

# **LA PROTEÍNA nsP1a/4 Y EL CICLO BIOLÓGICO DE ASTROVIRUS: APLICACIÓN EN EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR.**

Susana Guix Arnau

Tesis Doctoral



Departament de Microbiologia

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona





Albert Bosch i Navarro, Catedràtic de Microbiologia, i Rosa M<sup>a</sup> Pintó i Solé, Professora Titular de Microbiologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona,

#### CERTIFIQUEN

Que el treball d'investigació titulat "**La proteína nsP1a/4 y el ciclo biológico de astrovirus. Aplicación en epidemiología molecular**" i presentat com a tesi doctoral per **Susana Guix Arnau** s'ha realitzat sota la nostra direcció en el Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia, i que reuneix els requisits necessaris per a optar al Grau de Doctor en Biologia.

I per a que així consti, firmem la present certificació amb data 10 d'octubre de 2003.

Dr. Albert Bosch i Navarro

Dra. Rosa M<sup>a</sup> Pintó i Solé



*A tot aquell a qui  
li pugui interessar.*



# ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
Índice .....	i
Agradecimientos .....	vii
Prólogo .....	xi
Abreviaturas, anglicismos y unidades .....	xv

<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
-----------------------	----------

<b>1.1 Aspectos generales</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Gastroenteritis víricas	1
1.1.2 Perspectiva histórica	2
<b>1.2 Características biológicas de los astrovirus</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 Huéspedes naturales de astrovirus	5
1.2.2 Morfología y estructura	6
1.2.3 Taxonomía y clasificación de astrovirus	7
1.2.4 Serotipos de astrovirus	8
1.2.5 Propagación de astrovirus en líneas celulares	9
1.2.6 Astrovirus en las bases de datos	10
1.2.7 Biología molecular: organización genómica	11

1.2.8	Estrategias de transcripción y traducción	15
1.2.9	Procesamiento proteolítico de las poliproteínas sintetizadas	15
1.2.10	Estructura antigénica	18
1.2.11	Características bioquímicas y biofísicas de la partícula vírica	19
1.2.12	Estabilidad	20
<b>1.3</b>	<b>Detección y diagnóstico de astrovirus</b>	<b>21</b>
1.3.1	Microscopía electrónica (ME)	21
1.3.2	Inmuno-electromicroscopía (IEM)	21
1.3.3	Inmunoensayo (EIA)	22
1.3.4	Inmunofluorescencia (IF)	22
1.3.5	Ensayos moleculares	23
1.3.6	Serotipado y genotipado	26
<b>1.4</b>	<b>Aspectos clínicos de la infección por astrovirus</b>	<b>29</b>
1.4.1	Características clínicas de las infecciones en humanos	29
1.4.2	Epidemiología	30
1.4.3	Infecciones en inmunosuprimidos	32
1.4.4	Infecciones nosocomiales	32
1.4.5	Adquisición inmunidad y seroprevalencia	33
1.4.6	Transmisión fecal-oral: astrovirus en el medio ambiente y focos de infección	34
1.4.7	Tratamiento y prevención	34
1.4.8	Perspectivas de futuro para una vacuna	35
<b>1.5</b>	<b>Apoptosis</b>	<b>37</b>
1.5.1	Introducción general y definición	37
1.5.2	Apoptosis vs. Necrosis	38
1.5.3	Caspasas	38
1.5.4	Mecanismos de apoptosis	40
1.5.5	Apoptosis y virus	42

<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
--------------------	-----------

<b>3 ESTUDIO I: Caracterización de la proteína nsP1a/4 de astrovirus</b>	<b>51</b>
--	-----------

<b>3.1 Antecedentes</b> .....	<b>51</b>
<b>3.2 Material y Métodos</b> .....	<b>53</b>
3.2.1 Virus, líneas celulares	53
3.2.2 Anticuerpos	53
3.2.3 Inmunofluorescencia	53
3.2.4 Microscopía electrónica	53
3.2.5 Inmunoprecipitación	54
3.2.6 Análisis proteómicos computacionales	54
3.2.7 Colección de muestras fecales de astrovirus	54
3.2.8 Análisis variabilidad genética	55
3.2.9 Cuantificación de astrovirus en muestras fecales	55
3.2.10 Adaptación de astrovirus a la línea celular CaCo-2	55
3.2.11 Comparación de la producción de virus infecciosos	56
3.2.12 Análisis de la síntesis de ARN	56
<b>3.3 Resultados</b> .....	<b>56</b>
3.3.1 Caracterización biológica de la proteína nsP1a/4	56
3.3.2 Análisis proteómicos computacionales	56
3.3.3 Análisis de la variabilidad genética: asociación entre subgenotipo y carga vírica en muestras fecales	61
3.3.4 Comparación de la productividad vírica entre diferentes subgenotipos	62
<b>3.4 Discusión</b> .....	<b>65</b>

<b>4 ESTUDIO II: Diseño sistema de detección y tipado molecular</b>	<b>71</b>
---	-----------

<b>4.1 Antecedentes</b> .....	<b>71</b>
<b>4.2 Material y Métodos</b> .....	<b>73</b>
4.2.1 Colección de muestras de astrovirus	73
4.2.2 Amplificación y secuenciación de la región HVR	75
4.2.3 Serotipado de astrovirus	76
4.2.4 Secuencias de las bases de datos	76

4.2.5	Análisis de secuencias y parámetros genéticos	77
4.2.6	Tipado de astrovirus por RFLP	78
<b>4.3</b>	<b>Resultados</b>	<b>78</b>
4.3.1	Caracterización genética de la región HVR de nsP1a/4	78
4.3.2	Definición de subgenotipos y sistema de tipado por RFLP	82
4.3.3	Variabilidad genética de la región HVR y serotipo	87
<b>4.4</b>	<b>Discusión</b>	<b>89</b>

<b>5</b>	<b>ESTUDIO III: Epidemiología molecular de astrovirus en Barcelona</b>	<b>95</b>
----------	--	-----------

<b>5.1</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>95</b>
<b>5.2</b>	<b>Material y Métodos</b>	<b>96</b>
5.2.1	Muestras fecales	96
5.2.2	Detección de astrovirus	96
5.2.3	Serotipado de astrovirus	96
5.2.4	Análisis de secuencias	97
5.2.5	Análisis estadístico	97
<b>5.3</b>	<b>Resultados</b>	<b>97</b>
5.3.1	Epidemiología de las infecciones por astrovirus genogrupo A	97
5.3.2	Epidemiología de las infecciones por astrovirus genogrupo B	102
5.3.3	Tipado por RFLP	103
5.3.4	Variabilidad genética de la región de la cápside	104
<b>5.4</b>	<b>Discusión</b>	<b>110</b>

<b>6</b>	<b>ESTUDIO IV: Apoptosis en células CaCo-2 infectadas por astrovirus</b>	<b>117</b>
----------	--	------------

<b>6.1</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>117</b>
------------	---------------------	------------

<b>6.2 Material y Métodos</b> .....	<b>118</b>
6.2.1 Virus y líneas celulares	118
6.2.2 Agentes inductores de apoptosis	119
6.2.3 Observación de la morfología nuclear	119
6.2.4 Análisis del contenido de ADN celular	119
6.2.5 Ensayo de <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)</i>	119
6.2.6 Microscopía electrónica	120
6.2.7 Análisis de la activación de caspasa 8 por <i>western blotting</i>	120
6.2.8 Análisis de la localización subcelular del citocromo c	120
6.2.9 Inhibición de la apoptosis	120
6.2.10 Detección del ARN de astrovirus en células separadas por citometría de flujo	120
6.2.11 Estudios de doble marcaje: apoptosis y antígenos virales	121
6.2.12 Efectos de la inhibición de caspasas en la producción vírica	121
6.2.13 Análisis computacional de secuencias	122
6.2.14 Estudios de expresión transitoria de distintos ORFs de astrovirus	122

<b>6.3 Resultados</b> .....	<b>123</b>
6.3.1 La infección por astrovirus induce apoptosis en células CaCo-2	123
6.3.2 Implicación de la caspasa 8 en la apoptosis inducida por Astrovirus	127
6.3.3 La replicación vírica tiene lugar tanto en células apoptóticas como en células no apoptóticas. Sin embargo, una inhibición de la apoptosis reduce la progenie infecciosa	129
6.3.4 Inducción de apoptosis por expresión transitoria de productos génicos del ORF1a en células CaCo-2	132
<b>6.4 Discusión</b> .....	<b>134</b>

<b>7 CONCLUSIONES</b>	<b>141</b>
-----------------------	------------

<b>8 APÉNDICE: Material y Métodos</b>	<b>145</b>
---------------------------------------	------------

<b>8.1 Virus y líneas celulares</b> .....	<b>145</b>
<b>8.2 Infecciones víricas</b> .....	<b>146</b>
<b>8.3 Síntesis del péptido sintético</b> .....	<b>147</b>

8.4	Producción de anticuerpos contra el péptido sintético .....	147
8.5	Preparación de suspensiones fecales .....	147
8.6	Descontaminación de muestras fecales por tratamiento con cloroformo .....	148
8.7	Preparación de extractos celulares .....	148
8.8	Preparación de suspensiones de membranas celulares .....	149
8.9	Inmunoprecipitación .....	150
8.10	Fraccionamiento subcelular .....	151
8.11	Electroforesis SDS-PAGE y <i>Western blotting</i> .....	152
8.12	Inmunofluorescencia .....	154
8.13	Microscopía electrónica (ME) .....	156
8.14	Inmunolectromicroscopía (IEM) .....	157
8.15	Ensayo inmunoenzimático (EIA) .....	158
8.16	Tinción nuclear DAPI .....	159
8.17	Análisis del contenido de ADN celular .....	159
8.18	Ensayo de TUNEL .....	161
8.19	Análisis de doble marcaje por citometría de flujo .....	161
8.20	Obtención de plásmidos recombinantes .....	162
8.21	Purificación del ADN plasmídico a gran escala .....	163
8.22	Transfección por electroporación .....	166
8.23	Extracción ARN .....	167
8.24	RT-PCR .....	168
8.25	Oligonucleótidos .....	169
8.26	Electroforesis en gel de agarosa .....	170
8.27	<i>Southern blotting</i> e hibridación molecular .....	171
8.28	Análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) .....	173
8.29	Secuenciación .....	174
8.30	Números de acceso <i>Genbank</i> .....	175
8.31	Análisis computacionales .....	175
8.32	Análisis estadísticos .....	175
8.33	Anticuerpos .....	177

<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>181</b>
----------	---------------------	------------

<b>10</b>	<b>Índice temático</b>	<b>203</b>
-----------	------------------------	------------

## AGRADECIMIENTOS

*Les línies que segueixen a continuació simbolitzen el final d'un camí. Quan s'escriuen els agraïments d'una tesi, és que s'està a prop de la realització i culminació d'un projecte. És el moment de mirar enrera i fer balanç d'aquesta etapa de formació professional i personal.*

*Es diu de pressa, però han estat 6 anys, 6 anys que al recordar-los deixen una barreja de sentiments. Al repassar la feina, m'envaeix primer una lleugera sensació de desencís... Els resultats semblen pocs quan es pensa en 6 anys!*

*Afortunadament, la sensació de desencís és fugaç i tot seguit m'envaeix una gran satisfacció, tant personal com professional. Professional, perquè me n'adono de que jo, avui, necessitaria molt menys temps per dur a terme la mateixa feina. I això no és més que el reflexe de l'aprenentatge que perseguíem al començar. Això em fa adonar de que la formació ha donat el seu fruit. Però, i això per a mi és el més important, la satisfacció és també personal. Són tants els records de moments i experiències compartides amb persones excepcionals que he conegut al llarg d'aquest camí...*

*L'Albert i la Rosa van ser els qui, en un principi, no només em van donar l'opció de participar en un grup de recerca i de fer un doctorat, sinó que em van convidar a ser una de les primeres persones del grup en treballar a fons en astrovirus, un virus prou desconegut i atractiu i que, fins aleshores, no tenia la importància que té avui en dia en el grup de virus entèrics. Els hi vull agrair tot aquest temps, per haver-me fet sentir recolzada, haver-me ajudat, assessorat i per haver-me donat accés al món internacional de la ciència.*

*Pel que fa als companys del laboratori, no només els hi vull donar les gràcies, sinó que també els vull felicitar per ser persones d'aquelles que val la pena conèixer i que s'acaben convertint en exemples. Durant aquests anys, han estat el Xavi, el Santi, la Cris i la Glòria els qui s'han convertit en els meus amics dintre i fora del laboratori. Amb ells he compartit el dia a dia del lloc de treball, les alegries, els moments divertits i els més tristos, les frustracions, els projectes, etc. El Xavi sempre ha deixat de fer el que feia en aquell moment per donar-me un cop de mà amb qualsevol aparell, respondre qualsevol dubte, donar un savi consell, o unes paraules d'ànim. A més, crec que tots li hem d'agrair un munt de coses que ha fet per nosaltres i que, per la seva manera de ser, les ha fet sense que ningú se n'adoni. El Santi ha sigut un company fantàstic i amb el qual he treballat molt a prop (qui pot oblidar aquelles llarguíssimes extraccions d'RNA a la vitrina vertical... 2.347 gràcies per ajudar-me a processar totes aquelles mostres!). Però a més dels "astros", amb el Santi també hem compartit moltes estones divertides, converses i consells. I també li hem d'agrair la seva constància i paciència per perseguir-nos a l'hora de pagar i fer la travessa. No m'atreveixo a dir que haguem guanyat diners, però sí que tenim un munt de bons moments per a recordar! Arriba el torn de la Cris, la persona "entranyable" del grup a qui he d'agrair la seva incondicional alegria i sentit de l'humor, el seu optimisme, la seva força de voluntat i el seu esperit de lluita sempre amb un somriure als llavis. I és clar, també vull donar les gràcies a la Glòria, amb qui he compartit no només la bancada, el calaix del congelador i els bolis, sinó també molts moments d'aquells que no s'obliden. Els agraïments van per tantes converses, tanta comprensió, tant sentit comú, tants favors, tant sentit de l'humor, tanta humilitat, i tanta generositat. Gràcies a tots, de veritat. Al vostre costat, anar al laboratori cada dia ha sigut un plaer!*

*Sembla que a mida que escric, la llista de gent es va fent més i més llarga! No vull oblidar-me de donar les gràcies també per les primers lliçons del Joan Francesc i el Rodri, pel treball i la companyia de l'Àngels i la Patri, pels consells del José M<sup>a</sup> Díez quan ve a intentar-nos vendre algun reactiu, pel bon cor de la Xantal, per l'alegria dels nous estudiants que ara prendran amb empenta el nostre relleu, la Mari, el Lluís i l'Héctor, i, finalment per les experiències compartides amb la gent d'altres països que ha passat pel nostre laboratori i que ens ha ajudat a obrir els ulls a altres realitats, el Piotrek, la Dora, la Jackie, l'Alejandro, el Waled i la Islem.*

*Gràcies també a tots i cadascun de la resta de membres del departament de microbiologia, pel vostre companyerisme, per tots els consells i protocols, per tots els reactius que m'heu deixat, per tots els aparells que m'heu deixat utilitzar (l'electroporador, els aparells de PCR, les fonts d'electroforesi, els separadors dels gels,... ), i... és clar, gràcies també per les bones estones de sopars i partits de bàsquet!*

*Fa il.lusió aprofitar aquest espai per donar les gràcies també a tots els meus amics, per la vostra estimació, per estar sempre que us he necessitat, per la vostra confiança en mi i per tants moments fantàstics que hem viscut plegats. Per l'interès que heu demostrat en la meva tesi, i per les paraules d'ànims, tot i no entendre massa bé el món de la ciència. I també per les vostres visions crítiques que sovint m'han fet replantejar el perquè de fer un doctorat i que m'han esperonat a seguir endavant treballant pel que m'agrada.*

*I un cop més a la vida, gràcies als meus pares, a la meva germana i a la resta de la família (avis, tiets i cosins). Gràcies per tot, per l'exemple, pels valors transmesos i per fer-me sempre costat. I gràcies també a tu Josep, pel teu optimisme, per la motivació transmesa, per la teva clarividència, pel teu recolzament, per la teva mirada endavant i per ajudar-me a realitzar els meus projectes.*

*A tots vosaltres, gràcies per fer-me sentir afortunada.*



## PRÓLOGO

La gastroenteritis aguda es una de las enfermedades más comunes en humanos. Desde que fueron asociados con la enfermedad en 1940, cada vez son más los virus que provocan enfermedades gastrointestinales. Las infecciones víricas del aparato gastrointestinal provocan aproximadamente cada año 2 billones de casos de diarrea en niños de todo el mundo, resultando en aproximadamente 18 millones de casos de hospitalización. Después de las infecciones que afectan al aparato respiratorio inferior y la tuberculosis, la diarrea es la tercera causa de mortalidad en el mundo. Cada año mueren hasta 3 millones de niños por gastroenteritis víricas y deshidratación y se calcula que esta cifra representa el 25-30% de las muertes de niños menores de 5 años en todo el mundo. Los principales patógenos causantes de gastroenteritis virales son rotavirus, calicivirus, adenovirus entéricos y astrovirus.

Aunque los astrovirus fueron descubiertos tan sólo un año después que rotavirus, la caracterización de su epidemiología molecular ha evolucionado mucho más lentamente. Desde un principio se consideró que su incidencia era relativamente baja y que la sintomatología de la infección no era demasiado severa. No obstante, el diseño de nuevos y cada vez más sensibles sistemas de diagnóstico ha suscitado un cambio en esta concepción, y hoy en día los astrovirus se consideran la tercera causa de gastroenteritis no bacteriana en la población infantil, después de rotavirus y calicivirus. La incidencia de astrovirus oscila entre 2-10% en los países desarrollados y puede incrementarse hasta un 26% en países en vías de desarrollo. El impacto médico de estos virus también es relevante en casos de brotes de diarrea tanto en niños como en adultos. Así pues, desde su descubrimiento hace 28 años, fundamentalmente se ha profundizado en el conocimiento de su epidemiología y su importancia médica. No obstante, en nuestro país, todavía existen escasos datos epidemiológicos sobre este virus entérico.

Los astrovirus son unos virus icosaédricos de pequeño tamaño con un genoma ARN monocatenario de polaridad positiva y 3 pautas abiertas de lectura (ORF1a y ORF1b para las proteínas no estructurales, y ORF2 para las proteínas estructurales). La familia *Astroviridae* a la cual pertenecen agrupa tanto virus humanos como de distintos animales, incluyendo mamíferos y aves. Desde su descubrimiento en 1975, y gracias sobre todo a que es un virus capaz de replicar en cultivos celulares en presencia de tripsina, ha habido avances importantes en el conocimiento de su organización genómica. No obstante, se desconoce todavía el número total de proteínas codificadas por el virus, tanto estructurales como no estructurales, la función de cada una de ellas, los mecanismos exactos de transcripción y traducción, la ubicación de los principales epítomos, el significado de la existencia de una posible fase nuclear durante su ciclo replicativo, la naturaleza del receptor celular que utiliza para entrar en la célula, el papel que desempeña la tripsina en la infectividad del virus, los mecanismos de patogenicidad, etc.

En este contexto, esta tesis doctoral empezó con tres objetivos fundamentales.

En primer lugar, nos propusimos profundizar en el conocimiento de las posibles funciones biológicas de una de las proteínas no estructurales codificada por el ORF1a, denominada en este trabajo nsP1a/4 y la cual contiene una región hipervariable (Estudio I). Para estudiar la implicación de esta proteína en el ciclo biológico del virus, se diseñaron dos estrategias principales. Por un lado, con la ayuda de un anticuerpo producido en nuestro laboratorio contra la región más inmunogénica de dicha proteína, se estudió su localización subcelular, su patrón de expresión y su peso molecular aproximado. Por otro lado, se llevó a cabo un análisis computacional de dicha proteína en busca de homologías y de motivos conservados que pudieran indicar su posible función biológica. Los resultados de estos análisis apuntaron que la proteína nsP1a/4 podía jugar un papel importante en la replicación del ARN viral. Paralelamente, se observó que distintas cepas víricas, con secuencias en la región hipervariable muy distintas tanto en longitud como en composición de aminoácidos, mostraban diferencias en cuanto a la producción vírica y a la capacidad para replicar las distintas moléculas de ARN durante su ciclo biológico. Parecía existir una relación entre la proteína nsP1a/4 y la capacidad patogénica del virus.

En segundo lugar, la observación de estas diferencias en propiedades potencialmente virulentas nos motivó a investigar nuevos métodos de diagnóstico y tipado, que nos permitieran trazar estas diferentes características biológicas, las cuales pensamos que pueden tener una importancia médica considerable. De este modo, y basándonos en el elevado nivel de variabilidad genética, diseñamos un nuevo sistema de detección y tipado molecular para astrovirus (Estudio II) y aplicamos dicho método en la realización de un estudio epidemiológico a gran escala para conocer la incidencia de este virus entérico en la

población pediátrica de la región de Barcelona (Estudio III). Todos estos datos serían importantes para entender mejor el impacto de las infecciones por astrovirus y decidir si el desarrollo de una estrategia de prevención mediante una vacuna estaría o no justificada.

Finalmente, el escaso número de estudios existentes sobre los mecanismos de patogénesis de astrovirus en líneas celulares nos llevó a estudiar algunas de las relaciones entre el virus y la célula hospedadora durante la infección. Actualmente, cada vez son más los virus en los cuales se han identificado proteínas que interactúan con la célula modificando así a su favor algunas respuestas celulares frente a la infección. Uno de los principales procesos en los que se ha observado dicha interacción virus-célula es la apoptosis. En muchos casos la apoptosis, o muerte celular programada, es una respuesta de la célula para frenar la infección vírica e impedir la propagación del virus a células vecinas. No obstante, también se ha descrito que la apoptosis puede representar una ventaja para el virus si éste consigue adaptarse. Puesto que una vez finalizado el proceso de apoptosis los restos celulares son fagocitados por las células vecinas sin desencadenarse una respuesta inflamatoria local, determinados virus adoptan esta estrategia para infectar nuevas células y evadir la respuesta inmune del huésped. Son muchos los virus que codifican en su genoma proteínas que inhiben la apoptosis celular, como proteínas que la inducen. Concretamente nuestra atención se centró en la caracterización de la apoptosis inducida por astrovirus en la línea celular CaCo-2, en la identificación de potenciales proteínas codificadas por el virus responsables de dicha inducción y en entender el significado biológico de dicha estrecha interacción virus-célula (Estudio IV).

Tras una revisión bibliográfica sobre astrovirus como introducción, la tesis se estructura en 4 estudios y, finalmente, un apéndice con una ampliación de los materiales y métodos, muchos de los cuales son utilizados en varios estudios.



## ABREVIATURAS, ANGLICISMOS Y UNIDADES

A continuación se enumeran las abreviaturas y los anglicismos (*cursiva*) más frecuentes utilizados en esta tesis. En algunos casos, entre paréntesis se indica la traducción inglesa, de la cual derivan las iniciales. Finalmente, se incluye un listado con las unidades y los prefijos de unidad utilizados.

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
ANOVA	Análisis de la varianza
ANV	Virus de la nefritis aviar ( <i>Avian nephritis virus</i> )
AP	Fosfatasa alcalina ( <i>Alkaline phosphatase</i> )
ARN	Ácido ribonucleico
ASA	Ácido acetil salicílico
AstV	Astrovirus
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<i>Bootstrap</i>	Parámetro filogenético para medir el grado de significación estadística de una determinada topología
BSA	Albúmina bovina sérica ( <i>Bovine seric albumine</i> )
BVDV	Virus de la diarrea bovina vírica ( <i>Bovine viral diarrhea virus</i> )
CaCo-2	Carcinoma de Colon 2
CARD	Dominios reclutadores de caspasas ( <i>Caspase recruitment domains</i> )
CC	Estructura proteica de dos hélices alfa que, para estabilizarse, dimeriza enrollándose a otra estructura similar y formando una “superhélice” ( <i>Coiled Coil</i> )
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
<i>Cluster</i>	Grupo filogenético o grupo de aminoácidos de la misma naturaleza

Col.	Colaboradores
CSPD	<i>Disodium 3-(4-methoxy Spiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan]-4-yl) phenyl phosphate</i>
Cy <sup>TM</sup>	Cianina
DAPI	4',6-diamidina-2'-fenilindol clorodihidrato
DD	Dominios de muerte ( <i>Death domains</i> )
DED	Dominios efectores de muerte ( <i>Death effector domains</i> )
DISC	Complejo de señalización de muerte inducida ( <i>Death inducing signaling complex</i> )
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
<i>Dot blot</i>	Transferencia de ácidos nucleicos a una membrana en forma de gota
<i>Downstream</i>	Situado más al extremo 3'
EDTA	Ácido etileno-diamina-tetraacético
EIA	Análisis inmunoenzimático ( <i>Enzyme immunoassay</i> )
FAstV	Astrovirus felino ( <i>Feline astrovirus</i> )
FCA	Adyuvante completo de Freund
FCS	Suero fetal bovino ( <i>Fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoresceína
<i>Gap</i>	Posiciones de un alineamiento que carecen de nucleótidos o aminoácidos
GFP	Proteína fluorescente verde ( <i>Green fluorescent protein</i> )
HAstV	Astrovirus humano ( <i>Human astrovirus</i> )
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinetanosulfónico
HVR	Región hipervariable ( <i>Hypervariable Region</i> )
IBDV	Virus de la enfermedad bursal infecciosa ( <i>Infectious Bursal Disease Virus</i> )
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus ( <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> )
IEM	Inmunoelectromicroscopía
IF	Inmunofluorescencia
IRE	Epítipo inmunoreactivo ( <i>Immunoreactive epitope</i> )
Ka	Frecuencia de sustituciones no sinónimas por posición no sinónima
Ks	Frecuencia de sustituciones sinónimas por posición sinónima
LLCMK2	Células epiteliales de riñón de mono <i>Rhesus</i> ( <i>Rhesus monkey kidney epithelial cells</i> )
MAb	Anticuerpo monoclonal ( <i>Monoclonal antibody</i> )
MAstV	Astrovirus de visón ( <i>Mink astrovirus</i> )
ME	Microscopía Electrónica
MEM	Medio mínimo esencial ( <i>Minimal essential medium</i> )
MOI	Multiplicidad de infección ( <i>Multiplicity of infection</i> )
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium chloride</i>

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEAA	Aminoácidos no esenciales ( <i>Non-essential amino acids</i> )
NLS	Señal de localización nuclear ( <i>Nuclear localization signal</i> )
NP-40	Nonidet P-40 (etilfenil polietilen glicol)
nsP	Proteína no estructural ( <i>Non structural protein</i> )
nt	Nucleótido
ORF	Pauta abierta de lectura ( <i>Open reading frame</i> )
OMS	Organización Mundial de la Salud
p	Nivel de significación
p.i.	Post-infección
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida ( <i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<i>pairwise deletion</i>	Eliminación de las posiciones de nt o aa de un alineamiento únicamente para aquellos pares de secuencias en los que existe un <i>gap</i> .
PAstV	Astrovirus porcino ( <i>Porcine astrovirus</i> )
PBS	Tampón fosfato salino
PCD	Muerte celular programada ( <i>Programmed cell death</i> )
<i>Pellet</i>	Sedimento que resulta de una centrifugación
PEMS	<i>Poult enteritis and mortality syndrome</i>
PI	Yoduro de propidio ( <i>Propidium iodide</i> )
POL	Polimerasa
PRO	Proteasa
PRRSV	Virus porcino del síndrome reproductivo y respiratorio ( <i>Porcine reproductive and respiratory syndrome virus</i> )
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción ( <i>Restriction fragment length polymorphism</i> )
RFS	Mecanismo por el cual el ribosoma se desplaza 1 posición y modifica la pauta de lectura ( <i>Ribosomal frameshifting</i> )
RHDV	Virus de la enfermedad hemorrágica de conejos ( <i>Rabbit hemorrhagic disease virus</i> )
RT	Temperatura ambiente ( <i>Room Temperature</i> )
RT-PCR	Retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Reverse-transcription polymerase chain reaction</i> )
SDS	Sodio dodecil sulfato
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida
ShAstV	Astrovirus de oveja ( <i>Sheep astrovirus</i> )
SPIEM	Inmuno-electromicroscopía en fase sólida ( <i>Solid phase immunoelectronmicroscopy</i> )
SRSV	Virus pequeños, redondos y estructurados ( <i>Small round structured viruses</i> )
SRV	Virus pequeños y redondos ( <i>Small round viruses</i> )
s2m	Estructura secundaria del ARN sobreenrollada ( <i>stem-loop II-like motif</i> )

TAstV	Astrovirus de pavo ( <i>Turkey astrovirus</i> )
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metilen ediamina
TGEV	Virus de la gastroenteritis transmisible ( <i>Transmissible gastroenteritis virus</i> )
TM	Dominios transmembrana ( <i>Transmembrane helices</i> )
TNF	Factor de necrosis tumoral ( <i>Tumor necrosis factor</i> )
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral ( <i>Tumor necrosis factor receptor</i> )
TUNEL	Marcaje de extremos 3'OH del ADN ( <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling</i> )
Tween-20	Sorbitan monolaurato polioxietileno
UK	Reino Unido ( <i>United Kingdom</i> )
<i>Upstream</i>	Situado más al extremo 5'
USA	Estados Unidos de América ( <i>United States of America</i> )
UTR	Región no traducida ( <i>Untranslated region</i> )
VLPs	Partículas pseudovíricas ( <i>Virus-like particles</i> )
VP	Proteína vírica ( <i>Viral protein</i> )
VPg	Proteína vírica unida al genoma ( <i>Genome-linked viral protein</i> )
WB	<i>Western blotting</i>

#### Unidades y prefijos de unidad

Å	Angstrom
°C	grados Celsius
F	faradios
g	gramos
h	horas
l	litro
M	molar
min	minutos
N	normal
nm	nanómetros
p/v	peso/volumen
v/v	volumen/volumen
pb	pares de bases
V	voltios
m	mili ( $10^{-3}$ )
μ	micro ( $10^{-6}$ )
n	nano ( $10^{-9}$ )
p	pico ( $10^{-12}$ )

## **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1 ASPECTOS GENERALES

### 1.1.1 Gastroenteritis víricas

Los principales agentes clásicamente implicados en gastroenteritis víricas son rotavirus (RV), calicivirus (CV), adenovirus entéricos (EAdV) y astrovirus (AstV) (Wilhelmi *et al.*, 2003).

Actualmente, la importancia médica de rotavirus está muy bien consolidada debido a su elevada prevalencia y al enorme impacto económico que produce la enfermedad tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados. Todo esto justificó hace ya unos años la investigación para el desarrollo de una vacuna contra RV. La primera vacuna oral contra rotavirus (RotaShield, Wyeth-Lederle, USA) fue autorizada en Estados Unidos en el año 1998, pero tuvo que ser retirada 9 meses después debido a una posible asociación con un incremento en la incidencia de problemas de intususcepción. Hoy en día existen diferentes vacunas que están en fase de ensayos clínicos. Los rotavirus son miembros de la familia *Reoviridae*, virus icosaédricos de 70 nm de diámetro y sin envuelta. La cápside está compuesta por una doble capa proteica y su genoma consiste en 11 segmentos de ARN de doble cadena.

Los adenovirus humanos pertenecen a la familia *Adenoviridae* y son virus ADN de simetría icosaédrica, sin envuelta lipídica y de 70 nm de diámetro. Dentro del género adenovirus, la mayoría de adenovirus entéricos (EAdV) encontrados hasta ahora pertenecen al subgénero F. Especialmente, los adenovirus tipo 40 y 41 son una causa importante de diarrea en la población infantil y no se dispone de ninguna vacuna.

Los calicivirus humanos son miembros de la familia *Caliciviridae*, familia en la cual

se describen dos géneros, Norovirus y Sapovirus. Los viriones están constituidos por una cápside proteica de simetría icosaédrica y una molécula de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva. Fueron los primeros agentes víricos asociados a gastroenteritis en 1972 y desde entonces han provocado numerosos brotes epidémicos y hoy en día se consideran como la primera causa de brotes de gastroenteritis víricas en adultos.

Además de todos ellos, existen también otros virus que provocan gastroenteritis como por ejemplo los torovirus, los coronavirus o los picobirnavirus.

La investigación sobre astrovirus humanos (HAstV) se centra hoy en día en el desarrollo de métodos de detección tanto genéticos como antigénicos, y la valoración de su prevalencia en la población infantil y adulta, así como también en entender el grado de protección que genera la inmunidad contra estos agentes infecciosos. Toda esta información proporcionará datos para evaluar el impacto médico y económico de estas infecciones y justificar el desarrollo de estrategias de prevención como la vacunación.

### **1.1.2 Perspectiva histórica**

Los astrovirus fueron identificados por primera vez como agentes causantes de diarreas infantiles en el año 1975 durante la investigación de un brote de diarrea y vómitos entre los niños de una sala de maternidad (Appleton & Higgins, 1975). El análisis de las heces de unos cuantos niños por microscopía electrónica puso de manifiesto la presencia de unas partículas víricas de morfología distinta a otros virus asociados a gastroenteritis como rotavirus o calicivirus.

El término astrovirus fue propuesto por primera vez meses más tarde por Madeley y Cosgrove en Glasgow, al identificar unos virus icosaédricos de pequeño tamaño y con apariencia de estrella (del griego “astron”) en las heces de niños hospitalizados con diarrea y en brotes de gastroenteritis en guarderías para recién nacidos (Madeley & Cosgrove, 1975). Durante los años siguientes, partículas víricas similares de pequeño tamaño y con estructura estrellada fueron identificadas en diferentes mamíferos y aves.

Un paso importante lo dieron Lee y Kurtz en 1981, cuando consiguieron aislar por primera vez en cultivo celular una cepa de astrovirus humano y la propagaron con éxito en células HEK. Ello facilitó la identificación de 5 serotipos diferentes de astrovirus humanos en 1984 (Kurtz & Lee, 1984) y poco tiempo más tarde se consiguió desarrollar anticuerpos monoclonales que permitirían poner a punto un sistema de diagnóstico por inmunoensayo (EIA) (Herrman *et al.*, 1988; Herrmann *et al.*, 1990) y se identificaron 2 nuevos serotipos más en el Reino Unido (Lee & Kurtz, 1994). Durante la década de los 90, se confirmó su importancia clínica como agentes causantes de gastroenteritis en niños como también en brotes en adultos (Belliot *et al.*, 1997; Herrmann *et al.*, 1991; Oishi *et al.*, 1994). El clonaje

y la secuenciación del genoma completo del primer astrovirus humano se consiguió en 1993 (Jiang *et al.*, 1993). El avance en técnicas de biología molecular permitió por un lado la construcción del primer clon de ADNc del genoma completo de astrovirus en 1997 (Geigenmüller *et al.*, 1997) y, por otro lado, el desarrollo de múltiples técnicas de detección del virus por RT-PCR (Jonassen *et al.*, 1993; Matsui *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 1995 Noel *et al.*, 1995). Recientemente, se han obtenido *virus-like particles* (VLPs) de astrovirus en sistemas de expresión recombinante utilizando el virus vaccinia (Dalton *et al.*, 2003) y baculovirus (Caballero *et al.*, manuscrito en preparación).



## 1.2 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LOS ASTROVIRUS

### 1.2.1 Hospedadores naturales de astrovirus

Los astrovirus se han asociado etiológicamente con enfermedades en diversas especies animales que incluyen tanto mamíferos como aves. Se les ha asociado con diarreas leves en terneros (Woode & Bridger, 1978), corderos (Snodgrass *et al.*, 1979), cerdos (Shimizu *et al.*, 1990), gatos (Hoshino *et al.*, 1981), perros (Williams, 1980), y visones (Englund *et al.*, 2002). En la mayoría de estos casos, los astrovirus han sido aislados junto con otros virus también presentes en las heces de animales enfermos y se ha demostrado que eran ellos los causantes de la enfermedad.

En la mayoría de especies animales, las infecciones por astrovirus afectan al aparato gastrointestinal, aunque en aves también se han descrito manifestaciones de la infección en otros tejidos y órganos. Este es el caso del desarrollo de una hepatitis fatal en patos infectados con virus similares a astrovirus, los cuales fueron encontrados en hígado y heces.

Infecciones por astrovirus en aves pueden provocar enfermedades fatales, como por ejemplo, la nefritis intersticial aguda y el retraso del crecimiento en pollos (virus de la nefritis aviar: ANV) (Imada *et al.*, 1979), hepatitis en patos (Gough *et al.*, 1984) y una enfermedad multisistémica llamada *poult enteritis and mortality syndrome* (PEMS) en pavos, cuyos síntomas incluyen diarrea, enanismo, inmunosupresión y tasas elevadas de mortalidad de hasta 25-96% (Koci *et al.*, 2000; Qureshi *et al.*, 2001; Schultz-Cherry *et al.*, 2000). Esta última enfermedad causó la pérdida de millones de dólares en la industria de aves de corral durante la década de los 90 en Texas y Virginia, USA.

Las infecciones por astrovirus parecen poseer una elevada especificidad por la especie animal y nunca se han observado casos de transmisión interespecífica ni de reactividad cruzada entre los anticuerpos contra astrovirus de diferentes especies animales. Del mismo modo, en general esta barrera específica se conserva también a nivel de cultivos celulares.

Estudios filogenéticos recientes basados en el grado de similitud que se observa en las secuencias proteicas de la cápside de astrovirus humanos y animales sugiere la posibilidad de que algún día existieran casos de zoonosis que involucraron a cerdos, gatos y humanos (Jonassen *et al.*, 2001). Sin embargo, estos resultados han sido puestos en duda por Lukashov y Goudsmit (2002), quienes postulan la introducción de los astrovirus en la población humana debido tan sólo a una transmisión proveniente de otra única especie animal.

### 1.2.2 Morfología y estructura

Los astrovirus forman un grupo de virus pequeños, no envueltos, de simetría icosaédrica y con un genoma compuesto por una cadena de ARN de polaridad positiva. Su morfología observada por microscopía electrónica permite distinguir un relieve en forma de estrella con 5 ó 6 puntas.

Dentro del grupo de los virus pequeños y redondos (*small round viruses: SRV*), Caul y Appleton propusieron en 1982 una clasificación basada en su aspecto físico bajo un microscopio electrónico (Caul & Appleton, 1982). Se formaron dos grupos según las partículas víricas tuvieran un aspecto más o menos rugoso y estructurado. Así, dentro del grupo de los virus no-estructurados se incluyeron los enterovirus, parvovirus y parvovirus-like, mientras que en el grupo de los virus con estructura (*small round-structured viruses: SRSVs*) se incluyeron los calicivirus y astrovirus.

Por lo general, se considera que los astrovirus tienen un diámetro de 28 nm, aunque el tamaño de las partículas puede sufrir variaciones según el origen del virus y el método de preparación de la muestra. Además, la apariencia típica con forma de estrella tampoco se observa en todas las partículas víricas de una preparación, sino que está presente tan sólo en un 10% de los viriones. El análisis detallado de la ultraestructura de los astrovirus por Risco *et al.*, en 1995, definió para estos virus un diámetro de 41 nm y la presencia de una capa de espículas bien definidas en su superficie. Tan sólo después de un tratamiento a pH 10 se induciría la aparición de la típica morfología estrellada con agujeros triangulares en la superficie de la partícula.

La utilización de la crioelectromicroscopía ha permitido recientemente analizar también la ultraestructura de astrovirus humanos obtenidos en cultivo celular. La

reconstrucción tridimensional de las imágenes muestra unas partículas con una superficie de la cápside ligeramente estructurada y un diámetro de 330 Å. De la superficie se extienden treinta espículas diméricas que sobresalen unos 50 Å, centradas sobre el eje de simetría (Matsui *et al.*, 2001).

### 1.2.3 Taxonomía y clasificación de astrovirus

La familia *Astroviridae* fue establecida definitivamente dentro del *subphylum* de virus ARN de cadena positiva en 1995, tras la confirmación de una serie de características de su biología molecular.

En 1991, el análisis de las proteínas y los ARNs sintetizados durante la infección de astrovirus en cultivo celular disuadió de clasificar a los astrovirus como miembros de ninguna de las dos familias hasta entonces bien establecidas de virus desnudos de ARN de cadena positiva, es decir *Picornaviridae* y *Caliciviridae* (Monroe *et al.*, 1991). Más tarde, en 1993, se determinó la secuencia de su ARN subgenómico, lo cual respaldó el establecimiento de la familia *Astroviridae* como una nueva familia de virus ARN (Monroe *et al.*, 1993).

Durante ese mismo año, se obtuvo la secuencia del genoma completo de astrovirus y se corroboró su organización genómica característica, así como la presencia de una señal de *ribosomal frameshifting* (RFS) y la falta de un dominio helicasa (Jiang *et al.*, 1993). En 1994 se identificó el motivo de su ARN polimerasa ARN dependiente (Lewis *et al.*, 1994) y ya en 1995, basándose en todas estas observaciones, la ICTV clasificó a los astrovirus como una nueva familia llamada *Astroviridae*.

En resumen, las características generales de astrovirus se detallan en la Tabla 1.1. Y en especial, las características que, en conjunto, distinguen a los astrovirus de otros virus de ARN de cadena positiva son:

- su organización genómica con las proteínas no estructurales en el extremo 5', codificadas en dos pautas de lectura diferentes pero traducidas como una poliproteína gracias a una señal RFS, y con las proteínas estructurales en el extremo 3',
- la utilización de un ARN subgenómico para la síntesis de grandes cantidades de proteínas estructurales del virión,
- y la falta de un dominio helicasa típico de virus ARN de cadena positiva con genomas superiores a las 6 kb.

**Tabla 1.1** Características generales de la familia *Astroviridae*.

---

**Estructura**

- Partículas icosaédricas de 28-41 nm
- Sin envuelta lipídica
- Apariencia de estrella al microscopio electrónico

**Genoma**

- ARN monocatenario de aproximadamente 7 kb, de polaridad positiva y poliadenilado
- Tres ORFs: ORF1a y ORF1b (proteínas no estructurales) y ORF2 (proteínas estructurales)
- Presencia de una señal de *ribosomal frameshifting* entre ORF1a y ORF1b
- Falta de dominio helicasa
- Utilización de un ARN subgenómico de aproximadamente 2.8 kb para la síntesis de las proteínas estructurales
- El ARN puede producir partículas infecciosas al ser transfectado en células CaCo-2 y BHK-21

**Replicación**

- Replicación citoplasmática
  - Fase nuclear cuyo significado biológico se desconoce
  - Propagación en líneas celulares con ayuda de tripsina
- 

El Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV) propone actualmente la clasificación de la familia *Astroviridae* en dos géneros. El género *Mamastrovirus* incluiría los astrovirus de mamíferos y el género *Avastrovirus* los de aves.

## 1.2.4 Serotipos de astrovirus

### 1.2.4.1 Astrovirus humanos

Hasta la fecha, se han descrito 8 serotipos de astrovirus humanos. Los anticuerpos policlonales de referencia específicos para cada serotipo presentan una elevada especificidad en técnicas de inmunofluorescencia (IF) e inmunoelectromicroscopía (IEM), así como también en ensayos de neutralización (Lee & Kurtz, 1994).

No obstante, también se dispone de un anticuerpo monoclonal, denominado MAb 8E7, que reconoce a todos los serotipos humanos (Herrmann *et al.*, 1988). Aunque el epítipo de este anticuerpo no está mapado con exactitud, se cree que está localizado en la región N-terminal de la cápside, altamente conservada entre serotipos y se ha visto que no es capaz de neutralizar la infectividad del virus.

### 1.2.4.2 Astrovirus animales

La variabilidad serotípica en astrovirus animales no ha sido estudiada con tanta profundidad. Actualmente, tan sólo se han identificado varios serotipos en los astrovirus

bovinos (Woode *et al.*, 1984) y en los astrovirus de pavo (Imada *et al.*, 2000; Koci *et al.*, 2000). Para todas las demás especies, solamente se ha descrito un único serotipo. En ningún caso se ha detectado reactividad cruzada entre anticuerpos provenientes de especies distintas.

### 1.2.5 Propagación de astrovirus en líneas celulares

Seis años después del descubrimiento de los astrovirus, se consiguió propagar el virus durante múltiples pases en células primarias humanas embrionarias de riñón (HEK), gracias a la incorporación de tripsina en el medio de cultivo (Lee & Kurtz, 1981). Después de 6 pases ciegos en células primarias HEK, los 5 serotipos descritos hasta entonces pudieron replicar en líneas celulares continuas como la línea de riñón de mono LLCMK2 (Kurtz & Lee, 1984). En 1990, se consiguió cultivar los virus directamente a partir de muestras de heces en la línea celular intestinal humana CaCo-2, siempre en presencia de tripsina (Willcocks *et al.*, 1990).

Hoy en día, las dos líneas celulares más comúnmente utilizadas para el aislamiento de astrovirus a partir de muestras naturales son principalmente las líneas humanas CaCo-2 y PLC/PRF/5. Mientras que algunos estudios muestran una mayor eficiencia para las células de adenocarcinoma CaCo-2 (Brinker *et al.*, 2000), otros trabajos aportan datos que justifican la utilización de las células de hepatoma PLC/PRF/5 (Taylor *et al.*, 1997a).

Debido a su alta especificidad a nivel de especie, solamente se ha conseguido infectar células de especies distintas a la del virus salvaje, una vez éstos han sido adaptados a cultivo celular en líneas celulares pertenecientes a su misma especie (Brinker *et al.*, 2000). Así, una vez adaptadas a cultivo celular, las cepas de astrovirus de referencia de distintos serotipos replican eficientemente en líneas intestinales humanas (CaCo-2, T84 y HT-29), así como también en líneas de primates como MA104. Tan sólo el serotipo 2 es capaz de replicar en células de hámster BHK-21.

El proceso de adaptación a líneas celulares primarias HEK se ha asociado a una delección de 15 aminoácidos cerca del extremo C-terminal del ORF1a. Se ha visto que esta delección no está presente en los virus salvajes así como tampoco en los virus directamente adaptados a replicar en la línea CaCo-2 (Willcocks *et al.*, 1994a). No obstante, el significado funcional de esta delección no ha sido estudiado con profundidad. En otros trabajos también se han descrito diferencias en la composición proteica de la cápside entre cepas de referencia adaptadas a cultivo celular y cepas salvajes del mismo serotipo (Belliot *et al.*, 1997a).

En cuanto a los astrovirus animales, se han conseguido adaptar a cultivo celular los astrovirus bovinos (Aroonprasert *et al.*, 1989), porcinos (Shimizu *et al.*, 1990), felinos

(Harbour *et al.*, 1987) y también el virus de la nefritis aviar (ANV) (Imada *et al.*, 2000). Este último virus es el único miembro de la familia *Astroviridae* capaz de replicar sin necesidad de tripsina tanto en células primarias de pollo CK como en células de hámster BHK-21.

### 1.2.6 Astrovirus en las bases de datos

A fecha de hoy, el total de secuencias de nucleótidos disponibles en las bases de datos asciende únicamente a 292 entradas, de las cuales aproximadamente un 85% corresponde a secuencias de la región codificante para las proteínas de la cápside y tan sólo un 15% corresponde a secuencias de regiones de las proteínas no estructurales del virus.

Únicamente se ha secuenciado el genoma completo de 5 cepas de astrovirus humanos:

- la cepa de referencia Oxford serotipo 1, HAstV-1, propagada en células LLCMK2 (Lewis *et al.*, 1994; núm. de acceso L23513)
- la cepa de referencia Oxford serotipo 2, HAstV-2, propagada en células LLCMK2 (Jiang *et al.*, 1993; núm. de acceso L13745)
- la cepa Newcastle serotipo 1 A2/88, Newcastle-1, aislada y propagada en células CaCo-2 (Willcocks & Carter, 1992; Willcocks *et al.*, 1992; Willcocks *et al.*, 1994b; núm. de acceso Z25771)
- una cepa serotipo 3, Rostock, aislada en Alemania y secuenciada en su totalidad a partir de la muestra de heces (Oh & Schreier, 2001; núm. de acceso AF141381)
- una cepa serotipo 8, Yuc-8, aislada en México y propagada en células CaCo-2 (Mendez-Toss *et al.*, 2000; núm. de acceso AF260508)

También se dispone de las secuencias genómicas completas de varios astrovirus animales. Este es el caso de astrovirus ovinos ShAstV (Jonassen *et al.*, 2003; núm. de acceso Y15937), de astrovirus porcinos PAsV (núm. de acceso Y15938), de astrovirus de aves como el virus de la nefritis aviar ANV (Imada *et al.*, 2000; núm. de acceso AB033998), de los astrovirus de pavo TAsV-1 (Jonassen *et al.*, 2003; núm. de acceso Y15936) y TAsV-2 (Koci *et al.*, 2000; núm. de acceso AF206663) o del recientemente secuenciado astrovirus de visión MAsV (Englund *et al.*, 2002; núm. de acceso AY179509).

### 1.2.7 Biología molecular: organización genómica

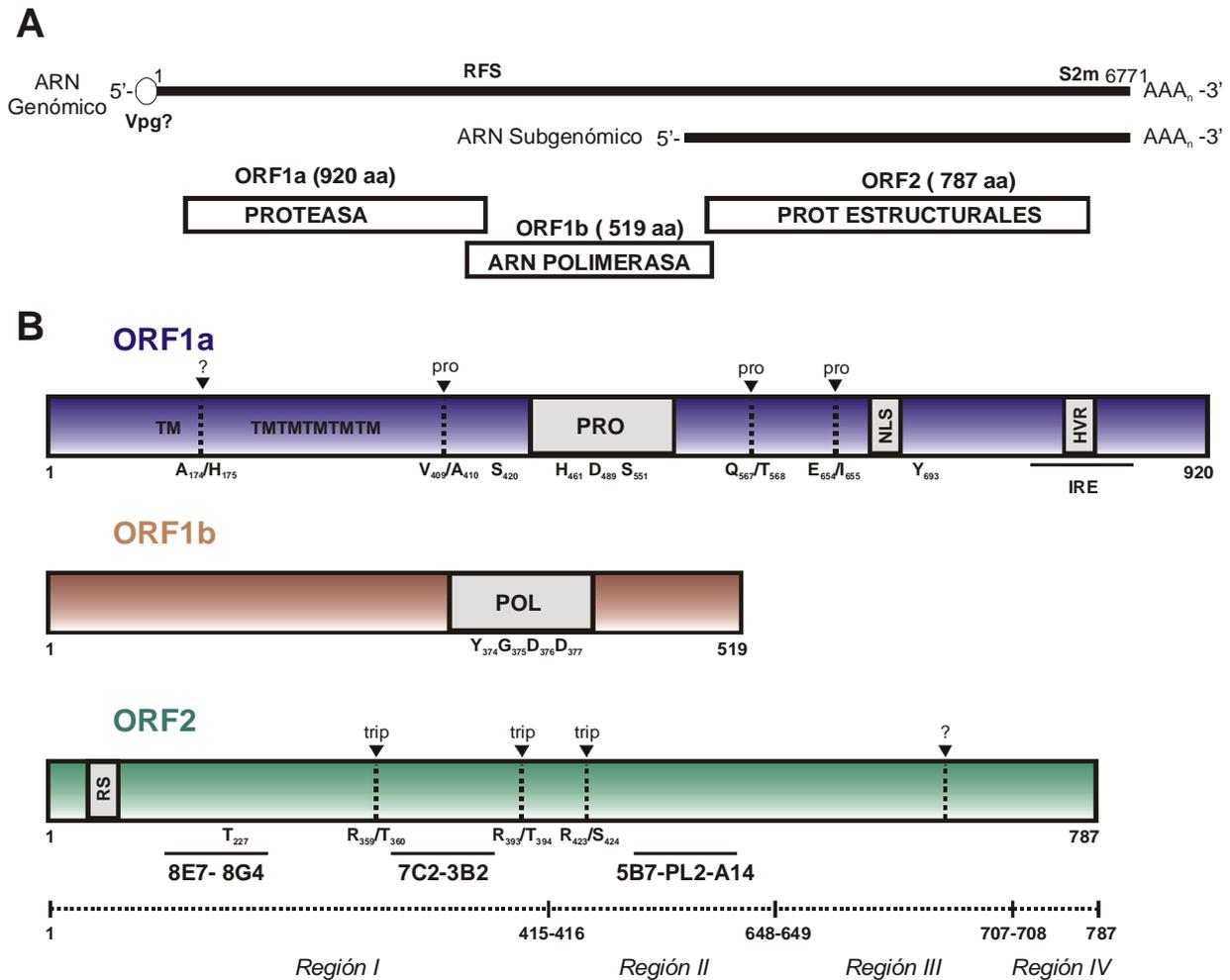
El genoma de astrovirus está compuesto por una molécula de ARN monocatenario de polaridad positiva, de aproximadamente 7 kb de longitud y poliadenilado en el extremo 3' (Matsui & Greenberg, 2001). La molécula de ARN es infecciosa tanto tras ser extraída de cápsides víricas, como si se obtiene por transcripción *in vitro*. Al mismo tiempo, el ARN de astrovirus es capaz de producir partículas víricas infecciosas al ser transfectado en líneas celulares no susceptibles a la infección por astrovirus, como son las células BHK-21 (Geigenmüller *et al.*, 1997).

Además de las moléculas de ARN de genoma completo, durante el ciclo replicativo del virus también se producen moléculas de ARN subgenómico de unas 2.8 kb de longitud, que corresponde al extremo 3' del ARN genómico y que codifica para las proteínas estructurales del virus (Monroe *et al.*, 1991).

El genoma de astrovirus se organiza en 3 pautas de lectura (ORFs), dos de las cuales codifican para las proteínas no estructurales y otra que codifica para las proteínas de la cápside y se encuentra en el extremo 3'. Según el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV), estos 3 ORFs se denominan ORF1a, ORF1b y ORF2, respectivamente (Monroe *et al.*, 1995).

En el ORF1a destaca un motivo *serin protease*, mientras que en el ORF1b destaca un motivo ARN polimerasa. El ORF1a está precedido por una secuencia 5'-no traducida (5'-UTR) de una longitud que varía entre 80 y 85 nucleótidos según los diferentes serotipos. Entre el ORF1a y ORF1b existe un solapamiento de entre 61 y 73 nt, mientras que el solapamiento entre el codón de *stop* de ORF1b y el codón de inicio de ORF2 es de 8 nt para todos los serotipos secuenciados hasta el momento. En el extremo 3' también existe una secuencia no traducida (3'-UTR) de una longitud entre 80 y 85 nt, así como una cola de aproximadamente 31 adeninas.

En la Figura 1.1 se muestra una representación esquemática de la organización genómica de estos virus (las posiciones de nucleótidos y aminoácidos que se mencionen con posterioridad harán referencia a la cepa de referencia HAsV-1, núm. de acceso en *Genbank* L23513).



**Fig. 1.1** (A) Organización genómica de HAsTV. (B) Representación esquemática de los 3 ORFs, destacando los principales motivos de cada uno de ellos y los residuos aminoacídicos más relevantes. Los triángulos pequeños invertidos marcan posibles lugares de procesamiento proteolítico, ya sean a cargo de la proteasa vírica (pro), de la tripsina (trip) o de alguna proteasa celular (?). RFS indica el dominio *ribosomal frameshifting*; s2m indica el dominio *stem II-like motif*; TM indica dominios transmembrana; PRO indica el motivo proteasa; NLS indica la señal de localización nuclear; HVR indica la región hipervariable; POL indica el motivo ARN polimerasa ARN dependiente; RS indica una región rica en residuos básicos. Los subrayados indican la posible localización de determinados epítomos víricos, IRE indica epítomo inmunoreactivo. El ORF2 se divide en cuatro regiones según su nivel de variabilidad proteica.

### 1.2.7.1 Proteínas no estructurales: ORF1a

El polipéptido codificado por ORF1a (nsP1a) consta de 920-935 aminoácidos y da lugar a diferentes proteínas (Fig. 1.1). El motivo proteasa de astrovirus pertenece al grupo de *3C-like serine proteases* y posee un elevado grado de homología con las proteasas de dos miembros de la familia *Caliciviridae*: el virus de la enfermedad hemorrágica de conejos (RHDV) y calicivirus felino (Jiang *et al.*, 1993). La tríada catalítica está formada por los aminoácidos His<sub>461</sub>, Asp<sub>489</sub> y Ser<sub>551</sub> y, entre otros, los residuos supuestamente implicados en

la unión al sustrato incluyen la Thr<sub>546</sub> y la His<sub>566</sub> (Jiang *et al.*, 1993; Kiang & Matsui, 2002).

En el extremo N-terminal de la poliproteína, se han identificado varios dominios transmembrana. Aunque el número de hélices transmembrana varía según los diferentes autores (Jiang *et al.*, 1993; Jonassen *et al.*, 2003), se cree que podrían estar implicados en el anclaje del complejo de replicación del ARN vírico a la membrana.

En el ORF1a también se ha identificado la presencia de una señal de localización nuclear (NLS) (Jiang *et al.*, 1993). Además, tanto en astrovirus bovinos como en astrovirus humanos se han localizado por inmunofluorescencia proteínas víricas tanto estructurales como no estructurales en el núcleo de células infectadas (Aroonprasert *et al.*, 1989; Willcocks *et al.*, 1999). No obstante, el significado biológico de dicha señal en el ciclo replicativo del virus no ha sido todavía analizado con detalle.

Hasta el momento, en ninguno de los astrovirus secuenciados se ha identificado un dominio metiltransferasa, lo cual sugiere que probablemente el genoma del virus debe estar unido covalentemente a una proteína VPg en su extremo 5' (Jiang *et al.*, 1993). Esta hipótesis estaría de acuerdo con el hecho de que la ARN polimerasa del virus pertenece al supergrupo I, un grupo en el que la mayoría de virus contienen proteínas VPg. A pesar de no haberse identificado claramente su dominio, algunos autores postulan que la Ser<sub>420</sub> podría ser la responsable de la unión entre la VPg y el ARN genómico (Jiang *et al.*, 1993). Por el contrario, también basándose en análisis computacionales de secuencias de astrovirus humanos y animales, otro trabajo reciente sugiere la implicación de la Tyr<sub>693</sub>, tal y como se ha observado en miembros de la familia *Caliciviridae* (Jonassen *et al.*, 2003).

Finalmente, los dos últimos aspectos a destacar en la secuencia del ORF1a se encuentran cerca del extremo C-terminal. En primer lugar, la presencia de un epítipo inmunoreactivo que fue identificado con anticuerpos producidos frente a partículas víricas purificadas (Matsui *et al.*, 1993). Y en segundo lugar, la presencia de una zona hipervariable (HVR) rica en inserciones y deleciones, las cuales se han asociado a la adaptación del virus a determinadas líneas celulares (Willcocks *et al.*, 1994a).

#### 1.2.7.2 Proteínas no estructurales: ORF1b

El ORF1b codifica para un polipéptido (nsP1b) de 515-519 aminoácidos (Fig. 1.1) y contiene el motivo ARN polimerasa ARN dependiente que, según la clasificación de Koonin, pertenece al supergrupo I, junto con las polimerasas de picornavirus, calicivirus y ciertos virus de plantas como bymovirus y potyvirus (Koonin, 1991). Se ha postulado que el lugar activo de la polimerasa corresponde a la secuencia de aminoácidos YGDD, altamente conservada en astrovirus humanos y animales (Carter & Willcocks, 1996).

A pesar de la existencia de un codón de inicio para el ORF1b, se ha demostrado que la síntesis de esta proteína tiene lugar mediante una señal de *ribosomal frameshifting* situada en la región de solapamiento que existe entre el ORF1a y el ORF1b (Jiang *et al.*, 1993; Marczinke *et al.*, 1994). Esta señal consta de 2 estructuras fundamentales. Existe una secuencia heptamérica (AAAAAAC) localizada entre los nucleótidos 1967-1973, lugar en el cual el ribosoma se desliza para retroceder una posición y modificar la pauta de lectura. Este elemento está seguido por una secuencia rica en GC constituida por una repetición invertida de 7 nt, capaz de formar una estructura en forma de *hairpin*.

### 1.2.7.3 Proteínas estructurales: ORF2

La proteína codificada por el ORF2 tiene un tamaño variable según los diferentes serotipos y oscila entre 782 y 796 aminoácidos. Por regla general en todos los astrovirus secuenciados hasta el momento, la región N-terminal está muchísimo más conservada que la región C-terminal (Fig. 1.1).

Un estudio realizado por Wang y col. (2001) divide la secuencia del ORF2 en 4 regiones. La región I (aa 1-415) situada en el extremo N-terminal es la que está más conservada y la que probablemente contiene los epítomos comunes a todos los serotipos. Los autores incluso describen una secuencia peptídica compartida por los 46 astrovirus humanos analizados, los astrovirus porcinos y felinos. Además, en esta región existe otro motivo también muy conservado entre astrovirus humanos y animales que consiste en un patrón de repetición de dipéptidos de carácter básico, concretamente serinas (S) y argininas (R). Motivos similares se han identificado en 2 coronavirus, en papilomavirus y en baculovirus y se han visto asociados a una localización nuclear y a la regulación de la expresión génica (Jonassen *et al.*, 2001). Otros trabajos han asociado esta elevada frecuencia de residuos básicos en el extremo N-terminal de la cápside a un posible papel en el empaquetamiento del ARN vírico (Geigenmüller *et al.*, 2002b). Finalmente, en esta región también está incluido un residuo (Thr<sub>227</sub>), que parece ser necesario para un correcto ensamblaje de las cápsides víricas (Matsui *et al.*, 2001).

La región II (aa 416-648) muestra un grado de variabilidad relativo entre serotipos mientras que la homología es considerable entre cepas del mismo serotipo. La región III (aa 649-707) contiene el mayor grado de variabilidad observada, siendo muy diferente en longitud entre los diferentes serotipos. Finalmente, la región IV (aa 708- 787) vuelve a mostrar un elevado grado de similitud entre diferentes serotipos.

En el extremo 3' del ORF2, se ha observado que el grado de identidad a nivel de nucleótidos es superior al grado de identidad a nivel de aminoácidos, lo cual pone de manifiesto la importancia funcional de la estructura secundaria del ARN. Concretamente, se ha descrito un motivo llamado *stem-loop II-like motif (s2m)* que está altamente conservado

tanto en todos los astrovirus humanos como también en astrovirus porcinos, felinos, ovinos y de aves (Jonassen *et al.*, 1998; Monceyron *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001). Comprende 21 nt del final del ORF2 y 22 nt de la región 3'-UTR y se ha sugerido que podría tener varias funciones tanto para aportar estabilidad a la estructura secundaria del ARN como al interactuar con proteínas de la célula hospedadora, con proteínas víricas o bien también con otras partes del genoma viral. Motivos similares también han sido descritos en otros virus de la familia *Coronaviridae* y *Picornaviridae* y se cree que podrían haberlos adquirido por fenómenos de recombinación.

### 1.2.8 Estrategias de transcripción y traducción

El esquema de replicación, transcripción y traducción que se ha postulado para astrovirus se deduce del bien caracterizado ciclo replicativo de los alfavirus, los cuales presentan una organización genómica y una estrategia de síntesis de las proteínas estructurales a partir de un ARN subgenómico similar a las de los astrovirus (Matsui *et al.*, 2001). Brevemente, tras la entrada del virus en la célula hospedadora, tendría lugar la síntesis de las proteínas no estructurales a partir del genoma. Estas proteínas transcribirían la cadena negativa completa, la cual a su vez serviría de molde para la síntesis tanto de nuevas moléculas genómicas como de moléculas de ARN subgenómico de polaridad positiva. Aunque todavía no ha sido demostrado, parece ser que existiría un promotor para el ARN subgenómico que sólo sería funcional en las cadenas negativas de ARN. Finalmente, tendría lugar la síntesis de las proteínas estructurales a gran escala al traducirse el ARN subgenómico. De este modo, la presencia de proteínas de la cápside es indicativa de que la replicación del genoma ya ha tenido lugar.

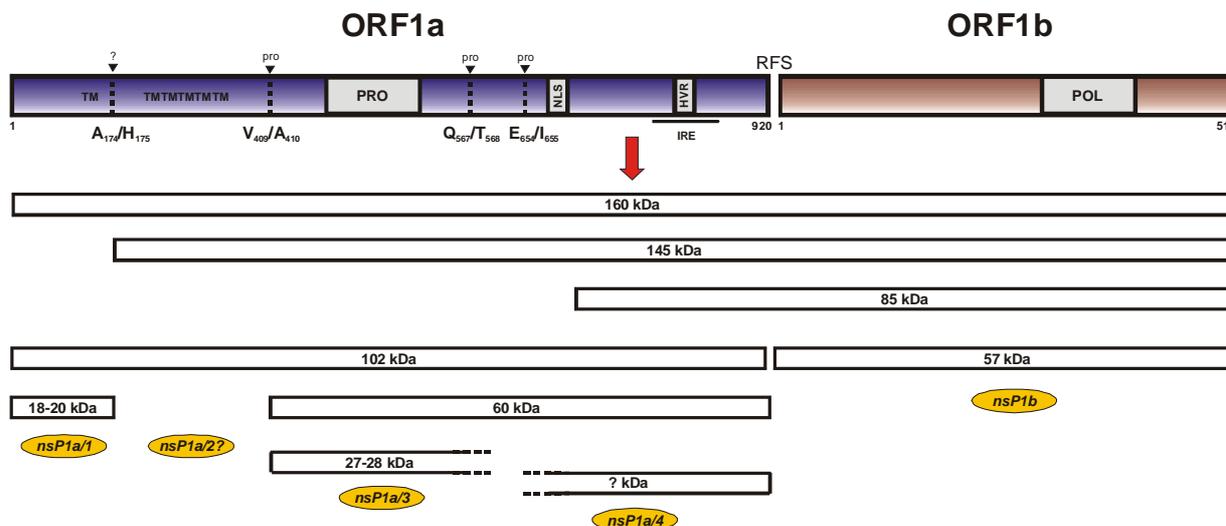
### 1.2.9 Procesamiento proteolítico de las poliproteínas sintetizadas

#### 1.2.9.1 Proteínas no estructurales

El procesamiento proteolítico que sufre la poliproteína nsP1a1b traducida mediante *ribosomal frameshifting* no ha sido todavía caracterizado con profundidad y se desconoce el número total de proteínas resultantes de dicho procesamiento. Tampoco está claro que sea la proteasa vírica la responsable de todos los cortes proteolíticos.

El modelo que se acepta hoy en día es el resultado de varios estudios realizados en diferentes sistemas y utilizando astrovirus humanos de distintos serotipos (Geigenmüller *et al.*, 2002a; Gibson *et al.*, 1998; Kiang & Matsui, 2002; Méndez *et al.*, 2003; Willcocks *et al.*, 1999). Según el modelo (Fig. 1.2), se sintetiza una poliproteína de un tamaño aproximado de 160 kDa (nsP1a1b) que se procesa para dar lugar a la ARN polimerasa de unos 60 kDa de peso molecular (nsP1b) y a una proteína de aproximadamente 102 kDa (nsP1a), la cual es procesada adicionalmente para dar lugar a varias proteínas definitivas.

Un trabajo reciente que se basa en una cepa de serotipo 8 como modelo, propone la existencia de otros precursores de la ARN polimerasa de 145 kDa y 85 kDa de peso molecular (Méndez *et al.*, 2003).



**Fig. 1.2** Modelo de procesamiento de los productos no estructurales (nsP) resultantes de la traducción del ORF1a y ORF1b. Los triángulos pequeños invertidos marcan posibles lugares de procesamiento proteolítico, ya sean a cargo de la proteasa vírica (pro) o de alguna proteasa celular (?). RFP indica *ribosomal frameshifting*; TM indica dominios transmembrana; PRO indica el motivo proteasa; NLS indica la señal de localización nuclear; HVR indica la región hipervariable; POL indica el motivo ARN polimerasa ARN dependiente. Los subrayados indican la posible localización de determinados epítomos víricos, IRE indica epítipo inmunoreactivo.

A pesar de que ninguno de ellos ha sido confirmado por secuenciación de las proteínas en su extremo N-terminal, en la proteína correspondiente al ORF1a se han descrito sitios de corte situados alrededor del aminoácido 170, concretamente después del residuo Ala<sub>174</sub>; entre Val<sub>409</sub> y Ala<sub>410</sub>; entre Gln<sub>567</sub> y Thr<sub>568</sub>; y entre Glu<sub>654</sub> y Ile<sub>655</sub> (Geigenmüller *et al.*, 2002a; Kiang & Matsui, 2002; Méndez *et al.*, 2003). Los datos que existen hasta la fecha sugieren que la proteasa vírica no sería responsable del procesamiento alrededor del aminoácido 170. Por un lado, se ha visto que el producto resultante de este procesamiento se genera de forma independiente de la actividad proteásica del virus (Kiang & Matsui, 2002), y por otro lado, se ha observado una similitud entre la secuencia de esa región y la diana reconocida por una proteasa celular en la secuencia del virus de la diarrea bovina BVDB (Méndez *et al.*, 2003). Finalmente, tampoco está claro todavía si los dos lugares de corte entre los residuos Gln<sub>567</sub>/Thr<sub>568</sub> y Glu<sub>654</sub>/Ile<sub>655</sub> son mutuamente excluyentes o no. Teniendo en cuenta la información anterior, hoy en día se cree que la poliproteína nsP1a sería procesada hasta dar lugar a 4 proteínas finales, las cuales en este trabajo se denominarán nsP1a/1, nsP1a/2, nsP1a/3 y nsP1a/4. La teórica proteína nsP1a/2 no se ha detectado todavía utilizando anticuerpos específicos, y la proteína nsP1a/4 únicamente se ha detectado en sistemas de transfección en células BHK-21 como una proteína de aproximadamente 20 kDa, pero no en células CaCo-2 infectadas (Méndez *et al.*, 2003). Por

*western blotting*, con anticuerpos contra los 298 residuos del extremo C-terminal de nsP1a, Willcocks y col. (1999) identificaron en células CaCo-2 infectadas proteínas cuyos pesos moleculares equivalen a 74, 34, 20, 6.5 y 5.5 kDa.

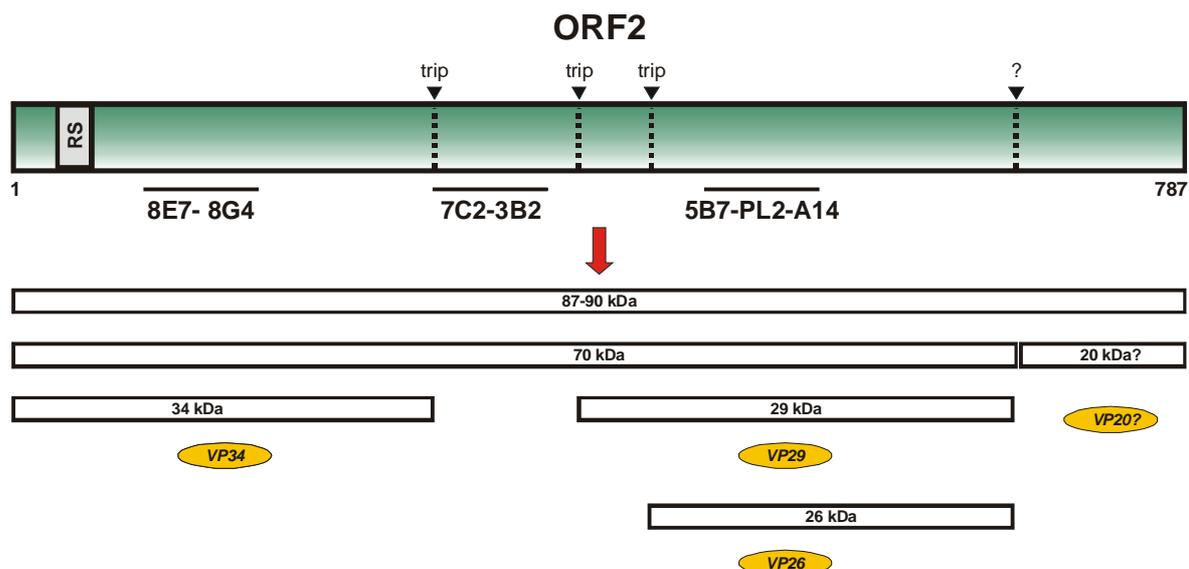
También cabe destacar que se ha demostrado por inmunofluorescencia la localización de algunas de estas proteínas en el núcleo de las células infectadas, por lo que parece que la señal de localización nuclear presente en el ORF1a sería funcional. Además, también se ha sugerido que algunas de estas proteínas podrían sufrir modificaciones postraduccionales y estar glicosiladas (Kiang & Matsui, 2002; Willcocks *et al.*, 1999).

#### 1.2.9.2 Proteínas estructurales

A pesar de que el análisis del procesamiento de las proteínas estructurales del virus ha sido abordado por diversos grupos de investigación, actualmente todavía existe polémica sobre cuál es el procesamiento exacto que sufre la poliproteína sintetizada a partir del ARN subgenómico y que tiene un peso molecular de aproximadamente 87-90 kDa (Fig. 1.3). Tampoco está claro si pueden existir grandes diferencias según el serotipo. En cualquier caso, todos los autores parecen estar de acuerdo en que la tripsina desempeña un papel importante en el procesamiento que da lugar a las proteínas presentes en el virión.

Por lo general, se cree que las cápsides maduras e infecciosas están compuestas por tres proteínas mayoritarias. En función del modelo celular y de la técnica utilizados, el tamaño que se ha descrito para las proteínas presentes en el virión varía entre 32-34 kDa, 29-31.5 kDa y 24-26 kDa (Bass & Qiu., 2000; Belliot *et al.*, 1997a; Monroe *et al.*, 1991; Sánchez-Fauquier *et al.*, 1994; Willcocks *et al.*, 1990). Una de las nomenclaturas más utilizadas denomina a las proteínas VP34, VP29 y VP26. Según el modelo, la proteína VP26 es una versión truncada por su extremo N-terminal de la proteína VP29, mientras que la proteína VP34 estaría codificada independientemente (Belliot *et al.*, 1997a; Sánchez-Fauquier *et al.*, 1994).

Algunos autores defienden que el precursor de 87-90 kDa sufre un primer procesamiento proteolítico intracelular a cargo de alguna proteasa distinta a la tripsina, resultando en una proteína de aproximadamente 70 kDa capaz de ensamblarse y formar partículas víricas (Fig. 1.3) (Bass & Qiu., 2000; Méndez *et al.*, 2002). Otros autores postulan que no existe tal procesamiento (Geigenmüller *et al.*, 2002b; Monroe *et al.*, 1991; Sánchez-Fauquier *et al.*, 1994), y según ellos, la proteína de 87-90 kDa puede ensamblarse sin necesidad de ningún procesamiento intracelular. En ambos modelos, parece que el ensamblaje de partículas víricas tiene lugar en el interior de la célula y que la tripsina realiza los procesamientos que dan lugar a las 3 proteínas definitivas de las cápsides maduras extracelularmente, provocando así un incremento considerable en la infectividad de las partículas.



**Fig. 1.3** Modelo de procesamiento de las proteínas estructurales (VP) resultantes de la traducción del ORF2. Los triángulos pequeños invertidos marcan posibles lugares de procesamiento proteolítico, ya sean a cargo de la tripsina (trip) o de alguna proteasa celular (?). RS indica una región rica en residuos básicos. Los subrayados indican la posible localización de determinados epítomos víricos.

### 1.2.10 Estructura antigénica

Los anticuerpos policlonales de referencia contra los distintos serotipos de astrovirus humanos permiten distinguir los 8 serotipos mediante técnicas de inmunoelectromicroscopía (IEM) e inmunoensayo (EIA). Sin embargo, debido al hecho de que estos reactivos son limitados, diversos grupos de trabajo han abordado la producción de anticuerpos monoclonales contra astrovirus.

Entre los anticuerpos monoclonales (MAb) descritos hasta la fecha, destacan el 8E7, PL2, 8G4, 5B7, 7C2 y 3B2. No obstante, ninguno de estos MAb ha sido caracterizado totalmente y para la mayoría de ellos se desconoce cuál es el epítipo exacto que reconocen. El mapaje de estos epítomos se ha llevado a cabo por aproximaciones experimentales (Geigenmüller *et al.*, 2002b; Matsui *et al.*, 1993) y por análisis del patrón de hidrofobicidad de las secuencias de aminoácidos disponibles (Wang *et al.*, 2001). En la Tabla 1.2 se describen las principales características para cada uno de ellos.

**Tabla 1.2** Anticuerpos monoclonales (MAb) existentes específicos de astrovirus.

MAb	Especif. Serotipo	Epítipo	NT	Técnicas	Referencia
8E7	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	VP34?	NO	EIA, IP, IF, WB, IEM	Herrmann <i>et al.</i> , 1988
PL2	2	VP26	SÍ	IP, IF, IEM	Sánchez-F <i>et al.</i> , 1994
8G4	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	VP34?	NO	EIA, IP, IF	Bass & Upadhyayula, 1997
5B7	1	VP26	SÍ	EIA, IP, IF	Bass & Upadhyayula, 1997
7C2	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	VP29	SÍ	EIA, IP, WB	Bass & Upadhyayula, 1997
3B2	1, 7	VP29	SÍ	EIA, IP	Bass & Upadhyayula, 1997

EIA: Análisis inmunoenzimático; IP: Inmunoprecipitación; IF: Inmunofluorescencia; WB: Western blotting; IEM: Inmuno-electromicroscopía.

### 1.2.11 Características bioquímicas y biofísicas de la partícula vírica

Las densidades de flotación de partículas intactas de astrovirus en gradientes de cloruro de cesio (CsCl) varían según los autores (Caul & Appleton, 1982; Konno *et al.*, 1982; Matsui *et al.*, 1993; Midthun *et al.*, 1993; Willcocks *et al.*, 1990), y son muy pocos los datos existentes sobre los métodos de purificación de este virus en gradientes de sacarosa.

Al purificar por CsCl virus producidos en células CaCo-2 o células LLCMK2, se observan 2 bandas de densidad 1,32-1,33 g/ml y 1,35-1,37, que equivalen a 2 picos antigénicos por EIA y que presentan un patrón proteico idéntico (Matsui *et al.*, 1993; Willcocks *et al.*, 1990). La ausencia de ARN en la banda menos densa permite pensar que la banda más densa corresponde a las partículas infecciosas que contienen ácido nucleico y que la banda menos densa corresponde a partículas vacías. Todavía hoy no está claro cuál es el papel que juegan los iones divalentes en la estabilidad de las partículas. Mientras que hay trabajos que sugieren que estos iones son necesarios durante el proceso de ensamblaje y que aportan estabilidad a las partículas en gradientes de CsCl (Matsui & Greenberg., 2001), otros autores han observado que determinadas concentraciones de iones calcio desestabilizan las cápsidas y sugieren la adición de EDTA durante el proceso de purificación para mantener la integridad del virión (Castón *et al.*, 1999; Risco *et al.*, 1995).

En nuestro laboratorio, se ha visto que al centrifugar suspensiones víricas en gradientes de sacarosa en tampón con EDTA, se obtienen 3 picos antigénicos con densidades correspondientes a 1.05 g/ml, 1.12 g/ml y 1.14 g/ml. Puesto que únicamente los picos 1.05 g/ml y 1.14 g/ml muestran reactividad por hibridación con una sonda específica para el genoma de astrovirus, la banda 1.14 g/ml corresponde a la fracción que contiene las partículas víricas completas (virus infecciosos), mientras que la banda 1.12 g/ml corresponde a la fracción que contiene las partículas sin ácido nucleico (no infecciosas). Probablemente, el pico correspondiente a la densidad de 1.05 g/ml corresponda a material vírico no ensamblado (proteínas y ácidos nucleicos) (Caballero *et al.*, 2003).

### 1.2.12 Estabilidad

Las partículas de astrovirus son estables a pH 3 y resistentes al cloroformo, a una variedad de detergentes y a solventes lipídicos (Kurtz & Lee, 1987). Los virus son estables durante al menos 6 ó 10 años, si se mantienen en ultracongeladores a temperaturas entre  $-70^{\circ}\text{C}$  y  $-85^{\circ}\text{C}$ , pero toleran bastante mal repetidos ciclos de congelación y descongelación (Williams, 1989).

Su viabilidad resiste tratamientos de 1 hora a  $50^{\circ}\text{C}$  y de 5 minutos a  $60^{\circ}\text{C}$ , pero decae después de 10 minutos a  $60^{\circ}\text{C}$  (Kurtz & Lee, 1987). El título vírico cae hasta 4 unidades logarítmicas en presencia de 1 mg/l de cloro durante 2 horas (Abad *et al.*, 1997). Aunque se ha descrito que pueden sobrevivir en agua de mar a bajas temperaturas, la inactivación es más rápida en agua de mar que en aguas continentales (Bosch *et al.*, 1997). También se ha descrito que concentraciones de 90% de metanol reducen de forma considerable el título vírico de astrovirus (Kurtz *et al.*, 1980).

## 1.3 DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO DE ASTROVIRUS

### 1.3.1 Microscopía electrónica (ME)

La microscopía electrónica es todavía hoy en día la única técnica que permite detectar todos los tipos de virus que provocan gastroenteritis y es la técnica que se ha utilizado tradicionalmente para su diagnóstico.

No obstante, para el caso de astrovirus puede presentar ciertas dificultades, pues aproximadamente tan sólo el 10% de las partículas virales muestra la característica forma estrellada. Por ello, el peligro de confundir los astrovirus con otros virus de morfología similar es alto incluso aunque el microscopista tenga gran experiencia. Esta limitación fue puesta de manifiesto en un estudio retrospectivo realizado en 1988, en el cual se describió como hasta esa fecha, muchos virus entéricos, especialmente astrovirus, habían sido clasificados erróneamente (Oliver & Phillips, 1988).

Otra conocida limitación importante de la ME es su nivel de sensibilidad, el cual se estima entre  $10^6$  y  $10^7$  partículas por gramo de heces (Madeley & Cosgrove, 1975).

### 1.3.2 Inmunoelectromicroscopía (IEM)

La sensibilidad y especificidad de detección de astrovirus por ME se incrementó con el desarrollo de técnicas de inmunoelectromicroscopía en fase sólida (SPIEM), en las que las rejillas se recubren con antisueros contra el virus (Konno *et al.*, 1982; Oishi *et al.*, 1994; Oliver & Phillips, 1988). La utilización de los anticuerpos de conejo de referencia también permitió el serotipado de las muestras de astrovirus por inmunoelectromicroscopía (IEM) (Kurtz & Lee, 1984; Moe *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 2001b). Así se consiguió caracterizar el

virus causante de un importante brote en California, el agente Marin County, como un astrovirus serotipo 5 (Midthun *et al.*, 1993).

### 1.3.3 Inmunoensayo (EIA)

Herrmann y col. diseñaron uno de los primeros inmunoensayos (EIA) para la detección de astrovirus en 1990. Este EIA se basaba en el recubrimiento de la placa con el MAb 8E7, el cual reconoce un epítipo común a todos los serotipos, y la posterior detección de los virus con un anticuerpo policlonal de conejo (Herrmann *et al.*, 1990). Con diferencia, este EIA ha sido el más ampliamente utilizado en los estudios epidemiológicos de astrovirus. Actualmente, en Europa se dispone de un *kit* comercial equivalente (IDEIA™ Astrovirus, DAKO, Cambridgeshire, United Kingdom) que es específico para la detección de astrovirus humanos (Grant *et al.*, 1996). Comparado con la ME, su sensibilidad es equiparable y su especificidad es del 98,6% (McIver *et al.*, 2000). Otro sistema de EIA descrito y utilizado se basa en la utilización del MAb 8G4 como anticuerpo de captura y del mismo anticuerpo biotinilado como anticuerpo detector. Al igual que el MAb 8E7, el MAb 8G4 reconoce todos los serotipos descritos de astrovirus humanos (Shastri *et al.*, 1998). En general, la sensibilidad de estas técnicas es de  $10^5$ - $10^6$  partículas víricas por gramo de materia fecal.

Paralelamente también se han desarrollado métodos que permiten serotipar las muestras. Los anticuerpos de referencia que se utilizan fueron producidos contra HAstV-1 hasta HAstV-8 por Lee y Kurtz en conejos. El EIA para serotipar utiliza estos anticuerpos como detectores y el MAb 8E7 para la captura (Herrmann *et al.*, 1990). No obstante, se ha descrito un grado bastante elevado de reacción cruzada entre serotipos 1 y 3 (Noel *et al.*, 1995).

El diseño de estos ensayos ha facilitado la realización de estudios epidemiológicos a gran escala de astrovirus y así se ha podido corroborar la importancia médica de astrovirus en todo el mundo (Cruz *et al.*, 1992; Gaggero *et al.*, 1998; Guerrero *et al.*, 1998; Herrmann *et al.*, 1991; López *et al.*, 2000; Maldonado *et al.*, 1998; McIver *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2000; Naficy *et al.*, 2000; Pager & Steele, 2003; Shastri *et al.*, 1998; Steele *et al.*, 1998; Unicomb *et al.*, 1998).

### 1.3.4 Inmunofluorescencia (IF)

La detección de antígeno de astrovirus mediante IF utilizando anticuerpos específicos es una técnica útil para el serotipado de astrovirus adaptados a propagarse en cultivos celulares, así como para estudiar la localización subcelular de determinadas proteínas víricas. A su vez, esta técnica también ha sido utilizada para detectar astrovirus salvajes después de infectar células en cultivo (Taylor *et al.*, 1997a).

A pesar de que no requiere la utilización de técnicas propiamente inmunológicas, cabe destacar un método de detección de astrovirus descrito recientemente por Matsui y col., (Matsui *et al.*, 2001) y que se fundamenta en una línea celular *reporter*. Entre otras aplicaciones, este método permite identificar astrovirus infecciosos presentes en muestras salvajes. Se trata de células CaCo-2 que han sido transformadas de forma estable con una construcción que contiene, bajo el control del promotor del virus de sarcoma de Rous, el cDNA de astrovirus con 2 modificaciones: una mutación que anula la función ARN polimerasa del virus y la substitución de las proteínas estructurales del virus por el gen *reporter Green Fluorescent Protein* (GFP). La presencia de virus infecciosos en la muestra complementa la función ARN polimerasa y permite que, en la célula infectada, tenga lugar la síntesis de ARN subgenómico y la consiguiente expresión de proteína GFP, la cual se detecta mediante un microscopio de fluorescencia.

### 1.3.5 Ensayos moleculares

La secuenciación y el clonaje de varios genomas de astrovirus humanos ha conducido al desarrollo de sistemas moleculares para la detección y caracterización de astrovirus mediante técnicas de hibridación (*dot blot*) y de retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

#### 1.3.5.1 Ensayos de Hibridación (*dot blot*)

Uno de los ensayos por *dot blot* consiste en la utilización de una mezcla de dos sondas de ADNc marcadas radiactivamente y correspondientes a 2 regiones diferentes del genoma del virus (Willcocks *et al.*, 1991). La hibridación se realiza frente a un extracto total de ácidos nucleicos de la muestra a ensayar. A pesar de que al compararse con la ME, esta técnica resulta ser menos sensible, fue efectiva al permitir identificar inequívocamente la presencia de astrovirus aunque su morfología no estuviera bien conservada.

Alternativamente, también se desarrolló una técnica de hibridación con una sonda ARN para la detección de astrovirus (Moe *et al.*, 1991). Se utilizó para detectar el virus en muestras clínicas y en sobrenadantes de medios de cultivo y su sensibilidad fue equivalente a la de las técnicas de EIA.

Para la detección de astrovirus infecciosos en muestras de agua residual se puso a punto una técnica basada en la infección de células CaCo-2 y un posterior *dot blot* utilizando una sonda de cDNA marcada con digoxigenina-11-dUTP y correspondiente a un fragmento de 1 kb del extremo 3' del genoma (Pintó *et al.*, 1996; Willcocks *et al.*, 1992). Tras tres pasajes consecutivos en células CaCo-2, el límite de detección de la técnica resultó ser de  $10^2$  partículas víricas por ml de muestra.

Finalmente, también se han desarrollado sistemas de hibridación acoplados a métodos de detección por RT-PCR.

#### 1.3.5.2 RT-PCR

La utilización de RT-PCR para la detección de virus en todo tipo de muestras está ampliamente extendida, sobre todo en los laboratorios de investigación. Mientras que hace unos años tan sólo se recurría a la RT-PCR para confirmar resultados dudosos obtenidos previamente por otras técnicas como el EIA, hoy en día su uso se ha extendido a diferentes tipos de aplicaciones. Las principales ventajas de la RT-PCR frente a otros métodos son su elevada sensibilidad, el hecho de que los reactivos dejan de ser limitados como los anticuerpos, y también su enorme potencial, pues permite también diseñar sistemas de genotipado y realizar estudios filogenéticos. Una de las únicas desventajas, la cual es además compartida por muchos otros sistemas de detección y diagnóstico, es que la RT-PCR no permite distinguir entre partículas víricas viables o infecciosas y partículas no infecciosas, lo cual es especialmente importante en el campo de la virología ambiental. Por ello, algunos grupos han desarrollado técnicas que combinan la RT-PCR con infección de células en cultivo (Mustafa *et al.*, 1998; Pintó *et al.*, 1996).

Los principales métodos de detección desarrollados para el diagnóstico de astrovirus pueden diferenciarse entre RT-PCRs comunes para diferentes serotipos de astrovirus (RT-PCR genéricas) y RT-PCRs que utilizan oligonucleótidos específicos de serotipo. En ningún caso el tamaño del amplímero obtenido es demasiado grande y oscila entre 79 y 666 pb. En general se estima que la sensibilidad de los métodos de RT-PCR es de 10-100 partículas víricas por gramo de materia fecal. Mientras que los métodos de RT-PCR capaces de detectar todos los serotipos se basan en distintas regiones a lo largo de todo el genoma del virus, los métodos específicos de serotipo se concentran sobre todo en el extremo 3' del ORF2 debido a que es la zona del genoma con mayor variabilidad. Entre los más comúnmente utilizados destacan:

##### 1.3.5.2.1 RT-PCR genéricas

- **ORF1a.** Los oligonucleótidos Mon340 y Mon348 fueron descritos por Belliot y col. (1997c) y pertenecen a la región del dominio catalítico de la proteasa del virus, altamente conservada en todos los serotipos. Recientemente han sido utilizados en varios estudios epidemiológicos en Francia (Traore *et al.*, 2000), Korea (Kang *et al.*, 2002) y Malawi (Cunliffe *et al.*, 2002). Recientemente, se ha descrito un nuevo método de detección por hibridación en estado líquido basado en esta misma región (Belliot *et al.*, 2001). A pesar de que su nivel de sensibilidad no es superior al de otros sistemas tradicionales de *dot blot*, esta técnica combinada con el uso de sondas

específicas de serotipo, podría ser útil para tipar muestras sin necesidad de realizar una secuenciación.

Un nuevo par de oligonucleótidos, denominados Astro3 y Astro5, fue utilizado en un estudio epidemiológico en Irlanda y se localizan en el extremo 5' del ORF1a (Foley *et al.*, 2000).

- **ORF1b.** Los oligonucleótidos Mon343 y Mon344 también fueron descritos por Belliot y col. y pertenecen a la región de la ARN polimerasa (Belliot *et al.*, 1997c). No obstante, la utilización de estos oligonucleótidos en estudios epidemiológicos ha sido mucho más restringida.
- **ORF1b-ORF2.** La utilización de los oligonucleótidos Mon344 y Mon270 ha permitido analizar y caracterizar genéticamente la región de transición entre el ORF1b y el ORF2. De este modo se pudo identificar en México y también en Texas, la primera cepa salvaje recombinante de astrovirus humanos (Walter *et al.*, 2001a).
- **5' ORF2.** En la región conservada N-terminal (región I) de las proteínas estructurales es donde se localizan los oligonucleótidos más utilizados, con diferencia, en los estudios epidemiológicos de astrovirus en todo el mundo. Estos oligonucleótidos, denominados Mon244 y Mon245, fueron descritos por Noel y col. (1995). Posteriormente se diseñaron los oligonucleótidos Mon269 y Mon270, los cuales parecen ser incluso más universales y detectar con más facilidad todos los serotipos existentes de astrovirus humanos. Hasta la fecha, la buena correlación observada entre el serotipo y la secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado ha permitido disponer de un sistema molecular fiable para el serotipado de las muestras, el cual se ha aplicado en diferentes partes del mundo (Cunliffe *et al.*, 2002; Gaggero *et al.*, 1998; Liste *et al.*, 2000; McIver *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2000; Mustafa *et al.*, 2000; Naficy *et al.*, 2000; Palombo & Bishop, 1996; Traore *et al.*, 2000). Hoy en día ya se dispone en *Genbank* de aproximadamente 200 secuencias de esta región.
- **3'ORF2.** A pesar de que el extremo 3' del ORF2 es muy variable, Saito y col. (1998) describieron unos oligonucleótidos para la detección de todos los serotipos de astrovirus humanos excepto el HAstV-4. No obstante, estos oligonucleótidos tan sólo han sido utilizados en combinación con otros en muestras que mostraban un resultado dudoso. Otro método que permite amplificar todos los serotipos excepto el HAstV-4 y que a la vez permite distinguir el HAstV-6 debido a una diferencia de tamaño fue descrito por Sakon y col. (2000) para caracterizar la cepa de astrovirus serotipo 6 responsable del importante brote de gastroenteritis que tuvo lugar en Osaka, Japón en 1991 y que afectó a más de 4700 personas.

- **Región 3' no traducida (3'-UTR).** Los métodos que trabajan sobre esta región fueron publicados por Jonassen y col. (1993) y por Mitchell y col. (1995). Puesto que el tamaño del fragmento amplificado por estos sistemas es muy pequeño, muestran una elevada sensibilidad, sobre todo al combinar la RT-PCR con métodos de hibridación molecular. Por este motivo estos oligonucleótidos se han utilizado tradicionalmente para el análisis de muestras ambientales como agua residual (Marx *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2001a) y para muestras de marisco (Le Guyader *et al.*, 2000). No obstante, también se han utilizado en algunos estudios epidemiológicos clínicos en Francia (Belliot *et al.*, 1997b; Bon *et al.*, 1999), el Reino Unido (Cubitt *et al.*, 1999), Sudáfrica (Taylor *et al.*, 1997b) y Venezuela (González *et al.*, 1998).

#### 1.3.5.2.2 RT-PCR mediante oligonucleótidos específicos de serotipo (ORF2)

Debido a su gran variabilidad genética, la región 3' ORF2 se ha utilizado mucho para el diseño de oligonucleótidos específicos de serotipo que permiten genotipar y serotipar las muestras por RT-PCR en función del tamaño del amplímero obtenido y sin necesidad de secuenciar el ADN resultante.

Uno de los métodos descritos fue desarrollado en Japón por Matsui y col. en 1998. Se fundamenta en la utilización de un oligonucleótido End común para todos los serotipos y una mezcla de oligonucleótidos específicos para cada serotipo. Inicialmente se diseñaron oligonucleótidos para detectar los serotipos HAstV-1 al HAstV-7 y un tiempo más tarde se publicó el oligonucleótido específico para el serotipo HAstV-8 (Sakamoto *et al.*, 2000).

Paralelamente, el grupo de Mitchell y col. (1991) fue modificando su método de RT-PCR basado en la región 3' no traducida (3'UTR) para conseguir un sistema que permitiera serotipar en función del tamaño del fragmento de PCR generado. Así, como oligonucleótido común a todos se utilizó el oligonucleótido Mon2 y se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada serotipo. Aunque al principio este método únicamente permitía detectar los serotipos más comunes de astrovirus HAstV-1 y HAstV-2, más adelante se perfeccionó y hoy en día permite amplificar los 8 serotipos. Recientemente, este método se ha aplicado a estudios epidemiológicos en México (Walter *et al.*, 2001b) y en Sudáfrica (Nadan *et al.*, 2003).

#### 1.3.6 Serotipado y genotipado

La información proporcionada por las secuencias de nucleótidos ha sido utilizada en muchos estudios recientes para analizar la similitud a nivel de aminoácidos en un grupo de virus y para estudiar las relaciones filogenéticas entre los diferentes aislados. La mayoría de estos estudios se han basado en secuencias relativamente cortas.

Uno de los primeros estudios de variabilidad genética confirmó la existencia de una buena correlación entre el serotipo y el subgenotipo deducido a partir de la secuencia de 348 pb de la región N-terminal conservada del ORF2 (Noel *et al.*, 1995). Más tarde, se describió que las agrupaciones filogenéticas de los diferentes serotipos se modificaban en función de la región del genoma secuenciada. Así, en un trabajo publicado en 1997, Belliot y col. demostraron que, mientras que basándose en una región del ORF2 o del ORF1b, los aislados se agrupaban perfectamente según su serotipo y de forma equidistante unos de los otros, cuando se hacía el análisis comparando las secuencias del ORF1a, los distintos virus se agrupaban únicamente en dos grupos filogenéticos claramente diferenciados y que fueron denominados genogrupo A (incluye los serotipos del 1 al 5 y el 8) y genogrupo B (incluye los serotipos 6 y 7) (Belliot *et al.*, 1997c).

Además, se ha visto que los grupos filogenéticos resultantes del análisis a partir de secuencias del ORF2 también varía en función de la región escogida y de la longitud del fragmento utilizado. De esta manera, a partir del análisis de las secuencias de 348 pb del extremo 5' del ORF2, se obtienen 4 grupos principales de secuencias que engloban los serotipos 1 y 6, 2 y 3, 4 y 8, y 5 y 7 (Noel *et al.*, 1995). Sin embargo, al analizar una región de 363 pb del extremo 3' del ORF2, se agrupan claramente los serotipos 2, 3 y 7, mientras que el resto quedan equidistantes de este *cluster* y entre ellos (Walter *et al.*, 2001b). Finalmente, si se considera la secuencia del ORF2 completa, únicamente se observan tres grupos filogenéticos robustos, uno de ellos comprende los serotipos 1, 3 y 7, otro los serotipos 5 y 6, y el tercero los serotipos 4 y 8. El serotipo 2 quedaría más cercano a este último grupo (Wang *et al.*, 2001).

Estas diferencias en las agrupaciones filogenéticas resultantes después de analizar diferentes regiones del genoma sugieren por un lado la existencia de diferentes presiones selectivas a lo largo del genoma, y por otro lado la posibilidad de que a lo largo de la historia evolutiva de estos virus hayan tenido lugar fenómenos de recombinación entre diferentes regiones. Por último, cabe destacar la importancia de tener presente que las relaciones filogenéticas encontradas entre secuencias de distintas regiones pueden no ser representativas de las verdaderas relaciones filogenéticas que existan entre los diferentes astrovirus (Lukashov & Goudsmit, 2002).



## 1.4 ASPECTOS CLÍNICOS DE LA INFECCIÓN POR ASTROVIRUS

### 1.4.1 Características clínicas de las infecciones en humanos

Las gastroenteritis causadas por infecciones por astrovirus en humanos ocurren en todo el mundo y afectan mayoritariamente a niños pequeños. Su incidencia también es importante en gente mayor y pacientes inmunosuprimidos. En adultos sanos, también se han detectado casos de gastroenteritis por astrovirus (Pager & Steele, 2003; Svenungsson *et al.*, 2000), pero la infección suele ser mucho más suave o incluso asintomática.

Estudios en voluntarios humanos adultos caracterizaron las infecciones por astrovirus como de patogenicidad leve. A pesar de que la mayoría de los voluntarios desarrolló una respuesta serológica frente a astrovirus, muy pocos desarrollaron una sintomatología grave (Kurtz *et al.*, 1979; Midthun *et al.*, 1993). Así pues, a diferencia de calicivirus, las infecciones por astrovirus en adultos suelen ser poco importantes. En la población adulta, hoy en día son mucho más abundantes los brotes epidémicos de gastroenteritis aguda causados por calicivirus que por astrovirus, aunque también han existido casos de brotes asociados a astrovirus, como el brote en un colegio de Osaka, Japón, que afectó a 4,700 personas en 1991 (Oishi *et al.*, 1994), o el brote que afectó a los reclutas de una base militar en Caen, Francia, también en 1991 (Belliot *et al.*, 1997b).

En general, la gastroenteritis aguda se caracteriza por un cuadro de diarrea precedido en ocasiones de náuseas y vómitos, acompañado de dolor abdominal como retortijones, ruidos abdominales aumentados y febrícula o hasta fiebre alta que dura de 2 a 7 días, y que aparece tras un período de incubación de 1-3 días. Los síntomas de la gastroenteritis causada por astrovirus en humanos no permiten distinguirla de las gastroenteritis causadas por otros virus como rotavirus o calicivirus, aunque en general se considera que la infección por astrovirus es un poco más suave y no suele desencadenar problemas graves de

hospitalización y deshidratación. Entre los factores que contribuyen a la elevada frecuencia de infecciones del aparato gastrointestinal destacan la mayor exposición a los agentes causantes de gastroenteritis por falta de medidas de higiene y la rápida transmisión que ocurre entre los individuos cuando éstos conviven juntos, como puede ser el caso de guarderías, familias o residencias de ancianos. Los individuos con deficiencias en el sistema inmunitario también muestran un riesgo superior a infecciones gastrointestinales.

La incidencia de diarreas persistentes entre las gastroenteritis asociadas a astrovirus se ha relacionado con más frecuencia al serotipo 3 (Caballero *et al.*, 2003). En este estudio reciente con niños que no padecían ninguna otra enfermedad, el 8.5% de las infecciones por astrovirus fueron consideradas gastroenteritis persistentes, y en el 37.5% de ellas se identificó al serotipo 3 como causante de la enfermedad. Por último, el 42.9% de las infecciones causadas por serotipo 3 se relacionaron a casos persistentes, los cuales han llegado a durar más de 3 meses.

En la población infantil, cada vez son más los autores que consideran astrovirus como la tercera causa de gastroenteritis víricas después de rotavirus y calicivirus, tanto en niños hospitalizados como en niños no hospitalizados. En algunos estudios las infecciones pediátricas por astrovirus también se han asociado a deshidratación severa y, aunque muy raramente, también se han descrito casos de muerte en pacientes infectados con astrovirus. Tampoco se debe perder de vista que las consecuencias y la gravedad de la infección dependen siempre en enorme medida del grado de desarrollo del país. A modo de ejemplo, podemos citar un estudio reciente llevado a cabo en la población infantil de Egipto en el cual el 48% de los casos de diarrea mostró cierto grado de deshidratación y en el 17% se diagnosticó deshidratación severa, según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Naficy *et al.*, 2000).

En otras palabras podríamos decir que por regla general, las manifestaciones clínicas de una infección por astrovirus suelen ser más suaves que las de una infección por rotavirus o calicivirus. No obstante, mientras que el número de niños afectados revela la importancia médica de este virus entérico en cada país, no podemos olvidar que las consecuencias de la infección pueden variar drásticamente entre países desarrollados y países en vías de desarrollo.

#### **1.4.2 Epidemiología**

Las infecciones por astrovirus ocurren en los cinco continentes (Glass *et al.*, 1996). A pesar de que en la mayoría de casos estas infecciones son suaves, los casos de hospitalización debidos a astrovirus son frecuentes, así como también su incidencia en infecciones nosocomiales (Traore *et al.*, 2000; Unicomb *et al.*, 1998). A pesar de que las infecciones por astrovirus ocurren con menor frecuencia que las infecciones por rotavirus o

calicivirus, desde el punto de vista de la salud pública deben tenerse en cuenta, puesto que han sido responsables de brotes de gastroenteritis en colegios (Oishi *et al.*, 1994), escuelas militares (Belliot *et al.*, 1997b), geriátricos (Lewis *et al.*, 1989), guarderías (Mitchell *et al.*, 1999) y entre individuos inmunosuprimidos (González *et al.*, 1998; Liste *et al.*, 2000).

La incidencia de astrovirus oscila aproximadamente entre el 2 y el 9% en países desarrollados (Bon *et al.*, 1999; Foley *et al.*, 2000; Gaggero *et al.*, 1998; Mustafa *et al.*, 1998; Svenungsson *et al.*, 2000; Walter & Mitchell, 2000) y asciende hasta el 26% en los países en vías de desarrollo en los cuales se han llevado a cabo estudios epidemiológicos (Maldonado *et al.*, 1998). La prevalencia de infecciones por astrovirus varía en función de los grupos de edad estudiados, pero por regla general, parece que es mayor en niños menores de dos años. Estudios sobre la seroprevalencia demuestran que la mayoría de los niños adquieren anticuerpos contra astrovirus durante los primeros años de vida (Koopmans *et al.*, 1998; Kriston *et al.*, 1996; Kurtz & Lee, 1978).

Actualmente, los astrovirus humanos se clasifican en 8 serotipos, de los cuales se considera que el serotipo HAstV-1 es el más prevalente en todo el mundo, siendo responsable de más de la mitad de las infecciones en Europa (Lee & Kurtz, 1994; Pang & Vesikari, 1999; Traore *et al.*, 2000), América del Norte (Shastri *et al.*, 1998), América del Sur (Gaggero *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 2000), Asia (Kang *et al.*, 2002; Unicomb *et al.*, 1998) y Australia (Mustafa *et al.*, 2000). Por su parte, los serotipos HAstV-6 y HAstV-7 se han aislado sólo muy raramente (Lee & Kurtz, 1994; Naficy *et al.*, 2000). A pesar de que el serotipo HAstV-8 se descubrió recientemente y que en un principio se pensó que su incidencia era baja, hoy en día se está detectando con relativa frecuencia en distintas regiones del mundo (Mustafa *et al.*, 2000; Naficy *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2001b). Las coinfecciones de astrovirus con algún otro patógeno se han descrito con frecuencia (Román *et al.*, 2003; Shastri *et al.*, 1998), y también, aunque en menor medida, ha habido algún caso en el que se ha demostrado la coinfección de distintos serotipos en el mismo paciente (Matsui *et al.*, 1998; Pang & Vesikari, 1999).

Paralelamente a lo que ocurre con rotavirus y calicivirus, las infecciones por astrovirus aumentan durante los meses fríos y/o lluviosos del año. Esto se ha descrito en muchos países como Australia (Palombo & Bishop, 1996), Finlandia (Pang & Vesikari, 1999), Tailandia (Herrmann *et al.*, 1991), Guatemala (Cruz *et al.*, 1992), Sudáfrica (Steele *et al.*, 1998), etc. No obstante, también existe algún estudio, como los realizados en México o en Egipto, en los que esta estacionalidad no se cumple (Guerrero *et al.*, 1998; Naficy *et al.*, 2000). Así pues, está abierto el debate sobre la estacionalidad de estos virus entéricos y podría haber variaciones en función de la región geográfica. Además, en algunos trabajos realizados en el Reino Unido, Australia y Sudáfrica, se describe también un patrón bianual

de incidencia de astrovirus, de manera que el impacto de estos virus sería mayor en años alternos (Lee & Kurtz, 1994; Mustafa *et al.*, 2000; Steele *et al.*, 1998).

#### **1.4.3 Infecciones en inmunosuprimidos**

A pesar de que los astrovirus se han identificado como agentes causantes de gastroenteritis en pacientes con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), no parecen desempeñar un papel importante. Un estudio llevado a cabo en Venezuela detectó astrovirus en el 10% de pacientes adultos con SIDA y en el 14% de aquellos pacientes que desarrollaron síntomas de gastroenteritis. Durante este estudio, en ningún caso se detectó la presencia ni de rotavirus ni de calicivirus (González *et al.*, 1998). En otro estudio realizado también en Venezuela pero con niños, aunque se detectó una incidencia de astrovirus significativamente mayor en niños afectados de SIDA que en niños sanos, las diferencias no fueron significativas (Liste *et al.*, 2000). En cambio, Cunliffe y col. (2002), en un estudio realizado en Malawi, observaron que la infección era más severa en niños coinfectados con SIDA y astrovirus.

Cubitt y col. describieron un brote de gran importancia causado por astrovirus HAstV-1 en una unidad infantil de trasplante de médula ósea en un hospital de Londres. Los niños afectados excretaron astrovirus durante varios meses después de la infección (Cubitt *et al.*, 1999).

Finalmente, también se han descrito infecciones prolongadas de astrovirus en pacientes con deficiencias congénitas de células T (Wood *et al.*, 1988) o en pacientes que han recibido tratamientos con fludarabina, la cual provoca una disminución de células T CD4 (Björkholm *et al.*, 1995; Coppo *et al.*, 2000). Algunos de estos pacientes reaccionaron satisfactoriamente a un tratamiento intravenoso y oral de gammaglobulinas con un título elevado de anticuerpos contra el serotipo 1, pero el papel del tratamiento en pacientes inmunosuprimidos con inmunoglobulinas todavía requiere estudiarse con detalle.

#### **1.4.4 Infecciones nosocomiales**

En un estudio realizado en California, el 50% de las infecciones atribuidas a astrovirus pudieron clasificarse como infecciones nosocomiales, sobre todo en la población infantil más joven (Shastri *et al.*, 1998). También en Francia, el 47% de las gastroenteritis causadas por astrovirus en pacientes hospitalizados se atribuyeron a infecciones nosocomiales (Traore *et al.*, 2000).

Otro estudio llevado a cabo en Bangladesh fue el primer estudio en el cual, además de asociar las infecciones de astrovirus a diarreas agudas, también fueron asociadas a diarreas persistentes. Aunque no pudieron descartar la participación de otros patógenos al inicio de

las gastroenteritis persistentes, la asociación que describieron con astrovirus fue muy elevada. Lo que sí pudieron demostrar fue que el 16% de las infecciones de astrovirus que identificaron en niños hospitalizados fueron nosocomiales (Unicomb *et al.*, 1998). Todo ello, relacionado con la posibilidad de la existencia de numerosas infecciones asintomáticas producidas por astrovirus en adultos (Mitchell *et al.*, 1993), hace que el papel de astrovirus como causante de infecciones nosocomiales no deba menospreciarse.

#### 1.4.5 Adquisición inmunidad y seroprevalencia

Por regla general, se cree que los anticuerpos adquiridos durante los primeros años de vida tras el contacto con el virus proporcionan inmunidad durante la edad adulta, pero esta protección se debilita en gente mayor.

Los estudios realizados de seroprevalencia indican que la mayoría de niños adquieren anticuerpos contra astrovirus cuando todavía son muy pequeños. Concretamente, en Norfolk, Virginia, se demostró que, a los 9 años, el 96% de los niños poseían anticuerpos contra HAstV-1 mientras que tan sólo el 43% de ellos tenía anticuerpos contra HAstV-3 (Mitchell *et al.*, 1999). Otro estudio realizado en Holanda, al analizar la presencia de anticuerpos en diferentes grupos de edad, demostró que, mientras que la mayoría de niños tenían anticuerpos contra HAstV-1, únicamente el 16% y el 10% tenían anticuerpos contra HAstV-6 y HAstV-7, respectivamente. Además también observaron que la adquisición de anticuerpos contra el serotipo HAstV-5 ocurría a una edad más avanzada y que por lo tanto la epidemiología de este serotipo podía ser relativamente distinta (Koopmans *et al.*, 1998). Actualmente, todavía no se dispone de datos sobre la seroprevalencia para el serotipo HAstV-8.

Tampoco se ha clarificado todavía el papel de la inmunidad cruzada entre diferentes serotipos en la protección de la enfermedad. Algunos datos parecen indicar que existe inmunidad homotípica pero no heterotípica. Tras analizar los brotes de gastroenteritis producidos por astrovirus en guarderías, Mitchell y col. (1999) observaron que en el 25% de las guarderías ocurrían brotes provocados por serotipos distintos durante el mismo año. Posteriormente, en Egipto se describieron casos de niños que sufrían infecciones por astrovirus HAstV-3 y HAstV-5 un tiempo después de haber sufrido una infección por HAstV-1. También observaron que la severidad de la gastroenteritis era menor durante el segundo episodio infeccioso (Naficy *et al.*, 2000).

Así pues, todos estos datos parecen indicar que no existe inmunidad heterotípica y que la adquisición de anticuerpos contra determinados serotipos tiene lugar con menor frecuencia o a una edad más avanzada. De acuerdo con estas afirmaciones, los principales brotes de astrovirus descritos en adultos se han asociado a serotipos poco comunes. Así, el brote producido entre los reclutas de una base militar en Francia se atribuyó al serotipo

HAstV-3 (Belliot *et al.*, 1997b); el brote de astrovirus en una escuela de secundaria en Japón fue causado por una cepa de serotipo HAstV-6 (Oishi *et al.*, 1994); y el brote producido en el condado de Marin, en California, fue causado por el serotipo HAstV-5 (Midthun *et al.*, 1993).

El sistema inmunitario de la mucosa intestinal juega un papel importante en la protección del individuo frente a repetidas infecciones con astrovirus. Los linfocitos T que residen en la lámina propia intestinal del intestino delgado reconocen los astrovirus de forma específica (Molberg *et al.*, 1998). Al activarse, estos linfocitos T CD4+ específicos para astrovirus producen citoquinas del subtipo 1, interferón gamma y factor de necrosis tumoral (TNF).

#### **1.4.6 Transmisión fecal-oral: astrovirus en el medio ambiente y focos de infección**

La transmisión de la infección de astrovirus ocurre fundamentalmente por la vía fecal-oral. La excreción de virus infecciosos en las heces de individuos contaminados puede llegar a contaminar el agua, alimentos o superficies, los cuales pueden representar a su vez nuevos focos de infección. El virus puede sobrevivir en el medio ambiente durante largos períodos de tiempo hasta que es ingerido por otro individuo en el que provoca una nueva infección (Abad *et al.*, 2001).

#### **1.4.7 Tratamiento y prevención**

Puesto que la gastroenteritis producida por astrovirus suele ser una enfermedad autolimitante y su sintomatología suele ser suave, por lo general, no se necesita ningún tratamiento específico; únicamente si se desarrollan problemas de deshidratación, se requerirá la aplicación de terapias de hidratación oral o intravenosa. Estos problemas de deshidratación suelen ocurrir en pacientes que ya tienen alguna otra enfermedad gastrointestinal, en pacientes con un estado de nutrición pobre, con infecciones mixtas severas o con enfermedades prolongadas. La administración de inmunoglobulina intravenosa puede ser eficiente en pacientes con inmunodeficiencias severas que no responden a las medidas terapéuticas normales, pero todavía no se conoce con exactitud la eficacia real de este tratamiento.

Debido a que se trata de una enfermedad de transmisión fecal-oral, la prevención de la infección se basa fundamentalmente en interrumpir las vías de transmisión del virus entre personas. Esto es especialmente importante en lugares como guarderías, hospitales, escuelas, residencias, etc. Por ello, en estos ambientes, cualquier medida higiénica debe extremarse. Debido a que el virus también puede transmitirse a través de agua o alimentos contaminados, también es especialmente importante lavar y manipular los alimentos

cuidadosamente y depurar adecuadamente el agua que irá destinada al consumo humano. La desinfección por adición de cloro libre al agua resulta ser menos eficiente sobre astrovirus que sobre otros virus como por ejemplo poliovirus (Abad *et al.*, 1997).

Tradicionalmente, el marisco ha sido uno de los alimentos más comúnmente relacionado con brotes de enfermedades provocadas por virus entéricos, sobre todo en individuos adultos. Aunque los astrovirus no se han visto todavía asociados a brotes de este tipo, sí que se han detectado por técnicas moleculares al analizar muestras de moluscos y ostras (Le Guyader *et al.*, 2000). Puesto que la excreción de virus en las heces puede proseguir aún cuando los síntomas ya se han normalizado, los manipuladores de alimentos deben extremar las precauciones para frenar la propagación del virus a través de comida contaminada.

Asimismo, también se ha visto que el contagio entre personas puede darse a través del contacto con superficies contaminadas, y por este motivo la descontaminación de superficies o *fomites* debe ser algo a tenerse en cuenta. Se ha observado que los astrovirus son bastante resistentes a la desinfección por alcohol y concretamente parece que las soluciones de metanol al 70% serían más efectivas que concentraciones equivalentes de isopropanol o etanol o que el metanol al 90% (Kurtz *et al.*, 1980).

#### **1.4.8 Perspectivas de futuro para una vacuna**

Actualmente, la mayoría de estudios realizados sobre astrovirus todavía van encaminados a evaluar con exactitud cuáles son las principales características epidemiológicas de estos virus y su importancia médica real en la población mundial. Una vez se disponga de esta información para diferentes regiones del mundo y se haya profundizado también en el conocimiento del grado de variabilidad estructural entre los distintos serotipos, podrá proseguirse con el desarrollo de una vacuna para prevenir la infección de astrovirus. Por otra parte, los datos de los que se disponen hasta ahora parecen indicar que la mayoría de infecciones por astrovirus tienen lugar en niños de menos de 2 años de edad. Por consiguiente, uno de los requerimientos de la posible vacuna sería que fuera capaz de inducir inmunidad en niños tan pequeños (Naficy *et al.*, 2000).



## 1.5 APOPTOSIS

### 1.5.1 Introducción general y definición

La apoptosis se puede definir como el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que concluyen con su muerte de una forma ordenada y silenciosa (Saraste & Pulkki, 2000.). A diferencia de la muerte celular por necrosis, en la apoptosis, la célula ejecuta una serie de programas celulares que la llevan a la muerte sin ocasionar daños en el tejido en el que se encuentra y permitiendo aprovechar al máximo todo su contenido celular. La sucesión de procesos durante la apoptosis o suicidio celular es tan ordenada que a menudo también se denomina muerte celular programada (PCD), y es un proceso requerido por la célula con la misma importancia que otros procesos celulares como por ejemplo la mitosis. El descubrimiento de este mecanismo de muerte celular controlado, durante la década de los 70, marcó una nueva época en muchos campos de estudio como la biología del desarrollo, la inmunología o la oncología.

La célula apoptótica sufre una serie de cambios morfológicos: la membrana citoplasmática se altera y aparece el característico *blebbing* (generación de pequeñas evaginaciones esféricas surgidas a partir de la membrana); el volumen celular se reduce considerablemente y el citoplasma se condensa; el núcleo se reduce y la cromatina se hace más densa. Finalmente, la célula apoptótica es fagocitada por macrófagos o por células vecinas, evitando así la respuesta inflamatoria local ocasionada en la necrosis cuando la célula, al romperse, libera su contenido al medio extracelular (Saraste & Pulkki, 2000).

En los organismos pluricelulares, la apoptosis es un proceso celular fisiológicamente necesario. De hecho, las primeras observaciones que se realizaron del

fenómeno de muerte celular programada fueron hechas en el campo de estudio del desarrollo embrionario. Además, también desempeña un papel importante en la regulación de la homeostasis, del recambio de células en los tejidos y en determinados procesos de selección celular, especialmente en el sistema nervioso e inmune (maduración de linfocitos T en el timo, eliminación de células infectadas por linfocitos T citotóxicos...). En consecuencia, la alteración de la apoptosis puede provocar numerosos trastornos patológicos, entre los cuales se incluyen trastornos neurodegenerativos, enfermedades autoinmunes y cáncer.

### 1.5.2 Apoptosis vs. Necrosis

Existen numerosas diferencias observables tanto morfológicas como bioquímicas entre los procesos celulares de apoptosis y necrosis. En general, la necrosis tiene lugar cuando las células quedan expuestas a condiciones extremadamente diferentes de las condiciones fisiológicas. No obstante, en condiciones fisiológicas, la membrana plasmática puede sufrir también daños, como por ejemplo, por ataque del complemento o por acción de determinados virus líticos. La Tabla 1.3 resume las principales diferencias entre ambos procesos de muerte celular.

### 1.5.3 Caspasas

Los estímulos inductores de apoptosis convergen hacia un punto común que implica la activación de las caspasas, verdaderos ejecutores del programa de muerte y responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que se producen en la célula. Las caspasas constituyen una familia de *cystein proteases*, altamente conservada a lo largo de la evolución, que producen cortes proteolíticos tras un residuo de ácido aspártico. Actualmente, se han descrito hasta 14 miembros de la familia (Denecker *et al.*, 2001). La síntesis de caspasas da lugar a un enzima inactivo o proenzima llamada procaspasa. La estructura de esta pro-caspasa distingue una región N-terminal muy variable tanto en secuencia como en longitud, que tiene funciones de regulación y activación, y una región catalítica que está formada por dos dominios, uno grande y otro pequeño, los cuales darán lugar a las dos subunidades del enzima una vez activado. Las señales apoptóticas provocan que estos enzimas sean procesados por autoproteólisis o por la intervención de otras proteasas, cortando el prodominio. De esta forma, el prodominio se pierde y el enzima activo queda formado por un heterodímero compuesto por la subunidad grande y la subunidad pequeña.

**Tabla 1.3** Características principales de los procesos de apoptosis y necrosis.

<b>APOPTOSIS vs NECROSIS</b>		
	<b>Apoptosis</b>	<b>Necrosis</b>
<b>Cambios Morfológicos</b>		
Tamaño y forma celular	Encogimiento Redondeamiento	Hinchamiento
Membrana plasmática	Continuidad preservada <i>Blebbing</i>	Pérdida de la integridad <i>Blebbing</i>
Núcleo	Picnosis Fragmentación nuclear Condensación cromatina	Lisis Disrupción membrana nuclear
Orgánulos citoplasmáticos	Intactos	Desintegrados
Mitocondrias	Intactas	Hinchamiento
Integridad celular	Fragmentación en cuerpos apoptóticos	Lisis celular total
<b>Cambios Bioquímicos</b>		
ADN nuclear	Fragmentación ordenada en fragmentos nucleosomales	Fragmentación al azar
Membrana plasmática	Translocación fosfatidil serina a la cara extracelular	Pérdida de funciones
Mitocondrias	Liberación citocromo c al citosol	Desintegración
Consumo de energía	Proceso activo	Proceso pasivo
Activación enzimática		
a) DNAsas	Sí	No
b) Proteasas	Sí (Caspasas)	No
Expresión génica celular	Normalmente se activa	No se activa
<b>Respuesta Tisular</b>		
Afectación	Células individuales	Grupos de células
Inflamación	No	Sí
Fagocitosis	Células vecinas y macrófagos	Macrófagos
<b>Estímulos</b>		
Estímulo general	Fisiológico (desarrollo embrionario, homeostasis...)	No-fisiológico
Estímulo específico	Unión receptores celulares Falta de factores de crecimiento Señales hormonales Toxicidad Incremento productos derivados del O <sub>2</sub> en la célula Daño en el ADN Infección vírica	Daño mecánico Ataque del complemento Toxicidad Radiación Hipoxia Isquemia Hipotermia Infección vírica lítica

Las caspasas se dividen en dos grupos según la longitud de su región reguladora N-terminal o prodominio. En primer lugar, las caspasas con prodominio largo parecen estar involucradas en funciones de regulación de la activación de la cascada apoptótica. Las caspasas mejor conocidas de este grupo son la procaspasa 8 y 10, las cuales contienen en sus prodominios repeticiones de una secuencia de interacción proteína-proteína llamada dominio efector de muerte o DED (*death effector domain*); y las procaspasas 1, 2, 4, 5 y 9, que contienen dominios de reclutamiento de caspasas o CARDs (*caspase recruitment domains*). Todas estas caspasas se conocen como caspasas iniciadoras.

En segundo lugar, se encuentran las caspasas con prodominio corto, las cuales a su vez corresponden a las caspasas efectoras. Así, en la cascada de amplificación de la señal apoptótica son activadas por alguna de las caspasas iniciadoras. Actúan proteolíticamente sobre multitud de sustratos celulares que son procesados de manera coordinada con la finalidad de hacerles perder su función o modificársela, de tal manera, que la organización celular resulte desmantelada.

El mecanismo de acción de su función enzimática es muy específico y eficaz. Cortan después de un residuo de aspártico, cuando existe en el sustrato una secuencia de reconocimiento compuesta por cuatro aminoácidos y que varía significativamente entre las diferentes caspasas. A la hora de estudiar el papel de las caspasas en distintos sistemas, se utilizan péptidos sintéticos inhibidores específicos, que compiten con los sustratos fisiológicos por el sitio activo del enzima.

#### **1.5.4 Mecanismos de apoptosis**

El inicio de la señal de apoptosis puede encontrarse tanto fuera de la célula, en los receptores de superficie, como dentro de ella respondiendo a estímulos de estrés celular a nivel de mitocondria o a disfunciones dentro del ciclo celular. De esta forma, se distinguen dos vías principales de inducción de apoptosis, las cuales se representan en la Fig. 1.4.

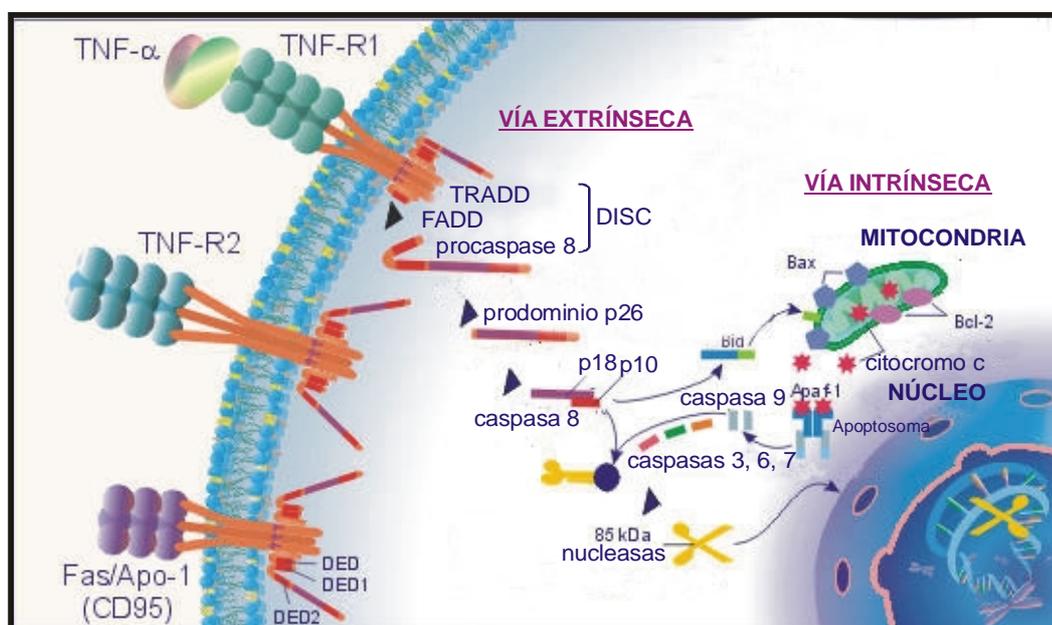
##### **1.5.4.1 Vía extrínseca o vía de los receptores de muerte**

Cuando el estímulo apoptótico proviene del exterior celular, se habla de vía extrínseca. Esta vía se desencadena por unión de determinados ligandos a receptores integrales de la membrana citoplasmática y resulta en la activación de la procaspasa 8. Tras la unión del ligando, se producen cambios conformacionales en las colas citoplasmáticas y se unen a ellas diferentes proteínas mediante su dominio de interacción proteína-proteína. El reclutamiento de la procaspasa 8 mediante la participación también de proteínas adaptadoras como TRADD o FADD disparan el autoprocesamiento de la procaspasa inducido por proximidad. El complejo proteico formado en este punto se denomina DISC (*death-inducing signaling complex*).

Los principales receptores que al ser estimulados inducen la activación de la cascada de señales que conducen a la apoptosis pertenecen a la superfamilia de los receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), cuyos miembros tienen en común un dominio extracelular rico en cisteína y una secuencia en el dominio intracitoplasmático que servirá para acoplar al receptor con el resto de la maquinaria apoptótica. Los receptores mejor caracterizados son la molécula Fas (CD95) y los receptores del TNF (TNFR).

Fas se expresa de forma bastante general en distintos tejidos. La proteína ha podido ser detectada en células epiteliales, fibroblastos, osteoblastos y ciertos tipos de células endoteliales. Por su parte, el ligando de Fas (FasL o CD95L) se expresa predominantemente en células T y NK activadas, lo cual demuestra su implicación en procesos fisiológicos relacionados con el sistema inmune.

El receptor 1 de TNF es una proteína que se expresa en la mayoría de los tipos celulares y su ligando es el TNF, una citoquina producida principalmente por macrófagos activados y células T en respuesta a la infección. A diferencia de la pareja formada por Fas/FasL, el par TNFR1/TNF es capaz de transmitir a la célula dos tipos de señales muy distintas entre sí: inducción de genes con carácter proinflamatorio e inmunomodulador y apoptosis.



**Fig. 1.4** Representación esquemática de las dos vías principales de inducción de apoptosis.

#### 1.5.4.2 Vía intrínseca o vía mitocondrial

La activación intrínseca de las procaspasas implica la liberación del citocromo c del espacio intermembrana mitocondrial al citosol de la célula y resulta en la activación de la procaspasa 9. En líneas generales, el estímulo intracelular provoca que la proteína Bcl-2, la

cual se encuentra en la membrana externa de las mitocondrias unida a la proteína Apaf-1, libere dicha proteína al citoplasma. Al mismo tiempo, otra proteína relacionada, denominada Bax, penetra en las membranas mitocondriales y provoca la liberación del citocromo c al citoplasma. El citocromo c liberado y las moléculas de Apaf-1 se unen a la procaspasa 9 y junto con ATP constituyen un complejo proteico denominado apoptosoma. En el apoptosoma, se produce la activación de la procaspasa 9 y se desencadena la cascada apoptótica.

Cabe destacar que todas las vías señalizadoras de apoptosis pueden interactuar entre sí en gran medida. De este modo, se ha visto que en numerosos tipos celulares la activación de la apoptosis por la vía extrínseca puede resultar también en la activación de la procaspasa 9 para amplificar la señal apoptótica al máximo (Denecker *et al.*, 2001; Kidd *et al.*, 2000). A su vez, las caspasas finales efectoras también pueden procesar de nuevo las caspasas iniciadoras para amplificar la señal.

### 1.5.5 Apoptosis y virus

Para que la replicación vírica resulte exitosa, no solo se requiere que el virus pueda replicar en la célula y producir suficiente progenie vírica, sino que el virus también necesita evadir los mecanismos de defensa del hospedador que infecta (Roulston *et al.*, 1999). Entre las respuestas antivíricas del hospedador, se encuentran la respuesta inmune celular, la respuesta inmune humoral o la síntesis de interferón.

Por regla general, también se ha visto que además de inducir una respuesta inmunitaria, la infección vírica puede constituir un estímulo en el interior de la célula que resulte en la activación de caspasas (Hardwick, 1998). Por ello, numerosos virus han desarrollado mecanismos para evitar esta destrucción celular y poder disponer de la maquinaria celular para su eficiente replicación.

No obstante, también existen virus que han desarrollado estrategias para inducir la apoptosis en la célula que infectan y obtener determinadas ventajas de dicha apoptosis. De este modo, al inducirse la apoptosis puede favorecerse la difusión de la progenie vírica a las células vecinas a través de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos. A su vez, y debido a que la muerte por apoptosis no provoca una respuesta inflamatoria en el tejido, una vez completado su ciclo replicativo, el virus puede infectar otras células evadiendo así la respuesta inmunitaria local. Por otro lado, aunque todavía se desconoce en gran medida el significado biológico que tiene para el virus, se ha visto que algunas proteínas víricas pueden ser substratos potenciales para determinadas caspasas activadas (Al-Molawi *et al.*, 2003; Eleouet *et al.*, 2000; Zhirnov *et al.*, 1999).

En conclusión, el éxito de la multiplicación vírica reside en último caso, en la capacidad del virus de bloquear o retrasar la apoptosis hasta que ha conseguido producir suficiente progenie vírica. En las etapas finales de la infección, una inducción de muerte celular por apoptosis de la célula infectada puede favorecer la propagación del virus sin tener que enfrentarse a la respuesta inmunitaria (O'Brien, 1998).

Por consiguiente, la lista de virus para los cuales se han descrito mecanismos de inducción y/o inhibición de apoptosis es cada vez más extensa, y la variedad de estrategias moleculares que afectan a diferentes puntos de las vías apoptóticas parece interminable. De este modo, un mejor conocimiento de las numerosas interacciones entre los virus y la respuesta apoptótica será seguro relevante para el diseño de nuevas terapias antivíricas.



## **2. OBJETIVOS**



## Objetivos

Los objetivos propuestos al comienzo del trabajo presentado en esta memoria fueron:

- Caracterizar las posibles funciones biológicas de la proteína no estructural nsP1a/4 de astrovirus.
- Estudiar la variabilidad genética de la región hipervariable contenida en la proteína nsP1a/4.
- Desarrollar un sistema de detección y tipado molecular por análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción para astrovirus.
- Aplicar el sistema de diagnóstico desarrollado en un estudio epidemiológico a gran escala sobre la población de la región de Barcelona.
- Caracterizar la respuesta celular apoptótica tras la infección por astrovirus en células CaCo-2.



### **3. ESTUDIO I: Caracterización de la proteína nsP1a/4 de astrovirus**



## ESTUDIO I: Caracterización de la proteína nsP1a/4 de astrovirus

### 3.1 Antecedentes

La traducción de las proteínas no estructurales (nsPs) de astrovirus tiene lugar a partir del ARN genómico en forma de 2 poliproteínas (nsP1a y nsP1a/1b), las cuales se procesan post-traduccionalmente por la acción de la proteasa vírica y de proteasas celulares. Una vez traducidas, estas proteínas no estructurales participan en la síntesis de la molécula completa de ARN complementaria de polaridad negativa, la cual servirá de molde para la síntesis de nuevas moléculas de ARN genómico y de moléculas de ARN subgenómico. A partir de dicho ARN subgenómico, el cual contiene el ORF2 completo y está poliadenilado, se sintetizan grandes cantidades de proteínas estructurales (Matsui *et al.*, 2001). Tanto la organización genómica de astrovirus como sus estrategias de replicación/transcripción se han comparado a menudo con el ciclo biológico de alfavirus debido a que existen entre ellos numerosos paralelismos.

Todavía se desconoce cuál es la función de la mayoría de los productos finales resultantes del procesamiento de la poliproteína nsP1a. Por el análisis de la secuencia, se ha hipotetizado la presencia de un motivo 3C serin proteasa (PRO), una señal de localización nuclear (NLS), así como también varios dominios transmembrana (TM) cercanos al extremo N-terminal (Jiang *et al.*, 1993; Jonassen *et al.*, 2003). A pesar de que la mayoría de virus ARN cuyo genoma supera las 6 kb codifican para una helicasa, en el genoma de astrovirus no se ha identificado todavía ningún dominio de este tipo (Jiang *et al.*, 1993). Hace unos años, se caracterizó parcialmente la presencia de un epítipo inmunoreactivo (IRE) cerca del extremo C-terminal del ORF1a (Matsui *et al.*, 1993). Además, distintos autores han identificado una región hipervariable (HVR) cercana a este epítipo, en aislamientos de HAstV-1 (Willcocks *et al.*, 1994a), HAstV-3 (Oh & Schreier, 2001) y HAstV-8 (Méndez-Toss *et al.*, 2000). Cabe

destacar que en la misma región, también se ha identificado una delección de 45 nt en determinadas cepas y que dicha delección ha sido relacionada con fenómenos de adaptación del virus a determinadas líneas celulares (Willcocks *et al.*, 1994a). Recientemente, el análisis computacional del producto nsP1a reveló la presencia de dos regiones en estructura *coiled coil* (CC) situadas en el extremo N-terminal de la poliproteína y *upstream* de la secuencia NLS (Jonassen *et al.*, 2003). Además, los mismos autores describieron un elevado grado de similitud entre la potencial señal NLS de astrovirus y determinadas proteínas de calicivirus unidas a su genoma.

Los datos que existen sobre el procesamiento de la poliproteína nsP1a de HAstV-1 *in vitro* sugieren que se procesa entre los residuos Gln<sub>567</sub>/Thr<sub>568</sub>, en un proceso que es dependiente de la proteasa vírica y que resulta en dos fragmentos. El fragmento N-terminal resultante contendría el motivo PRO (p64), mientras que el fragmento del extremo C-terminal incluiría la señal NLS y el IRE (p38) (Kiang & Matsui, 2002). Sin embargo, un trabajo posterior realizado sobre células BHK transfectadas sugiere la existencia de un lugar de corte cercano al aminoácido 170 de la proteína y 2 lugares de corte alrededor de los residuos 410 y 655. Según los autores, la proteasa vírica sería únicamente responsable de estos dos últimos procesamientos (Geigenmüller *et al.*, 2002a). Todavía no está claro si tan sólo uno de estos dos modelos es el correcto o si todos los lugares de corte son realmente funcionales. En cualquier caso, se cree que la poliproteína nsP1a sería procesada tanto por la proteasa vírica como por proteasas celulares resultando en al menos 4 productos finales denominados nsP1a/1, nsP1a/2, nsP1a/3 y nsP1a/4 (ver Fig. 1.2 de la pág. 16). Un trabajo reciente realizado por Méndez y col. (2003) propone que el corte proteolítico que tiene lugar alrededor del aminoácido 170, tendría lugar concretamente entre los residuos Ala<sub>174</sub>/His<sub>175</sub>, y detecta por ensayos de inmunoprecipitación en células CaCo-2 con anticuerpos específicos contra las 4 proteínas teóricas, bandas de 20 y 27 kDa, atribuyéndolas respectivamente a la proteína nsP1a/1 y a la proteína nsP1a/3 que contiene el motivo proteasa. Únicamente consiguen detectar una banda de 20 kDa utilizando el anticuerpo específico de nsP1a/4 en extractos de células BHK-21 transfectadas, pero no en células CaCo-2.

El objetivo principal de este estudio fue caracterizar la localización subcelular de la potencial proteína no estructural nsP1a/4, resultante del procesamiento entre los aminoácidos Gln<sub>567</sub>/Thr<sub>568</sub> del ORF1a (Kiang & Matsui, 2002), y estudiar cuál es el significado del elevado nivel de variabilidad genética descrita en la región comprendida dentro de dicha proteína. Los resultados de las búsquedas de homología y las predicciones realizadas con modelos informáticos, junto con las diferencias observadas entre diferentes subgenotipos de HAstV definidos en base a la variabilidad genética en dicha región, a nivel de sus propiedades replicativas, sugieren que la proteína nsP1a/4 desempeña un papel en la modulación de la replicación del ARN vírico.

## **3.2 Material y métodos**

### **3.2.1 Virus, líneas celulares**

Para realizar este estudio se utilizó la línea celular CaCo-2 y la cepa de astrovirus HAstV-4 (p23795) adaptada a cultivo celular y gentilmente cedida por W. D. Cubitt del Great Ormond Street Hospital for Children, en Londres. En el apartado 8.1 del apéndice material y métodos se encuentran los detalles sobre la manipulación y las características de dicha línea celular y de la cepa vírica utilizada.

### **3.2.2 Anticuerpos**

Para la caracterización de la proteína nsP1a/4, se sintetizó un péptido sintético de 15 residuos (QPLDLSQKKEKQPEH) correspondiente al pico de hidrofiliidad del ORF1a, según el modelo descrito por Hopp y Woods (1981), y se inoculó peritonealmente a ratones junto con adyuvante completo de Freund para inducir la producción de líquido ascítico y producir un anticuerpo policlonal contra dicha secuencia de aminoácidos (ver apartados 8.3 y 8.4 del apéndice material y métodos). Para utilizarlos como controles negativos se generaron líquidos ascíticos por inoculación de PBS diluido 1:10 en adyuvante completo de Freund (FCA). El anticuerpo específico contra el péptido sintético se denominó anti-1a778-792. El anticuerpo policlonal de conejo contra partículas purificadas de HAstV-1 (anti-HAstV-1) fue cedido por gentileza del Dr. D. M. Bass de Stanford University (USA).

### **3.2.3 Inmunofluorescencia**

Para los estudios de co-localización subcelular de la proteína nsP1a/4 y de las proteínas estructurales del virus, se infectaron células CaCo-2 de 3 días crecidas sobre cubreobjetos de vidrio, utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 0.5. Los protocolos utilizados para la infección y para la inmunofluorescencia se detallan en los apartados 8.2 y 8.12 del apéndice material y métodos respectivamente. En la inmunofluorescencia se utilizó una mezcla de dos anticuerpos primarios: el anticuepro policlonal de ratón anti-1a778-792 y un anticuerpo policlonal de conejo anti-HAstV-1. Como anticuerpos secundarios se utilizó una mezcla de anti-IgG de ratón marcado con Cy-3 y anti-IgG de conejo marcado con FITC.

### **3.2.4 Microscopía electrónica**

El análisis ultraestructural de células CaCo-2 infectadas a las 48 h p.i., se realizó por microscopía electrónica de transmisión, siguiendo el protocolo detallado en el apartado 8.13 del apéndice material y métodos. Para la inmunolocalización del antígeno nsP1a/4 por microscopía electrónica con el anticuerpo anti-1a778-792, se utilizaron células infectadas con una MOI de 5, a las 48 h p.i.

### 3.2.5 Inmunoprecipitación

Los ensayos de inmunoprecipitación de la proteína nsP1a/4, se realizaron a partir de extractos celulares (ver apartado 8.7 del apéndice material y métodos) obtenidos a partir de cultivos de  $2 \times 10^6$  células CaCo-2 infectadas (MOI de 5) y no infectadas, a las 48 h p.i. El protocolo se detalla en el apartado 8.9 del apéndice material y métodos. En la inmunoprecipitación se utilizó el anticuerpo específico anti-1a778-792 y el control negativo FCA, mientras que la detección de las proteínas inmunoprecipitadas se realizó por *western blotting* utilizando el mismo anticuerpo anti-1a778-792 a una dilución de trabajo 1:10 (ver apartado 8.11 del apéndice material y métodos).

### 3.2.6 Análisis proteómicos computacionales

Para el análisis bioinformático de secuencias de astrovirus, se utilizaron las 5 secuencias del genoma completo de astrovirus humanos disponibles en *Genbank* (Núm. de Acceso: L23513 para la cepa de HAstV-1 de referencia de Oxford, Z25771 para la cepa de HAstV-1 de Newcastle, L13745 para la cepa de HAstV-2 de referencia de Oxford, AF141381 para la cepa de HAstV-3 de Rostock y AF260508 para la cepa de HAstV-8 Yuc-8). La predicción de la estructura secundaria consenso se realizó con el programa Network Protein Server Analysis (Combet *et al.*, 2000). La presencia de potenciales estructuras *coiled coil* fue analizada con el programa COILS versión 2.2 de la red del EMB (Lupas, 1996). Las secuencias se analizaron contra la base de datos PROSITE para detectar posibles motivos funcionales (Hofmann *et al.*, 1999), utilizando el servidor PredictProtein. Para la identificación de potenciales sitios de fosforilación se utilizó el programa NetPhos 2.0 (Blom *et al.*, 1999) y un *cut off* de 0.7 para el valor de predicción. El programa SAPS se utilizó para evaluar una gran variedad de propiedades de las secuencias de aminoácidos siguiendo criterios estadísticos (Brendel *et al.*, 1992). Entre dichas propiedades se analizó la presencia de *clusters* de aminoácidos de carácter ácido o básico y distintas estructuras repetitivas. El cálculo del peso molecular teórico de las proteínas se realizó con el programa Compute pI/Mw Tool (Bjellqvist *et al.*, 1993). También se llevó a cabo una búsqueda de proteínas homólogas utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCB (Altschul *et al.*, 1990).

Las direcciones de los servidores de internet que dan acceso a la mayoría de los programas bioinformáticos citados, se resumen en la Tabla 8.2 del apéndice material y métodos.

### 3.2.7 Colección de muestras fecales de astrovirus

A partir del estudio epidemiológico llevado a cabo durante la realización de esta tesis (ver Estudio III), se construyó una colección de 46 muestras de heces de niños con

gastroenteritis positivas para distintos serotipos, para su cuantificación y análisis de la variabilidad genética.

### 3.2.8 Análisis de la variabilidad genética

La variabilidad genética se analizó sobre la región hipervariable (HVR) ubicada cerca del extremo C-terminal de la proteína nsP1a/4 (entre los nt 2360-2555 de la cepa de referencia de Oxford HAstV-1; núm. acceso L23513). Se utilizaron los oligonucleótidos A1 y A2 para amplificar por RT-PCR un fragmento de longitud variable entre cepas (192-237 pb). La RT-PCR se realizó a partir del ARN purificado de 50 µl de la suspensión fecal al 10% (p/v). Las condiciones para la realización de la suspensión fecal, la extracción de ARN y la reacción de RT-PCR se detallan en los apartados 8.5, 8.23 y 8.24 del apéndice material y métodos, respectivamente. La concentración final de MgCl<sub>2</sub> en la reacción de PCR fue de 2 mM y el programa utilizado fue una desnaturalización inicial de 3' a 95 °C, 40 ciclos de 30'' a 94 °C, 30'' a 55 °C y 30'' a 72 °C, y una extensión final de 7' a 72 °C.

Después de analizar el producto de la RT-PCR por gel de agarosa al 1.5%, los fragmentos de ADN fueron secuenciados con los dos oligonucleótidos (ver apartados 8.29 del apéndice material y métodos). Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron alineadas mediante el programa CLUSTAL W (Higgins *et al.*, 1994), ubicando las inserciones y deleciones (*indels*) según su posición en el alineamiento de aminoácidos. Finalmente, se definieron diferentes subgenotipos de HAstV según la variabilidad genética observada y se estableció un sistema de tipado molecular. Los distintos tipos de HAstV se denominaron con letras mayúsculas (ver Estudio II).

### 3.2.9 Cuantificación de astrovirus en muestras fecales

El número de moléculas de ARN genómico por gramo de heces se calculó por RT-PCR competitiva utilizando un control interno de ARN, siguiendo el protocolo descrito por Caballero y col. (2003).

### 3.2.10 Adaptación de astrovirus a la línea celular CaCo-2

Diferentes cepas salvajes de HAstV pertenecientes a diferentes subgenotipos se adaptaron a cultivo celular utilizando células CaCo-2. Tras una descontaminación de la suspensión fecal al 10% (p/v) con un tratamiento con cloroformo al 30% (ver apartado 8.6 del apéndice material y métodos), se inocularon monocapas de células CaCo-2 siguiendo el protocolo de infección habitual (ver apartado 8.2 del apéndice material y métodos).

### 3.2.11 Comparación de la producción de virus infecciosos

La capacidad de producción y liberación de virus infecciosos en el medio de cultivo de los distintos subgenotipos de HAstV adaptados a cultivo celular se evaluó titulando el número de virus infecciosos presentes en el sobrenadante del medio de cultivo a las 48 h p.i. (MOI de 0.01), siguiendo el protocolo descrito por Abad y col. (1997). Brevemente, el proceso consiste en infectar una placa de 24 pocillos de células CaCo-2 con diluciones seriadas en base 10 del sobrenadante a titular. Tras 6 días de incubación a 37 °C, se evalúa por RT-PCR la presencia de virus en el medio de cultivo de cada pocillo y el título infeccioso se expresa como partículas infecciosas por ml, teniendo en cuenta la última dilución positiva por RT-PCR.

### 3.2.12 Análisis de la síntesis de ARN

Tras infectar aproximadamente  $2 \times 10^6$  células CaCo-2 con diferentes subgenotipos de HAstV, utilizando una MOI de 0.01, se preparó un extracto de membranas a las 48 h p.i., siguiendo el protocolo detallado en el apartado 8.8 del apéndice material y métodos. El volumen completo de extracto final se sometía a una extracción de ácidos nucleicos para purificar el ARN vírico (apartado 8.23 del apéndice material y métodos) y finalmente se titulaba por *end-point dilution RT-PCR* utilizando 2 pares de oligonucleótidos correspondientes a dos zonas distintas del genoma (ORF1a y ORF2), y utilizando en reacciones independientes de RT el oligonucleótido *forward* o el *reverse*, con el objetivo de titular tanto la cadena de ARN (+) como la (-).

Para la región del ORF1a se utilizaron los oligonucleótidos A1 y A2 con varias modificaciones (A1-F, A1-C y A2-C) para evitar *mismatches* entre los diferentes subgenotipos. Para la región del ORF2 se utilizaron los oligonucleótidos A4673 y A4844 para la detección del ARN (-) y (+) respectivamente. Las secuencias de los oligonucleótidos se encuentran en la Tabla 8.1 del apéndice material y métodos. Tras analizar los productos de RT-PCR en geles de acrilamida al 8% TBE 1X, el título de ARN se expresó como logaritmo de las unidades de RT-PCR por ml. Todos los experimentos se realizaron como mínimo por duplicado.

## 3.3 Resultados

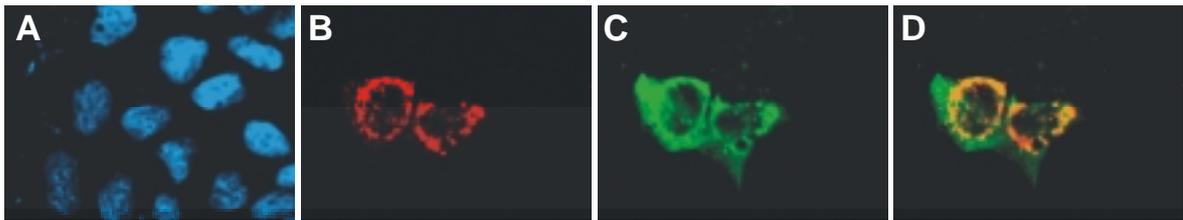
### 3.3.1 Caracterización biológica de la proteína nsP1a/4

Se estudió la localización subcelular de la proteína nsP1a/4 mediante varias técnicas inmunológicas utilizando un anticuerpo policlonal de ratón producido contra un péptido sintético correspondiente al pico más alto de hidrofiliidad de la secuencia completa del ORF1a (anti-1a778-792). Dicha secuencia de aminoácidos está también en la región

hipervariable del virus previamente descrita por varios autores (Méndez-Toss *et al.*, 2000; Oh & Schreier, 2001; Willcocks *et al.*, 1994a).

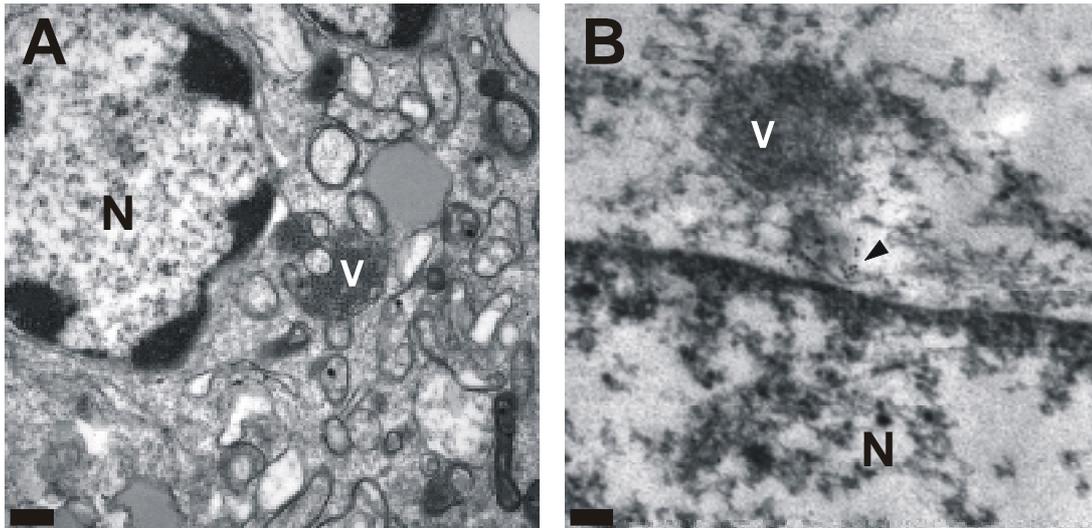
En primer lugar, se realizó un análisis de inmunofluorescencia con doble marcaje de la proteína nsP1a/4 y de las proteínas estructurales del virus, utilizando el anti-1a778-792 y el anticuerpo policlonal de conejo anti-HAstV-1. A pesar de que no se observó una co-localización total de ambos antígenos, los dos anticuerpos mostraron un marcaje predominantemente citoplasmático (Fig. 3.1). Mientras que la expresión de las proteínas estructurales mostraba una señal de fluorescencia ampliamente distribuida por todo el citoplasma, el marcaje de la proteína nsP1a/4 consistía en acumulaciones muy brillantes de fluorescencia concentradas a lo largo de la región perinuclear y con un aspecto mucho más granular, típico de un marcaje derivado de agregados de membrana.

Un análisis de la cinética de expresión de ambas proteínas a lo largo del tiempo indicó que mientras que los niveles de expresión eran muy elevados tanto a las 24 h, como a las 48 h o a las 72 h p.i., eran indetectables a las 6 h p.i.



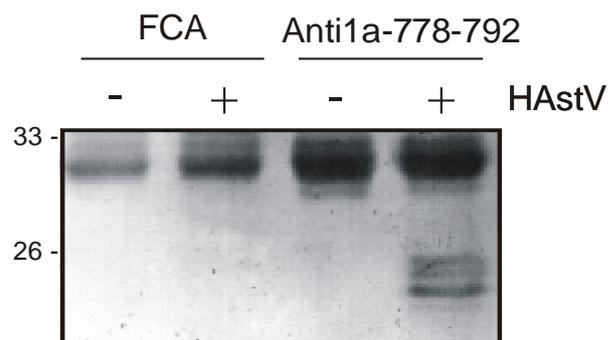
**Fig. 3.1** Resultados del análisis de doble marcaje por inmunofluorescencia a las 48 h p.i. (A) Tinción nuclear con DAPI. (B) Inmunofluorescencia anti-1a778-792. (C) Inmunofluorescencia anti-HAstV-1. (D) Análisis co-localización doble inmunofluorescencia.

Las células CaCo-2 infectadas también se examinaron por microscopía electrónica e inmunoelectromicroscopía. Los agregados de partículas víricas se observaban predominantemente cercanos a la periferia nuclear, rodeados por un gran número de vacuolas que parecían resultar de una intensa proliferación y redistribución de endomembranas celulares y de fusión de vesículas (Fig. 3.2A). El ensayo de inmunoelectromicroscopía con el anticuerpo anti-1a778-792 tras una fijación de las células mucho más suave mostraba marcaje de oro en pequeñas membranas acumuladas en la región perinuclear (Fig. 3.2B).



**Fig. 3.2** Análisis por microscopía electrónica. (A) Ultraestructura células CaCo-2 infectadas a las 48 h p.i. (B) Immunoelectromicroscopía de células CaCo-2 infectadas con anticuerpo anti-1a778-792. N: núcleo, v: agregados de partículas víricas. Las flechas indican áreas positivas para el marcaje inmunológico.

Finalmente, extractos celulares de células CaCo-2 fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-1a778-792 y analizados por *western blotting* después de separar las proteínas inmunoprecipitadas por gel de acrilamida SDS-PAGE. Como control negativos se utilizaron también ascites de ratones que no habían recibido el péptido sintético (FCA). Tras la inmunoprecipitación, el anticuerpo anti-1a778-792 no reaccionó únicamente con una banda del tamaño esperado de 38 kDa, sino que reaccionó con varias proteínas cuyos pesos moleculares oscilaban entre 24-26 kDa (Fig. 3.3).



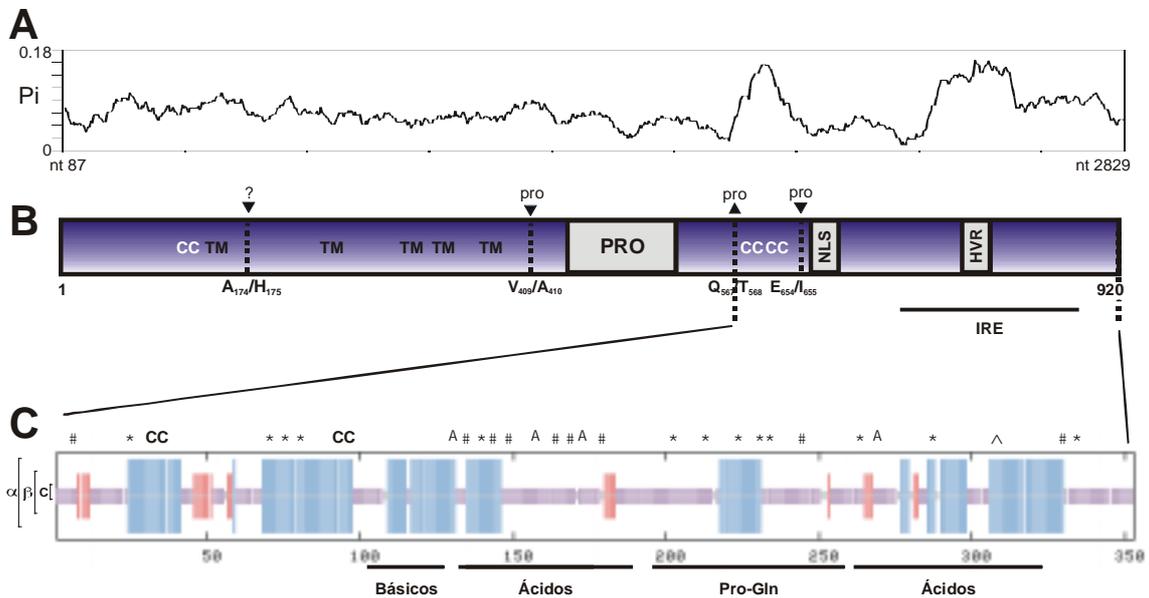
**Fig. 3.3** Resultados de la inmunoprecipitación de extractos celulares de células CaCo-2 infectadas y no infectadas utilizando el anticuerpo anti-1a778-8792 y un antisuero producido contra adyuvante de Freund (FCA) como control negativo. El peso molecular (kDa) se indica a la izquierda.

Estos resultados sugieren que la proteína nsP1a/4, la cual según los distintos lugares de corte publicados tiene un peso molecular teórico de 40.1 kDa (Kiang & Matsui, 2002) o de 30.6 kDa (Geigenmüller *et al.*, 2002a) es procesada hasta dar lugar a proteínas de menor peso

molecular. La identificación de al menos tres bandas con distinta movilidad electroforética podría deberse al reconocimiento de varias proteínas precursoras o también podría ser reflejo de la existencia de algún tipo de modificación post-traducciona, como la glicosilación o la fosforilación.

### 3.3.2 Análisis proteómicos computacionales.

Con el fin de obtener información sobre las posibles modificaciones post-traduccionales que podría sufrir la proteína nsP1a/4 y sobre otras características de la proteína, se utilizaron varios programas bioinformáticos de predicción para realizar un análisis proteómico computacional de dicha proteína. Las secuencias que se utilizaron en este análisis fueron las 5 secuencias del genoma completo de HAstV correspondientes a 4 serotipos diferentes. Los resultados se resumen en la Fig. 3.4.



**Fig. 3.4** Representación esquemática del ORF1a de HAstV. (A) Variabilidad genética a lo largo de la región codificante para nsP1a, estimada por el parámetro Pi (Jukes-Cantor) utilizando el programa DnaSP. Las posiciones hacen referencia a los nucleótidos en la cepa HAstV-1 de Oxford (Núm. acceso L23513). (B) Diagrama del producto nsP1a total. Las posiciones de aminoácido hacen referencia a la misma cepa). TM: Hélices transmembrana; PRO: motivo proteasa; NLS: región de localización nuclear; IRE: epítipo inmunoreactivo; CC: *coiled coil*; HVR: región hipervariable. Las flechas en negro indican potenciales lugares de corte, dependientes tanto de la proteasa vírica (pro) como de proteasas celulares (?). (C) Predicción de la estructura secundaria de la proteína nsP1a/4. A la izquierda se muestran tanto las conformaciones en hélices  $\alpha$  como láminas  $\beta$ , codificadas también por colores. Las potenciales modificaciones post-traduccionales están representadas mediante símbolos (\*: fosforilación en Ser/Thr; #: fosforilación en Tyr; ^: glicosilación en Asn), así como también los *clusters* de aminoácidos ácidos (A) y las estructuras *coiled coil* (CC).

El análisis de la estructura secundaria de la proteína reveló la presencia de muchas hélices  $\alpha$ , así como también de varias estructuras del tipo *coiled coil*, tal y como se había

descrito con anterioridad (Jonassen *et al.*, 2003). Las estructuras *coiled coil* desempeñan una gran variedad de funciones, entre las cuales se encuentran la formación de grandes estructuras rígidas, la formación del esqueleto de complejos de regulación o incluso la unión al ADN (Lupas, 1996). En los resultados de nuestro análisis, la proporción de residuos aminoacídicos a los que no les fue asignada una determinada conformación de estructura secundaria fue mayor para la región del ORF1a centro de nuestro estudio, que para otras regiones del genoma, lo cual sugiere un mayor grado de flexibilidad estructural asociada a esta región. Además, también se pudieron describir motivos potenciales de modificación post-traducciona, tales como dos lugares de glicosilación en Asn y numerosos lugares de fosforilación en Ser/Thr (proteína quinasa C (PKC) o caseína quinasa II (CKII)) y de fosforilación en Tyr.

A raíz del análisis comparativo entre la composición de aminoácidos de la proteína nsP1a/4 y otras proteínas víricas, pudieron definirse varios dominios: un *cluster* de aminoácidos básicos, ubicado entre los aa 665-686 de nsP1a y que corresponde a la señal NLS previamente identificada (12 Lys+Arg en una región de 22 aa, 54.5%); un dominio ácido cargado negativamente ubicado entre los aa 690-749 de nsP1a (25 Asp+Glu en una región de 60 aa, 41.6%); una región rica en prolinas y glutaminas ubicada entre los aa 755-818 de nsP1a (11 Pro y 9 Gln en una región de 64 aa, 17.2% y 14.1%, respectivamente); y un dominio ácido ubicado entre los aa 821-890 de nsP1a (15 Asp+Glu en una región de 70 aa, 21.4%) (las posiciones de aa hacen referencia a la cepa de HAstV-1 de referencia, núm. acceso L23513). En general, las regiones ricas en aminoácidos ácidos, prolinas y glutaminas, en las cuales no se describe ninguna secuencia consenso, se han asociado a motivos presentes en dominios de factores de transcripción (Mermoud *et al.*, 1989). Además, también se detectó un elevado número de *clusters* de aminoácidos ácidos compuestos por al menos 4 aminoácidos de naturaleza ácida seguidos (A).

Cabe destacar que todos los motivos descritos a lo largo de la proteína nsP1a/4 estaban altamente conservados entre los diferentes serotipos, a excepción de la región hipervariable de aproximadamente 65 aa, ubicada entre las posiciones 758-823 de nsP1a (Núm. acceso L23513). Entre los diferentes serotipos de HAstV, esta región hipervariable varía enormemente tanto en longitud como en composición de aminoácidos, y el número y posición de los potenciales lugares de fosforilación también son muy variables (ver más adelante), lo cual sugiere que dichos motivos podrían desempeñar diferentes funciones biológicas según las distintas variantes de la proteína nsP1a/4.

Con el objetivo de identificar proteínas de otras familias víricas con cierto grado de similitud con la proteína nsP1a/4 de HAstV, se realizó una búsqueda computacional de homologías utilizando el programa BLAST. A diferencia de otras proteínas no estructurales, las cuales muestran grandes homologías con proteínas de otros virus ARN de polaridad positiva, todas las proteínas resultantes de la búsqueda únicamente mostraron niveles de

homología y similitud relativamente débiles. Los resultados más relevantes fueron proteínas de familias víricas que pertenecen tanto a la superfamilia *picornavirus-like* como *alphavirus-like*. Concretamente, una región de 45 aa (aa 803-847 de L23513) mostró homología con el dominio N-terminal de la poliproteína codificada por el RNA2 del *grapevine fanleaf virus* de la familia de virus de plantas *Comoviridae*, con un 42% de similitud (Núm. acceso P18474). Otra región de 18 aa (aa757-774 de L23513) mostró homología con la proteína no estructural nsP3 de *Mayaro virus*, miembro de la familia *Alphaviridae*, con un 61% de similitud (Núm. acceso AAL79763). Una característica interesante compartida por ambas proteínas es que su función está relacionada con la formación del complejo de replicación del ARN.

### 3.3.3 Análisis de la variabilidad genética: asociación entre subgenotipo y carga vírica en muestras fecales.

Para analizar con detalle el nivel de variabilidad genética de la región hipervariable entre diferentes cepas, se secuenció esta región de aproximadamente 50 aminoácidos de una colección de 46 muestras clínicas pertenecientes a diferentes serotipos. Se encontraron numerosas inserciones y deleciones (*indels*), así como también muchas sustituciones de aminoácidos, sin observar una correlación completa con la información de serotipo. Aproximadamente el 50% de las sustituciones de nucleótidos detectadas fueron no sinónimas, y únicamente el 9% de todas las sustituciones de aminoácidos fueron conservativas, confirmando así la elevada variabilidad de esta proteína.

En base a esta variabilidad genética, se definieron diferentes subgenotipos de HAstV (ver Estudio II). De esta forma, las 46 cepas de HAstV se dividieron en 5 subgenotipos diferentes, los cuales fueron denominados con letras mayúsculas (HAstV-A, HAstV-BE, HAstV-C, HAstV-D, y HAstV-FP). Las secuencias de aminoácidos más prevalentes dentro de cada subgenotipo se muestran en la Fig. 3.5, así como también el elevado nivel de variabilidad en el número y posición de los potenciales lugares de fosforilación (señalados en negrita). Cabe destacar, que 3 de las 4 inserciones de aminoácidos encontradas implicaban la aparición de un nuevo lugar de fosforilación, y que 5 de las 14 variaciones de aminoácidos (35.7%) implicaban la adición de una nueva diana de fosforilación.

Finalmente, se analizó la carga vírica presente en las suspensiones fecales de 33 de la 46 muestras por ensayo competitivo por RT-PCR (Caballero *et al.*, 2003). La media del título vírico calculado para cada subgenotipo se muestra en la Fig. 3.5 y el análisis ANOVA de la varianza indicó la existencia de diferencias significativas entre el número de genomas por gramo de heces en las muestras pertenecientes a diferentes subgenotipos. Así, el subgenotipo HAstV-C ( $11.96 \pm 0.35$ ) y el subgenotipo HAstV-D ( $11.92 \pm 0.43$ ) mostraron una carga vírica significativamente más elevada, en comparación al resto de subgenotipos ( $p < 0.05$ ). El momento de la toma de muestra, un factor que podría ser relevante y afectar al título vírico, no explicaría las diferencias observadas entre subgenotipos, pues todas las muestras de

gastroenteritis fueron tomadas entre los días 1 y 3 después del inicio de los síntomas (Caballero *et al.*, 2003).

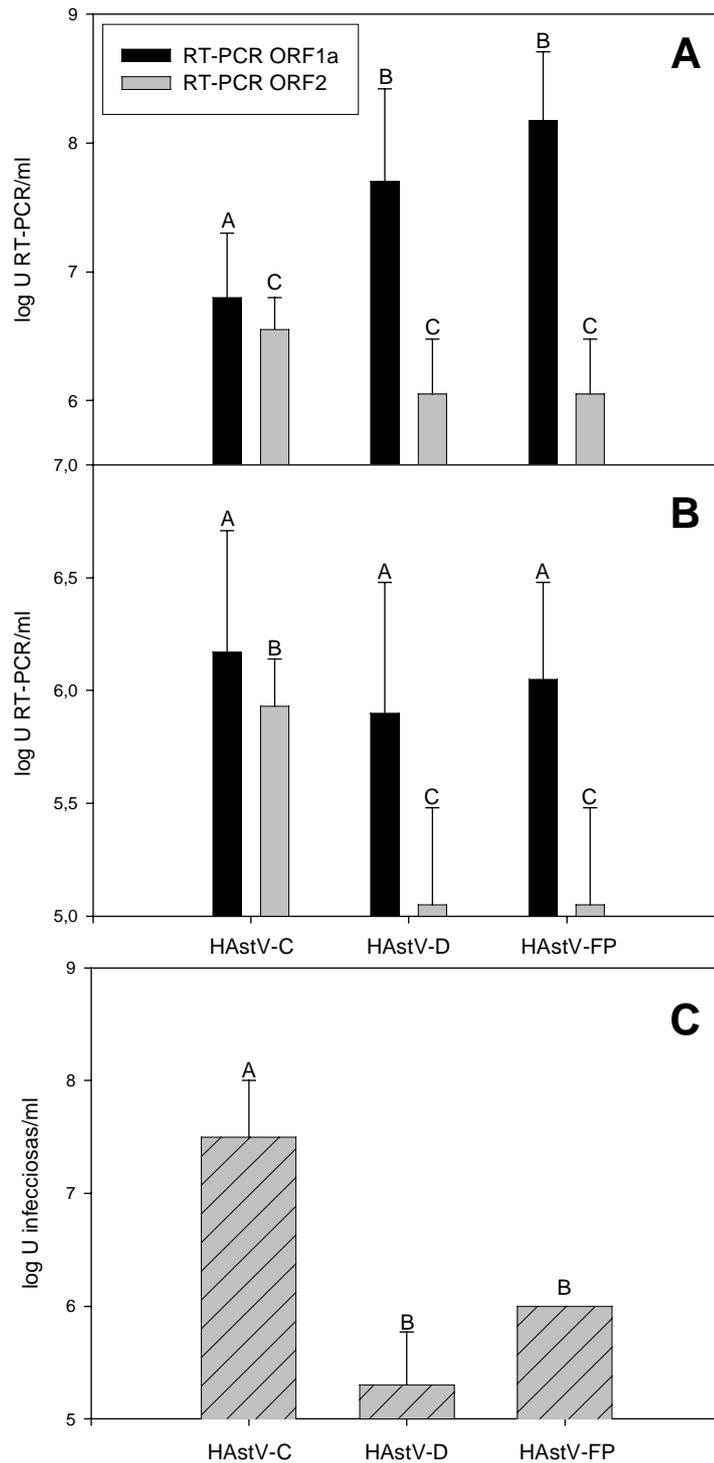
		Media±SD del log Genomas/gramo (n)
HAsT-V-C	--QQTNTS <b>QKSHPELE</b> -----AESQPLDLSQKK-----EKQPEHEQQAVKPIKPKQKNEPQ <b>PYSQTYGK</b>	11.96 ± 0.35 (7)*
HAsT-V-D	-----KPCPEPE-----TEAQPLDLSQKK-----EKQPEQEQQVAKPTK <b>SQKSE</b> PQP <b>YSQTYGK</b>	11.92 ± 0.43 (5)*
HAsT-V-BE	-----KPCPEPE <b>SNK</b> PALTEAQPLDLSQKK-----EK <b>TE</b> HEQQMAKPVKHQK <b>SE</b> PQP <b>YSQTYGK</b>	10.80 ± 0.67 (9)
HAsT-V-FP	<b>VLTSSE</b> KLKPCPEPE-----AEAQPLDLSQKKAENPEKQPEYETQVVKP-K <b>PQKSE</b> PQP <b>YSQTYGK</b>	10.67 ± 0.36 (7)
HAsT-V-A	-----KICPEPE-----AETQPLDLSQKK-----EKQPEHEQQVVK <b>STK</b> PQKNEPQ <b>PYSQTYGK</b>	10.45 ± 0.24 (5)
	* * * * :*:***** **.* *:*. * *.*****	

**Fig. 3.5** Alineamiento de aminoácidos de la región hipervariable del ORF1a, utilizando las secuencias más prevalentes de cada tipo. A la derecha del alineamiento, se muestra la media del título logarítmico de genomas víricos por gramo de materia fecal y el error estándar (SD) obtenido a partir de diferentes pacientes (n). El \* indica una diferencia estadísticamente significativa (p<0.05). En negrita, se destacan los potenciales lugares de fosforilación para cada secuencia.

La posible implicación de la proteína nsP1a/4 en la replicación del ARN y el elevado nivel de variabilidad observado en la región estudiada podrían explicar parcialmente las diferencias en la carga vírica presente en las heces pertenecientes a diferentes subgenotipos de HAsT-V.

### 3.3.4 Comparación de la productividad vírica entre diferentes subgenotipos.

El siguiente paso fue seleccionar una serie de cepas de HAsT-V pertenecientes a diferentes subgenotipos para profundizar en la caracterización de su capacidad de productividad vírica y sus estrategias de replicación del ARN. Así, se seleccionaron 2 cepas salvajes de los subgenotipos HAsT-V-C, HAsT-V-D y HAsT-V-FP y se adaptaron a cultivo celular en la línea CaCo-2. La productividad vírica y diferentes propiedades de la replicación del ARN se analizaron evaluando el título de virus infecciosos presente en el sobrenadante del medio de cultivo de células infectadas, y titulando el número de cadenas de ARN positivas y negativas en extractos de membranas celulares de cultivos infectados a las 48 h p.i. Para la titulación del ARN vírico por RT-PCR, se utilizaron dos pares de oligonucleótidos pertenecientes a diferentes regiones del genoma y se llevaron a cabo dos reacciones de RT independientes con el oligonucleótido *forward* o *reverse* con el fin de detectar, por separado, tanto la cadena negativa como la positiva. De este modo, los oligonucleótidos A1 y A2 (ORF1a) detectarían las cadenas de ARN genómica y antigenómica, mientras que los oligonucleótidos A4673 y A4844 (ORF2) amplificarían además del ARN genómico y antigenómico, la cadena de ARN subgenómico que se sintetiza durante el ciclo replicativo del virus. Debido a que no se podían asumir niveles de sensibilidad equivalentes para las distintas reacciones de RT-PCR, las comparaciones ANOVA se realizaron únicamente entre los resultados obtenidos entre los diferentes subgenotipos para cada reacción independiente. El resultado de los títulos de ARN (+) y (-) obtenidos, así como los títulos infecciosos generados a partir de las infecciones con diferentes subgenotipos, se muestra en la Fig. 3.6.



**Fig. 3.6** Análisis de la productividad vírica de diferentes subgenotipos de HAstV. (A) Títulos de cadena positiva de ARN, calculados por *end-point dilution* RT-PCR utilizando oligonucleótidos de una región del ORF1a y ORF2. (B) Títulos de cadena negativa de ARN, calculados por *end-point dilution* RT-PCR utilizando oligonucleótidos de una región del ORF1a y ORF2. (C) Títulos de virus infecciosos liberados al sobrenadante de cultivos infectados. Las letras mayúsculas sobre cada barra indican las diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ).

Bajo condiciones similares de infección, en el subgenotipo HAstV-C se podía inferir un patrón de replicación del ARN distinto a los demás. En referencia al título de la cadena de ARN (+) (Fig. 3.6A), el subgenotipo HAstV-C mostraba un título significativamente menor cuando se utilizaban los oligonucleótidos del ORF1a ( $p < 0.05$ ), mientras que estas diferencias estadísticas desaparecían cuando se utilizaban oligonucleótidos de la región del ORF2. En las infecciones con los subgenotipos HAstV-D y HAstV-FP, no se observaban diferencias entre los títulos de las cadenas de ARN (+). Por otro lado, en cuanto a los títulos de la cadena de ARN (-) (Fig. 3.6B), no se observaban diferencias entre subgenotipos utilizando el oligonucleótido del ORF1a, pero el subgenotipo HAstV-C mostraba un título significativamente superior de ARN (-) al utilizar el oligonucleótido del ORF2 ( $p < 0.05$ ). Finalmente, comparado con los subgenotipos HAstV-D y HAstV-FP, la infección con el subgenotipo HAstV-C generaba un título de virus infecciosos en el sobrenadante del medio de cultivo más de 1 log superior que el resto ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3.6C).

Puesto que en la mayoría de virus todas las funciones replicativas están codificadas en las proteínas no estructurales, y debido al elevado grado de conservación proteica observado a lo largo de los dos ORFs 1a y 1b de todos los HAstV secuenciados hasta el momento a excepción de la región hipervariable, se puede hipotetizar un papel de la proteína nsP1a/4 en la regulación de la síntesis de ARN. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que otras partes del genoma también estén implicadas en la regulación de la actividad del complejo de replicación del ARN. Además, puesto que la proteína nsP1a/4 contiene varios potenciales sitios de fosforilación en Ser/Thr, así como también en Tyr, es probable que esta proteína exhiba diferentes propiedades biológicas dependiendo de su estado de fosforilación. De acuerdo con esta idea, se observó que en la región de 920 aminoácidos del producto de nsP1a total de las 5 cepas disponibles en las bases de datos, 52,5% de los potenciales lugares de fosforilación se concentraban en la región codificante para nsP1a/4, la cual representa aproximadamente el 30% del total de nsP1a.

El análisis de la naturaleza de las sustituciones aminoacídicas observadas nos indicó que, mientras que el porcentaje de sustituciones no conservativas en la proteína nsP1a/4 era del 52.2%, en el resto de la poliproteína nsP1a (nsP1a/123), era únicamente del 20.6%, poniendo de manifiesto el mayor grado de variabilidad presente en la proteína nsP1a/4. Del total de sustituciones aminoacídicas presentes en la proteína nsP1a/4, el 17.4% afectaba a sitios de fosforilación. En cambio, para el producto nsP1a/123, este porcentaje representaba únicamente el 5.9%. En la proteína nsP1a/4, de las 21 posiciones de aminoácidos con capacidad potencial para fosforilarse, 11 correspondían a residuos de Ser, 7 a residuos de Tyr y 3 a residuos de Thr. Además curiosamente, al analizar el producto nsP1a total, se vio que la mayoría de los cambios de aminoácido que afectaban a potenciales sitios de fosforilación (67%) estaban incluidos dentro de la secuencia de nsP1a/4, y que uno de estos cambios

consistía en una sustitución conservativa Thr→Ser, manteniendo así la potencial capacidad para fosforilarse.

### 3.4 Discusión

Los resultados obtenidos de la utilización de herramientas de análisis proteómico computacional, incluyendo análisis de alineamientos de secuencias y algoritmos para la predicción de estructuras y funciones proteicas, junto con la localización subcelular de la proteína nsP1a/4 asociada a estructuras membranosas sugieren la implicación de dicha proteína en la replicación del ARN vírico.

Curiosamente, entre las proteínas de otras familias víricas que mostraron similitud a nivel de secuencia con la proteína nsP1a/4, se encontraron proteínas pertenecientes a diferentes miembros de las superfamilias *picornavirus-like* y *alphavirus-like*, tales como el dominio N-terminal de la poliproteína codificada por el RNA2 de *grapevine fanleaf virus* de la familia *Comoviridae*, o la proteína nsP3 de alfavirus. La familia de virus de plantas *Comoviridae* contiene un genoma bipartito de dos moléculas de ARN de polaridad positiva (RNA1 y RNA2) que están encapsidadas en cápsides independientes. A pesar de que todas las funciones replicativas del virus están codificadas en el RNA1, en el *grapevine fanleaf virus* se ha demostrado que en la replicación del ARN, es imprescindible la participación del dominio N-terminal de la proteína codificada por su RNA2. Una de las hipótesis sugiere que este dominio podría actuar como “proteína reclutadora”, anclando el RNA2 y formando un complejo ribonucleoproteico que sería reconocido por la maquinaria replicativa codificada por el RNA1 (Gaire *et al.*, 1999). Por su parte, a pesar de que las funciones de la proteína nsP3 de alfavirus todavía no están bien definidas, se ha sugerido que podría estar implicada en la síntesis de la cadena de ARN negativa y posiblemente también en la síntesis del ARN subgenómico (Lstarza *et al.*, 1994). Además, sus funciones están reguladas por múltiples lugares de fosforilación Ser/Thr (Li *et al.*, 1990), y se ha visto que determinadas mutaciones que afectan a lugares de fosforilación de nsP3, reducen significativamente la tasa de síntesis de ARN vírico, así como también el nivel de patogenicidad del virus en un modelo de ratón (Vihinen *et al.*, 2001). En general, estos paralelismos encontrados entre la proteína nsP1a/4 y las proteínas analizadas no son de extrañar, pues los astrovirus comparten muchas características comunes tanto con picornavirus como con alfavirus. A pesar de que nuestro trabajo aporta datos que sugieren la modificación post-traducciona l de la proteína nsP1a/4 por fosforilación, todavía se requieren más estudios para confirmar el posible efecto funcional de la fosforilación de nsP1a/4 sobre la replicación del ARN de HAstV.

La replicación genómica de todos los virus ARN de polaridad positiva bien caracterizados, incluyendo virus de plantas, animales e insectos, tiene lugar en grandes complejos de replicación asociados a membranas intracelulares (Alquist *et al.*, 2003). En el caso de HAstV, se ha sugerido que el complejo de replicación del ARN podría estar anclado a

la membrana a través de varios dominios transmembrana presentes en el extremo N-terminal del producto nsP1a (Jiang *et al.*, 1993). No obstante, todavía no está claro si la poliproteína derivada del ORF1a total (nsP1a/1234) se anclaría a la membrana antes de madurar proteolíticamente, o si únicamente los productos derivados de su extremo N-terminal serían los que se anclarían a las estructuras membranosas. En el caso del virus Sindbis, la síntesis de la molécula intermediaria de ARN negativa tiene lugar cuando la poliproteína todavía no está procesada. También se ha visto que los componentes del complejo de replicación permanecen unidos a la membrana incluso después de que tengan lugar los cortes proteolíticos (Lemm *et al.*, 1994). Además, la regulación temporal del procesamiento proteolítico del complejo replicativo tiene importancia y afecta en gran medida a la inducción de la síntesis de ARN de cadena positiva. Debido a la existencia de un gran número de paralelismos entre la biología molecular de astrovirus y alfavirus, se podría pensar que los productos no estructurales de astrovirus también podrían desempeñar diferentes funciones a lo largo del ciclo replicativo en función de su estado de maduración, de su estado de fosforilación o incluso de su localización subcelular.

Los distintos trabajos disponibles sobre el procesamiento proteolítico de las poliproteínas no estructurales de HAstV sugieren dos posibles lugares de corte entre el dominio de la proteasa y el final del ORF1a (Geigenmüller *et al.*, 2002a; Kiang & Matsui, 2002). Nuestros estudios de inmunoprecipitación utilizando extractos de células CaCo-2 infectadas revelan la presencia de distintas bandas con diferente movilidad electroforética y pesos moleculares comprendidos entre los 24 y 26 kDa y, por consiguiente, sugieren que o bien estas bandas corresponden a formas precursoras de la proteína nsP1a/4 o bien que ésta podría sufrir modificaciones post-traduccionales. Por otro lado, debido a que el peso molecular calculado teóricamente a partir de la secuencia peptídica según los lugares de corte descritos Gln<sub>567</sub>/Thr<sub>568</sub> (Kiang & Matsui, 2002) o Glu<sub>654</sub>/Ile<sub>655</sub> (Geigenmüller *et al.*, 2002a) serían de 40.1 kDa y 30.6 kDa, respectivamente, parece que dicha proteína sería todavía procesada. De acuerdo con esta idea, en estudios de expresión transitoria en células BHK-21, Méndez y col. detectaron una banda de aproximadamente 20 kDa con un anticuerpo específico de la región C-terminal del ORF1a (Méndez *et al.*, 2003). Puesto que no se detectó marcaje nuclear en los análisis de inmunofluorescencia, podría pensarse en la existencia de un lugar de corte situado entre la señal NLS y la posición del péptido sintético utilizado para la producción del anticuerpo contra la proteína nsP1a/4 (778-792).

Cerca del extremo C-terminal, la proteína nsP1a/4 contiene una región hipervariable con un elevado número de *indels* y sustituciones de aminoácidos. Basándonos en la variabilidad genética encontrada en dicha región HVR, se definieron diferentes subgenotipos de HAstV (denominados HAstV-A, HAstV-BE, HAstV-C, HAstV-D y HAstV-FP). Las diferencias en la carga vírica encontrada en heces de diferentes subgenotipos y la posible implicación de la proteína nsP1a/4 en la replicación del ARN vírico nos llevaron a pensar en

una relación existente entre la variabilidad de la proteína y la capacidad replicativa de los diferentes subgenotipos. Puesto que el resto de la secuencia de las proteínas no estructurales está muy conservada entre todos los serotipos de HAstV y puesto que la mayoría de inserciones descritas aportan nuevos lugares de fosforilación, parece probable que dicha variabilidad esté relacionada de alguna manera con la modulación de la replicación del ARN vírico y que el estado de fosforilación participe de algún modo en esta modulación. Al titular las cadenas de ARN positiva y negativa en extractos de membrana de células infectadas utilizando oligonucleótidos de la región del ORF1a, se vio que las infecciones por subgenotipo HAstV-C producían un título menor de moléculas de ARN genómico de polaridad positiva. Sin embargo, al titular el mismo ARN con oligonucleótidos de la región del ORF2, las diferencias dejaban de ser estadísticamente significativas. Puesto que la utilización de oligonucleótidos del ORF2 permiten amplificar también el ARN subgenómico, los resultados obtenidos indican de forma indirecta que durante las infecciones por subgenotipo HAstV-C se produce una mayor proporción de ARN subgenómico. Por otro lado, también se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los títulos de las cadenas negativas de ARN de los diferentes subgenotipos. Mientras que los tres subgenotipos mostraban niveles similares de ARN antígeno, al utilizar los oligonucleótidos del ORF2, se detectó un título superior de moléculas de ARN negativo en el subgenotipo HAstV-C. Este resultado podría sugerir que durante el ciclo biológico de estos virus, podría sintetizarse también moléculas de ARN subgenómico de polaridad negativa. A pesar de que el significado biológico de esta estrategia todavía no está claro, parece que también resultaría en una mayor producción/liberación de partículas víricas infecciosas al medio de cultivo (Fig. 3.6C) y un título de copias genómicas en heces de niños infectados superior (Fig. 3.5). Una posible explicación para estas diferencias encontradas en el subgenotipo HAstV-C sería que en estos virus la síntesis de ARN de cadena positiva favoreciese la síntesis de moléculas de ARN subgenómico en detrimento de las moléculas de ARN genómico, lo cual resultaría en un mayor número de moléculas para la síntesis de las proteínas estructurales y posiblemente en una mayor encapsidación. No obstante, a pesar de que el título de copias genómicas en heces pertenecientes al subgenotipo HAstV-D también es estadísticamente superior al resto (Fig. 3.5), este subgenotipo no parece tener una mayor proporción de ARN subgenómico, ni generar un título de partículas infecciosas en el sobrenadante de células infectadas demasiado elevado. Una posible explicación sería que HAstV-D produjera una mayor cantidad de ARN genómico, que su *ratio* ARN genómico:ARN subgenómico fuese elevada, y que fuera más eficiente en la síntesis de proteínas estructurales a partir del ARN subgenómico. De este modo su ciclo replicativo resultaría en un buen nivel de cápsides víricas llenas de ARN genómico, detectadas en la titulación molecular de las heces. Así, tanto el subgenotipo HAstV-C como HAstV-D proporcionarían títulos de virus en heces estadísticamente superiores al resto de subgenotipos (Fig. 3.5), pero estas partículas víricas mostrarían diferencias en cuanto a su capacidad infecciosa (Fig. 3.6C), posiblemente relacionadas con el estado de maduración de la partícula vírica (ver Estudio IV).

En conclusión, nuestros resultados apuntan hacia la existencia de una relación entre el patrón de variabilidad genética en la región hipervariable de la proteína nsP1a/4 y la eficiencia de la replicación del ARN. En concordancia con esta idea, hace unos años, Willcocks y col. describieron una delección de 15 aminoácidos en la misma región de ciertas cepas de astrovirus y la relacionaron con fenómenos de adaptación del virus a determinadas líneas celulares no humanas (Willcocks *et al.*, 1994a). De este modo, la participación de esta variabilidad genética en la replicación del ARN vírico podría desempeñar un papel importante en la optimización de la replicación del ARN en diferentes células hospedadoras, quizás vía interacción con determinados factores específicos de la célula que podrían regular la eficiencia de la replicación. Curiosamente, a pesar de que no podemos descartar la implicación de otras regiones del genoma en la modulación de la capacidad replicativa del virus, después de cuantificar el número de partículas víricas presentes en muestras de heces de niños con gastroenteritis, se observaron diferentes cargas víricas asociadas a diferentes subgenotipos con patrones diferentes de inserciones y delecciones.

En resumen, nuestra hipótesis sugiere que la proteína nsP1a/4 de HAsV está implicada en la replicación del ARN vírico y que tanto el nivel de procesamiento proteolítico como su estado de fosforilación podrían contribuir a la modulación de su función en la síntesis del ARN. La proteína nsP1a/4 podría ser necesaria para una eficiente formación del complejo de replicación a través de una interacción directa con el ARN vírico o con otras proteínas del complejo macromolecular. De este modo, determinadas mutaciones en esta proteína podrían fácilmente afectar la eficiencia de la replicación y por consiguiente estar relacionadas con la capacidad patogénica del virus.

## **4. ESTUDIO II: Variabilidad genética y diseño de un sistema de tipado molecular**



## **ESTUDIO II: Variabilidad genética y diseño de un sistema de tipado molecular**

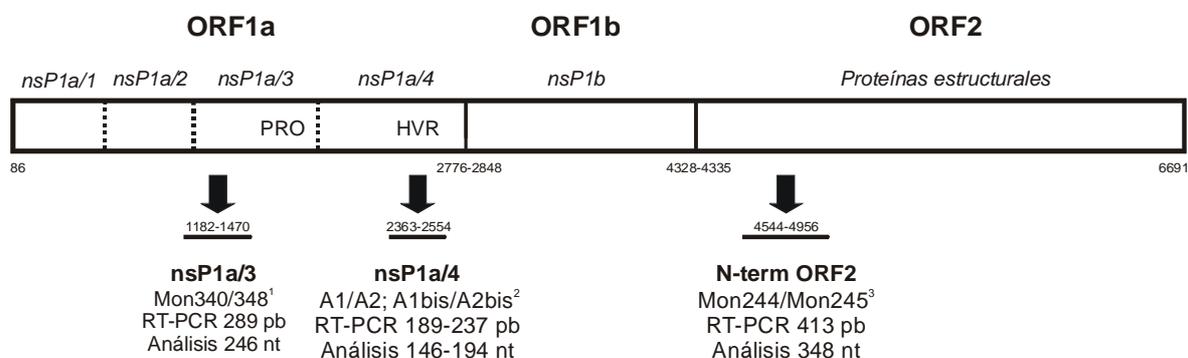
### **4.1 Antecedentes**

El hecho de que tan sólo se hayan secuenciado completamente cinco cepas de astrovirus humanos, hace que todavía se desconozcan muchos aspectos de la diversidad genética de estos virus. Dependiendo de la región del genoma analizada, el análisis filogenético de los astrovirus humanos da lugar a diferentes agrupaciones resultantes (Belliot *et al.*, 1997c; Lukashov & Goudsmit, 2002; Méndez-Toss *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2001b). La mayoría de estudios basados en regiones que codifican para las proteínas de la cápside sugieren una elevada correlación entre las agrupaciones genéticas (genotipos) y las agrupaciones antigénicas (serotipos); una correlación que permite determinar la información del serotipo de una muestra por análisis de la secuencia. Los métodos de serotipado molecular más ampliamente utilizados se basan en regiones del extremo 5' y 3' del ORF2 (Matsui *et al.*, 1998; Noel *et al.*, 1995; Walter *et al.*, 2001b). De todos ellos, el método adoptado por la gran mayoría de grupos de investigación epidemiológica es el descrito por Noel y col. (1995), el cual analiza la secuencia de una región conservada de 348 pb que codifica para el extremo N-terminal de la poliproteína de la cápside (Fig. 4.1). Unos cuantos años después de su publicación en 1995, a partir de un estudio epidemiológico llevado a cabo en Colombia y Venezuela, se identificaron diferentes linajes genéticos para el serotipo HAstV-1, teniendo en cuenta que la diversidad genética entre las secuencias de distintos linajes fuera superior al 7% (Medina *et al.*, 2000). No obstante, los autores no pudieron determinar el significado epidemiológico de la variación genética observada.

Mientras que la comparación de secuencias de la región de la cápside da lugar a árboles filogenéticos con topologías que muestran distancias equivalentes entre todos los agrupamientos de serotipos, Belliot y col. (1997c) observaron que el análisis basado en una

región conservada *upstream* del motivo de la proteasa en el ORF1a (Fig. 4.1) resulta en únicamente 2 agrupaciones genéticas bien diferenciadas. Estas agrupaciones fueron denominadas por el autor genogrupos A y B y, mientras que el genogrupo A incluye los serotipos del 1 al 5 y el serotipo 8, el genogrupo B incluye los serotipos 6 y 7. Los autores sugirieron la existencia de fenómenos de recombinación como una posible explicación a estas diferencias en las relaciones genéticas según se analizaran distintas regiones del genoma.

A pesar de que ninguno de los posibles lugares de corte de la poliproteína del ORF1a se ha confirmado por secuenciación de las proteínas en su extremo N-terminal, hoy en día se cree que existen 4 proteínas maduras denominadas en este trabajo nsP1a/1, nsP1a/2, nsP1a/3 y nsP1a/4. Mientras que la proteína nsP1a/3 sería la que codifica para las funciones de proteasa, todavía se desconoce el papel de las otras tres proteínas. Tal como se ha visto en el estudio I del presente trabajo, la proteína nsP1a/4, en la cual se localiza una región hipervariable (HVR) de aproximadamente 200 pb identificada por diferentes autores (Fig. 4.1) (Méndez *et al.*, 2000; Oh & Schreier, 2001; Willcocks *et al.*, 1994a), podría estar implicada en procesos de replicación del ARN vírico. Además, curiosamente, su variabilidad estaría relacionada con las propiedades replicativas de determinados tipos de HAstV, influyendo así sobre sus capacidades virulentas. Concretamente, en nuestro laboratorio se ha visto que los HAstV del subgenotipo C disponen de unas propiedades replicativas especiales y se han asociado a títulos de partículas víricas en heces de niños enfermos superiores al resto de subgenotipos, así como a casos de diarreas persistentes (Caballero *et al.*, 2003).



**Fig. 4.1** Organización genómica de HAstV. Las posiciones de nucleótido corresponden a la cepa de referencia HAstV-1 de Oxford (Núm. acceso L23513). Se detalla la información de las 3 regiones analizadas en este estudio: los oligonucleótidos utilizados, la longitud del fragmento obtenido en la RT-PCR y la longitud de la secuencia analizada. PRO: dominio proteasa; HVR: región hipervariable. <sup>1</sup>Belliot *et al.*, (1997c); <sup>2</sup> presente trabajo; <sup>3</sup>Noel *et al.*, (1995).

Mientras que el tipado de astrovirus ha tenido siempre un interés predominantemente epidemiológico, el mejor conocimiento que se tiene hoy en día sobre las diferencias existentes en el grado de virulencia entre distintos tipos de virus ha motivado la investigación y el

desarrollo de nuevos sistemas de tipado, y ha incrementado también el valor médico del tipado de las muestras.

En este estudio, se analiza la diversidad genética de la región hipervariable de la proteína nsP1a/4 a partir de una colección de 101 cepas de HAstV. Además, se compara la variabilidad genética de dicho fragmento con la variabilidad de otras regiones del genoma tanto de la región codificante para la proteína nsP1a/3 del ORF1a que permite distinguir los genogrupos A y B (Belliot *et al.*, 1997c), como del extremo conservado del ORF2 que permite conocer la información de serotipo (Noel *et al.*, 1995) (Fig. 4.1). Finalmente, se presenta el diseño de un nuevo método de tipado molecular de astrovirus por amplificación por RT-PCR y análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) basado en la región hipervariable HVR de la proteína nsP1a/4 asociada a distintas propiedades replicativas.

## 4.2 Material y métodos

### 4.2.1 Colección de muestras de astrovirus

A partir de diferentes estudios epidemiológicos realizados en diferentes partes del mundo, se construyó una colección de 98 especímenes de astrovirus que contenía tanto muestras fecales como cepas adaptadas a cultivo celular en células CaCo-2. La información del serotipo y origen de las muestras se detalla en la Tabla 4.1. Además, también se incluyeron en el análisis, las secuencias de los 5 genomas completos de astrovirus disponibles en *Genbank* (núm. acceso: L23513 para la cepa de referencia de Oxford HAstV-1, Z25771 para la cepa de Newcastle de HAstV-1, L13745 para la cepa de referencia de Oxford HAstV-2, AF141381 para la cepa Rostock de HAstV-3 y AF260508 para la cepa Yuc-8 de HAstV-8).

Las muestras silvestres de astrovirus, aisladas a partir de heces de niños con gastroenteritis, incluían 53 muestras aisladas en Barcelona (ver Estudio III); 7 muestras aisladas en el Reino Unido y cedidas por gentileza de W. D. Cubitt del Great Ormond Street Hospital for Children, en Londres; 6 muestras aisladas en Francia y cedidas por gentileza de E. Kohli del Centre Hospitalier Universitaire Dijon; y 1 muestra aislada en Albania y cedida por gentileza de M. Divizia de la Università di Tor Vergata, en Italia.

Las cepas adaptadas a replicar en células CaCo-2 incluían las cepas de referencia de los serotipos HAstV-1 al HAstV-7, 11 muestras de estudios epidemiológicos realizados en Holanda y cedidas por gentileza de M. Koopmans del RIVM, 11 muestras cedidas por gentileza de la CDC y 2 muestras del Reino Unido cedidas por gentileza de W. D. Cubitt en Londres.

**Tabla 4.2** Colección muestras positivas para astrovirus.

<b>Nombre</b>	<b>Serotipo</b>	<b>Origen</b>
<b>Muestras clínicas</b>		
Bcn1.1	1	Barcelona
Bcn1.2	1	Barcelona
Bcn1.3	1	Barcelona
Bcn1.4	1	Barcelona
Bcn1.5	1	Barcelona
Bcn1.6	1	Barcelona
Bcn1.7	1	Barcelona
Bcn1.8	1	Barcelona
Bcn1.9	1	Barcelona
Bcn1.10	1	Barcelona
Bcn1.11	1	Barcelona
Bcn1.12	1	Barcelona
Bcn1.13	1	Barcelona
Bcn1.14	1	Barcelona
Bcn1.15	1	Barcelona
Bcn1.16	1	Barcelona
Bcn1.17	1	Barcelona
Bcn1.18	1	Barcelona
Bcn2.1	2	Barcelona
Bcn2.2	2	Barcelona
Bcn2.3	2	Barcelona
Bcn3.1	3	Barcelona
Bcn3.2	3	Barcelona
Bcn3.3	3	Barcelona
Bcn3.4	3	Barcelona
Bcn3.5	3	Barcelona
Bcn3.6	3	Barcelona
Bcn3.7	3	Barcelona
Bcn3.8	3	Barcelona
Bcn4.1	4	Barcelona
Bcn4.2	4	Barcelona
Bcn4.3	4	Barcelona
Bcn4.4	4	Barcelona
Bcn4.5	4	Barcelona
Bcn4.6	4	Barcelona
Bcn4.7	4	Barcelona
Bcn4.8	4	Barcelona
Bcn4.10	4	Barcelona
Bcn4.11	4	Barcelona
Bcn4.12	4	Barcelona
Bcn4.13	4	Barcelona
Bcn8.1	8	Barcelona
Bcn8.2	8	Barcelona
Bcn8.3	8	Barcelona
Bcn8.4	8	Barcelona
Bcn8.5	8	Barcelona
Bcn8.6	8	Barcelona
BcnB.1	-	Barcelona
BcnB.2	-	Barcelona
BcnB.3	-	Barcelona
BcnB.4	-	Barcelona
BcnB.5	-	Barcelona
BcnB.6	-	Barcelona

UK1.1	1	Reino Unido
UK1.2	1	Reino Unido
UK1.5	1	Reino Unido
UK1.7	1	Reino Unido
UK1.9	1	Reino Unido
UK1.11	1	Reino Unido
UK1.12	1	Reino Unido
F1.4	1	Francia
F2.2	2	Francia
F4.3	4	Francia
F8.1	8	Francia
F8.5	8	Francia
F8.7	8	Francia
Alb1.2172	1	Albania

#### Cepas adaptadas a CaCo-2

HastV-1	1	Cepa referencia
HastV-2	2	Cepa referencia
HastV-3	3	Cepa referencia
HastV-4	4	Cepa referencia
HastV-5	5	Cepa referencia
HastV-6	6	Cepa referencia
HastV-7	7	Cepa referencia
Neth1.15	1	Holanda
Neth1.25	1	Holanda
Neth2.22	2	Holanda
Neth3.11	3	Holanda
Neth3.12	3	Holanda
Neth3.17	3	Holanda
Neth3.23	3	Holanda
Neth3.24	3	Holanda
Neth3.26	3	Holanda
Neth3.27	3	Holanda
Neth8.19	8	Holanda
CDC1.37	1	CDC
CDC1.43	1	CDC
CDC2.31	2	CDC
CDC2.42	2	CDC
CDC3.33	3	CDC
CDC3.35	3	CDC
CDC4.38	4	CDC
CDC4.39	4	CDC
CDC5.40	5	CDC
CDC6.36	6	CDC
CDC7.34	7	CDC
UK1cc	1	Reino Unido
UK4cc	4	Reino Unido

#### 4.2.2 Amplificación y secuenciación de la región HVR

A partir de suspensiones fecales al 10% (p/v) o de extractos celulares de cultivos infectados con las cepas adaptadas, se realizó una extracción de ARN tal y como se detalla en el apartado 8.23 del apéndice material y métodos, para su posterior amplificación por RT-PCR y secuenciación de la región hipervariable HVR del ORF1a. Todas las muestras fueron analizadas por separado con dos pares de oligonucleótidos (Tabla 8.1 del apéndice material y

métodos). En primer lugar se utilizaron los oligonucleótidos A1 y A2, los cuales amplifican un fragmento de tamaño variable entre cepas (192-237 pb) de los virus del genogrupo A. Las condiciones para la realización de la RT-PCR se detallan en el apartado 8.24 del apéndice material y métodos. La concentración final de  $MgCl_2$  en la reacción de PCR fue de 2 mM y el programa utilizado fue una desnaturalización inicial de 3' a 95 °C, 40 ciclos de 30'' a 94 °C, 30'' a 55 °C y 30'' a 72 °C, y una extensión final de 7' a 72 °C.

Paralelamente, las muestras se analizaron utilizando los oligonucleótidos A1bis y A2bis, los cuales corresponden a las mismas posiciones nucleotídicas del genoma de astrovirus que los oligonucleótidos A1 y A2, pero contienen numerosas modificaciones para amplificar específicamente los virus del genogrupo B, dando un amplímero de 189 pb. Las condiciones utilizadas en la RT-PCR fueron idénticas que para los oligonucleótidos A1 y A2, y se utilizó el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización inicial de 3' a 95 °C, 40 ciclos de 30'' a 94 °C, 1' a 55 °C y 30'' a 72 °C, extensión final de 7' a 72 °C.

Después de analizar el producto de la RT-PCR por gel de agarosa al 1.5%, los fragmentos de ADN fueron secuenciados con los dos oligonucleótidos correspondientes (ver apartados 8.29 del apéndice material y métodos).

#### **4.2.3 Serotipado de astrovirus**

El serotipo de todas las muestras de la colección fue confirmado por amplificación de una región de 413 pb del extremo 5' del ORF2, y el análisis de la secuencia de 348 pb, según el método publicado por Noel *et al.* (1995). Los oligonucleótidos utilizados para dicha RT-PCR y la posterior secuenciación se denominan Mon244 y Mon245. Las condiciones utilizadas en la RT-PCR fueron las descritas en el apéndice material y métodos, apartado 8.24, utilizando una concentración de  $MgCl_2$  de 1.5 mM y el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización inicial de 3' a 95 °C, 40 ciclos de 1' a 94 °C, 30'' a 55 °C y 1' a 72 °C, extensión final de 7' a 72 °C. El protocolo utilizado para la secuenciación del ADN se detalla en el apartado 8.29 del apéndice material y métodos. Las secuencias obtenidas se comparaban a las secuencias de las cepas de referencia depositadas en *Genbank* utilizando el programa BLAST (National Center for Biotechnology Information) para determinar el serotipo.

#### **4.2.4 Secuencias de las bases de datos**

Además de las secuencias de la región hipervariable HVR del ORF1a y de las secuencias de 348 pb del ORF2 obtenidas en nuestro laboratorio, en el análisis genético se incluyeron también secuencias de la región conservada de la proteasa nsP1a/3 (Belliot *et al.*, 1997c) de cepas de astrovirus aisladas en diferentes regiones del mundo y depositadas en las bases de datos. La información de las secuencias se recoge en la Tabla 4.2. Finalmente, las 5

secuencias del genoma completo de astrovirus disponibles en las bases de datos también se incluyeron en los análisis.

**Tabla 4.2** Información de las secuencias de *Genbank* utilizadas para el análisis de la región conservada de la proteína nsP1a/3 del ORF1a.

Nombre cepa	Núm. acceso	Origen	Referencia
HAstV-3 Oxford	AF290504	Oxford (UK)	Walter <i>et al.</i> , 2001a
HAstV-4 Oxford	AF290505	Oxford (UK)	Walter <i>et al.</i> , 2001a
HAstV-5 Oxford	AF290506	Oxford (UK)	Walter <i>et al.</i> , 2001a
HAstV-6 Oxford	AF290507	Oxford (UK)	Walter <i>et al.</i> , 2001a
HAstV-7 Oxford	AF290508	Oxford (UK)	Walter <i>et al.</i> , 2001a
AS20	AF290509	Sudáfrica	Taylor <i>et al.</i> , 2001b
KS106203	AF361028	Korea	Kang <i>et al.</i> , 2002
KS106204	AF361029	Korea	Kang <i>et al.</i> , 2002
KS106205	AF361030	Korea	Kang <i>et al.</i> , 2002
KS106206	AF361031	Korea	Kang <i>et al.</i> , 2002
KS106207	AF361032	Korea	Kang <i>et al.</i> , 2002
KS106208	AF361033	Korea	Kang <i>et al.</i> , 2002
KS106209	AF361034	Korea	Kang <i>et al.</i> , 2002
KS106210	AF361035	Korea	Kang <i>et al.</i> , 2002
KS106211	AF361036	Korea	Kang <i>et al.</i> , 2002
HA	AY027809	Korea	Kang <i>et al.</i> , 2002

#### 4.2.5 Análisis de secuencias y parámetros genéticos

Los alineamientos de secuencias se realizaron con el programa CLUSTAL W (Higgins *et al.*, 1994). En los alineamientos de nucleótidos (nt), las posiciones de las inserciones y deleciones (*indels*) se corregían manualmente para ubicarlas en los lugares indicados según los alineamientos de aa. Las distancias de nt y de aa se calcularon como el número de sustituciones por posición (p-dist), así como el porcentaje de transiciones (S) y transversiones (V), y su *ratio* R se calcularon utilizando el programa MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 1993) y la opción *pairwise deletion* para el tratamiento de los *indels* (eliminación de las posiciones del alineamiento en las cuales existe un *gap* en alguna de las dos secuencias comparadas, para cada pareja de secuencias). Tanto los valores de Ks y de Ka (Ks=frecuencia de sustituciones sinónimas por posición sinónima y Ka= frecuencia de sustituciones no sinónimas por posición no sinónima), como la *ratio* Ks/Ka se calcularon en base al método de Nei-Gojobori (Nei & Gojobori, 1986) utilizando el programa DnaSP 3.0 (Rozas & Rozas, 1999).

Finalmente, la construcción de árboles filogenéticos se realizó utilizando el paquete de programas MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 1993). La matriz de distancias se calculó utilizando tanto la distancia p-dist como la corrección para las sustituciones múltiples de Kimura (*Kimura 2-parameters*; Kimura, 1980), y la opción *pairwise deletion* para el tratamiento de los *indels* en ambos casos. Para la construcción del árbol filogenético sin raíz, se utilizó el método de

*neighbor joining* (Saitou & Nei, 1987), aplicando un *bootstrap* de 100 réplicas para analizar la robusteza estadística del análisis. El árbol filogenético consenso se visualizó mediante el programa TreeView.

Además, también se construyeron filogramas mediante el servidor CLUSTAL W (Higgins *et al.*, 1994), el cual también utiliza el método de *neighbor joining* (Saitou & Nei, 1987). En este caso, el tratamiento de los *indels* fue diferente, puesto que no se eliminó ninguna de las posiciones que contenían algún *gap* en el alineamiento.

Las direcciones de los servidores de internet que dan acceso a la mayoría de los programas bioinformáticos citados, se resumen en la Tabla 8.2 del apéndice material y métodos.

#### 4.2.6 Tipado de astrovirus por análisis de RFLP

Tal y como se describe en el apartado 8.28 del apéndice material y métodos, los amplímeros obtenidos por RT-PCR fueron digeridos con la enzima de restricción *DdeI* y el producto de la digestión se analizó por gel de 8% acrilamida en TBE. El número y tamaño de los fragmentos resultantes de la digestión se determinaron por comparación con los marcadores de peso molecular.

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Caracterización genética de la región HVR de ORF1a

Además de analizar los diferentes parámetros genéticos calculados con el objetivo de comparar la variabilidad genética de la región HVR de la proteína nsP1a/4 con la de otras regiones del genoma, en este estudio también se incluyó un análisis de los mismos parámetros genéticos para los tres ORFs completos por separado de las 5 cepas cuyo genoma ha sido totalmente secuenciado.

**Tabla 4.3** Parámetros genéticos calculados para los diferentes ORFs de HAstV.

	Región genómica		
	ORF1a	ORF1b	ORF2
<b>n</b>	5	5	5
<b>Longitud (pb)</b>	2760-2805	1557	2346-2388
<b>Núm de <i>Indels</i></b>	2	0	7
<b>p-dist (nt)</b>	0.08	0.10	0.28
<b>p-dist (aa)</b>	0.03	0.04	0.25
<b>Ks</b>	0.28	0.38	0.55
<b>Ka</b>	0.02	0.02	0.18
<b>Ks/Ka</b>	16.92	20.21	3.14
<b>S (transiciones)</b>	0.07	0.08	0.13
<b>V (transversiones)</b>	0.01	0.02	0.15
<b>R=S/V</b>	6.00	5.32	1.08

Al comparar los tres ORFs completos (Tabla 4.3), se pudo comprobar que el grado de variabilidad genética (p-dist), tanto a nivel de nt como de aa, era mucho menor en los ORFs que codifican para las proteínas no estructurales, que en el ORF2 que codifica para la poliproteína de la cápside del virus. Por consiguiente, debido a esta mayor variabilidad, para el ORF2 completo, tanto los valores de Ks y Ka, como las estimaciones de transiciones (S) y transversiones (V) fueron claramente superiores al resto de ORFs. La mayor abundancia de sustituciones no sinónimas en relación a las sustituciones sinónimas se pone de manifiesto al analizar *la ratio* Ks/Ka, la cual tuvo un valor de únicamente 3.14 para el ORF2, mientras que el valor fue de 16.92 y 20.21 para el ORF1a y ORF1b, respectivamente.

El resultado de los mismos parámetros genéticos calculados para distintas regiones de corta longitud dentro de la proteína nsP1a/3 (proteasa), de la región HVR de nsP1a/4 y de una región del extremo N-terminal del ORF2 (VP34) se muestra en la Tabla 4.4. A pesar de que el número total de nt analizados para cada región no fue homogéneo, debido tanto a la diferencia en el número de secuencias analizadas, como a su longitud, los resultados indicaron que el grado de diversidad genética en la región HVR del ORF1a era muy elevado. Curiosamente, en dicha región, a pesar de que la distancia genética (p-dist) a nivel de nucleótidos era similar a la de la región N-terminal de la cápside, a nivel de aminoácidos era más de tres veces mayor en la región HVR. En esta región hipervariable, la proporción de sustituciones sinónimas era baja, mientras que la proporción de sustituciones no sinónimas era más del doble que la de la región N-terminal del ORF2 y cuatro veces más que la de la región conservada de la proteína nsP1a/3 del ORF1a que codifica para la proteasa. Así, la *ratio* Ks/Ka dio un valor de 23.32 para la región conservada del ORF1a, de 16.51 para la región conservada de la cápside y de únicamente 4.75 para la región HVR de la proteína nsP1a/4.

**Tabla 4.4** Parámetros genéticos calculados para las diferentes regiones genómicas de HAsTV utilizadas como sistemas de detección molecular.

	Región genómica		
	nsP1a/3 PRO ORF1a <sup>1</sup>	nsP1a/4 HVR ORF1a <sup>2</sup>	N-term ORF2 <sup>3</sup>
<b>n</b>	21	101	95
<b>Longitud (pb)</b>	246	146-194	348
<b>Núm de Indels</b>	0	7	0
<b>p-dist (nt)</b>	0.11	0.16	0.17
<b>p-dist (aa)</b>	0.04	0.19	0.05
<b>Ks</b>	0.41	0.38	0.56
<b>Ka</b>	0.02	0.08	0.03
<b>Ks/Ka</b>	23.32	4.75	16.51
<b>S (transiciones)</b>	0.08	0.12	0.09
<b>V (transversiones)</b>	0.03	0.04	0.08
<b>R=S/V</b>	3.42	3.70	1.95

<sup>1</sup> Belliot *et al.*, (1997c); <sup>2</sup> Presente trabajo; <sup>3</sup> Noel *et al.* (1995)

Finalmente, es interesante destacar el gran número de inserciones y deleciones observadas en esta región, las cuales producen una gran variabilidad en el tamaño del amplímero obtenido en la RT-PCR (Fig. 4.2A). De las 101 cepas analizadas, con los oligonucleótidos A1/A2 se obtuvieron fragmentos de una longitud que oscilaba entre las 192 y las 237 pb, mientras que con los oligonucleótidos A1bis/A2bis se obtuvo en todos los casos una banda de 189 pb. Es importante destacar que absolutamente todas las inserciones y deleciones identificadas fueron múltiples de 3 nt, lo cual confirma el hecho de que la región HVR corresponde a una región codificante (Fig. 4.2B).

**A**



**B**

	5	15	25	35	45	55	65	75			
Neth3.12	--QQANTSQK	PRPELE----	--AETQPLDL	SQKK-----	KQPEHEQQVA	KPT-----	-----	KM	QKNEPQYSQ	TYGK	
Rostock	--QQANTSQK	PRPELE----	--AEAQLDDL	SQKK-----	KQPEHEQQVA	KPT-----	-----	KM	QKNEPQYSQ	TYGK	
Neth3.17	--QQANTSQK	PRPELE----	--AEAQLDDL	SQKK-----	KQPEHEQQVA	KPT-----	-----	KM	QKNEPQYSQ	TYGK	
Neth3.11	--QQVNTSQK	PRPELE----	--TEAQLDDL	SQKK-----	KQPEHEQQVA	KPT-----	-----	KM	QKNEPQYSQ	TYGK	
Neth3.27	--QQANTSQK	PRPELE----	--TEAQLDDL	SQKK-----	KQPEHEQQVA	KPT-----	-----	KM	QKNEPQYSQ	TYGK	
Bcn3.4	--QQANTSQK	PRPELE----	--AESQLDDL	SQKK-----	KQPEHEQQVA	KPI-----	-----	KP	QKNEPQYSQ	TYGK	
HastV-3	--QQANTSQK	PRPELE----	--AEAQLDDL	SQKK-----	KQPEHEQQVA	KPT-----	-----	KP	QKNEPQYSQ	TYGK	
Bcn3.2	--QQTNTSQK	SHPELE----	--AESQLDDL	SQKK-----	KQPEHEQQAV	KPI-----	-----	KP	QKNEPQYSQ	TYGK	
Bcn3.9	--QQTNTSQK	SHPELE----	--AESQLDDL	SQKK-----	KQPEHEQQAV	KPI-----	-----	KP	QKNEPQYSQ	TYGK	
Bcn3.5	--QQTNTSQK	SHPELE----	--AESQLDDL	SQKK-----	KQLEHEQQAV	KPI-----	-----	KP	QKNEPQYSQ	TYGK	
Bcn3.1	--QQTNTSQK	PHPELE----	--AESQLDDL	SQKK-----	KQPEHEQQAV	KPN-----	-----	KP	QKNEPQYSQ	TYGK	
UK1cc	-----	K PYPEPESNKP	ALVEAQLDDL	SQKK-----	KQPEHVQVV	KPN-----	-----	KP	QKSEPPYSQ	TYGK	
CDC1.43	-----	K LYPEPEINKP	ALVEAQLDDL	SQKK-----	KQPEHEQQVV	KPN-----	-----	KP	QKSEPPYSQ	TYGK	
UK1.2H	-----	K PYPEPESNKP	ALVEAQLDDL	SQKK-----	KQPEHEQQVV	KPN-----	-----	KP	QKSEPPYSQ	TYGK	
HastV-4	-----	K PYPEPESNKP	ALAEAQLDDL	SQKK-----	KQPEHEQQVM	KPT-----	-----	KP	QKSEPPYSQ	TYGK	
Bcn2.1	-----	K PSPEPESNKP	ALTEAQLDDL	SQKK-----	KQAEHEQQMA	KPA-----	-----	KH	QKSEPPYSQ	TYGK	
F2.2	-----	K PSPEPESNKP	ALTEAQLDDL	SQKK-----	KQVEHEQQMA	KPA-----	-----	KH	QKSEPPYSQ	TYGK	
Neth2.22	-----	K PCPEPESNEP	ALTEAQLDDL	SQKK-----	KQTEHEQQMD	KPA-----	-----	KH	QKSEPPYSQ	TYGK	
F8.5	-----	K LCPEPESNKP	ALTEAQLDDL	SQKK-----	KQTEHEQQVA	KPV-----	-----	KH	QKSEPPYSQ	TYGK	
Neth8.19	-----	K PCPEPESNKP	ALTEAQLDDL	SQKK-----	KQTEHEQQVA	KPV-----	-----	KH	QKSEPPYSQ	TYGK	
Bcn4.13	-----	K PCPDPE----	--TEAQLDDL	SQKK-----	KQPEHEQQVA	KPT-----	-----	KP	QKSEPPYSQ	TYGK	
Bcn4.1	-----	K PCPEPE----	--TEAQLDDL	SQKK-----	KQPEHEQQVA	KPT-----	-----	KS	QKSEPPYSQ	TYGK	
Yuc8	-----	K PCPEPK----	--TEAQLDDL	SQKK-----	KQPEHEQQVA	KPT-----	-----	KP	QKIEPQYSQ	TYGK	
Bcn1.9	-----	K VLTSSSEKLPK	PCPEPE----	--AEAQLDDL	SQKKAENPE	KQPEYETQVV	-----	KP	QKSEPPYSQ	TYGK	
Bcn4.9	-----	K VPTSSEKLPK	PCPEPE----	--AEAQLDDL	SQKKAENPE	KQPEYEQVV	-----	KP	QKSEPPYSQ	TYGK	
F8.7	-----	K VPTSSEKLPK	PCPEPE----	--AEAQLDDL	SQKKAENPE	KQPECEKQVV	-----	KP	QKSEPPYSQ	TYGK	
UK1.11	-----	K VPTSLEKLPK	PCPEPE----	--AEAQLDDL	SQKKAENPE	KQPEYEQVV	-----	KP	QKSEPPYSQ	TYGK	
F8.1	-----	K VPTSLEKLPK	PCPEPE----	--AEAQLDDL	SQKKAENPE	KQPEYEQVV	-----	KP	QKSEPPYSQ	TYGK	
Bcn4.12	-----	K VPTSSEKLPK	PCPEPE----	--AEAQLDDL	SQKKAENPE	KQPEHEKQVV	-----	KP	QKSEPPYSQ	TYGK	
CDC4.39	-----	K VPTSSEKLPK	PCPEPE----	--AETQPLDL	SQKK-----	KQPEYEQVA	KPT-----	-----	KP	QKSEPPYSQ	TYGK
UK1.7	-----	K ICPEPE----	--VDSQLDDL	SQKK-----	KQLEYEQVV	KSTKPQQLH	EQQVVKPK	IKP	QKSEPPYSQ	TYGK	
CDC1.37	-----	K ICPEPE----	--VASQLDDL	SQKK-----	KQSEYEQVV	KSTKPQQLH	EQQVVKPK	IKP	QKSEPPYSQ	TYGK	
UK1.9	-----	K ICPEPE----	--VESRPLDL	SQKK-----	KQSEYEQVV	KSTKPQQLH	EQQVVKPK	IKP	QKSEPPYSQ	TYGK	
Newc	-----	K ICPEPE----	--VESQLDDL	SQKK-----	KQSEYEQVV	KSTKPQQLH	EQQVVKPK	IKP	QKSEPPYSQ	TYGK	
UK1.5	-----	K ICPEPE----	--VEPQLDDL	SQKK-----	KQSEYEQVV	KSIKPQQLH	EQQVVKIKP	IKP	QKSEPPYSQ	TYGK	
HastV-1	-----	K TCPEPE----	--VESQLDDL	SQKK-----	KQSEYEQVV	KSIKPQQLH	EQQVVKIKP	IKP	QKSEPPYSQ	TYGK	
HastV-1N	-----	K TCPEPE----	--VESQLDDL	SQKK-----	KQSEYEQVV	KSI-----	-----	KP	QKSEPPYSQ	TYGK	
CDC2.42	-----	K TCSEPE----	--VESQLDDL	SQKK-----	KQSEHEQQVV	KST-----	-----	KP	QKSEPPYSQ	TYGK	
CDC2.31	-----	K PCPEPE----	--VEIQPLDL	SQKK-----	KQPEHEQQVV	KST-----	-----	KP	QKNEPQYSQ	TYGK	
Neth1.15	-----	K ICPEPE----	--AETQPLDL	SQKK-----	KQPEHEQQVV	KST-----	-----	KP	QKNEPQYSQ	TYGK	
Bcn1.13	-----	K ICPEPE----	--AETQPLDL	SQKK-----	KQPEHEQQVV	KST-----	-----	KP	QKNEPQYSQ	TYGK	
Alb1.2172	-----	K ICPEPE----	--VETQPLDL	SQKK-----	KQPEHEQQVV	KST-----	-----	KP	QKNEPQYSQ	TYGK	
HastV-5	-----	K PCPEPE----	--AETQPLDL	SQKK-----	KQPEHEQQVV	KST-----	-----	KP	QKNDPQYSQ	TYGK	
HastV-2	-----	K PCPEPE----	--TETQPLDL	SQKK-----	KQPEHEQQVV	KST-----	-----	KP	QKNEPQYSQ	TYGK	
CDC3.33	-----	K PCPEPE----	--AEAQLDDL	SQKK-----	KQPEHEQQVV	KST-----	-----	KP	QKNEPQYSQ	TYGK	
CDC5.40	-----	K PCPEPE----	--AEIQPLDL	SQKK-----	KQPEHEQQIV	KPT-----	-----	KP	QKNDPQYSQ	TYGK	
HastV-6	-----	K PAPAPV----	--TEVQLDDL	SCKQ-----	QVQSEPEQQ-P	EPI-----	-----	KT	QKNEPQYSQ	TYGK	
BCNB.2	-----	K LAPAPV----	--TEVQLDDL	SCKQ-----	QVQSEPEQQ-P	EPI-----	-----	KT	QKNEPQYSQ	TYGK	
CDC6.36	-----	K LAPAPA----	--IEAQLDDL	TCKQ-----	R VQPEPEQQ-S	EPT-----	-----	KT	QKNEPQYSQ	TYGK	
HastV-7	-----	K LAPAPI----	--NEVQLDDL	TCKQ-----	K VQPAPEQQ-P	EPT-----	-----	KT	QKPEPQYSQ	TYGK	
CDC7.34	-----	K PAPAPV----	--NEVQLDDL	TCKQ-----	K VQPALEQQ-P	EPT-----	-----	KT	QKPEPQYSQ	TYGK	
Clustal Co	:	:	:****:	::	:	*	*	:	*	** :****: ****	

**Fig. 4.2** (A) Análisis de fragmentos de RT-PCR con los oligonucleótidos A1/A2 en gel de agarosa 1.5%. (B) Alineamiento de aminoácidos de todas las secuencias de la región HVR obtenidas durante el estudio (\*= aminoácido conservado, := sustitución conservativa, . = sustitución semi-conservativa).



Curiosamente, a diferencia de lo que ocurre en el análisis filogenético de regiones de la cápside, dentro de cada genogrupo no se observó un agrupamiento por serotipos, es decir, en un mismo grupo o *cluster* se encontraban secuencias de serotipos distintos. La distancia genética media (p-dist) entre los dos genogrupos fue de 0.32 y de 0.35, a nivel de nt y de aa, respectivamente. Dentro de cada genogrupo, la p-dist a nivel de nt media fue de 0.13 para el genogrupo A y 0.09 para el genogrupo B, mientras que a nivel de aa, estas distancias fueron de 0.15 y de 0.11 respectivamente. En ambos genogrupos, la diversidad genética fue superior a nivel de aa que a nivel de nt, la cual cosa es propia de regiones del genoma en las cuales la estructura secundaria del ARN desempeña también una función biológica importante para el virus.

#### 4.3.2 Definición de subgenotipos y sistema de tipado por RFLP

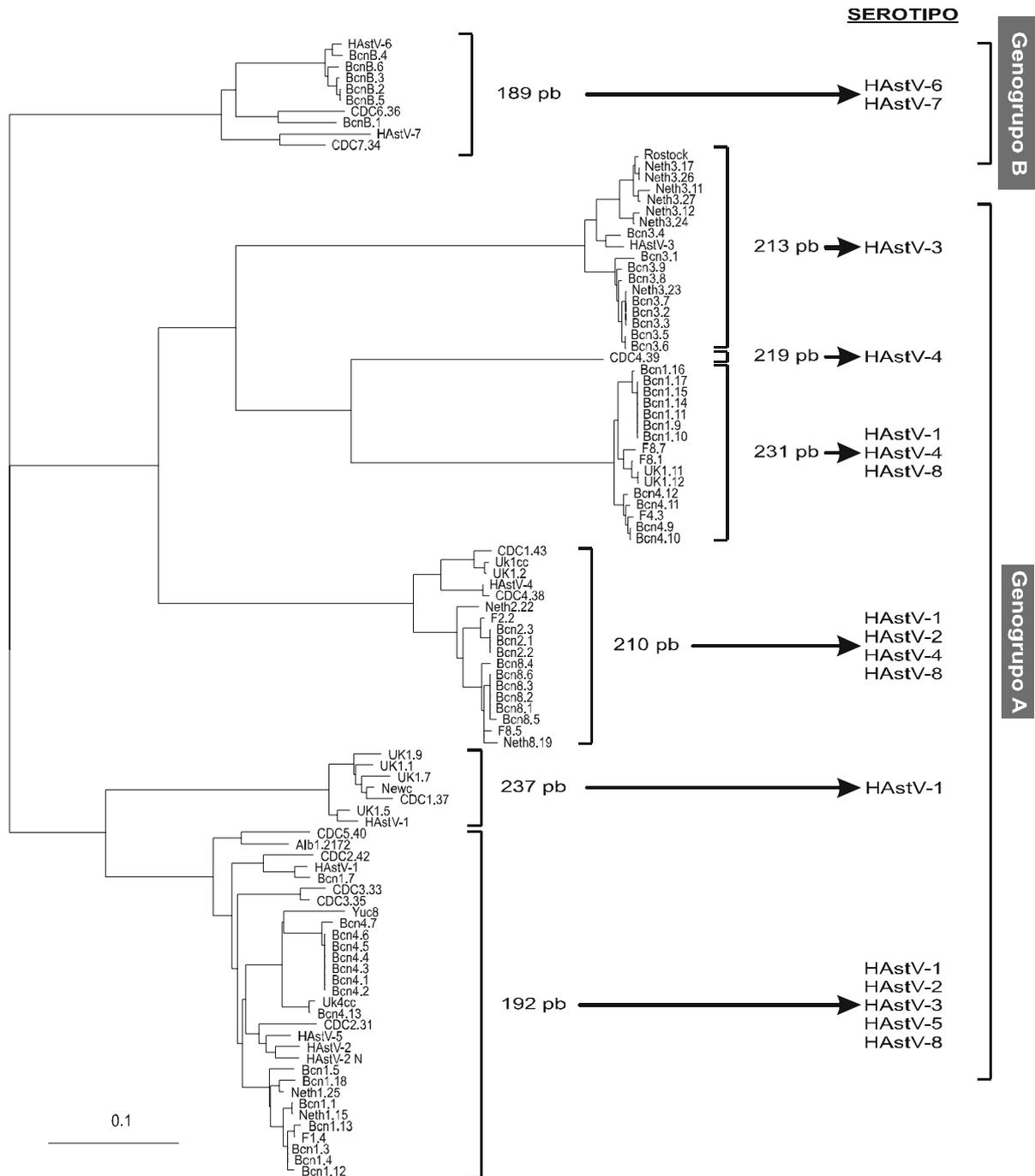
Una de las principales características genéticas observadas en la región HVR fue la presencia de un gran número de *indels* que hacen que el fragmento obtenido en la RT-PCR tenga un tamaño variable. Con el objetivo de poder trazar dicha variabilidad, se aplicaron varios criterios para poder clasificar las secuencias en distintos grupos genéticos o subgenotipos. Se utilizó la nomenclatura de subgenotipo, equiparando los genogrupos A y B previamente descritos por Belliot y col. (1997c) a la categoría de genotipo. Posteriormente, se diseñó un método de análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del fragmento obtenido en la RT-PCR, para poder identificar los distintos subgenotipos. Los criterios que se utilizaron fueron los siguientes:

1. Tamaño del fragmento obtenido en la RT-PCR.
2. Distancia genética (p-dist) intragrupo inferior o igual al 7%.
3. Distancia genética (p-dist) entre grupos superior al 7%.
4. Elevado valor estadístico del *bootstrap* para cada subgenotipo.
5. Presencia de más de una secuencia en cada subgenotipo.

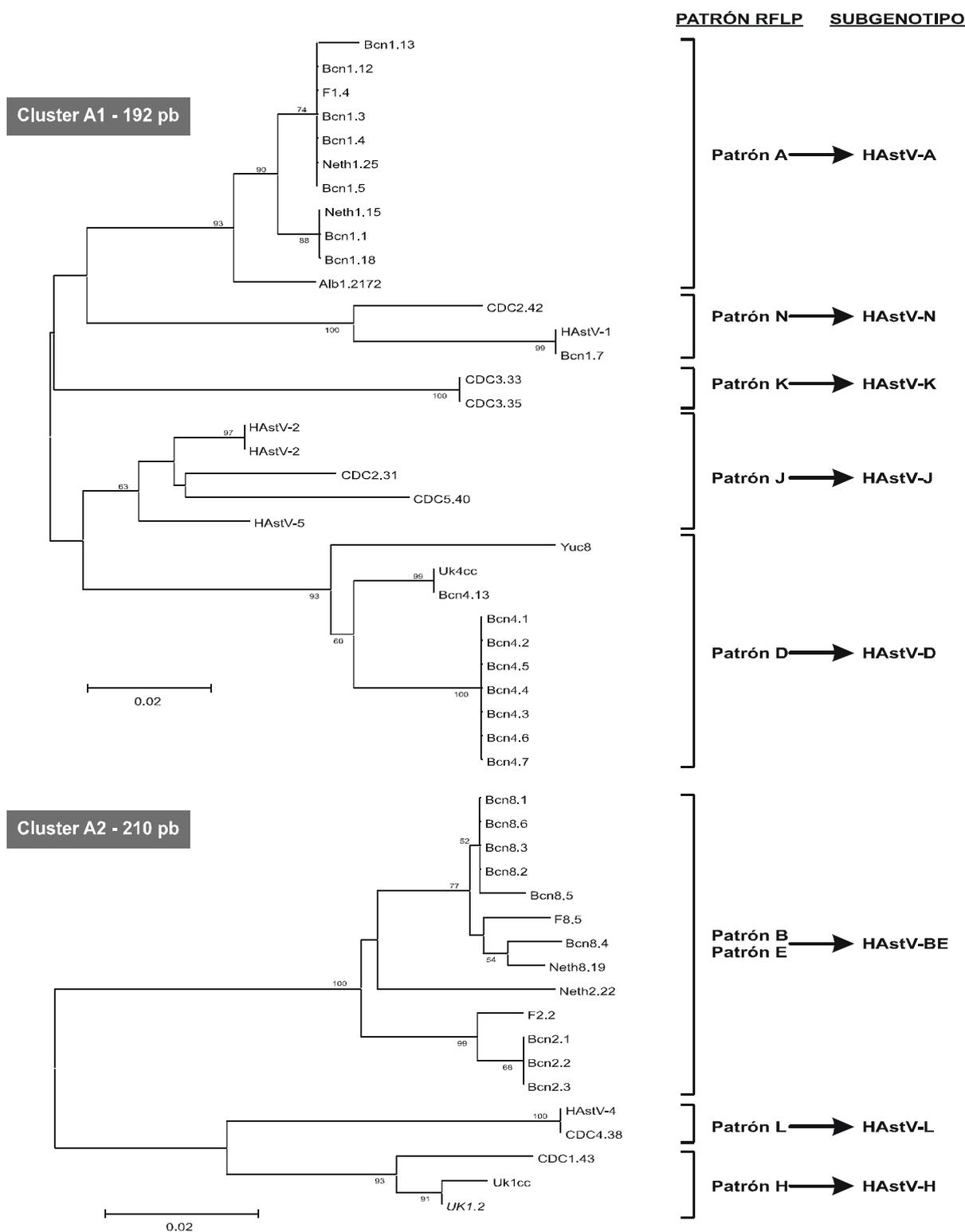
Entre las 101 muestras amplificadas y secuenciadas, se encontraron bandas que correspondían a los tamaños de 189 , 192 , 210 , 213 , 219 , 231 y 237 pb. Al construir un árbol filogenético teniendo en cuenta las inserciones y deleciones, las secuencias quedaban agrupadas, en función de su longitud, en 7 *clusters* principales (Fig. 4.4). Debido a que únicamente se encontró una muestra cuya longitud de banda era de 219 pb, este *cluster* no se consideró posteriormente en el análisis por falta de significado estadístico. Así, para el genogrupo A se definieron 5 *clusters* con patrones de inserciones y deleciones específicos, mientras que para el genogrupo B se definió únicamente uno.

Para poder analizar con mayor detalle la variabilidad dentro de cada *cluster*, se construyeron árboles filogenéticos utilizando las secuencias de cada *cluster* y el método de *neighbor joining Kimura 2-parameters* (Fig. 4.5). De esta forma, se definieron un total de 15

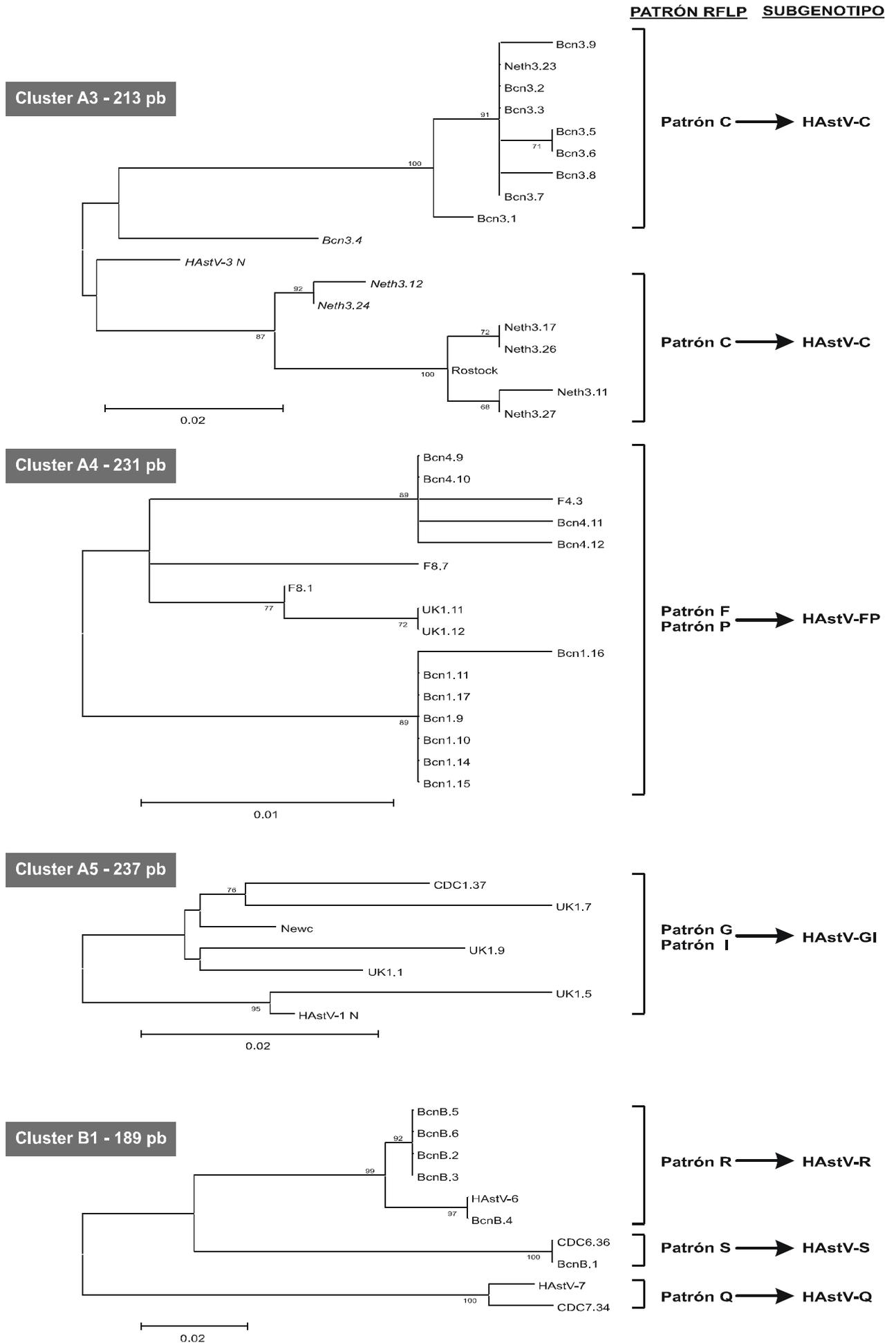
subgenotipos con una divergencia genética entre ellos superior al 7%. Paralelamente, todas las muestras fueron analizadas por digestión enzimática con la enzima de restricción *DdeI* y el patrón de bandas resultante se visualizó en gel de al 8%. En total, se observaron 19 patrones de RFLP diferentes los cuales se denominaron con letras mayúsculas, de la A a la S.



**Fig. 4.4** Análisis filogenético de la región HVR de la proteína nsP1a/4 utilizando el método *neighbor joining Kimura 2-parameters* y sin eliminar las posiciones correspondientes a *gaps* en el alineamiento para el cálculo de la matriz de distancias. Las secuencias quedaron agrupadas según su patrón de *indels* y se obtuvo 1 *cluster* para el genogrupo B y 5 *clusters* para el genogrupo A (el *cluster* correspondiente a 219 pb no se consideró por estar constituido por únicamente una cepa).



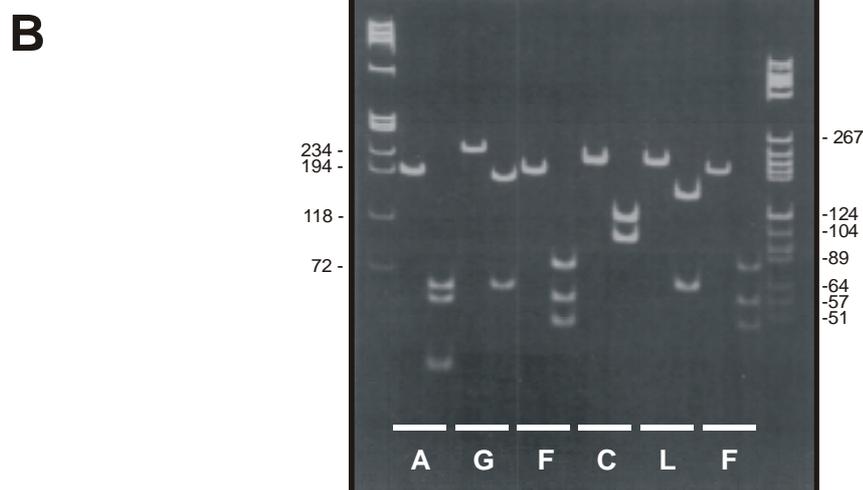
**Fig. 4.5** Análisis filogenético para cada *cluster* y definición de subgenotipos. El método utilizado fue *neighbor joining* y el modelo p-dist para la estimación de la distancia genética. Se realizó un *bootstrap* de 100 réplicas. Los subgenotipos se definieron considerando una divergencia nucleotídica entre ellos superior al 7%. Únicamente se muestran los valores con un *bootstrap* superior al 50% y a la derecha se indican los diferentes patrones RFLP observados para cada subgenotipo. Las secuencias que no quedan incluidas en ningún subgenotipo están identificadas en *cursiva* (Continuación en la página siguiente).



En la Fig. 4.6 se muestra el número y tamaño de los fragmentos resultantes de cada patrón de RFLP (Fig. 4.6A), la frecuencia observada para cada patrón en la colección representativa de muestras y un ejemplo del resultado del análisis de algunas muestras (Fig. 4.6B). En la Tabla 4.3 se resumen las características de cada *cluster* y los diferentes patrones de RFLP identificados en cada grupo.

**A**

RFLP	Tamaño total (pb)	Núm. dianas <i>DdeI</i>	Fragmentos (pb)	Frecuencia
A	192	3	35/36/57/64	11 %
B	210	5	35/30/24/42/9/70	4 %
C	213	1	92/121	16 %
D	192	2	71/57/64	10 %
E	210	4	35/30/24/42/79	8 %
F	231	4	98/15/48/6/65	15 %
G	237	1	173/64	5 %
H	210	1	89/121	3 %
I	237	2	128/45/64	1 %
J	192	3	71/57/15/49	5 %
K	192	2	35/36/121	2 %
L	210	1	146/64	2 %
M	210	3	35/30/75/70	1 %
N	192	1	128/64	4 %
O	219	2	98/57/64	1 %
P	231	3	113/48/6/65	1 %
Q	189	1	119/70	2 %
R	189	2	47/63/79	6 %
S	189	1	110/79	2 %



**Fig. 4.6** Caracterización de los diferentes patrones RFLP. (A) Nomenclatura de los diferentes patrones e información del tamaño del amplímero obtenido en la RT-PCR, del número de dianas para la enzima de restricción *DdeI*, del tamaño de los fragmentos resultantes y frecuencia de cada patrón observada en la colección de 101 muestras de HAstV. (B) Resultado del análisis RFLP de 6 muestras en gel de acrilamida 8% en TBE. Para cada muestra el carril de la izquierda corresponde al fragmento sin digerir y el carril de la derecha al fragmento digerido. A ambos lados de la fotografía se muestra los marcadores de pesos moleculares de ADN (pb).

**Tabla 4.3** Características de los *clusters* identificados para cada genogrupo.

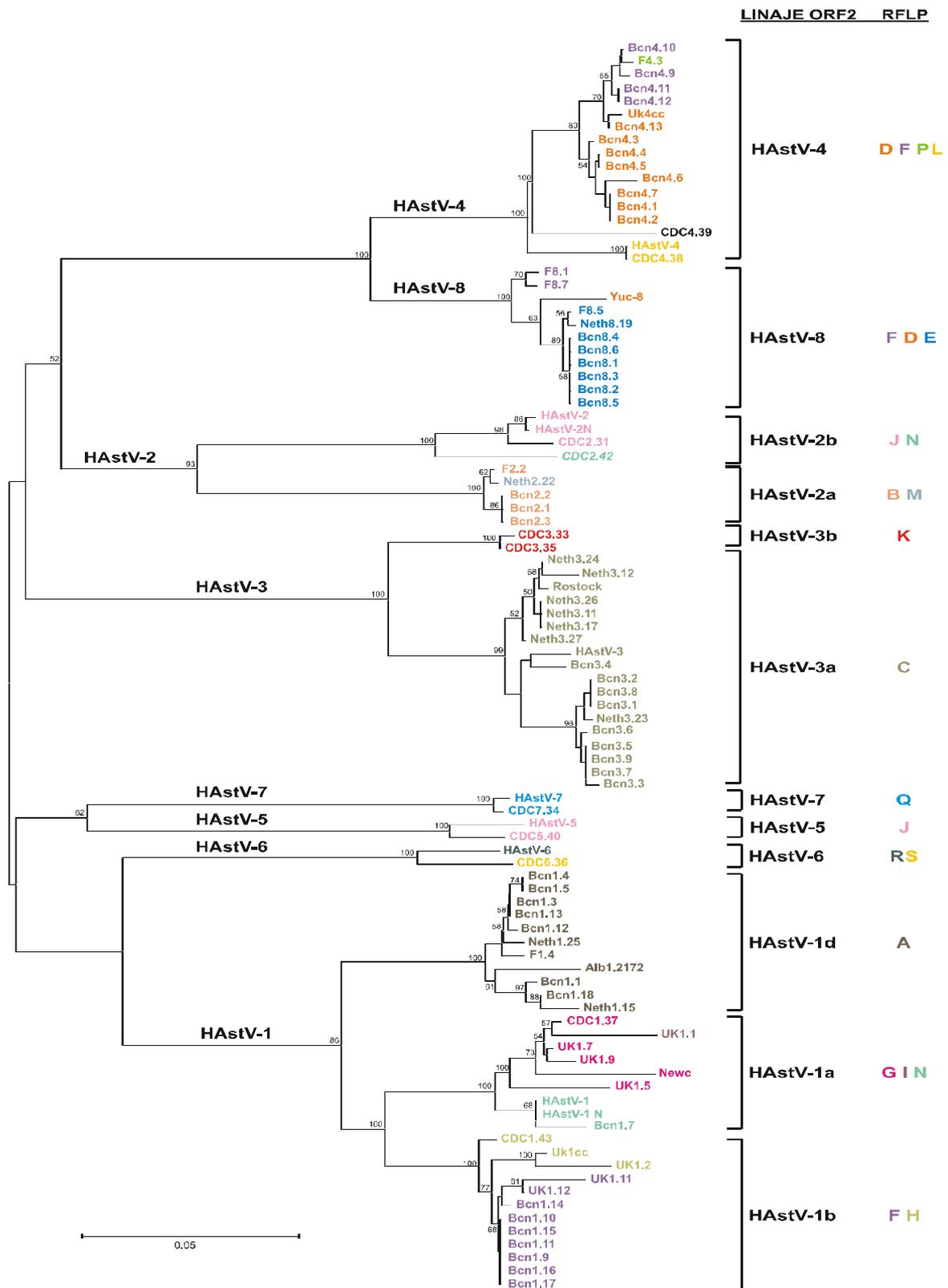
	<b>Amplímero</b>	<b>Indels</b>	<b>Nº Subgenotipos</b>	<b>Patrón RFLP</b>
<b>Genogrupo A</b>				
<i>Cluster A1</i>	192 pb	-	5	A - D - J - K - N
<i>Cluster A2</i>	210 pb	774[In 5]	3	BE - H - L
<i>Cluster A3</i>	213 pb	767[In 7]	2	C
<i>Cluster A4</i>	231 pb	767[In 9] 786[In 6] 800[Del 1]	1	FP
<i>Cluster A5</i>	237 pb	903[In 15]	1	GI
<b>Genogrupo B</b>				
<i>Cluster B1</i>	189 pb	795[Del 1]	3	Q - R - S

Codificación *indels*: posición aminoácido en la cual se encuentra la inserción (In) o deleción (Del) (L23513). Entre corchetes, se indica el número de residuos implicados en la inserción o deleción.

### 4.3.3 Variabilidad genética de la región HVR y serotipo

A pesar de que no se observó una correlación entre la variabilidad genética en la región HVR y el serotipo, puesto que la región HVR está contenida dentro de una secuencia para la que se describió la presencia de un epítipo inmunoreactivo (Matsui *et al.*, 1993), en este trabajo también se analizó la relación entre la variabilidad genética de HVR y la variabilidad de secuencias entre serotipos.

Para ello, se construyó un árbol filogenético utilizando las secuencias del extremo N-terminal del ORF2 de las 101 muestras. Posteriormente se identificaron las distintas agrupaciones genéticas o linajes derivados de esta región, siguiendo el criterio descrito por Medina *et al.* (2000). Estos autores definen los linajes genéticos teniendo en cuenta una divergencia nucleotídica entre ellos superior al 7%. Adicionalmente, en el presente trabajo y considerando una divergencia nucleotídica entre linajes superior al 5.5%, se definieron nuevos linajes. Finalmente, se compararon los linajes obtenidos según la región de la cápside con las distintas variantes de RFLP obtenidas. Los resultados se muestran en la Fig. 4.7. Según nuestro análisis, para la mayoría de casos, la información del patrón RFLP permite identificar también el serotipo y el linaje genético al que pertenece la muestra, definido según la región de la cápside. No obstante, existen 3 patrones que están compartidos por más de un serotipo. Así, por ejemplo, mientras que todas las muestras con patrón RFLP A corresponden siempre al serotipo HAstV-1d, o todas las muestras con patrón RFLP E corresponden siempre al serotipo HAstV-8, las muestras con patrón RFLP F pueden corresponder tanto al serotipo HAstV-1b, como al serotipo HAstV-4 o al HAstV-8. Puesto que determinadas capacidades replicativas se han asociado de forma específica a determinados subgenotipos, y puesto que esta característica podría tener importancia clínica, es interesante poder llegar a conocer la información tanto del serotipo como del subgenotipo a partir de un único test de diagnóstico.



**Fig. 4.7** Análisis filogenético de la región del extremo N-terminal del ORF2 (*neighbor joining Kimura 2-parameters* y un *bootstrap* de 100 réplicas) indicando los diferentes linajes derivados de esta región. Correlación con los diferentes patrones RFLP codificados por colores. Únicamente se muestran los valores con un *bootstrap* superior al 50%. Las secuencias que no quedan incluidas en ningún linaje están identificadas en *cursiva*.

#### 4.4 Discusión

La proteína nsP1a/4 de astrovirus contiene una región hipervariable rica en inserciones y deleciones. Por otro lado, el análisis realizado en nuestro laboratorio sobre las posibles funciones de esta proteína ha revelado que podría estar involucrada en el proceso de replicación del ARN vírico (Estudio I). Concretamente, en un estudio publicado hace unos años, una deleción de 45 nt se relacionó con fenómenos de adaptación a determinadas líneas celulares no humanas (Willcocks *et al.*, 1994a). Por otro lado, en la misma región también se identificó la presencia de un epítipo inmunoreactivo cuya caracterización no fue completada (Matsui *et al.*, 1993). Con el fin de poder aportar más datos sobre la caracterización de la proteína nsP1a/4 de astrovirus, en este estudio se realizó un análisis exhaustivo de la diversidad genética de su región HVR.

Los parámetros genéticos comparados entre la región HVR y otras dos regiones del genoma pusieron de manifiesto una enorme variabilidad genética a nivel de nucleótidos, pero sobre todo, a nivel de aminoácidos. La diversidad genética de aminoácidos ( $p$ -dist), así como la proporción de sustituciones sinónimas frente a las no sinónimas ( $K_s/K_a$ ) fueron parámetros que dieron valores del orden de las proteínas víricas estructurales, las cuales en general muestran una mayor capacidad para admitir cambios de aminoácidos en su secuencia que modifiquen su estructura. Por su parte, las proteínas no estructurales de los virus son bastante reacias a la incorporación de cambios de aminoácido, y en estas zonas del genoma suelen abundar más las sustituciones sinónimas frente a las no sinónimas. Este sería el caso de la región analizada para la proteína nsP1a/3, la cual contiene las funciones de la proteasa vírica. En cambio, la región HVR de nsP1a/4 muestra una buena tolerancia a los cambios de aminoácidos y esto podría aportarle ciertas ventajas evolutivas. Concretamente, por ejemplo, esta característica podría permitir al virus adaptarse a interactuar con factores celulares de líneas o tipos celulares distintos para la replicación de su ARN.

En el trabajo de Willcocks y col. (1994a) se describe una deleción de 15 aa en determinadas cepas de HAstV y se relaciona con fenómenos de adaptación del virus a replicar en líneas celulares no humanas como las células HEK. Así, las cepas que habrían sido aisladas directamente en células CaCo-2, no contendrían la deleción. En nuestro trabajo, de la colección de 101 muestras la cual incluye tanto muestras salvajes como cepas adaptadas a replicar en células CaCo-2, esta deleción se encontró en el 95% de las muestras. Puesto que parece improbable que todas estas muestras contengan la deleción por fenómenos de adaptación a células no humanas, y después de analizar con detalle la secuencia de aminoácidos, nos inclinaríamos a sugerir que en realidad, más que una deleción, estaríamos frente a un fenómeno de una duplicación de 15 aa, el cual estaría presente en el 5% de las cepas. Del mismo modo, esta duplicación podría estar relacionada con la adaptación del virus a determinados tipos celulares. Es más, la observación de una relación entre diferentes

propiedades replicativas y la variabilidad de esta región HVR (Estudio I) corroboraría de forma indirecta esta hipótesis.

Las transiciones (S) consisten en la incorporación por error de una purina por una purina o de una pirimidina por una pirimidina, mientras que las transversiones (V) resultan en una sustitución de una purina por una pirimidina o *vice versa*. En total, existen 4 posibles errores que generan una transición (A↔G, C↔T) y 8 posibles cambios que dan lugar a una transversión (A↔C; A↔T; G↔C; G↔T). Así pues, a pesar de que las transversiones son más probables, cuando conducen a un cambio de aminoácido provocan un impacto mucho mayor sobre la proteína, y por este motivo en la mayoría de genes, las transversiones son mucho menos frecuentes que las transiciones (Salemi & Vandamme, 2003). En la región HVR analizada, a pesar de que los porcentajes de transversiones y transiciones son superiores que para otras regiones de las proteínas no estructurales, la *ratio* R=S/V es del mismo orden de magnitud que en las otras regiones analizadas, indicando que en cualquier caso, las transiciones son más frecuentes que las transversiones.

El análisis filogenético de las secuencias confirmó los resultados obtenidos por otros autores, quienes observaron que las relaciones evolutivas entre los serotipos de HAstV varían según los tres ORFs (Belliot *et al.*, 1997c; Lukashov & Goudsmit, 2002; Méndez-Toss *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2001b; Walter *et al.*, 2001b). A pesar de que la aplicación de diferentes presiones selectivas en diferentes regiones del genoma podría contribuir a explicar estas diferencias, parece probable que las diferencias más acentuadas sean debidas a la existencia de fenómenos de recombinación entre los diferentes ORFs, o incluso entre diferentes zonas de un mismo ORF. En varios estudios epidemiológicos se han observado casos de co-infecciones entre diferentes tipos antigénicos de HAstV (Matsui *et al.*, 1998), ofreciendo la posibilidad de que ocurran fenómenos de recombinación en una célula infectada por ambos serotipos. Recientemente, Walter y col. (2001a) aislaron la primera cepa salvaje recombinante entre los serotipos 3 y 5. Además, determinados virus ARN tienen una mayor tendencia a la recombinación debido a la naturaleza de su ARN polimerasa, la cual tiene facilidad para cambiar de molde durante la transcripción (Arnold & Cameron, 1999; Nagy & Simon, 1997; Nagy *et al.*, 1998; Nagy *et al.*, 1999). Este mecanismo de recombinación se denomina *copy-choice* (Kirkegaard & Baltimore, 1986). Debido a que en este trabajo se han analizado secuencias de fragmentos relativamente cortos, es imposible identificar el lugar exacto donde podría ocurrir la recombinación. En cualquier caso, la recombinación debería tener lugar en algún punto entre el ORF1a y el ORF2. Algunas hipótesis apuntarían como posibles lugares “calientes” o *hot spots* de recombinación, a regiones del ARN genómico con una elevada estructura secundaria. Este es el caso del *ribosomal frameshifting* (RFS) que existe entre los ORFs 1a y 1b (Jiang *et al.*, 1993) o de la estructura de triple *hairpin* descrita entre el ORF1b y el ORF2 (Walter *et al.*, 2001a). Finalmente, también podrían producirse fenómenos de recombinación gracias a la participación del ARN subgenómico. Del mismo modo que se ha

visto que ocurre con virus vegetales de la familia *Luteoviridae*, la ARN polimerasa podría cambiar de molde al llegar a la región promotora del ARN subgenómico y continuar copiando la cadena de ARN subgenómico de otro virus (Koev *et al.*, 1999; Miller & Koev, 2000).

Asimismo, es interesante destacar la poca variabilidad genética observada en la región N-terminal del ORF2 estudiada y tan ampliamente utilizada en los estudios epidemiológicos. Curiosamente, la *ratio* entre sustituciones sinónimas y no sinónimas  $K_s/K_a$  dio un valor similar al valor calculado para el ORF1a y el ORF1b completos. En cambio, el valor de  $K_s/K_a$  para el ORF2 completo fue mucho menor. Todo esto indica que mientras que la región de la cápside es, en general, muy tolerante a los cambios de aminoácidos, la secuencia peptídica de la región N-terminal del ORF2 podría tener una importancia especial para el virus. A pesar de que el epítipo para el anticuerpo MAb 8E7 que reconoce por igual todos los serotipos de HAstV (Herrmann *et al.*, 1988) no se ha mapado con exactitud, resultados no publicados de Geigenmüller y col. sugieren que el epítipo podría estar comprendido entre los aminoácidos 71 y 260 del total del ORF2, y que por tanto, podría solaparse a la región analizada en este estudio.

La caracterización de la diversidad genética de la región hipervariable de la proteína nsP1a/4 y su posible relación con la capacidad replicativa nos motivó a diseñar un nuevo sistema de detección y tipado que nos permitiera identificar estas distintas propiedades de determinadas cepas de HAstV y poder trazar así diferentes características de virulencia que pudieran tener un interés médico. Sistemas similares se han desarrollado recientemente para otros virus como Adenovirus (Allard *et al.*, 2001). El sistema consiste en la amplificación por RT-PCR de la región HVR y el análisis del amplímero obtenido por RFLP después de una digestión única con la enzima de restricción *DdeI*. Las ventajas de este sistema frente a otros sistemas de tipado radica en la simplicidad y el bajo coste económico que conlleva realizar una digestión enzimática. Puesto que el fragmento amplificado es de pequeño tamaño, la sensibilidad de la RT-PCR con los oligonucleótidos A1/A2 y A1bis/A2bis es mayor que la RT-PCR con los oligonucleótidos Mon244/Mon245 de Noel y col. (1995). Además, a pesar de que la correlación no es absoluta, la mayoría de patrones RFLP permiten también inferir la información del serotipo de la muestra. De este modo, mediante un único test de diagnóstico, se puede llegar a conocer dos tipos de información de gran interés en epidemiología clínica. Finalmente, mientras que cualquier otro sistema de tipado que implique la secuenciación del fragmento obtenido en la RT-PCR no permite tipar a la vez dos virus que estén presentes en una misma muestra, el análisis por RFLP permite con facilidad co-detectar dos virus de tipos distintos simultáneamente. Esta característica es importante cuando se trata de analizar muestras de origen clínico, pero puede tener especial interés para muestras ambientales, en las cuales es común identificar más de un tipo de virus en la misma muestra.



## **5. ESTUDIO III: Epidemiología molecular de astrovirus en Barcelona**



## ESTUDIO III: Epidemiología molecular de astrovirus en Barcelona

### 5.1 Antecedentes

A pesar de que la mayoría de estudios epidemiológicos realizados sobre HAstV han utilizado técnicas de detección basadas en la microscopía electrónica (ME) y en las técnicas de inmunoensayo (EIA), durante los últimos años también ha incrementado mucho el número de trabajos basados en técnicas moleculares, sobre todo en la RT-PCR. Puesto que la sensibilidad de las técnicas moleculares frente al EIA es mucho mayor (Gaggero *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 1995), hoy en día se tiende a creer que la incidencia de HAstV ha sido infravalorada. Por otro lado, los estudios de seroprevalencia indican que la mayoría de niños adquieren anticuerpos contra HAstV durante los primeros años de vida (Koopmans *et al.*, 1998; Kriston *et al.*, 1996) y por consiguiente, la comunidad científica de hoy cada vez otorga a los HAstV una mayor relevancia médica. En España sin embargo, los datos epidemiológicos que existen de las infecciones por astrovirus son todavía muy escasos y se desconoce cuál es el impacto real de este virus entérico en la población tanto infantil como adulta.

Así pues, el objetivo de nuestro estudio fue aplicar el sistema de diagnóstico y tipado molecular desarrollado en nuestro laboratorio y realizar el primer estudio epidemiológico a gran escala de las infecciones por astrovirus en la población pediátrica en España. Para ello, se recogieron periódicamente durante 3 años las muestras de niños con gastroenteritis de 4 hospitales de la región de Barcelona. Todas las muestras se analizaron por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos para la detección del genogrupo A, y una colección representativa de muestras se analizó para la detección del genogrupo B. Paralelamente, puesto que todas las muestras positivas para astrovirus fueron serotipadas por secuenciación de una región de la

cápside, también se analizó con detalle la diversidad genética de esta región de los distintos HAstV aislados durante el estudio.

## **5.2 Material y métodos**

### **5.2.1 Muestras fecales**

Entre el mes de mayo de 1997 y el mes de abril del año 2000, se coleccionaron 2,291 muestras de heces de niños con gastroenteritis de 4 hospitales del área de Barcelona (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Hospital de Sant Joan de Déu, Hospital de Terrassa y Hospital Vall d'Hebron). Además, también se recogieron 56 muestras de gastroenteritis de adultos. En un número elevado de muestras y siguiendo las prescripciones médicas, se realizaron tests de diagnóstico rutinario para la detección de patógenos bacterianos comunes, rotavirus, adenovirus y parásitos (Tabla 5.1). Para la detección de astrovirus, se preparaba una suspensión fecal al 10% (p/v) en tampón de suspensión y se guardaba a una temperatura de – 80 °C hasta su posterior análisis (ver apéndice material y métodos, apartado 8.5).

Para el estudio específico del genogrupo B de astrovirus, de la colección de muestras utilizadas para el genogrupo A, se seleccionaron al azar 195 muestras negativas para el análisis del genogrupo A, cuya fecha de obtención estaba comprendida entre mayo de 1998 y abril del 2000.

### **5.2.2 Detección de astrovirus**

La detección molecular de HAstV se realizó por RT-PCR sobre los ácidos nucleicos extraídos de la suspensión fecal. Para la detección de astrovirus pertenecientes al genogrupo A, se utilizaron los oligonucleótidos A1 y A2 (Willcocks *et al.*, 1994a), mientras que para la detección del genogrupo B, la RT-PCR se realizó con los oligonucleótidos A1bis y A2bis (ver Tabla 8.1 del apéndice material y métodos). Las condiciones de las reacciones de RT-PCR se detallan en el apartado 4.2.2. Los productos obtenidos de la RT-PCR se confirmaron por *southern blotting* e hibridación molecular con una sonda interna HAstV universal para el genogrupo A y B (ver Tabla 8.1 y apartado 8.27 del apéndice material y métodos), y finalmente, las muestras positivas fueron tipadas por RFLP siguiendo el protocolo detallado en el apartado 8.28 del apéndice material y métodos.

### **5.2.3 Serotipado de astrovirus**

Todas las muestras positivas para HAstV fueron serotipadas por secuenciación del producto de RT-PCR obtenido mediante la amplificación de un fragmento del extremo 5' del ORF2, tal y como lo describen Noel y col. (1995).

### 5.2.4 Análisis de secuencias

Tanto los alineamientos múltiples de secuencias de nucleótidos como de aminoácidos se realizaron con el programa CLUSTALW (Higgins *et al.*, 1994). La diversidad genética se estimó mediante el parámetro de distancia genética (p-dist), es decir, el número de cambios por posición y se calculó utilizando el programa MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 1993). Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el mismo programa. Las matrices de distancias se calcularon con el método de *Kimura two-parameter* y las relaciones filogenéticas se analizaron después de aplicar un *bootstrap* de 100 réplicas. El árbol filogenético consenso se visualizó mediante el programa TreeView.

### 5.2.5 Análisis estadístico

El test de Chi-Cuadrado se utilizó para comparar las tasas de prevalencia entre cada período anual del estudio y para evaluar las diferencias entre la incidencia de HAstV en los diferentes grupos de edad. La asociación entre el serotipo y el grupo de edad se estudió realizando un análisis ANOVA.

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Epidemiología de las infecciones por astrovirus genogrupo A

Durante un período de 3 años comprendido entre mayo de 1997 y abril del año 2000, se analizaron un total de 2,347 muestras fecales provenientes de pacientes con gastroenteritis. La incidencia general de HAstV genogrupo A fue de 4.9% (116 de 2,347 muestras).

**Tabla 5.1** Incidencia de enteropatógenos detectados en las muestras fecales.

Enteropatógeno	Analiz./Total	Positivos (%)	Negativos (%)
Bacterias y Hongos <sup>a</sup>	1896/2347	171 (9%)	1725 (91%)
Parásitos	888/2347	10 (1%)	878 (99%)
Rotavirus <sup>c</sup>	1265/2347	151 (12%)	1114 (88%)
Adenovirus <sup>c</sup>	404/2347	8 (2%)	396 (98%)
Astrovirus genogrupo A	2347/2347	116 (5%)	2229 (95%)

<sup>a</sup> Bacterias y hongos se diagnosticaron mediante técnicas de cultivo estándares.

<sup>b</sup> Los parásitos se determinaron por microscopía óptica y técnicas inmunológicas.

<sup>c</sup> Rotavirus y adenovirus se determinaron por tests de aglutinación de látex o técnicas de EIA.

Un número importante de muestras fue también analizado en los diferentes hospitales para identificar la presencia de otros patógenos (Tabla 5.1). Un total de 235 muestras fueron positivas para alguno de los siguientes agentes: rotavirus, adenovirus, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Aeromonas spp.*, *Yersinia spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Candida spp.*, *Giardia*, *Entamoeba* y *Cryptosporidium*. Además, se detectaron infecciones

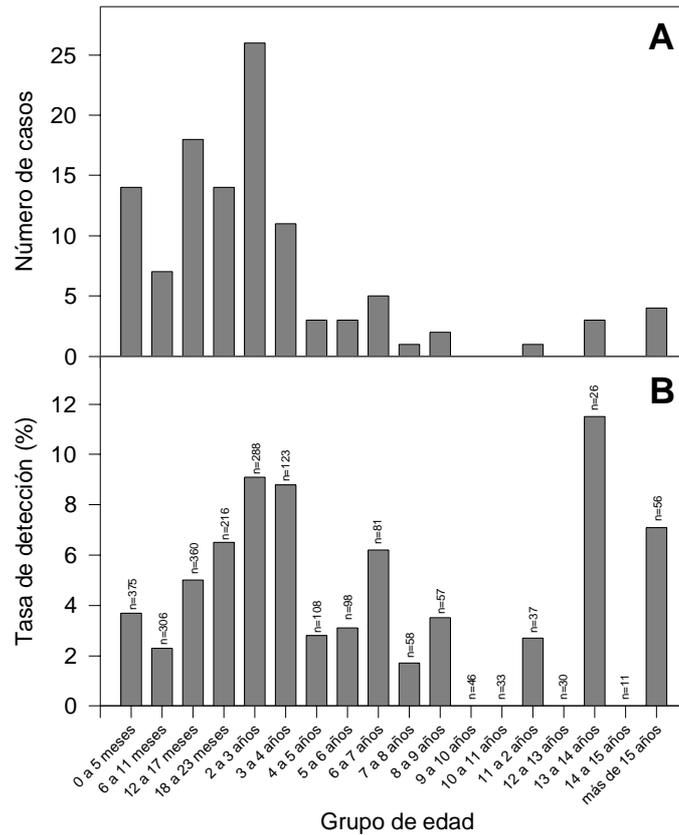
mixtas producidas por HAstV genogrupo A y algún otro patógeno en 20 de las 116 muestras positivas para HAstV, las cuales representan un 17.2% del total de muestras positivas (Tabla 5.2).

**Tabla 5.2** Infecciones mixtas en los casos positivos para HAstV genogrupo A.

<b>Enteropatógeno</b>	<b>Analiz./Total</b>	<b>Núm. de coinfecciones (%)</b>
Rotavirus	60/116	7 (11.7%)
<i>Campylobacter spp.</i>	87/116	5 (5.7%)
<i>Salmonella spp.</i>	87/116	4 (6.7%)
<i>Aeromonas caviae</i>	87/116	2 (3.3%)
<i>Candida albicans</i>	87/116	1 (1.7%)
<i>Cryptosporidium</i>	47/116	1 (2.1%)
Adenovirus	17/116	0 (0%)

Las características clínicas de las infecciones producidas por HAstV genogrupo A se documentaron para un grupo de 52 pacientes pediátricos del Hospital Vall d'Hebrón. El 51.9% de dichos niños no precisó hospitalización, mientras que el 34.6% fue ingresado a causa de la gastroenteritis (la media de días de hospitalización fue de 10.7, oscilando entre 1-57 días), y el 13.5% de las infecciones fueron consideradas infecciones nosocomiales (la mayoría de pacientes padecía enfermedades oncológicas). Los síntomas clínicos observados fueron diarrea, 86.3%; fiebre por encima de 37.8 °C, 54.9%; y vómitos, 49.0%. Todos los pacientes evolucionaron satisfactoriamente, excepto un niño que sufrió dos episodios de gastroenteritis producida por HAstV genogrupo A durante el mismo año (ver más adelante).

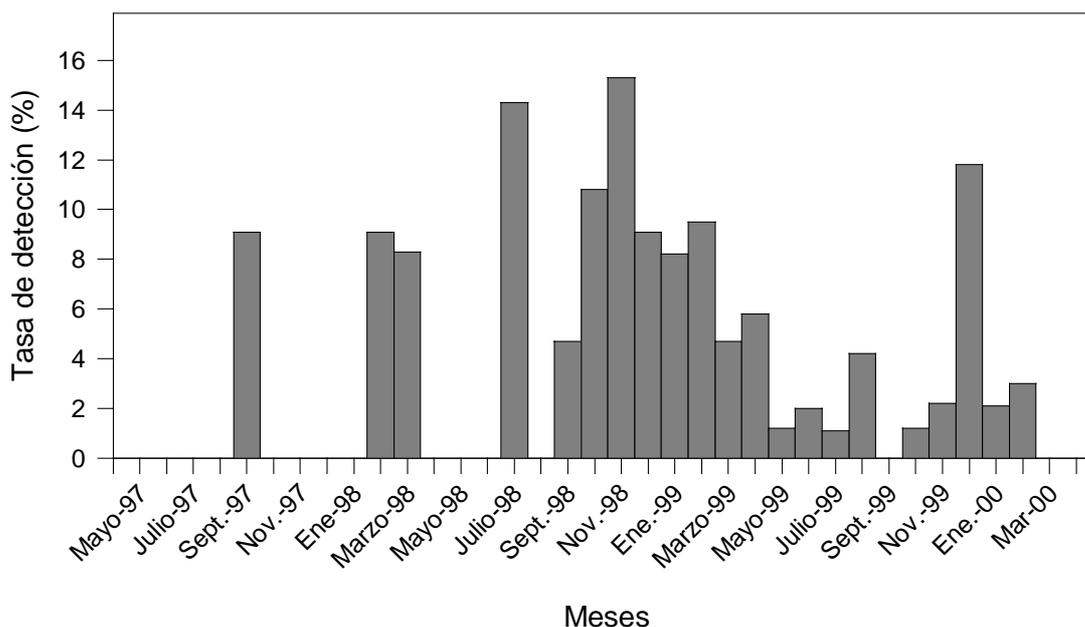
Para la población pediátrica analizada (hasta los 15 años de edad), la media de edad fue de 2.8 años (33.5 meses), y la mediana fue de 1.6 años (19 meses). Para las muestras positivas para HAstV genogrupo A, la media de edad y la mediana fueron, respectivamente, de 2.5 años (29.6 meses) y de 1.9 años (23 meses). Aunque se detectaron infecciones en la mayoría de grupos de edad (Fig. 5.1), el número de casos fue mayor en los niños de entre 2 y 3 años, y el 80% de las infecciones se produjeron en niños menores de 3 años (Fig. 5.1A). También se detectaron 3 casos de infección en recién nacidos. Las tasas de detección para cada grupo de edad se muestran en la Fig. 5.1B. La tasa más alta se observó entre los niños de 13 a 14 años. No obstante, debido a que el número de muestras correspondientes a este grupo de edad es significativamente menor, se puede concluir que la tasa de detección máxima se encuentra en los niños de entre 2 y 4 años.



**Fig. 5.1** Distribución por edades de las infecciones de HAstV genogrupo A causantes de gastroenteritis entre abril 1997 y mayo 2000. (A) Número de muestras positivas para HAstV en cada grupo de edad. (B) Tasa de detección de HAstV en cada grupo de edad. En la parte superior de cada barra del panel B, se muestra el número de muestras analizadas para cada grupo de edad. Se disponía de la información de la edad del paciente para 2,309 muestras.

En este estudio, también se analizaron muestras de pacientes de edades comprendidas entre los 15 y los 82 años. Se detectó ARN de HAstV genogrupo A en 4 muestras de 56 (edades: 27, 28, 59 y 69), lo cual representa una tasa de positividad en adultos del 7%. Cabe destacar que estos pacientes eran pacientes inmunosuprimidos (transplante de médula ósea o mieloma múltiple) o sufrían también otros síndromes (accidente vascular cerebral o colitis ulcerosa).

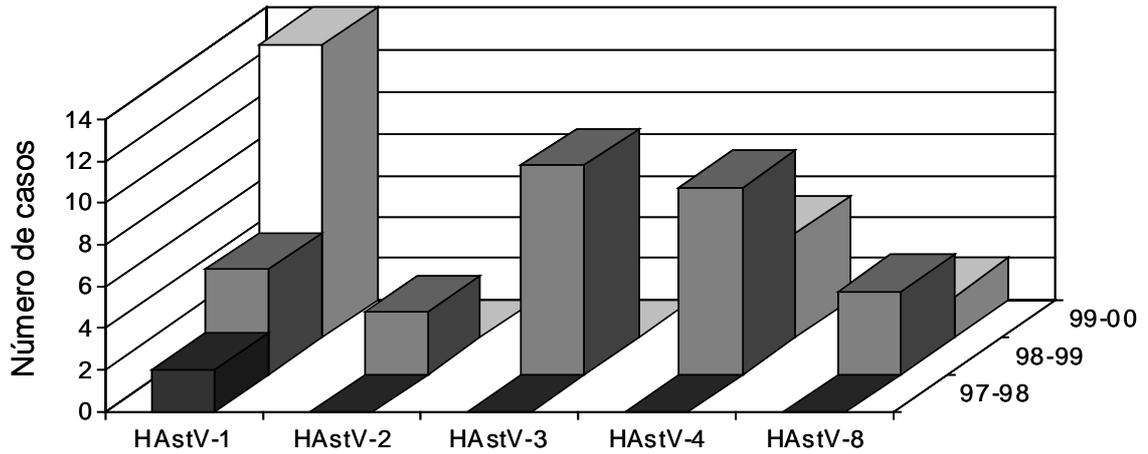
La distribución mensual de la incidencia de HAstV genogrupo A se muestra en la Fig. 5.2. Durante los 3 años que duró el estudio, las tasas de detección fueron superiores durante los meses de invierno, aunque también se produjeron infecciones en verano. Curiosamente, la incidencia entre mayo-98 y abril-99 fue mayor que la incidencia observada entre los años comprendidos entre mayo-97 y abril-98 y mayo-99 y abril-00, siendo respectivamente, 8%, 2.6% y 2.5%. Al analizar estos valores mediante un test  $\chi^2$ , se vio que la incidencia de HAstV durante el año 98-99 fue significativamente mayor que las incidencias durante los años 97-98 y 99-00 ( $\chi^2 = 4.2163$ ,  $p < 0.01$ ).



**Fig. 5.2** Distribución mensual de HAstV genogrupo A entre mayo 1997 y abril 2000.

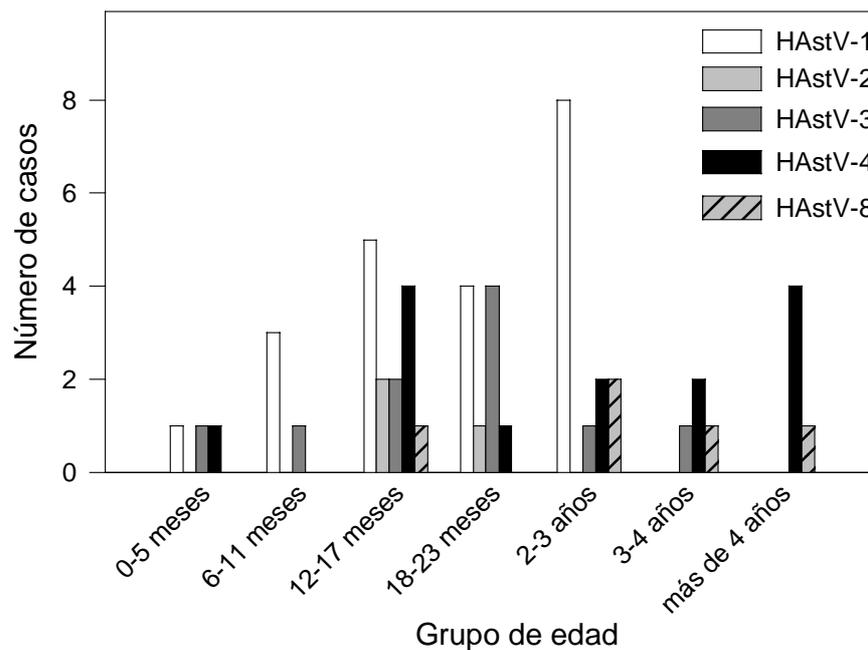
La incidencia anual de cada serotipo se muestra en la Fig. 5.3. Durante el período anual 97-98, el serotipo 1 fue el único serotipo detectado, mientras que en el año 98-99 cinco serotipos diferentes afectaron a la población estudiada, siendo el serotipo 3 el más prevalente, seguido por el serotipo 4. Durante el año siguiente, el serotipo 1 volvió a mostrarse como el más común, siendo responsable del 67% de los casos. La incidencia de los serotipos 4 y 8 mostró una tendencia a disminuir y tampoco se detectó ningún caso ni de serotipo 2 ni 3.

El análisis de la variabilidad genética de los distintos aislados nos permitió describir la emergencia de una cepa de HAstV-1 diferente durante el año 99-00 (ver más adelante). Durante el período de estudio, un niño sufrió un episodio de diarrea producida por un serotipo 3 en noviembre de 1998 y un segundo episodio producido por un serotipo 1 nueve meses más tarde, la cual cosa sugiere la inexistencia de inmunidad heterotípica entre diferentes tipos antigénicos. Asimismo, esta falta de inmunidad heterotípica podría también explicar los cambios en la distribución de serotipos observados en años consecutivos. En general, el serotipo 1 resultó ser el serotipo más prevalente (38%), seguido por el 4 (26%), el 3 (19%), el 8 (11%) y el 2 (6%). Durante el tiempo que duró el estudio, no se detectó ningún caso de serotipo 5.



**Fig. 5.3** Distribución de serotipos de HAstV genogrupo A durante cada período anual del estudio.

De los datos obtenidos sobre la prevalencia de cada serotipo en los diferentes grupos de edad, se observó que los serotipos 1, 2 y 3 tienen una mayor tendencia a afectar a niños menores de 3 años de edad, mientras que los serotipos 4 y 8 tienen una mayor relevancia en niños mayores (Fig. 5.4). Las edades medias para cada serotipo fueron 18.8 meses para el serotipo 1, 17.3 meses para el serotipo 2, 19.1 meses para el serotipo 3, 43.1 meses para el serotipo 4 y 57 meses para el serotipo 8. Al analizar estos resultados mediante un análisis ANOVA, se vio que las medias de edad de los serotipos 4 y 8 eran significativamente superiores a las de los serotipos 1 y 3 ( $p < 0.05$ ). La falta de significación para el serotipo 2 puede explicarse por un número insuficiente de muestras.

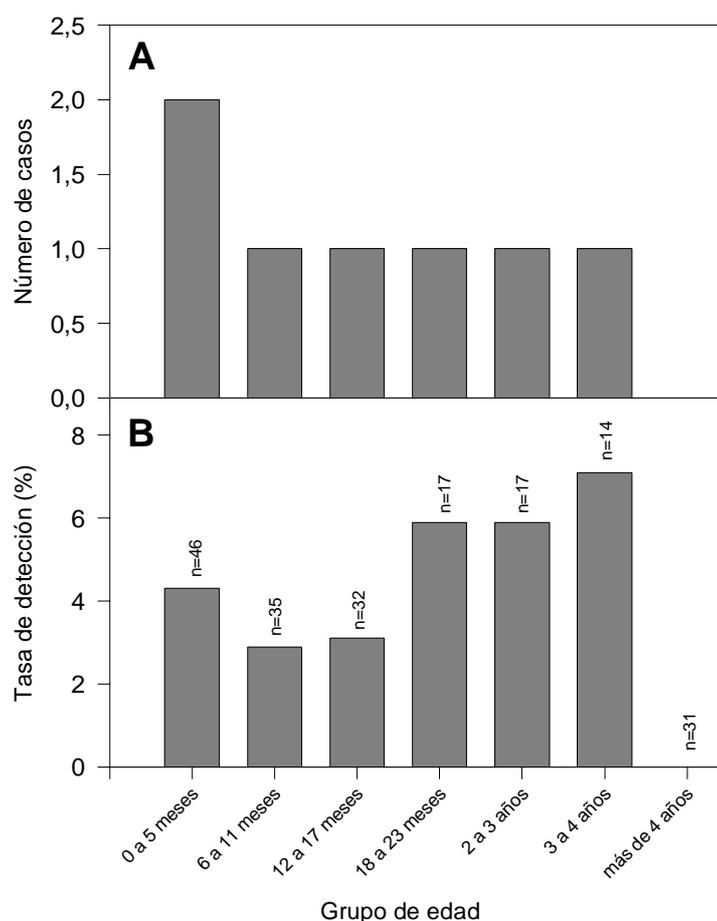


**Fig. 5.4** Distribución de serotipos de las infecciones de HAstV genogrupo A para cada grupo de edad.

### 5.3.2 Epidemiología de las infecciones por astrovirus genogrupo B

La incidencia observada para los astrovirus del genogrupo B a partir de una colección de 195 muestras negativas para el genogrupo A y comprendidas durante un período de tiempo de 2 años fue del 3.6%. De las 7 muestras positivas, 4 de ellas (57%) resultaron ser positivas para otros patógenos (*Salmonella spp.*, rotavirus y adenovirus). No se encontraron diferencias en las características clínicas de las infecciones causadas por el genogrupo B, en comparación a las causadas por el genogrupo A.

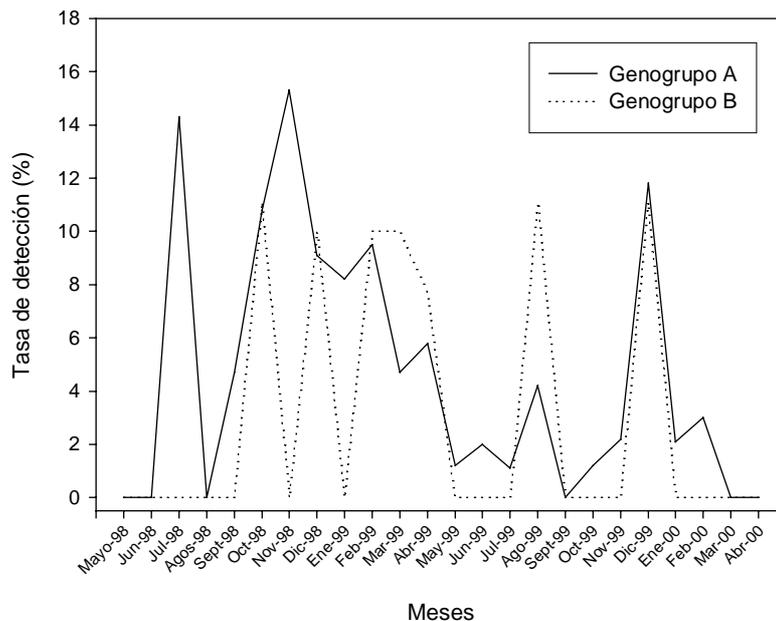
La media y la mediana de edad de la población analizada de 195 muestras fueron respectivamente de 26.3 y 13 meses. Para las 7 muestras positivas, la media de edad observada fue de 18.6 meses y la mediana de 12 meses. A pesar de que se analizaron muestras de niños de todos los grupos de edad hasta los 14 años, únicamente se detectaron HAstV del genogrupo B en niños menores de 4 años, siendo la tasa de positividad más alta en los niños de 3 a 4 años (7.1%) (Fig. 5.5).



**Fig. 5.5** Distribución por edades de las infecciones de HAstV genogrupo B causantes de gastroenteritis entre mayo 1998 y abril 2000. (A) Número de muestras positivas en cada grupo de edad. (B) Tasa de detección en cada grupo de edad. En la parte superior de cada barra del panel B, se muestra el número de muestras analizadas para cada grupo de edad.

En la Fig. 5.6, se muestra la estacionalidad de la incidencia de los dos genogrupos estudiados. De la misma forma que ocurre con el genogrupo A, la frecuencia de infecciones por genogrupo B de HAstV también aumenta durante los meses fríos del año. Curiosamente, del mismo modo que ocurre con el genogrupo A, la incidencia de HAstV genogrupo B entre mayo-98 y abril-99 fue mayor que la incidencia observada entre los años comprendidos entre mayo-99 y abril-00, siendo respectivamente, 8%, 2.5%. Al analizar estos valores mediante un test  $\chi^2$ , se vio que la incidencia de HAstV genogrupo B durante el año 98-99 fue significativamente mayor que la incidencia durante el año 99-00 ( $\chi^2 = 5.7139$ ,  $p < 0.01$ ).

De las 7 muestras positivas para el genogrupo B, ninguna de ellas pudo ser amplificadas utilizando los oligonucleótidos de la región de la cápside que permite conocer el serotipo a partir de la información de la secuencia de nucleótidos. No obstante, puesto que el estudio publicado por Belliot y col. (1997c) agrupa a los serotipos 6 y 7 en el genogrupo B, cabe pensar que es probable que las muestras positivas pertenezcan a estos serotipos.



**Fig. 5.6** Distribución mensual de las infecciones de HAstV de los dos genogrupos causantes de gastroenteritis entre mayo 1998 y abril 2000.

### 5.3.3 Tipado por RFLP

Del total de 123 muestras positivas para HAstV genogrupo A y B, 65 pudieron ser genotipadas mediante el sistema de RFLP (52.8%). El resultado obtenido muestra que el subgenotipo más prevalente fue el genotipo HAstV-A (20%), seguido por HAstV-C (18.6%), HAstV-D (16.9%), HAstV-FP (16.9%), HAstV-BE (15.4%), HAstV-R (9.2%), HAstV-N (1.5%) y HAstV-S (1.5%). Es interesante recordar que los subgenotipos HAstV-C y HAstV-D han demostrado estar asociados a un título de partículas víricas en heces de niños con

gastroenteritis superior al resto de subgenotipos y que también se ha observado una relación entre el subgenotipo HAstV-C y casos de diarreas persistentes (Caballero et al., 2003).

Al analizar la distribución anual de los distintos subgenotipos (Fig. 5.7), los resultados confirman que, a pesar de que durante un mismo año distintas cepas co-circulan en la comunidad, el patrón de frecuencia de subgenotipos varía a lo largo de los años. Así, por ejemplo, mientras que durante el año 98-99 el subgenotipo más prevalente fue el subgenotipo HAstV-C, durante el año siguiente, se detectaron más casos de subgenotipo HAst-FP.

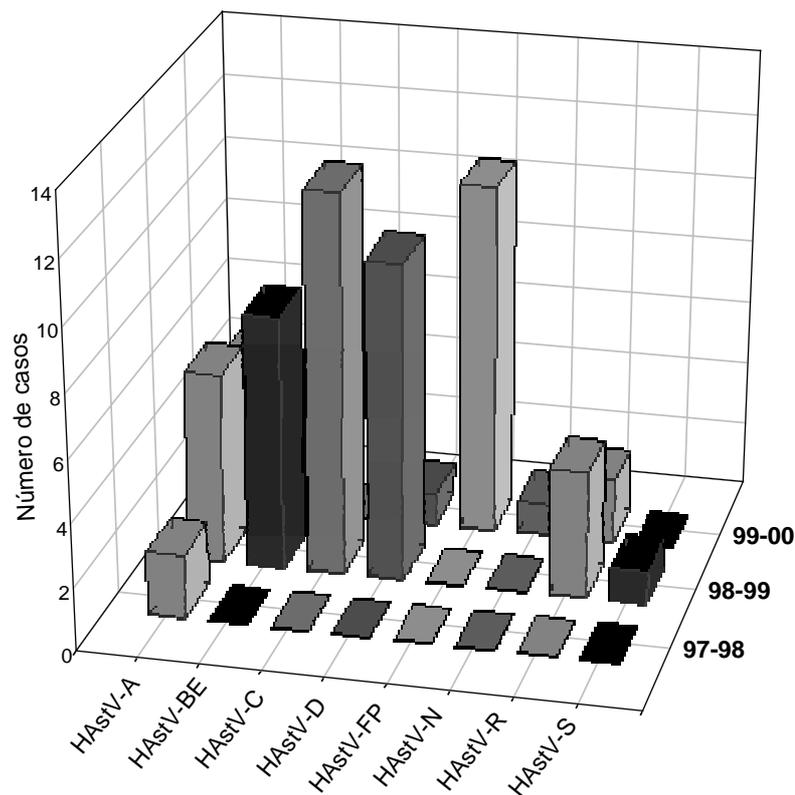


Fig. 5.7 Distribución de subgenotipos de HAstV aislados durante cada período anual del estudio.

### 5.3.4 Variabilidad genética de la región de la cápside

Del total de 123 muestras positivas, 49 de ellas (39.8%) pudieron ser serotipadas a partir de la secuencia obtenida del fragmento de 348 pb de la cápside (Noel *et al.*, 1995). Debido al gran número de secuencias correspondientes a esta región disponibles en las bases de datos, nos propusimos realizar un análisis exhaustivo de la variabilidad nucleotídica y aminoacídica de este fragmento. La información de las secuencias utilizadas de las bases de datos se muestra en la Tabla 5.3. También incluimos en el análisis las secuencias correspondientes a la colección de muestras positivas para astrovirus utilizada en el Estudio II. En total, el análisis incluía 212 cepas de distintas regiones geográficas de los 5 continentes: Albania (Alb), Alemania, Argentina (Arg), Australia, China, Colombia (Col), España (Bcn),

Francia (F), Japón, Holanda (Neth), Reino Unido (UK), México (Yuc), Sudáfrica (AS) y Venezuela (Ven).

**Tabla 5.3** Información de las secuencias del *Genbank* utilizadas para el análisis genético.

Cepa	Serot.	Núm. Acc.	Origen	Fecha	Referencia
<b>Cepas de Referencia</b>					
HAstV-1 Oxford	1	L23513	Reino Unido		Matsui <i>et al.</i> , 1994
HAstV-1 Newcastle	1	Z25771	Reino Unido		Willcocks <i>et al.</i> , 1992
HAstV-2 Oxford	2	L13745	Reino Unido		Jiang <i>et al.</i> , 1993
HAstV-3 Oxford	3	L38505	Reino Unido		Noel <i>et al.</i> , 1995
HAstV-4 Oxford	4	L38506	Reino Unido		Noel <i>et al.</i> , 1995
HAstV-5 Oxford	5	U15136	Reino Unido		Monroe <i>et al.</i> , <i>unpub.</i>
HAstV-6 Oxford	6	L38507	Reino Unido	1989	Noel <i>et al.</i> , 1995
HAstV-7 Oxford	7	L38508	Reino Unido	1991	Noel <i>et al.</i> , 1995
<b>Estudios epidemiológicos</b>					
Rostock	3	AF141381	Alemania	1998	Oh & Schreier, 2001
BLZ/12/97/DEU	1	AY007577	Alemania	1997	
BER/3/98/DEU	3	AY007585	Alemania	1998	
STU/3/99/DEU	3	AY007588	Alemania	1999	
KOB/4/99/DEU	4	AY007591	Alemania	1999	
HEI/2.3/99/DEU	1	AY007578	Alemania	1999	
ORA/1/98/DEU	1	AY007579	Alemania	1998	
PIR/4/98/DEU	1	AY007580	Alemania	1998	
ROS/3.2/98/DEU	1	AY007581	Alemania	1998	
SWE/3.1/98/DEU	1	AY007582	Alemania	1998	
SWE/3.2/98/DEU	1	AY007583	Alemania	1998	
HEI/2.2/99/DEU	2	AY007584	Alemania	1999	
NEU/3.2/98/DEU	3	AY007586	Alemania	1998	
HEI/2.1/99/DEU	3	AY007587	Alemania	1999	
NEU/3.1/98/DEU	4	AY007579	Alemania	1998	
BER/4/99/DEU	4	AY007590	Alemania	1999	
Arg154	4	AY324854	Argentina	-	Espul <i>et al.</i> , <i>unpub.</i>
Arg359	4	AY324855	Argentina	-	
Arg486	4	AY324856	Argentina	-	
Arg855	2	AY324857	Argentina	-	
Arg158	1	AY324858	Argentina	-	
Arg0.28	1	AY324859	Argentina	-	
Arg053	1	AY324860	Argentina	-	
Arg319	1	AY324861	Argentina	-	
Arg248	1	AY324862	Argentina	-	
Arg660	1	AY324863	Argentina	-	
Arg797	3	AY324864	Argentina	-	
Arg422	3	AY324865	Argentina	-	
Arg316	5	AY324866	Argentina	-	
Arg917	5	AY324867	Argentina	-	
Arg317	5	AY324868	Argentina	-	
CAV1A	1	AF440292	Australia	1982, 84, 85	Schnagl <i>et al.</i> , 2002
CAV1B	1	AF440293	Australia	1993	
CAV1C	1	AF440294	Australia	1993	
CAV1D	1	AF440295	Australia	1995	

CAV1E	1	AF440296	Australia	1995	Schnagl <i>et al.</i> , 2002
CAV1F	1	AF440297	Australia	1996	
CAV1G	1	AF440298	Australia	1992	
CAV2A	2	AF440299	Australia	1981	
CAV2B	2	AF440300	Australia	1995, 96	
CAV2C	2	AF440301	Australia	1996	
CAV3A	3	AF440302	Australia	1982	
CAV3B	3	AF440303	Australia	1990	
CAV3C	3	AF440304	Australia	1991, 92	
CAV3D	3	AF440305	Australia	1994	
CAV3E	3	AF440306	Australia	1997	
CAV3F	3	AF440307	Australia	1997	
CAV3G	3	AF440308	Australia	1998	
CAV3H	3	AF440309	Australia	1998	
CAV4A	4	AF440791	Australia	1982	
CAV4B	4	AF440792	Australia	1985	
CAV4C	4	AF440793	Australia	1994	
CAV4D	4	AF440794	Australia	1995	
CAV4E	4	AF440795	Australia	1995	
CAV4F	4	AF440796	Australia	1997	
CAV4G	4	AF440797	Australia	1998	
RCH1C	1	U49212	Australia	1995	Palombo & Bishop, 1996
RCH1D	1	U49213	Australia	1995	
RCH1E	1	U49214	Australia	1980	
RCH1F	1	U49215	Australia	1982, 85	
RCH1A	1	U49216	Australia	1995	
RCH1B	1	U49217	Australia	1995	
RCH4A	4	U49218	Australia	1995	
RCH4B	4	U49219	Australia	1995	
MAV5	5	U49220	Australia	1984	
Melb1E	1	AF175253	Australia	1997	Mustafa <i>et al.</i> , 2000
Melb1F	1	AF175254	Australia	1997	
Melb1G	1	AF175255	Australia	1997	
Melb1H	1	AF175256	Australia	1997	
Melb1I	1	AF175257	Australia	1998	
Melb1J	1	AF175258	Australia	1998	
Melb4C	4	AF175259	Australia	1998	
Melb2A	2	AF175260	Australia	1996	
Melb8A	8	AF175261	Australia	1997	
Col237	4	AF211957	Colombia	1997-99	Medina <i>et al.</i> , 2000
Col505	3	AF211958	Colombia	1997-99	
Col673	2	AF211959	Colombia	1997-99	
Col664	2	AF211960	Colombia	1997-99	
Col546	2	AF211961	Colombia	1997-99	
Col526	1	AF211962	Colombia	1997-99	
Col509	1	AF211963	Colombia	1997-99	
Col503	1	AF211964	Colombia	1997-99	
Col418	1	AF211965	Colombia	1997-99	
Osaka91	6	AB013618	Japón	1991	Oishi <i>et al.</i> , 1994
Katano23-6	6	AB031031	Japón	1991	
Katano24	6	AB031030	Japón	1991	
O-03/91-283	4	AB025801	Japón	1991	Hachiya <i>et al.</i> , <i>unpub.</i>
O-15/88-532	4	AB025802	Japón	1988	
O-16/88-561	4	AB025803	Japón	1988	
O-20/93-601	4	AB025804	Japón	1993	

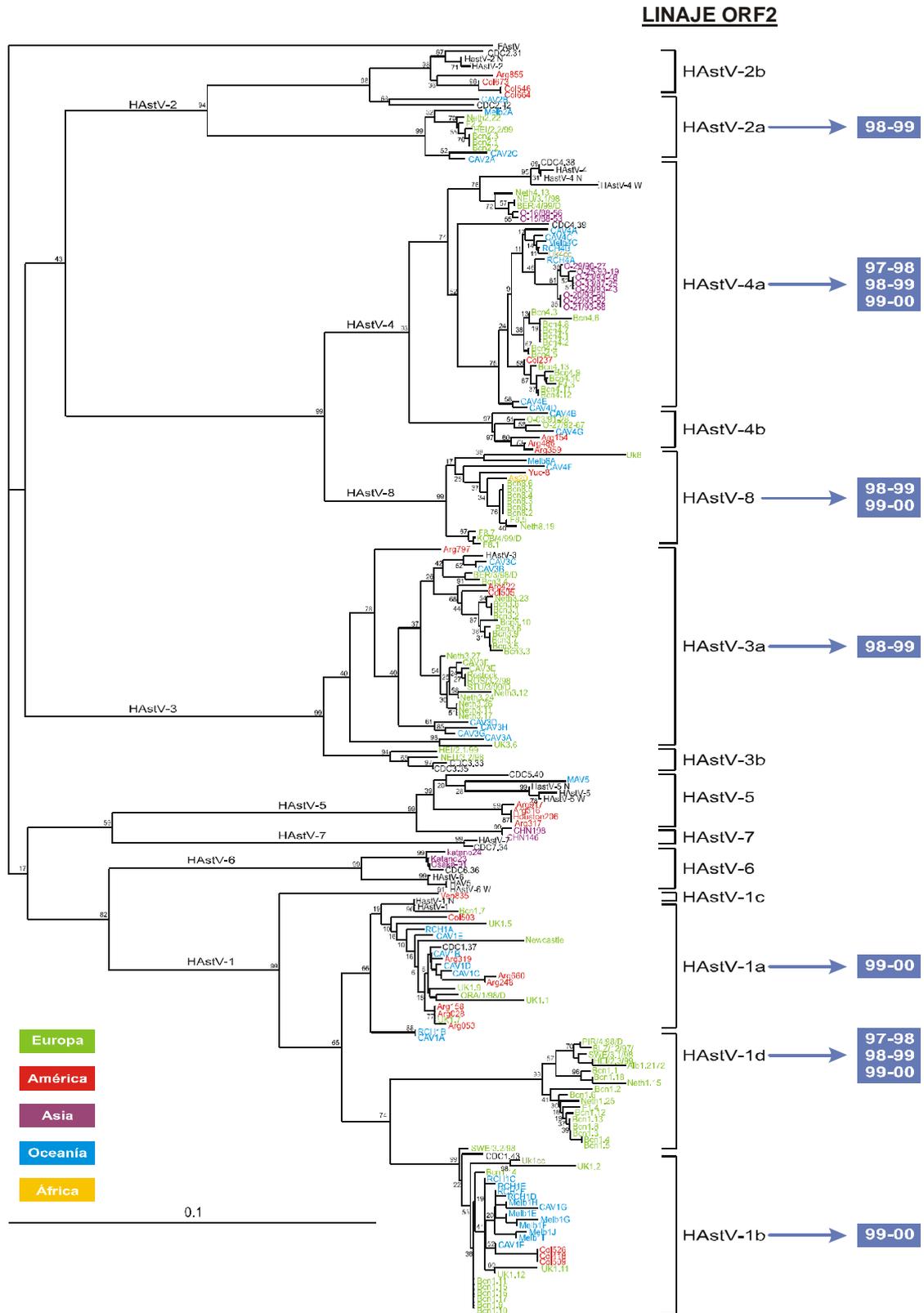
O-21/93-583	4	AB025805	Japón	1993	Hachiya <i>et al.</i> , <i>unpub.</i>
O-22/93-525	4	AB025806	Japón	1993	
O-23/93-482	4	AB025807	Japón	1993	
O-24/93-439	4	AB025808	Japón	1993	
O-25/93-197	4	AB025809	Japón	1993	
O-27/92-676	4	AB025810	Japón	1992	
O-29/90-276	4	AB025811	Japón	1990	
O-33/87-25	4	AB025812	Japón	1987	
Ven15	3	AF211954	Venezuela	1994-95	
Ven14	3	AF211955	Venezuela	1994-95	
Ven835	1	AF211956	Venezuela	1994-95	
<b>Otras cepas</b>					
CHN198	5	AB037274	China	1996	Wang <i>et al.</i> , <i>unpub.</i>
CHN146	5	AB037273	China	1996	Want <i>et al.</i> , <i>unpub.</i>
Houston2067	3/5	AF292080	USA		Walter <i>et al.</i> , 2001a
Yuc-8	8	AF260508	México		Méndez-Toss <i>et al.</i> , 2000
AS20	8	AF292079	Sudáfrica		Taylor <i>et al.</i> , 2001b
HAstV-8	8	Z66541	Reino Unido		Carter <i>et al.</i> , <i>unpub.</i>
hav6005	6	Z46658	Reino Unido		Willcocks <i>et al.</i> , 1994a
FAstV	-	AF056197	Reino Unido	-	Harbour <i>et al.</i> , 1987

*unpub.*: no publicados

Con todas las secuencias disponibles, se construyó un árbol filogenético con el fin de estudiar las relaciones genéticas y analizar la presencia de distribución geográfica entre ellas (Fig. 5.8). Se realizó un *bootstrap* de 100 réplicas y se colocó la raíz utilizando la secuencia de astrovirus felino (FAstV) como *outgroup*.

El nivel de variabilidad genética, medido como el número de sustituciones nucleotídicas por posición nucleotídica (p-dist) se calculó para cada serotipo/genotipo. El grupo antigénico con una mayor diversidad nucleotídica resultó ser el serotipo 2 (p-dist=0.083), seguido por el serotipo 1 (p-dist=0.060), el serotipo 5 (p-dist=0.038), el serotipo 3 (p-dist=0.036), el serotipo 4 (p-dist=0.035), el serotipo 6 (p-dist=0.026), el serotipo 8 (p-dist=0.022) y el serotipo 7 (p-dist=0.006). Todos los valores de distancias genéticas entre los diferentes serotipos fueron superiores al 0.18, a excepción de los serotipos 4 y 8, entre los cuales esta distancia era únicamente de 0.09.

Siguiendo lo establecido por Medina y col. (2000), se identificaron los diferentes linajes genéticos dentro de cada serotipo. Adicionalmente, se consideró una divergencia nucleotídica entre linajes superior al 5.5%. Los resultados muestran como las muestras de serotipo 1 se agrupaban en 4 linajes principales con un elevado nivel de confianza (HAstV-1a, HAstV-1b, HAstV-1c y HAstV-1d). En cuanto al serotipo 2, únicamente pudieron distinguirse 2 grandes linajes (HAstV-2a y HAstV-2b). En el serotipo 4 las muestras se agrupaban también



**Fig. 5.8** Árbol filogenético basado en la región de 348 pb del ORF2 de 212 cepas de astrovirus aisladas en distintos países, incluyendo las 49 muestras aisladas en Barcelona (Bcn). Los valores del análisis de *bootstrap* se muestran en los vértices (algunos valores se han omitido para una mayor brevedad). El código de colores indica la procedencia geográfica de las distintas cepas para las cuales se dispone de la información. A la derecha del árbol se indican los distintos linajes genéticos y el período anual durante el cual se aislaron las muestras del estudio epidemiológico en Barcelona.

en 2 linajes principales (HAstV-4a y HAstV-4b), igual que en el serotipo 3 (HAstV-3a y HAstV-3b). Para los serotipos 5, 6, 7 y 8 no pudo distinguirse más que un linaje para cada uno. Las cepas correspondientes al estudio epidemiológico de Barcelona (Bcn) fueron aisladas durante los 3 períodos anuales que duró el estudio y mientras que algunos linajes, como el HAstV-1d, se detectaron durante los 3 años, otros linajes se detectaron únicamente durante una temporada determinada (Fig. 5.8).

El análisis de las relaciones genéticas entre cepas de distinta procedencia geográfica permitió concluir que en la mayoría de poblaciones co-circulan diferentes cepas pertenecientes a distintos serotipos y distintos linajes genéticos. No obstante, también se observó que algunos linajes sólo han sido identificados hasta ahora en regiones geográficas exclusivas. Este es el caso del linaje HAstV-1c, que contiene exclusivamente una muestra de Venezuela, el linaje 3b, que contiene secuencias europeas, o el linaje HAstV-1d, el cual también contiene únicamente muestras de cepas aisladas en Europa (Barcelona, Alemania, Francia, Holanda y Albania).

Al comparar las muestras de Barcelona con las cepas de referencia para cada serotipo, la identidad nucleotídica resultó ser alta en todos los casos (90-97%) excepto en el serotipo 2, la cual fue únicamente del 85%. A nivel de aminoácidos, el grado de conservación fue alto para todos los tipos antigénicos, incluso para el serotipo 2. Todas las muestras fueron 100% idénticas a las cepas de referencia, excepto una muestra de serotipo 3, 1 muestra de serotipo 1, todas las muestras de serotipo 4 y todas las de serotipo 8. En la muestra de serotipo 3 (Bcn3.10) se detectó una sustitución de aminoácido conservativa, no descrita con anterioridad en la bibliografía. La muestra contenía un cambio Arg→His en la posición 84 de la proteína de la cápside. Al comparar esta posición con los residuos presentes en los otros serotipos, se vio que es una posición bastante variable, siendo Arg en los serotipos 2, 3 y 7; Arg o Thr en el serotipo 1; Arg o Gln en el serotipo 5; Lys en el serotipo 6; y Thr en los serotipos 4 y 8. En la muestra de serotipo 1 (Bcn1.7) se detectó una sustitución Ala→Gly en la posición 87, comparado con la cepa de referencia. En esta misma posición, todas las cepas serotipo 4 aisladas en Barcelona mostraban un cambio Pro→Ala, comparado con la cepa de referencia. En todas las demás secuencias de serotipo 4 disponibles en las bases de datos, en esta posición encontramos una Ala, así como también en todos los demás serotipos, la cual cosa indica que es un aminoácido relativamente muy conservado. Además, también se detectó una sustitución de Val→Ile en la posición 192 de la cápside en la muestra Bcn4.9. Esta sustitución también la encontramos en las cepas de serotipo 6 y en las cepas de Sudamérica de serotipo 1 (Col418, Col509 y Col526). Las demás muestras de serotipo 1, en esta posición contenían un residuo Thr.

## 5.4 Discusión

Este trabajo constituye el primer estudio a gran escala realizado en España sobre las infecciones por HAstV. La incidencia general de este tipo de infecciones resultó ser del 4.9% para el genogrupo A y del 3.6% para el genogrupo B. En general, estos resultados están en concordancia con estudios realizados en otros países desarrollados, los cuales hablan de incidencias de entre el 2 y el 9% (Bon *et al.*, 1999; Gaggero *et al.*, 1998; Mustafa *et al.*, 2000). Los estudios realizados en España de un año de duración, muestran tasas de detección de astrovirus del 5.5% en Zaragoza (López *et al.*, 2000) y del 11.4% en Madrid (Dalton *et al.*, 2002). Por otra parte, cabe destacar la elevada incidencia observada para las infecciones causadas por genogrupo B, el cual engloba los serotipos 6 y 7, pues en la mayoría de estudios epidemiológicos realizados hasta la fecha mediante técnicas moleculares, estos dos serotipos han sido aislados con una frecuencia extremadamente baja. Así, mientras que no se han detectado casos de infecciones por 6 ni 7 en Alemania (Oh & Schreier, 2001; Oh *et al.*, 2003), Australia (Mustafa *et al.*, 2000), Chile (Gaggero *et al.*, 1998), Francia (Traore *et al.*, 2000), Irlanda (McIver *et al.*, 2000), ni en Japón (Sakamoto *et al.*, 2000), sí que se detectaron casos de serotipo 6 en Egipto (Naficy *et al.*, 2000), representando el 7% de las infecciones, y en Sudáfrica, donde se atribuyeron al serotipo 6 el 8% de las infecciones por astrovirus y donde se detectó serotipo 7 en un 16% de las muestras ambientales positivas para astrovirus (Nadan *et al.*, 2003). Todo ello, junto con los resultados generados por este estudio, indica que la incidencia de estos serotipos, los cuales constituyen el genogrupo B de astrovirus, podrían tener una relevancia especial tanto en el continente africano como en nuestro país, y por consiguiente ponen de manifiesto la importancia de controlar y estudiar la epidemiología de dichas infecciones producidas por genogrupo B, ante la posibilidad de estar frente a variantes emergentes en nuestra región.

En el presente estudio, se detectaron co-infecciones con otros enteropatógenos en 17.2% de las muestras positivas para HAstV genogrupo A y, con un número de muestras positivas reducido, en 57% de las muestras positivas para el genogrupo B, cuando este porcentaje oscila entre el 33 y el 65% en la bibliografía (Cruz *et al.*, 1992; Guerrero *et al.*, 1998; Wilhelmi *et al.*, 2003). El hecho de que la mayoría de estos estudios pertenezcan a países en vías de desarrollo en los cuales las condiciones higiénicas son subóptimas contribuye a una mayor incidencia de infecciones entéricas.

La tasa de detección máxima se observó en niños de edades comprendidas entre los 2 y los 4 años. Estudios realizados en otros países como México, Tailandia, Guatemala, Francia, Australia, Colombia y Venezuela describen incidencias más elevadas en poblaciones más jóvenes (Bon *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 1992; Guerrero *et al.*, 1998; Herrmann *et al.*, 1991; Medina *et al.*, 2000; Mustafa *et al.*, 2000). No obstante, en Guatemala y Francia (Bon *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 1992), la tasa de detección a los 2 años de edad también resultó ser

considerablemente alta. Curiosamente, en un estudio reciente realizado en Castilla y León, la edad media de los niños infectados por astrovirus fue de 4.5 años (Eiros Bouza *et al.*, 2003).

La tasa de detección fue más elevada en invierno, aunque también se detectaron casos de infecciones durante los meses de verano. Este patrón estacional corrobora otros estudios epidemiológicos llevados a cabo en países de clima templado (Matsui & Greenberg, 2001). Sin embargo, también existen trabajos que apuntan que existen incidencias elevadas de HAstV durante los meses de primavera y verano (Guerrero *et al.*, 1998; Naficy *et al.*, 2000). Por otra parte, otros estudios epidemiológicos realizados durante largos períodos de tiempo también describen patrones de estacionalidad ligeramente diferentes, con la característica de que el pico de incidencia invernal solo se pone de manifiesto en años alternos. Nuestro estudio, a pesar de que únicamente se analizaron 3 años, parece corroborar dichas observaciones realizadas en UK, Sudáfrica y Australia (Lee & Kurtz, 1994; Mustafa *et al.*, 2000; Steele *et al.*, 1998) y también sugieren un mayor impacto de las infecciones por HAstV en la población pediátrica en años alternos. En UK, se describió una mayor frecuencia del serotipo 1 en años alternos durante un período de tiempo de 5 años. Un fenómeno parecido se observó en Australia, donde en los años con una incidencia más baja de serotipo 1, no se detectaba ningún pico de incidencia durante los meses fríos. No obstante, en el presente estudio, tanto el serotipo 1 como el pico de incidencia en invierno fueron detectados en los 3 años de duración del trabajo. Por consiguiente, otros motivos deberán explicar este aparente comportamiento bianual de la incidencia de infecciones por HAstV.

De las 123 muestras positivas, se pudo obtener la información del serotipo para 54 de ellas (43.9%), utilizando el método previamente descrito por Noel y col. (1995). Esta aparente falta de sensibilidad en el método de serotipado ya ha sido descrita con anterioridad por otros autores (Naficy *et al.*, 2000). En general, el serotipo más prevalente fue el serotipo 1, seguido por el serotipo 4, 3, 8 y 2, mientras que no se detectó ningún caso de serotipo 5. Cabe destacar no obstante, que el serotipo 1 no fue el más prevalente durante los 3 años que duró el estudio. Aunque no pudieron ser confirmados por secuenciación de su extremo N-terminal del ORF2, también se detectaron 7 muestras supuestamente pertenecientes a los serotipos 6 y 7. El serotipo 1 se considera por regla general el serotipo más frecuente en la mayor parte del mundo, con algunas excepciones (Guerrero *et al.*, 1998). El segundo serotipo más frecuente puede ser diferente en función de la región geográfica. En nuestro estudio, el segundo serotipo más frecuente resultó ser el serotipo 4, como ocurre en Australia o Bangladesh (Mustafa *et al.*, 2000; Unicomb *et al.*, 1998). Curiosamente, un 11% de las muestras positivas para genogrupo A correspondían al último serotipo identificado recientemente, el serotipo 8. Este serotipo resultó ser el tercer serotipo más común en Egipto (Naficy *et al.*, 2000), también se detectó en Uganda (Monceyron *et al.*, 1997) y en Sudáfrica (Taylor *et al.*, 2001b), sugiriendo su amplia distribución por el continente africano. También en la región de Yucatán en México este serotipo últimamente representa el 40% de los aislamientos. No obstante, puesto que en los

análisis filogenéticos, el serotipo 8 también queda equidistante de los demás serotipos, existe la teoría de que, desde un punto de vista evolutivo, no parece que estemos delante de un serotipo emergente (Monroe *et al.*, 2001).

Más del 50% de las muestras de serotipo 1 y 3 fueron aisladas en niños menores de 2 años, mientras que la mayoría de muestras de serotipo 4 y 8 provenían de niños mayores de 3 años. Por su parte, el 70% de las infecciones producidas por astrovirus genogrupo B afectaron también a niños menores de 2 años. Estas diferencias estadísticamente significativas en cuanto al grupo de edad mayoritariamente afectado en función del serotipo sugieren indirectamente que la protección inmune adquirida contra los serotipos más prevalentes durante las primeras etapas de la vida no permite evitar la infección producida por serotipos diferentes o nuevas variantes víricas que aparezcan más adelante. Fenómenos similares han sido descritos previamente en estudios de seroprevalencia realizados en niños pertenecientes a diferentes grupos de edad (Koopmans *et al.*, 1998; Nacify *et al.*, 2000).

El análisis de la variabilidad genética de la región de la cápside a partir de la cual se estima el serotipo de la muestra (Noel *et al.*, 1995) indicó que el serotipo más variable era el serotipo 2, seguido por el serotipo 1. Previamente ya se había descrito un elevado grado de variabilidad genética entre las muestras de serotipo 2 (Mustafa *et al.*, 2000). Por otro lado, mientras que las distancias genéticas entre todos los serotipos/genotipos fueron superiores a 0.18 siguiendo lo establecido por los autores del método, curiosamente entre los serotipos 4 y 8 esta distancia fue mucho menor, incluso menor que la distancia entre determinados pares de secuencias pertenecientes al mismo serotipo. A pesar de que esto apoyaría la idea de que en realidad los serotipos 4 y 8 pertenecerían a un único serotipo, hoy en día, tanto el análisis filogenético de regiones más variables del extremo C-terminal del ORF2 como otros análisis con anticuerpos específicos secundan la clasificación de estas cepas en dos serotipos claramente diferenciados (Monroe *et al.*, 2001). No debemos olvidar que la región utilizada, próxima al extremo N-terminal del ORF2 quedaría contenida dentro de la proteína estructural VP34, la cual contiene al menos un epítipo compartido por todos los serotipos. El otro extremo C-terminal del ORF2 quedaría contenido dentro de proteínas que contienen epítipos específicos para cada serotipo. También es interesante destacar que la distancia entre la secuencia de astrovirus felino utilizada como *outgroup* respecto a los serotipos humanos es del mismo orden que las distancias encontradas entre serotipos humanos, indicando una distancia evolutiva entre ellos similar y sugiriendo una transmisión interespecífica y una posible zoonosis en algún momento de la evolución. Consecuente con esta idea, se ha visto que los astrovirus felinos pueden infectar células humanas CaCo-2, aunque no producen partículas infecciosas (Monroe *et al.*, 2001).

El estudio de las relaciones genéticas entre las distintas cepas de HAstV aisladas en Barcelona y las secuencias disponibles en las bases de datos nos permitió distinguir varios

*clusters* o linajes genéticos dentro de cada serotipo. Para el serotipo 1, junto con los 3 linajes previamente descritos por Medina y col. (2000), se definió un nuevo linaje que hasta el momento únicamente contenía secuencias aisladas en países europeos. Otras secuencias de muestras de Barcelona se agrupaban tanto en el linaje HAstV-1a como en el HAstV-1b, indicando que las muestras de serotipo 1 aisladas en Barcelona representan variantes de 3 cepas distintas de HAstV. Además, también se observó que, mientras que las cepas de Barcelona pertenecientes al linaje HAstV-1d fueron aisladas predominantemente durante los años 97-98 y 98-99 y ocasionalmente durante el año 99-00, las cepas pertenecientes a los linajes 1a y 1b únicamente fueron aisladas durante el año 99-00. Estos resultados sugieren que las cepas 1a y 1b podrían haber reemplazado a las cepas 1d a lo largo del tiempo. Al mismo tiempo, esta observación también podría explicar el incremento considerable encontrado para la prevalencia del serotipo 1 durante el año 99-00, asumiendo que una infección por una cepa 1d no confiriese protección completa frente a una posterior infección por otra cepa del tipo 1a ó 1b. No obstante, esta hipótesis únicamente podría ser aceptada si los epítomos del virus contuvieran no únicamente aminoácidos de la región de la cápside estudiada, sino también aminoácidos de otras regiones. No debemos olvidar, que la región secuenciada en el presente trabajo muestra una similitud a nivel de aminoácidos del 100% entre las diferentes muestras del serotipo 1.

En general, al comparar alrededor de 200 secuencias de la región conservada de la cápside, fruto de estudios epidemiológicos en todo el mundo, vemos como aunque cepas idénticas se han aislado en países muy lejanos entre sí, ciertas cepas o linajes genéticos se han identificado únicamente en determinados continentes, indicando una cierta incidencia regional de determinados linajes. Todo ello, junto con una mejor caracterización de la protección inmunológica inducida por cada serotipo y/o linaje, constituye una información importante de cara al diseño en un futuro de una vacuna contra astrovirus.



**6. ESTUDIO IV: Apoptosis en células CaCo-2  
infectadas por astrovirus**



## **ESTUDIO IV: Apoptosis en células CaCo-2 infectadas por astrovirus**

### **6.1 Antecedentes**

La apoptosis se define como un proceso fisiológico de auto-destrucción celular dependiente de energía, en respuesta a una variedad de estímulos. Se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, entre los cuales se incluyen un encogimiento celular, la condensación de la cromatina, el procesamiento del ADN celular dando lugar a fragmentos de longitud equivalente a oligonucleosomas y, finalmente, la fragmentación celular que resulta en la formación de cuerpos apoptóticos, los cuales son fagocitados por las células vecinas evitando una respuesta inflamatoria en el tejido (Saraste & Pulkki, 2000).

Por un lado, parece que la muerte celular programada actúa como un mecanismo de defensa del hospedador frente a una infección. No obstante por otro lado, en estadios tardíos de la infección vírica, y cuando ya se ha generado suficiente progenie vírica, la apoptosis puede facilitar la propagación celular a las células colindantes evitando la inflamación del tejido. Por todo ello, muchos virus tanto ADN como ARN han desarrollado estrategias tanto para inducir como para inhibir la apoptosis en diferentes estadios de su ciclo replicativo (Hardwick, 1998; Koyama *et al.*, 2000; Roulston *et al.*, 1999).

La patogénesis de HAstV no se conoce todavía con detalle y no existe de momento ningún trabajo que describa interacciones entre el ciclo biológico del virus y fenómenos de apoptosis celular. Hace más de diez años, Gray y col. (1990) publicaron algunos trabajos ultraestructurales utilizando corderos infectados y observaron acumulaciones de agregados víricos en vacuolas lisosomales y vacuolas autofágicas de las células epiteliales del intestino así como también en los *microvilli*. También describieron la presencia de partículas víricas en

los macrófagos y observaron un cierto grado de degeneración nuclear en los enterocitos. Woode y col. (1984) describieron la degeneración de las células epiteliales de las vellosidades intestinales debida a la infección por astrovirus del íleon de corderos infectados. También se ha publicado recientemente un estudio sobre los efectos patogénicos del astrovirus de pavo que produce un síndrome denominado *poult enteritis and mortality syndrome (PEMS)* (Qureshi *et al.*, 2001). Aunque no se ha demostrado, de este último trabajo, podría extrapolarse una posible relación entre la degeneración en macrófagos y apoptosis.

Debido al carácter universal que presentan las células CaCo-2 para permitir la replicación de todos los serotipos de HAstV (Brinker *et al.*, 2000), el uso de esta línea celular para la adaptación y propagación de astrovirus se ha extendido ampliamente. Aunque no se conoce su mecanismo de acción, se sabe que la tripsina es necesaria para la eficiente multiplicación del virus, y diferentes laboratorios han observado que las partículas víricas producidas en ausencia de tripsina muestran una infectividad muy reducida (Bass & Qiu, 2000; Méndez *et al.*, 2002; Monroe *et al.*, 1991). Mientras que algunos autores defienden que la tripsina es la única enzima responsable de la maduración de las proteínas de la cápside vírica (Dalton *et al.*, 2003; Geigenmüller *et al.*, 2003; Monroe *et al.*, 1991), otros autores afirman que otras proteasas, las cuales podrían ser de origen celular, son necesarias para una correcta maduración del virión (Bass & Qiu, 2000; Méndez *et al.*, 2002).

En este estudio, se caracteriza la respuesta celular apoptótica inducida por astrovirus en células CaCo-2 y se utilizan diferentes estrategias para analizar las relaciones que existen entre la apoptosis y el ciclo biológico del virus.

## **6.2 Material y métodos**

### **6.2.1 Virus y líneas celulares**

La línea celular continua empleada en el presente trabajo fue la línea humana de adenocarcinoma de colon CaCo-2 (ATCC HBT 37). La cepa vírica utilizada para estos estudios fue una cepa de HAstV serotipo 4 adaptada a cultivo celular y gentilmente cedida por W. D. Cubitt del Great Ormond Street Hospital for Children, en Londres (ver apartado 8.1 del apéndice material y métodos). Para los estudios de apoptosis, la infección se realizaba tal y como se describe en el apartado 8.2 del apéndice de material y métodos con algunas modificaciones. Con el objetivo de evitar múltiples ciclos de replicación vírica, no se añadía tripsina en el medio post-infección (Bass & Qiu, 2000; Méndez *et al.*, 2002; Monroe *et al.*, 1991). Brevemente, las monocapas celulares eran infectadas a los de 3 días de su siembra, cuando mostraban una confluencia del 80%. Tras dos lavados con tampón PBS, las células se inoculaban con una suspensión vírica previamente activada por un tratamiento con 10 µg/ml de tripsina durante 30 min a 37 °C. Al cabo de 1 h de adsorción a 37 °C, se añadía medio de cultivo suplementado con un 2% de FCS. Debido a que normalmente al entrar en apoptosis las

células se desprenden de la superficie donde están adheridas, en todos los experimentos las células presentes en el sobrenadante también fueron analizadas junto con las células de la monocapa, las cuales eran recuperadas mediante un tratamiento con tripsina. Como controles negativos para los estudios de apoptosis se utilizaron suspensiones de células CaCo-2 no infectadas y lisadas.

### 6.2.2 Agentes inductores de apoptosis

Se preparó una solución 0.5 M de aspirina (ASA: ácido acetil salicílico; por gentileza de Bayer AG) en tampón Tris-HCl 0.75 M pH 7.4. Para la inducción de apoptosis, las células CaCo-2 se incubaban durante 48 h a 37 °C en medio MEM 2% FCS suplementado con ASA 15 mM, después de dos lavados de la monocapa con tampón PBS (Ricchi *et al.*, 1997). En todos los experimentos se incluyó un control negativo de células tratadas con tampón Tris-HCl 0.75 M sin ASA.

### 6.2.3 Observación de la morfología nuclear

La morfología nuclear de células infectadas y no infectadas se analizó después de una tinción con DAPI (ver apartado 8.16 del apéndice de material y métodos). La observación se realizaba utilizando un microscopio de fluorescencia (Leica DMRB FLUO).

### 6.2.4 Análisis del contenido de ADN celular

Para detectar dos de los principales efectos apoptóticos que se producen en la célula, se aplicó una técnica para la extracción del ADN de células apoptóticas previamente publicada, con ligeras modificaciones (Gong *et al.*, 1994). Esta técnica permite analizar por un lado la fragmentación del ADN hasta fragmentos de longitud equivalente a oligonucleosomas (*DNA ladder*) y, por otro lado, la reducción del contenido de ADN celular (técnica del pico sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) (ver apartado 8.17 del apéndice material y métodos).

### 6.2.5 Ensayo de *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling* (TUNEL)

El ensayo del TUNEL permite detectar la fragmentación del ADN celular que ocurre durante la apoptosis por marcaje de los extremos 3'OH libres por incorporación de un nucleótido dUTP marcado con fluoresceína mediante una transferasa de deoxinucleótidos terminal. Se utilizó el kit *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Roche), siguiendo las instrucciones de la casa comercial (ver apartado 8.18 del apéndice material y métodos). Las células marcadas fueron analizadas por citometría de flujo.

### **6.2.6 Microscopía electrónica.**

Para los estudios de microscopía electrónica de transmisión, se utilizaron cultivos de células CaCo-2 infectadas y no infectadas crecidas sobre placas de 100 mm, a un tiempo p.i. de 48 h. El procesamiento de las muestras se detalla en el apartado 8.13 del apéndice material y métodos.

### **6.2.7 Análisis de la activación de caspasa 8 por *western blotting*.**

Se prepararon lisados celulares a partir de cultivos de  $2 \times 10^6$  células CaCo-2 infectadas y no infectadas en tampón RIPA (ver apartado 8.7 del apéndice material y métodos). Tras equiparar la concentración proteica entre muestras, se analizaron por gel de acrilamida 12% SDS-PAGE y *western blotting* con un anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa 8 (PharMingen), siguiendo el protocolo detallado en el apartado 8.11 del apéndice material y métodos.

### **6.2.8 Análisis de la localización subcelular del citocromo c.**

A partir de cultivos infectados y no infectados de  $7 \times 10^6$  células obtenidos a diferentes tiempos p.i., se separaron las distintas fracciones subcelulares correspondientes a la fracción mitocondrial y a la fracción citosólica (ver apartado 8.10 del apéndice material y métodos). Las diferentes fracciones se analizaron por gel de acrilamida 12% SDS-PAGE y *western blotting* con un anticuerpo monoclonal anti-citocromo c (PharMingen), siguiendo el protocolo detallado en el apartado 8.11 del apéndice material y métodos.

### **6.2.9 Inhibición de la apoptosis**

Para los estudios de inhibición de la apoptosis se utilizaron inhibidores peptídicos específicos de la caspasa 8 y la caspasa 9, Z-IETD-FMK y Z-LEHD-FMK (Sigma), respectivamente. Fueron resuspendidos en dimetil sulfóxido (DMSO) y diluidos a concentraciones de 10, 100 y 150  $\mu\text{M}$  en el medio de cultivo p.i., tras infectar cultivos de  $1 \times 10^6$  células. En todos los experimentos se añadieron controles negativos en los que se añadían cantidades equivalentes de DMSO al medio de cultivo p.i. El porcentaje de células apoptóticas tras una incubación de 48 h se calculaba por citometría de flujo después de marcar las células apoptóticas por la técnica del TUNEL (ver apartado 8.18 del apéndice material y métodos).

### **6.2.10 Detección del ARN de astrovirus en células separadas por citometría de flujo**

La presencia de ARN vírico se analizó en subpoblaciones de células infectadas apoptóticas y no apoptóticas, por *end-point dilution RT-PCR*. El fraccionamiento subcelular se

realizó por citometría de flujo mediante un separador celular automático (Immunotech Coulter, EPICS Elite), después de analizar aproximadamente  $1 \times 10^6$  células. Sobre los cultivos infectados se realizaba un doble marcaje por inmunofluorescencia con el anticuerpo MAb 8E7 específico contra la cápside del virus (cedido por gentileza del Dr. J. E. Herrmann) y por la técnica del TUNEL para marcar núcleos apoptóticos (ver apartado 8.19 del apéndice material y métodos). Una vez separadas las poblaciones celulares en función del marcaje por TUNEL, se realizó una extracción del ARN siguiendo el método descrito por Boom y col. (1990) (ver apartado 8.23 del apéndice material y métodos) y utilizando el mismo número de células en las dos subpoblaciones celulares y para una muestra de la población celular total. El ARN purificado se tituló por *end-point dilution RT-PCR* utilizando los oligonucleótidos A1 y A2, correspondientes al ORF1a (ver Tabla 8.1 y apartado 8.24 del apéndice material y métodos). Con el fin de detectar de forma específica las dos cadenas de ARN (+) y (-), se realizaron dos reacciones de RT independientes en paralelo, incluyendo o bien el oligonucleótido A1 o el A2 en la mezcla de reacción. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado a partir de experimentos de separación celular independientes y se calcularon las medias para los títulos de ARN. Para comparar las medias del título de ARN entre la población apoptótica y la no apoptótica, se realizó un análisis estadístico *t Student*. La carga de ARN se expresó como unidades de RT-PCR por célula infectada, facilitando así la comparación de los títulos de ARN vírico entre las dos subpoblaciones y la relación molar entre ARN (+) / ARN (-) en cada población celular.

#### **6.2.11 Estudios de doble marcaje: apoptosis y antígenos virales**

Con el fin de analizar la cinética a distintos tiempos p.i., de la proporción de células positivas para la expresión de proteínas del virus y del porcentaje de células apoptóticas en cada momento, se analizaron cultivos de  $2 \times 10^6$  células infectadas mediante una técnica de doble marcaje y un posterior análisis por citometría de flujo (ver apartado 8.19 del apéndice material y métodos). La expresión de proteínas víricas se detectó por inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo MAb 8E7 específico contra la cápside del virus y la apoptosis se analizó por la técnica del TUNEL. Tras la incubación con el anticuerpo primario MAb 8E7, la población celular fue dividida en dos partes y se incubó con dos anticuerpos secundarios diferentes. En primer lugar, se utilizó un anticuerpo anti-ratón marcado con Cy<sup>TM</sup> 5 y la muestra se analizó por citometría de flujo (Immunotech Coulter XL). En segundo lugar, se utilizó un anticuerpo anti-ratón marcado con Cy<sup>TM</sup> 3 y la muestra se analizó por microscopía de fluorescencia (Leica DMRB FLUO).

#### **6.2.12 Efectos de la inhibición de caspasas en la producción vírica**

A un tiempo de 48 h p.i., se analizó la producción vírica en el sobrenadante del medio de cultivo en células infectadas (virus liberados), en presencia de inhibidores específicos de caspasa 8 (Z-IETD-FMK) y caspasa 9 (Z-LEHD-FMK) a una concentración de 100  $\mu$ M. La

producción vírica se evaluó mediante 3 aproximaciones experimentales. En primer lugar, la cantidad de antígeno vírico en el sobrenadante de cultivos infectados se estimó mediante un ensayo inmunoenzimático de captura (EIA), previamente descrito por Herrmann *et al.* (1990) (ver apartado 8.15 del apéndice material y métodos). En segundo lugar, el título de moléculas genómicas del virus se calculó por *end-point dilution RT-PCR* utilizando los oligonucleótidos A1 y A2 tal y como se ha descrito anteriormente. El título de moléculas genómicas se expresó como unidades de RT-PCR por ml. Finalmente, también se evaluó el título de virus infecciosos, siguiendo el protocolo descrito por Abad *et al.* (1997). Brevemente, las muestras a titular se pre-trataron durante 30' a 37 °C con 10 µg/ml de tripsina. Inóculos de 100 µl de diluciones seriadas en base 10 se inocularon sobre monocapas de células CaCo-2 crecidas en multiplacas de 24 pocillos. Se añadió 5 µg/ml de tripsina en el medio p.i. y se analizó la presencia de virus en el sobrenadante a los 6 días p.i. por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos A1 y A2. El título infeccioso se expresó como partículas víricas infecciosas por ml.

### 6.2.13 Análisis computacional de secuencias

La secuencia completa de la proteína nsP1a/4 de la cepa de HAstV-4 utilizada se obtuvo mediante 2 amplificaciones por RT-PCR utilizando los pares de oligonucleótidos A1739/A2 y A1/RFS (ver Tabla 8.1 del apéndice material y métodos) sobre 5 µl de ARN purificado a partir de un extracto de células infectadas. Las condiciones de las RT-PCR fueron las que se describen en el apartado 8.24 del apéndice material y métodos utilizando 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y un programa de desnaturalización inicial de 3' a 95 °C, 40 ciclos de 45'' a 94 °C, 30'' a 55 °C y 2'30'' a 72 °C, y una extensión final de 7' a 72 °C. Las secuencias se obtuvieron con los 4 oligonucleótidos siguiendo los apartados 8.29 del apéndice material y métodos. La estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos se predijo utilizando el programa PredictProtein. El análisis de homologías a nivel de secuencias de aminoácidos teniendo en cuenta la estructura secundaria, información 3D y la capacidad solvente de la secuencia se realizó utilizando el servidor 3D-PSSM V2.6.0 (Kelley *et al.*, 2000). Las direcciones de internet de dichos programas bioinformáticos se resumen en la Tabla 8.2 del apéndice material y métodos.

### 6.2.14 Estudios de expresión transitoria de distintos ORFs de astrovirus

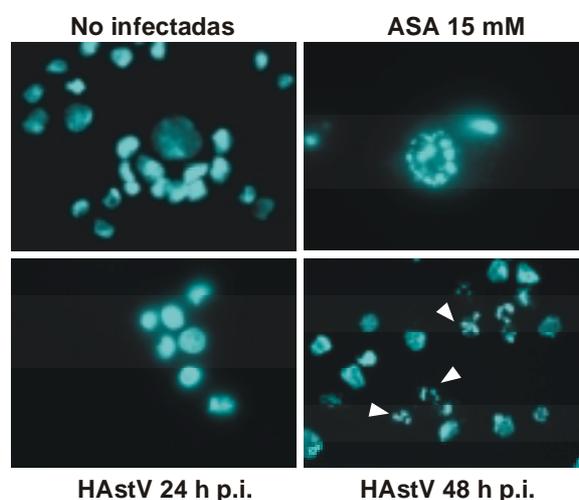
Con el objetivo de realizar estudios de expresión transitoria de proteínas víricas en células CaCo-2, los ORF1a y ORF2 completos de astrovirus se clonaron en el vector de expresión eucariota pcDNA3.1(+) (Invitrogen), siguiendo procedimientos estándares de clonaje (ver apartado 8.20 del apéndice material y métodos). Los plásmidos recombinantes se denominaron respectivamente pcDNA1a y pcDNA2 y fueron introducidos en células CaCo-2 por electroporación (ver apartado 8.22 del apéndice material y métodos). Como control negativo se incluyeron células electroporadas con el vector pcDNA3.1(+) sin inserto. La expresión proteica se analizó a las 72 h post-transfección por inmunofluorescencia y la

apoptosis se detectó por la técnica del TUNEL. Los anticuerpos primarios utilizados en la inmunofluorescencia fueron el anticuerpo de ratón producido en nuestro laboratorio contra un péptido sintético (anti-1a778-792) y el anticuerpo monoclonal MAb 8E7 contra las proteínas de la cápside. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (ver los apartado 8.19 del apéndice material y métodos) y las células se analizaron por microscopía de fluorescencia (Leica DMRB FLUO). El porcentaje de células transfectadas que exhibían núcleos apoptóticos se calculó después de contar entre 50 y 100 células positivas para la expresión de proteínas víricas. El mismo experimento se repitió dos veces para cada construcción.

### 6.3 Resultados

#### 6.3.1 La infección por astrovirus induce apoptosis en células CaCo-2

Con el objetivo de investigar los efectos de la infección de astrovirus sobre células CaCo-2, se llevaron a cabo una serie de experimentos utilizando varias técnicas que caracterizan los principales cambios morfológicos y bioquímicos que se producen durante la apoptosis. Para todos los análisis celulares que se detallan a continuación, las células CaCo-2 fueron infectadas utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 5 y se fijaron a distintos tiempos post-infección (p.i.). Como control negativo y positivo se utilizaron células no infectadas y células tratadas con ASA, respectivamente.

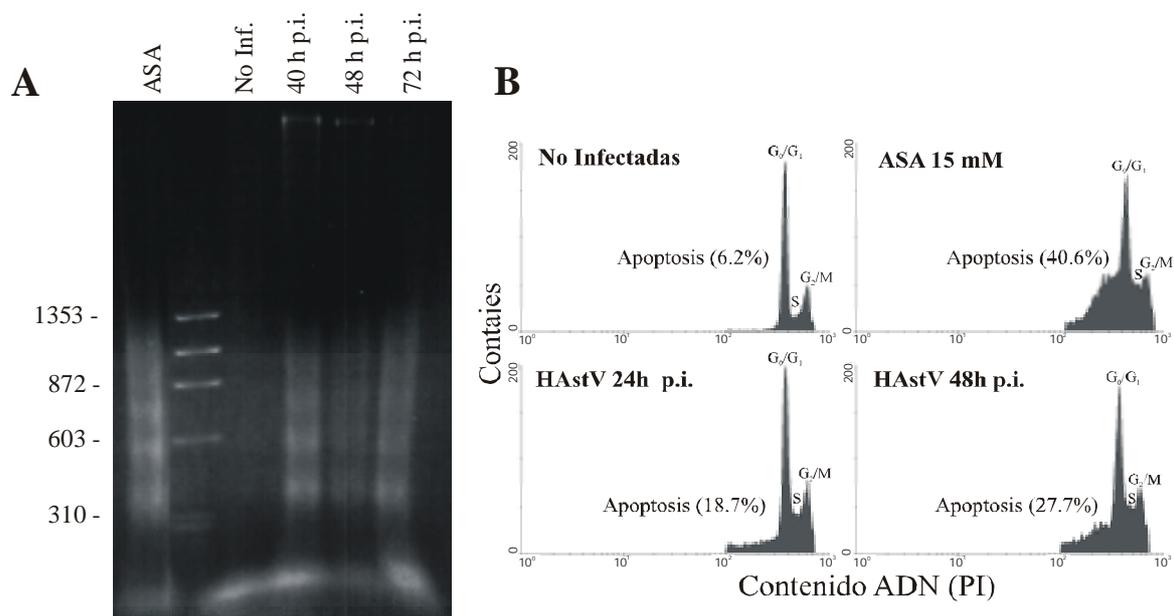


**Fig. 6.1** Morfología nuclear de células CaCo-2 no infectadas, células tratadas con ASA 15 mM y células infectadas, a las 24 h y 48 h p.i., tras una tinción con DAPI. A las 48 h p.i., podía observarse la presencia de cuerpos apoptóticos, resultado de la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear, en muchas células infectadas (flechas).

Los cambios morfológicos producidos en células CaCo-2 infectadas se examinaron por microscopía óptica después de una tinción nuclear con DAPI. Tal como se muestra en la Fig. 6.1, estos cambios morfológicos no se observaban a las 24 h después de la infección. No obstante, a las 48 h p.i. en muchas células se observaba un elevado grado de condensación de

la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos (flechas). Los núcleos de las células no infectadas, en cambio, estaban teñidos de forma uniforme y mostraban un aspecto normal sin signos de condensación de la cromatina, incluso a las 48 h p.i.

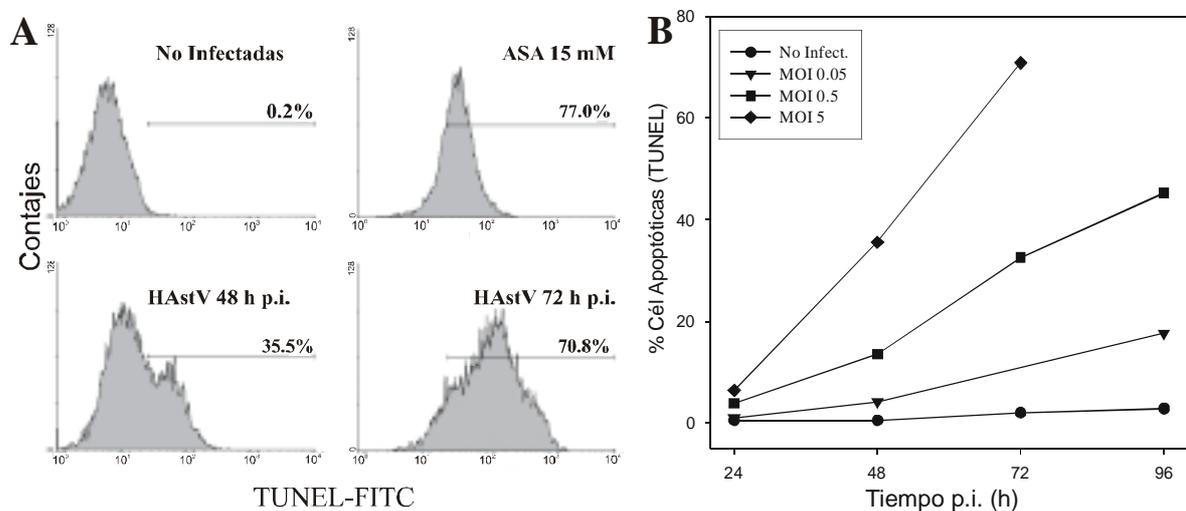
Durante el proceso apoptótico, se activan endonucleasas celulares que fragmentan el ADN nuclear dando lugar a fragmentos de tamaños múltiples a los oligonucleosomas. Se utilizaron dos estrategias para evaluar este fenómeno. En primer lugar, se extrajo el ADN de bajo peso molecular de células infectadas y se analizó en electroforesis en gel de agarosa. En los extractos de células infectadas, se observó un patrón característico de fragmentación del ADN denominado comúnmente *DNA ladder*, a partir de las 40 h p.i. En las células no infectadas, no se detectaron signos de dicha fragmentación y se incluyeron células tratadas con ASA como control positivo (Fig. 6.2A).



**Fig. 6.2** (A) Análisis de la fragmentación del ADN en células CaCo-2 por electroforesis en gel de agarosa. El ADN de bajo peso molecular se aisló de células tratadas con ASA, células no infectadas y células infectadas, a las 40 h, 48 h y 72 h p.i. Los pesos moleculares se muestran en pb. (B) Análisis por citometría de flujo del contenido de ADN celular de células CaCo-2 teñidas con yoduro de propidio (PI). El porcentaje de células apoptóticas se calculó como el porcentaje de células de la población que mostraba un contenido de ADN menor que las células que estaban en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular.

En segundo lugar, con el fin de cuantificar el porcentaje de células apoptóticas, cultivos infectados y no infectados fueron analizados por citometría de flujo después de teñir el ADN con yoduro de propidio (PI). El porcentaje de células apoptóticas (pico sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) se calculaba a partir del histograma de frecuencia del contenido de ADN celular. Las células tratadas con ASA exhibían un 40.6% de células apoptóticas. En los cultivos infectados por astrovirus, la proporción de células apoptóticas incrementaba del 18.7% a las 24 h p.i. hasta el 27.7% a las 48 h p.i., mientras que en los cultivos no infectados el nivel de células apoptóticas no superaba el 7% (Fig. 6.2B).

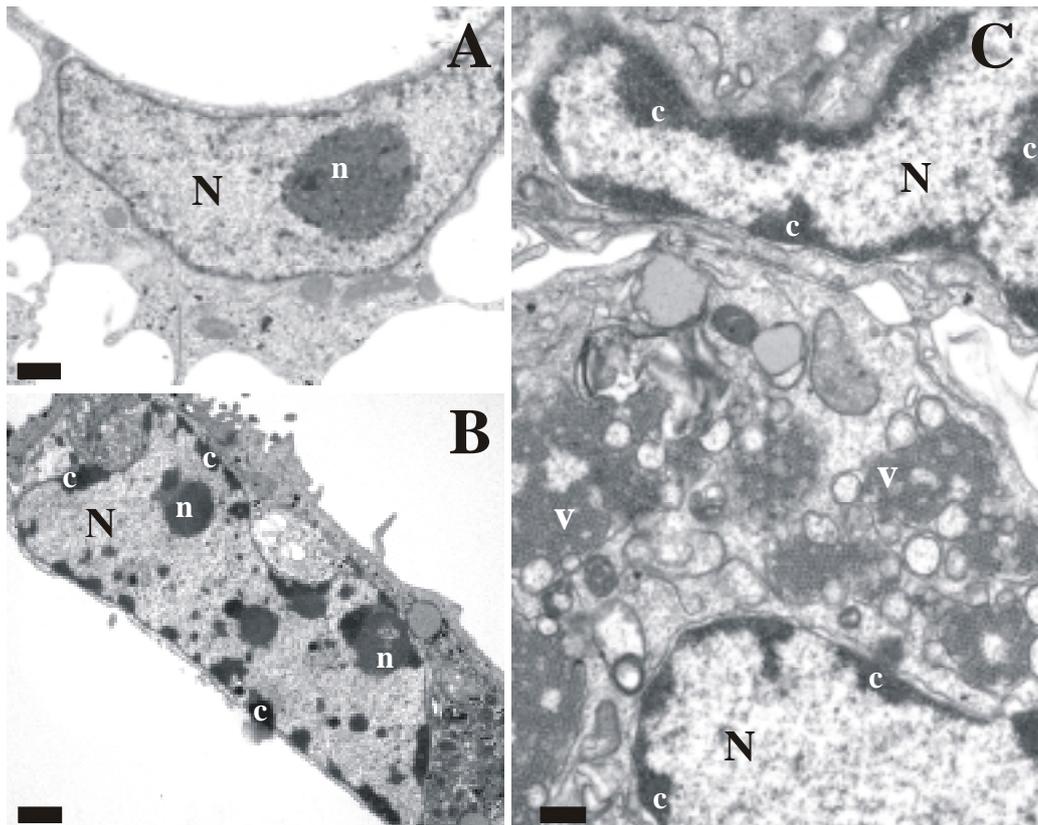
El ensayo de TUNEL se realizó para caracterizar con mayor profundidad la respuesta apoptótica. El porcentaje de células con el ADN celular fragmentado se cuantificó por citometría de flujo. Al infectar las células con una MOI de 5, se detectaban un 70% de células apoptóticas a las 72 h p.i., mientras en los controles negativos no se detectaban más del 0.2% (Fig. 6.3A). A las 24 h p.i., el porcentaje de células apoptóticas era únicamente del 6.4%. El ensayo de TUNEL también se utilizó para evaluar el inicio de la apoptosis al infectar con diferentes MOI (5, 0.5 y 0.05) y se observó una correlación entre la MOI y la apoptosis (Fig. 6.3B), lo cual sugiere la existencia de una relación directa entre la infección vírica y la apoptosis. A las 72 h p.i., el porcentaje de células apoptóticas utilizando una MOI de 5 se incrementó hasta el 70%. Además, una disminución de la dosis vírica inicial producía un retraso en el desarrollo de la apoptosis. De esta forma, la infección con una MOI de 0.05 no producía un aumento significativo del número de células apoptóticas hasta las 96 h p.i.



**Fig. 6.3** Detección de apoptosis *in situ* por la técnica de TUNEL. (A) Análisis por citometría de flujo de células no infectadas, células tratadas con ASA y células infectadas a las 24 h y 48 h p.i., después de realizar una tinción de los núcleos apoptóticos con TUNEL. El porcentaje de células apoptóticas se estimó como el porcentaje de células que mostraban núcleos positivos por fluorescencia con FITC, debida a las moléculas de dUTP marcadas con fluoresceína incorporadas en los extremos 3'OH del ADN fragmentado. Se estableció un cursor de positividad para la fluorescencia FITC en los cultivos no infectados, en los cuales el porcentaje de células positivas oscilaba entre el 0.1 y el 3% de la población celular total. (B) Análisis de la apoptosis en función de la dosis vírica y del tiempo. Las células se infectaron utilizando diferentes MOI y se recogieron a varios tiempos p.i., se analizaron por TUNEL y por citometría de flujo. Los valores de las barras de error, los cuales no están representados para conseguir una mayor claridad, fueron en todos los casos menores que 0.44X el valor de la media.

Finalmente, las células infectadas fueron observadas a las 48 h p.i. por microscopía electrónica de transmisión para analizar su ultraestructura (Fig. 6.4). Se observó la formación de masas de cromatina condensada dispersadas mayoritariamente a lo largo de la periferia del núcleo, el cual a su vez estaba replegado. Otras características observadas en las células

infectadas fueron la desintegración de los nucleolos o el mantenimiento de la morfología de las mitocondrias y otros orgánulos celulares, como por ejemplo las membranas nuclear y citoplasmática (Fig. 6.4, B y C). Por el contrario, el aspecto de las células control era completamente correcto, con una morfología normal, orgánulos celulares dispersados al azar por el citoplasma, un núcleo con la cromatina uniformemente dispersada y no demasiado condensada y un único nucleolo grande y electro-denso (Fig. 6.4, A). Además, en la mayoría de células con características morfológicas típicas de apoptosis, se detectaron numerosos agregados de partículas víricas (Fig. 6.4, C).

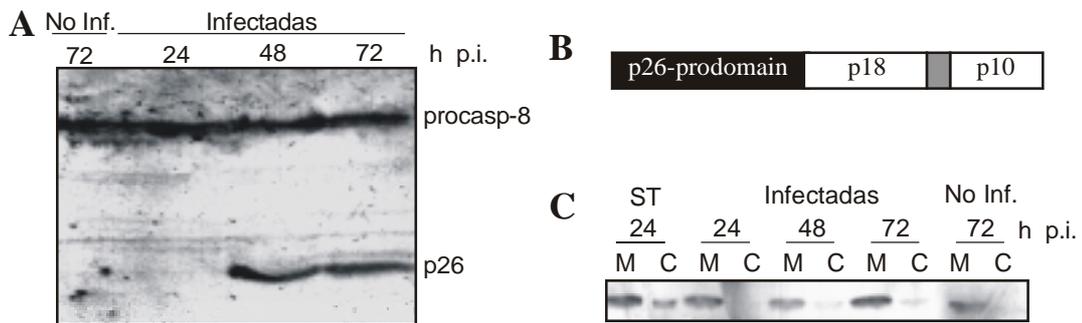


**Fig. 6.4** Micrografías electrónicas de células CaCo-2 no infectadas (A) e infectadas a las 48 h p.i. (B y C). Las células no infectadas muestran un núcleo grande con un único nucleolo de gran tamaño (n). Las células infectadas se caracterizaban por presentar masas de cromatina condensada (c) dispersadas a lo largo de la periferia del núcleo replegado. En el citoplasma de las células infectadas, se acumulaban agregados de partículas víricas (v). La barra equivale a 1  $\mu\text{m}$  en las fotografías A y B, y a 0.5  $\mu\text{m}$  en C.

En conclusión, el estudio de la morfología nuclear y celular, el análisis de la reducción del contenido de ADN celular y la caracterización de la fragmentación del ADN tanto por electroforesis en gel de agarosa como por el ensayo de TUNEL, demostraron sin ambigüedades que en las células CaCo-2 se desencadena una respuesta apoptótica después de la infección por astrovirus, y que ésta respuesta apoptótica tiene un comportamiento dependiente de la dosis infecciosa.

### 6.3.2 Implicación de la caspasa 8 en la apoptosis inducida por astrovirus

Con el objetivo de estudiar la activación de las caspasas iniciadoras durante el proceso apoptótico inducido por astrovirus, se analizaron los papeles de las caspasas 8 y 9. La caspasa 8 se detectó por la técnica del *western blotting* utilizando extractos celulares totales obtenidos a distintos tiempos p.i., mediante un anticuerpo específico. En los extractos de células no infectadas, el anti-caspasa 8 reconoció una proteína de 55 kDa que corresponde a la procaspasa. Además, en los extractos de células infectadas a las 48 h p.i. se detectó un polipéptido de aproximadamente 26 kDa, el cual corresponde al prodominio de la caspasa 8 (Fig. 6.5A y B). Estos resultados indican que durante la infección se produce la activación de la caspasa 8.

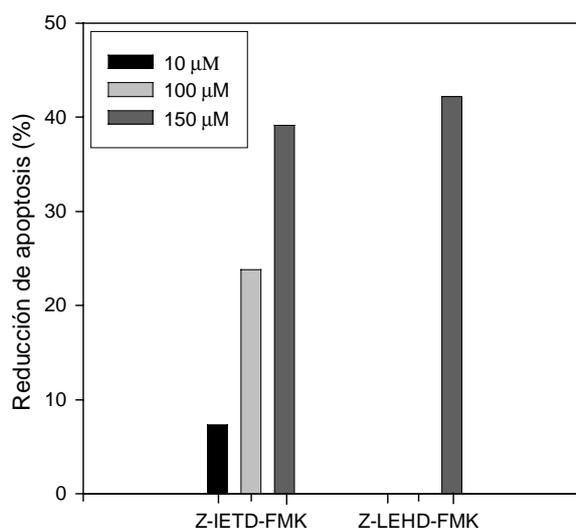


**Fig. 6.5** Procesamiento de la caspasa 8 y distribución del citocromo c mitocondrial durante la infección por HAsV. (A) Detección por *western blotting* de la procaspasa-8 y del prodominio p26 resultante de su activación (B), a los tiempos p.i. indicados. (B) Distribución del citocromo c en las fracciones mitocondriales (M) y citosólicas (C), en células tratadas con estaurosporina 1  $\mu$ M (ST), células infectadas recogidas a diferentes tiempos p.i. y células no infectadas recogidas a las 72 h p.i.

Para investigar si también se producía activación de la vía apoptótica mitocondrial, se analizó la redistribución del citocromo c desde el espacio intermembrana mitocondrial al citosol, fenómeno indicativo de la activación de la caspasa 9. En la Fig. 6.5C, se muestra como en ningún tiempo p.i. ensayado se detectó una liberación completa del citocromo c al citosol, así como tampoco se observó una disminución de la cantidad de citocromo c detectada en la mitocondria a lo largo del tiempo. En células infectadas, a las 48 h y 72 h se detectó un nivel muy bajo de citocromo c en citosol. Este bajo nivel podría explicarse como resultado de la amplificación de la señal apoptótica inicial, que implica también factores mitocondriales (Denecker *et al.*, 2001; Kidd *et al.*, 2000).

Finalmente, para profundizar en el conocimiento del papel que juegan la caspasa 8 y 9 en la inducción de la apoptosis por astrovirus se realizaron una serie de ensayos con inhibidores peptídicos específicos e irreversibles de cada una de las caspasas. Concretamente, se ensayaron los efectos de distintas concentraciones de los inhibidores Z-IETD-FMK (caspasa 8) y Z-LEHD-FMK (caspasa 9).

Tal y como se muestra en la Fig. 6.6, los efectos inhibitorios del inhibidor Z-IETD-FMK fueron dependientes de la dosis, mientras que el inhibidor Z-LEHD-FMK únicamente consiguió inhibir la apoptosis a la concentración máxima utilizada. No obstante, cabe destacar que la especificidad de estos compuestos no está garantizada cuando se utilizan a elevadas concentraciones. Según su especificidad por el sustrato, las caspasas se clasifican en 3 grupos principales (Thornberry *et al.*, 1997). Las caspasas pertenecientes al grupo III (6, 8 y 9) reconocen dianas con muchos aa diferentes en la posición P<sub>4</sub>, aunque muestran preferencia por los residuos que tienen cadenas laterales alifáticas grandes. La secuencia peptídica diana que reconocen de forma óptima es (X)E(H/T)D, siendo bastante tolerantes a las sustituciones en la posición P<sub>2</sub>. La única excepción se encuentra en la caspasa 9, la cual es extremadamente específica por H en posición P<sub>2</sub>. De esta forma, a una concentración de 150  $\mu$ M, los efectos bloqueantes del inhibidor de la caspasa 9 podrían ser debidos a una inhibición no específica tanto de la caspasa 9 como de la caspasa 8, mientras que a bajas concentraciones, únicamente la secuencia óptima podría inhibir la activación de la caspasa. De acuerdo con estas observaciones, a las concentraciones de 10 y 100  $\mu$ M tan sólo es efectivo en reducir el porcentaje de células apoptóticas después de la infección el inhibidor de la caspasa 8. Estos resultados sugieren de nuevo la existencia de una relación entre infección y caspasa 8.



**Fig. 6.6** Análisis de la reducción de la apoptosis en presencia de inhibidores específicos de la caspasa 8 (Z-IETD-FMK) y de la caspasa 9 (Z-LEHD-FMK), utilizados a tres concentraciones diferentes (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 150  $\mu$ M). Los porcentajes de reducción de apoptosis se calcularon en relación a los cultivos de células infectadas en presencia de una cantidad equivalente de DMSO. Los resultados que se muestran corresponden a los de un experimento representativo.

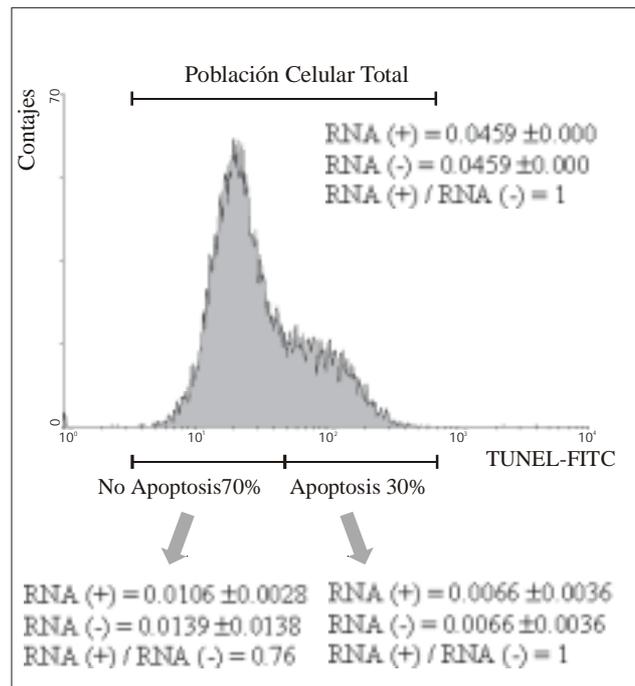
En resumen, a pesar de que el inhibidor de la caspasa 8 no bloquea completamente la apoptosis inducida por astrovirus, nuestros resultados, junto con el resultado del análisis de la activación de la misma caspasa por *western blotting*, proporcionan evidencias claras de que

esta caspasa está implicada en la cadena de eventos que tiene lugar durante la apoptosis inducida por astrovirus.

### 6.3.3 La replicación vírica tiene lugar tanto en células apoptóticas como en células no apoptóticas. Sin embargo, una inhibición de la apoptosis reduce la progenie infecciosa.

Para analizar la relación existente entre la apoptosis y el ciclo biológico del virus, se estudiaron los fenómenos víricos de replicación genómica y de expresión proteica en poblaciones de células apoptóticas y no apoptóticas.

La presencia de moléculas de ARN de cadena positiva y negativa se analizó tanto en la población apoptótica como no apoptótica, separadas por citometría de flujo después de un proceso de fijación. La separación por citometría proporcionó un media de 24,000 células apoptóticas (rango, 10,500-48,000) y una media de 40,000 células no apoptóticas (rango, 5,000-82,000). Los resultados de un experimento representativo y la media del contenido de ARN en cada población celular después de repetir el experimento 2 veces, se muestran en la Fig. 6.7. Por RT-PCR en células fijadas, se detectó ARN (+) y ARN (-) vírico en ambas poblaciones.



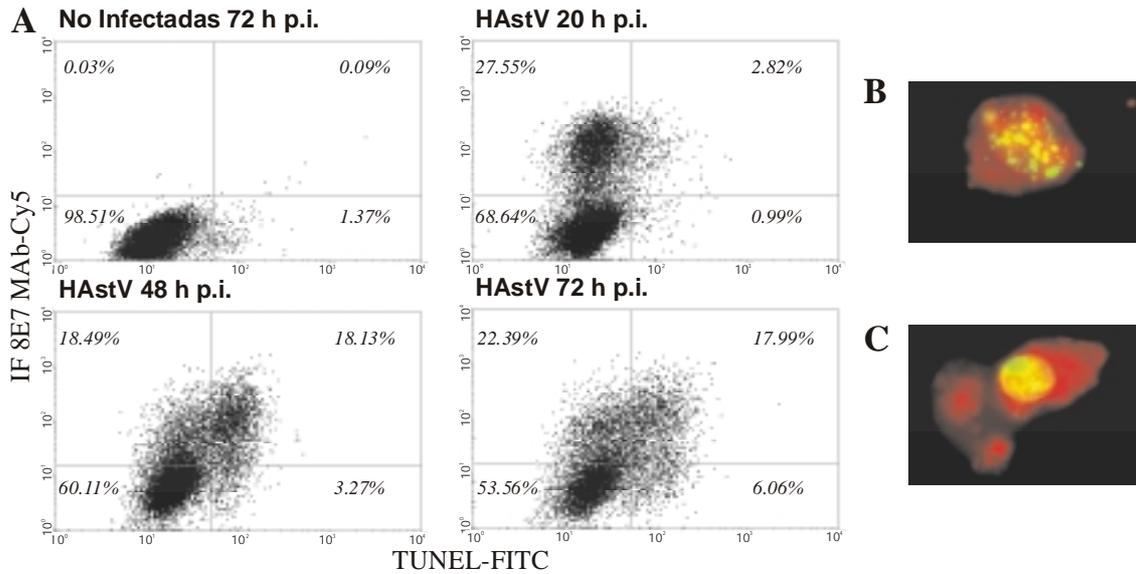
**Fig. 6.7** Análisis del contenido de ARN vírico en las poblaciones de células apoptóticas y no apoptóticas separadas por citometría de flujo. Se representan las medias y los errores estándares de dos experimentos. Los títulos de ARN se expresan como unidades de RT-PCR/célula infectada, después de tener en cuenta la proporción de células infectadas en cada subpoblación.

A pesar de que los títulos de ARN encontrados fueron muy bajos, probablemente debido a procesos de degradación y/o de fijación durante el marcaje y la separación celular, podrían considerarse como indicativos del nivel de replicación en cada población. Aunque no se observaron diferencias significativas entre la carga de ARN viral de las dos poblaciones celulares, tanto el número de copias de moléculas de ARN (+) como de ARN(-) fueron débilmente superiores en la población de células no apoptóticas.

La cinética de la expresión de proteínas víricas y de la aparición de apoptosis se analizaron simultáneamente mediante una técnica de doble marcaje. Las células que expresaban proteínas de la cápside eran detectadas por inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo MAb 8E7 (Herrmann *et al.*, 1988), mientras que los núcleos apoptóticos eran marcados con la técnica del TUNEL. Las células CaCo-2 se infectaron con una MOI de 0.5 con el fin de evitar una infección extensiva de toda la monocapa, y se fijaron a las 20 h, 48 h y a las 72 h p.i. (Fig. 6.8). Los resultados de citometría de flujo indicaron que la apoptosis se desarrollaba mayoritariamente en las células infectadas y a un nivel mucho menor en las células no infectadas, sugiriendo así que la inducción de la apoptosis es dependiente de la replicación activa del virus dentro de la célula (Fig. 6.8A).

A cualquier tiempo p.i. analizado, la proporción de células marcadas por TUNEL que expresaban proteínas víricas oscilaba entre el 74% y el 84.7% y era entre 3 y 5 veces mayor que el porcentaje de células apoptóticas que eran negativas por inmunofluorescencia. No obstante, también se observó que no todas las células infectadas mostraban características del proceso apoptótico; tanto a las 48 h como a las 72 h p.i., aproximadamente solo el 47% de las células positivas por inmunofluorescencia estaban marcadas por TUNEL. Por otra parte, a las 20 h p.i., la subpoblación de células apoptóticas dentro de la población infectada representaba únicamente el 9.3%, sugiriendo que la replicación vírica dentro de la célula tiene lugar antes que el inicio de la aparición de la apoptosis.

Posteriormente, también se analizó la morfología de las células doblemente marcadas a las 72 h p.i., por microscopía de fluorescencia. Puesto que durante la apoptosis, el proceso de fragmentación del ADN genómico tiene lugar en una fase más temprana que el proceso de fragmentación nuclear, no únicamente las células que ya tenían cuerpos apoptóticos fueron positivas por TUNEL (Fig. 6.8B), sino que también se observaba marcaje por TUNEL en células que presentaban el núcleo entero y perfectamente delimitado (Fig. 6.8C).



**Fig. 6.8** Detección simultánea de antígenos víricos (IF) y apoptosis (TUNEL) por citometría de flujo, a distintos tiempos p.i. (A) Diagrama representativo de los resultados del doble marcaje por citometría de flujo. Los valores de corte para las células positivas se establecieron de manera que el 99.5% de las células totales pertenecieran al cuadrante inferior izquierdo, en un gráfico correspondiente a un control de células infectadas e incubadas con la solución de control negativo proporcionada por los fabricantes del *kit* del TUNEL, y con el anticuerpo secundario utilizado para el marcaje por IF (no se muestra). En la figura aparecen indicados los porcentajes celulares correspondientes a cada cuadrante. (B y C) Análisis de los cambios morfológicos de las células infectadas a las 72 h p.i. por microscopía de fluorescencia. La fluorescencia color rojo corresponde a la IF para detectar los antígenos víricos y la fluorescencia verde corresponde al marcaje con FITC del ADN fragmentado debido a la apoptosis.

Estos resultados obtenidos sobre la expresión proteica vírica en células apoptóticas y no apoptóticas apoyan los resultados del análisis de la replicación genómica en ambas poblaciones e indican que ambos procesos pueden ocurrir tanto en células apoptóticas como no apoptóticas. No obstante, puesto que estos experimentos fueron realizados con células fijadas, el efecto directo de la apoptosis en el ciclo biológico del virus no pudo analizarse completamente. Por ello, para examinar la importancia funcional de la inducción de la apoptosis, también se analizó el título de virus infecciosos liberados en el medio de cultivo. Se analizaron los efectos de la apoptosis sobre la replicación de astrovirus comparando la producción vírica en presencia y ausencia de 100  $\mu$ M de Z-IETD-FMK y Z-LEHD-FMK. El título vírico en el sobrenadante del medio de cultivo se tituló mediante diferentes estrategias. La cuantificación de la progenie vírica tanto por EIA como por RT-PCR produjo resultados idénticos tanto en ausencia como en presencia de cualquier inhibidor de caspasa (Tabla 6.1). Sorprendentemente, la inhibición de la actividad de la caspasa 8 causó una reducción de 1 logaritmo en el título de la progenie vírica infecciosa. Estos resultados sugieren que la apoptosis derivada de la activación de la caspasa 8 podría desempeñar un papel importante en el proceso de maduración de la cápside del virus, necesario para una correcta capacidad infecciosa de los viriones.

**Tabla 6.1** Efectos de la inhibición de caspasas en la liberación e infectividad de la progenie vírica<sup>a</sup>.

	DMSO	Z-IETD-FMK	Z-LEHD-FMK
EIA <sup>b</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
RT-PCR <sup>c</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
Infectividad <sup>d</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>

<sup>a</sup> Los resultados son representativos de dos experimentos independientes (MOI=5), después de una incubación de 48 h p.i.

<sup>b</sup> Los resultados se expresan como la dilución final recíproca.

<sup>c</sup> Los resultados se expresan como unidades de RT-PCR por ml, después de una titulación por *end-point dilution* RT-PCR.

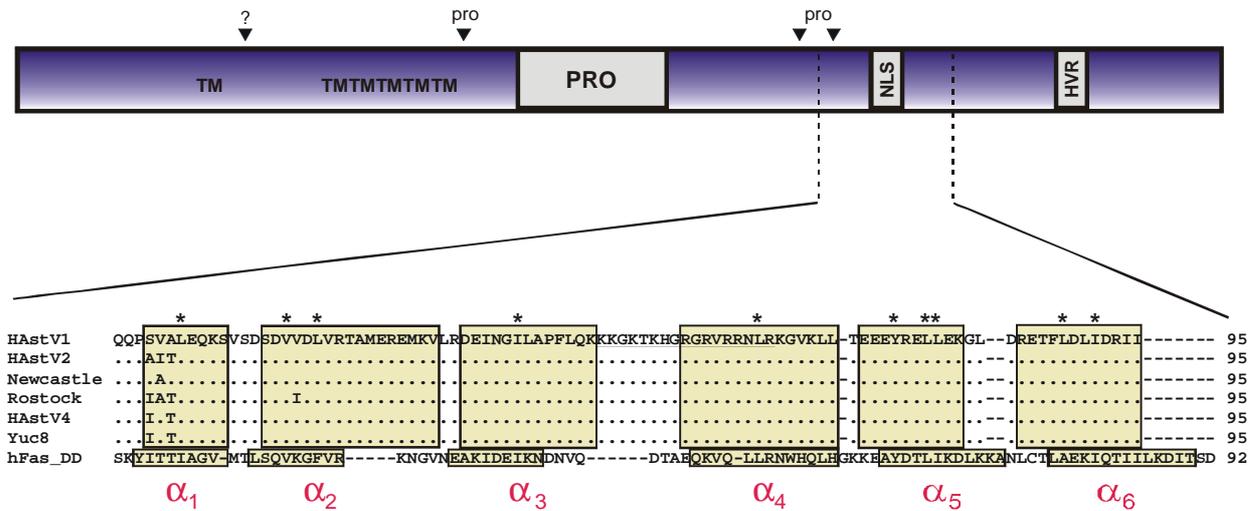
<sup>d</sup> Los resultados se expresan como virus infecciosos por ml y se obtuvieron mediante la técnica de RT-PCR con cultivo celular integrado, previamente descrita (Abad *et al.*, 1997).

### 6.3.4 Inducción de apoptosis por expresión transitoria de productos génicos del ORF1a en células CaCo-2

Recientemente, en proteínas implicadas en las vías de apoptosis, se han identificado tres dominios de interacción proteína-proteína relacionados. Se conocen bajo el nombre de la superfamilia *death domains* e incluyen los *death domains (DD)*, *death effector domains (DED)* y *caspase recruitment domains (CARD)*. Cada una de las proteínas pertenecientes a esta familia interactúa con otras proteínas a través de interacciones homotípicas y son responsables de la mayoría de fenómenos específicos de reclutamientos proteicos que tienen lugar durante la apoptosis. Estos dominios presentan unas estructuras muy similares entre sí que consisten en seis hélices  $\alpha$  antiparalelas con residuos centrales hidrofóbicos. El grado de similitud entre los miembros de la superfamilia de los *death domains* puede ser bastante bajo si no se considera la información de la estructura tridimensional y únicamente se considera la secuencia de aa (Weber & Vincenz, 2001). Con el fin de analizar la presencia de proteínas proapoptóticas codificadas por el genoma de HAstV, se realizó un análisis computacional de la secuencia aminoacídica de los 3 ORFs del virus para identificar dominios potenciales relacionados con los fenómenos de apoptosis. Mediante el servidor PredictProtein, se analizó la estructura secundaria de las poliproteínas completa del virus y se observó la presencia de una estructura óptima de seis hélices  $\alpha$  que comprendía una región de 95 aa cercana al extremo C-terminal del ORF1a (residuos 620 al 714, número de acceso L23513).

El porcentaje medio de identidad y de similitud entre esta región y varios miembros de la superfamilia de los *death domains* fue respectivamente de 19.1% y de 41.7%. Además, utilizando el programa 3D-SSPM, el cual realiza búsquedas de homología teniendo en cuenta la información tridimensional, esta misma región mostró homología estructural con el DD presente en la molécula del Fas humano (hFasDD). En la Fig. 6.9 se representa un

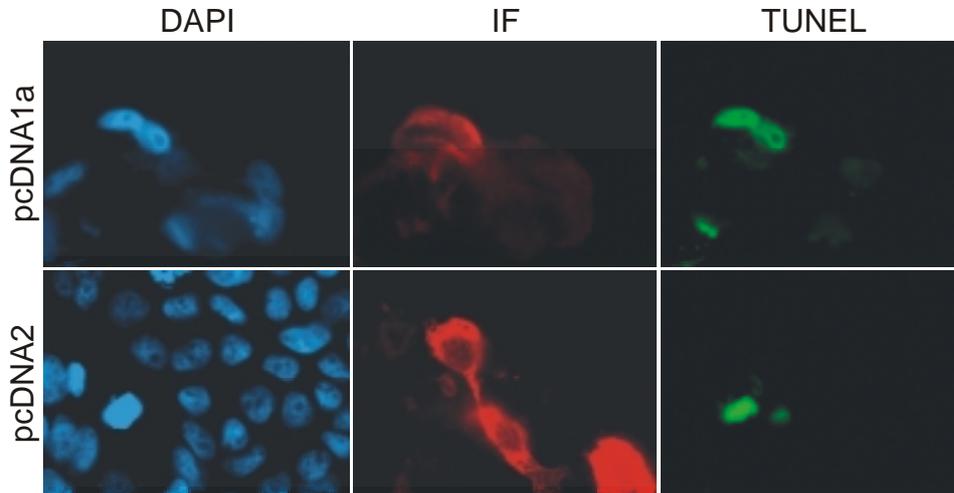
alineamiento de las secuencias disponibles en las bases de datos de esta región de astrovirus y el hFasDD. La presencia de un DD en una proteína no estructural del ORF1a hace pensar en la existencia de una relación directa entre esta proteína y la vía apoptótica.



**Fig. 6.9** Diagrama esquemático del ORF1a de HAstV. Se representan los dominios transmembrana (TM), el motivo proteasa (PRO), la señal de localización nuclear (NLS) y la región hipervariable (HVR). Las flechas negras indican potenciales lugares de corte proteolítico, los cuales parecen ser dependientes tanto de proteasas celulares (?) como de la proteasa vírica (pro). El potencial dominio DD aparece indicado, junto con un alineamiento de secuencias basado en información estructural en el que aparecen todas las secuencias disponibles de HAstV y la secuencia del DD de hFas. Los aminoácidos enmarcados indican las hélices  $\alpha$  y los asteriscos indican los residuos centrales hidrofóbicos conservados. Los números de acceso de *Genbank* para las secuencias utilizadas se detallan a continuación: L23513 (HAstV-1), L13745 (HAstV-2), Z25771 (A2/88 Newcastle), AF141381 (Rostock), AY257977 (HAstV-4 p23795) y AF260508 (Yuc-8).

En este contexto, se analizó la capacidad del ORF1a para modular la respuesta apoptótica mediante experimentos de expresión transitoria. Para ello, se clonó el ORF1a en el vector de expresión eucariota pcDNA3.1(+). También se obtuvo una construcción con el ORF2 como control. Los plásmidos pcDNA1a y pcDNA2 se transfectaron en células CaCo-2 por electroporación y se analizó la expresión de proteínas por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra un péptido sintético correspondiente a una secuencia del ORF1a y el anticuerpo MAb 8E7 contra un epítipo presente en las proteínas de la cápside. Simultáneamente, se marcaron los núcleos apoptóticos por TUNEL. En la Fig. 6.10 se muestran imágenes de células positivas para la expresión de proteínas. Debido a la conocida baja eficiencia de transfección descrita para las células CaCo-2 (Geigenmüller *et al.*, 1997), el porcentaje de células que expresaban proteína en todos los experimentos realizados fue muy bajo. No obstante, se realizaron contajes del porcentaje de células que expresaban proteínas que tenían el núcleo apoptótico y se observó un número significativamente superior de células apoptóticas después de la transfección del plásmido pcDNA1a ( $27.3\% \pm 12.7\%$ ), comparado con la transfección del plásmido pcDNA2 ( $2.15\% \pm 2.15\%$ ). Estos resultados confirmaron la

presencia de una proteína proapoptótica en el ORF1a del virus. Paralelamente, también se observó que a pesar de que a los 5 días p.i., había un incremento de la expresión proteica para ambas construcciones plasmídicas, únicamente se detectaba un incremento proporcional del porcentaje de células apoptóticas en las células que expresaban el ORF1a.



**Fig. 6.10** Análisis de doble marcaje de la expresión de proteínas víricas y de la apoptosis en experimentos de expresión transitoria al transfectar células CaCo-2 con vectores de expresión que contienen clonado el ORF1a y el ORF2 completos. Los núcleos de las células se tiñeron además con DAPI. La fluorescencia color rojo corresponde al marcaje de las proteínas víricas por IF, mientras que la fluorescencia verde corresponde al marcaje por TUNEL de los núcleos en estado apoptótico.

#### 6.4 Discusión

Los mecanismos de daño celular inducidos por virus desempeñan un papel importante en la patogénesis de las infecciones víricas. Durante los últimos años, se han realizado numerosos esfuerzos para profundizar en el conocimiento de las interacciones que se producen entre el virus y la célula hospedadora y se ha visto que el número de virus relacionados con fenómenos de inducción e inhibición de la apoptosis durante su ciclo replicativo, tanto directa como indirectamente, ha incrementado de forma considerable (O'Brien, 1998). A pesar de que también se ha demostrado la inducción de apoptosis tras la infección de virus de familias como *Caliciviridae* y *Picornaviridae* (Alonso *et al.*, 1998; Ammendolia *et al.*, 1999; Kuo *et al.*, 2002; López-Guerrero *et al.*, 2000), las cuales se encuentran taxonómicamente próximas a la familia *Astroviridae* (Monroe *et al.*, 1993), este trabajo constituye la primera aproximación que aporta evidencias de una respuesta apoptótica en células humanas frente a la infección por HAstV. Tras la infección de células CaCo-2 con HAstV, se detectaron cambios morfológicos y bioquímicos característicos de apoptosis, tales como condensación de la cromatina, activación de endonucleasas celulares, fragmentación del ADN hasta fragmentos de longitud múltiple al tamaño de un oligonucleosoma o la formación de cuerpos apoptóticos. Hubo una

concordancia muy elevada entre los resultados obtenidos con diferentes técnicas y se vio que la apoptosis se inducía de forma dependiente de la dosis.

En este estudio, también se examinó la activación de las caspasas 8 y 9 con el objetivo de descifrar los mecanismos de inducción de la apoptosis. Las caspasas son enzimas que desempeñan un papel central durante la muerte celular por apoptosis y, mientras que la caspasa 8 es indicativa de la activación de la vía apoptótica extrínseca, la caspasa 9 es indicativa de la vía intrínseca o mitocondrial. Sin embargo, experimentos recientes han demostrado que la jerarquía establecida para la activación de las caspasas no siempre se mantiene, con el fin de amplificar señales apoptóticas débiles (Denecker *et al.*, 2001; Kidd *et al.*, 2000). Hoy en día se sabe que en determinados tipos celulares, durante la ejecución de la apoptosis por la vía extrínseca, el complejo proteico formado DISC (*death-inducing signaling complex*) no es suficientemente eficiente como para activar las posteriores caspasas efectoras y que, por lo tanto, necesita que la señal apoptótica se amplifique utilizando elementos de la vía mitocondrial. De esta forma, la caspasa 8 media el procesamiento de una proteína denominada Bid, la cual es un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, y dirige su translocación hacia la mitocondria, donde induce la liberación de citocromo c al citoplasma celular (Luo *et al.*, 1998). Tal y como ocurre en los casos del coronavirus de la gastroenteritis transmisible TGEV (Eleouet *et al.*, 2000), del virus Sendai (Bitzer *et al.*, 2002), del parovirus B19 (Sol *et al.*, 1999) o del flavivirus Langat (Pridhod'ko *et al.*, 2002), nuestros resultados, tanto los obtenidos por *western blotting* como los de los experimentos con inhibidores específicos de caspasas, sugieren que la vía de la caspasa 8 está implicada en la respuesta apoptótica que se desarrolla frente a la infección por HAstV.

Para varios virus ARN se ha caracterizado el producto génico del virus responsable de la inducción de apoptosis. Este es el caso por ejemplo, del virus porcino del síndrome reproductivo y respiratorio PRRSV (Fernández *et al.*, 2002), del coronavirus murino (An *et al.*, 1999), del virus de la enfermedad bursal infecciosa IBDV (Fernández-Arias *et al.*, 1997), del virus del SIDA HIV (Muthumani *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 2000), de poliovirus (Barco *et al.*, 2000; Goldstaub *et al.*, 2000), del virus influenza (Schultz-Cherry *et al.*, 2001), del flavivirus Langat (Pridhod'ko *et al.*, 2002) o del enterovirus 71 (Kuo *et al.*, 2002). Para otros virus ARN, como el virus Sindbis (Jan *et al.*, 1999) o reovirus (Connolly & Dermody, 2002), se ha visto que la inducción de apoptosis no requiere la replicación vírica. Tras experimentos de expresión transitoria, nuestras observaciones sugieren que un inductor apoptótico podría estar codificado en el ORF1a de HAstV y por análisis computacional, se ha identificado un motivo potencial para un DD ubicado entre los residuos 620-714 de dicho ORF y, por lo tanto, podría estar incluido dentro de la proteína nsP1a/4. No obstante, los resultados de inmunoprecipitación con el anticuerpo contra el péptido sintético correspondiente a la región hipervariable de la proteína sugieren que la proteína nsP1a/4 sería todavía procesada hasta dar lugar a una proteína de 24-26 kDa (ver Estudio I). Todavía se requieren más estudios para

averiguar si el DD sería funcional cuando el producto nsP1a está en forma de poliproteína o si ejercería su función cuando la poliproteína ya ha sido procesada por acción de las proteasas. La identificación exacta de los lugares de corte que dan lugar a la proteína de 24-26 kDa también sería de gran utilidad para clarificar el número total de proteínas resultantes del procesamiento del nsP1a total y conocer la ubicación exacta del DD en los productos finales de maduración. Los DD constituyen uno de los dominios prototipo de las interacciones proteína-proteína que suceden durante las fases iniciales y efectoras de la apoptosis. La confirmación experimental de la existencia de un DD en el ORF1a de HAstV aportaría información de gran ayuda para la comprensión de las funciones de las proteínas no estructurales de este virus.

No obstante, no debemos olvidar que tanto al infectar como al transfectar, no todas las células que expresan proteínas víricas desarrollan una respuesta apoptótica. Únicamente al utilizar una MOI elevada y tiempos de infección largos, se consigue inducir la apoptosis en el 70% de las células del cultivo. Varios motivos podrían explicar por qué no todas las células infectadas entran en apoptosis. Una posibilidad podría ser un problema técnico, el cual impediría detectar la apoptosis mediante la técnica de TUNEL a lo largo de todas sus fases. Otra explicación podría ser que a un determinado tiempo p.i., debido a diferentes estadios del ciclo biológico del virus, la cantidad de proteína vírica inductora de apoptosis producida en cada célula no fuera igual y en algunos casos fuera todavía insuficiente para inducir la apoptosis. Tampoco debería descartarse incluso que en el genoma del virus hubiera también algún inhibidor apoptótico codificado y que se expresara en distintas fases del ciclo replicativo. De esta forma, el equilibrio entre los estímulos proapoptóticos y antiapoptóticos, tanto de origen vírico como celular, sería el que tendría la última palabra en decidir si la célula morirá por apoptosis o no. Además, en células como CaCo-2 que sufren diferenciación *in vitro*, este equilibrio podría ser incluso más variable dependiendo también del estadio de diferenciación celular.

Es interesante destacar los resultados obtenidos al titular la progenie vírica producida en presencia del inhibidor específico de la caspasa 8. Por un lado, se observó una reducción significativa en la capacidad infecciosa de la progenie vírica resultante de la infección y por otro lado, el título de partículas físicas (estimado mediante EIA y RT-PCR) no se vio afectado. Estos datos son diferentes de los obtenidos en experimentos similares realizados con otros virus como el virus Sendai (Bitzer *et al.*, 1999), el coronavirus TGEV (Eleouet *et al.*, 1998) o el coronavirus aviar de la bronquitis infecciosa (Liu *et al.*, 2001), la producción vírica de los cuales no se veía afectada al inhibir los procesos apoptóticos. Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir que la muerte por apoptosis de la célula hospedadora parece ser necesaria para una maduración eficiente y correcta de las partículas de HAstV. Para algunos virus se ha observado que algunas de sus proteínas son procesadas proteolíticamente por acción de caspasas de la célula hospedadora (Al-Molawi *et al.*, 2003; Eleouet *et al.*, 2000;

Zhirnov *et al.*, 1999). Todavía hoy existe controversia sobre los procesos de procesamiento y ensamblaje de la cápside de HAstV. Recientemente, diferentes autores han propuesto diferentes modelos utilizando serotipos de HAstV diferentes (Bass & Qiu, 2000; Geigenmüller *et al.*, 2002b; Méndez *et al.*, 2002). Por otra parte, el análisis de las secuencias disponibles de la cápside de HAstV pone de manifiesto la presencia de varias dianas potenciales para ser sustrato de caspasas en una región cercana al extremo C-terminal de la poliproteína, como por ejemplo, la secuencia  ${}_{675}\text{IETD}_{678}$  en el serotipo 1 (Núm. acceso L23513), sustrato para la caspasa 8, o la secuencia  ${}_{683}\text{DEVD}_{686}$  en el serotipo 8 (Núm. acceso AF260508), la cual constituye una diana para las caspasas 3 y 7 (Thornberry *et al.*, 1997). Ambos procesamientos generarían una proteína de aproximadamente 12 kDa de peso molecular en el extremo C-terminal de la poliproteína, cumpliendo así con uno de los modelos de procesamiento propuesto que postula que la poliproteína de la cápside se procesa intracelularmente por una proteasa distinta de la tripsina antes de ensamblarse para constituir la partícula vírica (Méndez *et al.*, 2002). De ser así, la existencia de diferencias en los niveles de apoptosis inducidos por distintos serotipos o subgenotipos de HAstV podría explicar las diferencias en la capacidad infecciosa observadas entre diferentes suspensiones víricas con un título similar de partículas físicas y que se han atribuido a diferencias en los procesos de maduración de la cápside. Sería de gran interés profundizar en el análisis de la relación existente entre el posible papel de una maduración de la cápside dependiente de caspasas y el significado biológico de la inducción de apoptosis por HAstV en células intestinales humanas.



## **7. CONCLUSIONES**



## Conclusiones

Las conclusiones más relevantes derivadas de cada uno de los estudios fueron:

- 1- La caracterización biológica y computacional de la proteína nsP1a/4 permiten concluir que:
  - nsP1a/4 tiene un peso molecular que oscila entre 24-26 kDa y puede sufrir modificaciones post-traduccionales por fosforilación y/o glicosilación.
  - Existe una asociación entre la variabilidad genética observada en la región hipervariable de la proteína nsP1a/4 y la capacidad replicativa del virus.
- 2- La variabilidad genética presente en la región hipervariable HVR de la proteína nsP1a/4 se caracteriza por:
  - La presencia de numerosas inserciones y deleciones que conservan la pauta de lectura, así como también un gran número de sustituciones nucleotídicas y de aminoácidos.
  - Una *ratio* Ks/Ka del orden de las proteínas estructurales, lo cual refleja la enorme tolerancia de la región HVR a los cambios de aminoácido.
- 3- El sistema de diagnóstico desarrollado sobre la región hipervariable por RFLP permite detectar y caracterizar la variabilidad genética de astrovirus y presenta la ventaja frente a otros sistemas moleculares de permitir co-detectar dos tipos diferentes de virus presentes en una misma muestra.

4- La epidemiología de las infecciones por astrovirus en la población infantil de Barcelona se caracteriza por:

- Una incidencia del 4.9% y del 3.6% para los genogrupos A y B, respectivamente. La incidencia observada para el genogrupo B contrasta con la baja incidencia observada en la mayoría de países, a excepción del continente africano.
- Una distribución bianual y una mayor incidencia durante los meses de invierno.
- Una tasa de detección máxima en niños de edades comprendidas entre los 2 y los 4 años.
- El serotipo más prevalente es el serotipo 1 (38%), seguido por el serotipo 4 (26%), el 3 (19%), el 8 (11%) y finalmente el serotipo 2 (6%), aunque las incidencias relativas de cada serotipo varían cada año, sugiriendo que no existe inmunidad cruzada entre diferentes serotipos.

5- Las células CaCo-2 infectadas por astrovirus humanos entran en apoptosis. La caracterización de la respuesta apoptótica permite afirmar que:

- Sigue un patrón dosis-dependiente, siendo el porcentaje de células apoptóticas directamente proporcional a la multiplicidad de infección utilizada.
- Existe una relación directa entre la expresión de las proteínas no estructurales codificadas por el ORF1a y la respuesta apoptótica. Se identifica un potencial dominio *death domain* (DD) en la proteína nsP1a/4 del virus.
- La caspasa 8 está implicada en la inducción de apoptosis tras la infección.
- La apoptosis inducida por el virus podría ser necesaria para una correcta maduración de las proteínas de la cápside.

## **8. APÉNDICE: Material y Métodos**



## APÉNDICE: Material y Métodos

### 8.1 Virus y líneas celulares

La línea celular continua empleada en el presente trabajo para la propagación de astrovirus fue la línea humana de adenocarcinoma de colon CaCo-2 (ATCC HBT 37). Las células se cultivaban a 37 °C en medio mínimo esencial (MEM) de Eagle con sales de Earle suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FCS), aminoácidos, antibióticos y soluciones tamponadoras. Las células CaCo-2 se subcultivaban cada 5-7 días según protocolos clásicos de cultivo celular y se sembraban con una relación de multiplicación de 1:3, obteniendo una monocapa confluyente tras la incubación durante unos 4 días a 37 °C. La cepa de astrovirus humanos utilizada como control positivo durante estos estudios fue la cepa p23795 correspondiente a una cepa serotipo 4 aislada en UK y gentilmente cedida por W. D. Cubitt del Great Ormond Street Hospital for Children, en Londres.

#### • Soluciones necesarias:

*MEM 10% FCS:*      *MEM 1X con sales de Earle autoclavado 15'*  
*suplementado en condiciones de esterilidad con:*  
 FCS.....10% (v/v)  
 L-Glutamina.....4 mM  
 NEAA (100X).....1X  
 HEPES.....15 mM  
 Bicarbonato 7.5% (p/v).....2% (v/v)  
 Penicilina/Estreptomina.....100 U/ml-100 µg/ml  
*Conservar a 4 °C*

*Tampón PBS:* NaCl..... 8 g/l  
KCl..... 0.2 g/l  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 1.15 g/l  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>..... 0.2 g/l  
*pH 7.2*

*Esterilizar por autoclave 15'*

*Conservar a 4 °C*

*Tripsina-EDTA:* Tripsina 1:250 (Difco)..... 0.25% (p/v)  
EDTA..... 0.5 mM  
Penicilina/Estreptomycin..... 100 U/ml y 100 µg/ml

*En tampón PBS*

*Esterilización por filtración*

*Conservar a -20 °C*

## 8.2 Infecciones víricas

La propagación de la cepa vírica en la línea celular CaCo-2 se realizaba siguiendo el protocolo previamente descrito por Pintó y col. (1994), el cual se describe a continuación:

1. Pre-tratamiento del inóculo vírico con 10 µg/ml de tripsina GIX (Sigma) durante 30' a 37 °C
2. Decantar el medio de crecimiento y lavar la monocapa celular con tampón PBS para eliminar completamente el FCS (x2)
3. Añadir el inóculo vírico a la monocapa e incubar durante 1 h a 37 °C para favorecer la adsorción del virus
4. Añadir medio MEM 0% FCS suplementado con 5 µg/ml de tripsina GIX (Sigma)
5. Incubar las células a 37 °C durante 4 días
6. Lisis total de las células mediante 3 ciclos de congelación (-80 °C) y descongelación
7. Eliminación de los restos celulares por centrifugación durante 10' a 3000 xg
8. Conservación de la suspensión vírica a - 80 °C

### • Soluciones necesarias:

*Tripsina GIX (Sigma):* 1 mg/ml de tripsina en tampón PBS.

*Esterilizar por filtración*

*Conservar a -20 °C*

**MEM 0% FCS:** MEM 1X con sales de Earle autoclavado 15'  
 suplementado en condiciones de esterilidad con:  
 L-Glutamina ..... 4 mM  
 NEAA (100X)..... 1X  
 HEPES..... 15 mM  
 Bicarbonato 7.5% (p/v)..... 2% (v/v)  
 Penicilina/Estreptomocina..... 100 U/ml y 100 µg/ml  
 Conservar a 4 °C

### 8.3 Síntesis del péptido sintético

El péptido sintético utilizado en el Estudio I del presente trabajo se diseñó en base a los resultados del análisis de hidrofobicidad de la secuencia completa de aminoácidos del ORF1a de astrovirus, utilizando el programa ProtScale y que utiliza el algoritmo descrito por Hopp y Woods (1981). Se diseñó un péptido de 15 aminoácidos de longitud correspondiente a la secuencia comprendida entre las posiciones 778-792 de la cepa de HAstV-1 de referencia (núm. de acceso L23513 de *Genbank*). La secuencia del péptido diseñado fue <sup>778</sup>QPLDLS-QKKEKQPEH<sup>792</sup> y el anticuerpo se denominó anti-1a778-792. La síntesis del péptido sintético fue realizada por el grupo del Dr. David Andreu en el *Servei de Síntesi de Pèptids* de la UB, y conjugado por el método MBS a través de un residuo de Cys a una molécula de KLH (*Keyhole limped hemocyanin*).

### 8.4 Producción de anticuerpos contra el péptido sintético

La producción de anticuerpos policlonales se llevó a cabo mediante generación de líquido ascítico en ratones. Se utilizaron 6 ratones hembra de 8 semanas de la cepa *swiss*. Se inyectaron intraperitonealmente dosis de 25 µg de péptido diluido 1:10 en adyuvante completo de Freund (FCA). Las dosis fueron administradas a las semanas 0, 2, 3, 4 y 5. La recolección de los ascites se realizaba a partir de la 4ª ó 5ª dosis durante 3 a 6 semanas. La extracción se efectuaba mediante una punción intraperitoneal con una cánula de acero inoxidable de 0.8 mm de diámetro. Una vez extraído el líquido ascítico se procesaba según un método estándar (Harlow & Lane, 1988):

1. Incubar durante 1 h a 37 °C y a continuación 16 horas a 4 °C
2. Centrifugar durante 10' a 3,000 xg, descartando el *pellet* y la capa aceitosa
3. Guardar el volumen resultante a -20 °C repartido en partes alícuotas

### 8.5 Preparación de suspensiones fecales

La preparación de las suspensiones fecales al 10% (p/v) se realizaba siempre en una cabina de seguridad biológica de clase II, siguiendo los pasos que se describen a continuación:

1. Añadir en un microtubo aproximadamente 0.1 g de materia fecal
2. Añadir 0.9 ml de tampón de suspensión
3. Mixotubar durante 1'
4. Centrifugar a 2,000 xg durante 5' a temperatura ambiente (RT) y recuperar el sobrenadante
5. Conservar la suspensión a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis

• **Soluciones necesarias:**

*Tampón Suspensión:*

NaCl.....	8 g/l
KCl.....	0.2 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.15 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.2 g/l
NaNO <sub>3</sub> .....	2 M
Beef Extract V (BBL)..	1% (p/v)
Tritón X-100.....	0.1% (v/v)

*pH 7.2*  
*Esterilizar por autoclave 15' antes de añadir Tritón X-100*  
*Conservar a 4°C*

### 8.6 Descontaminación de muestras fecales por tratamiento con cloroformo

Con el fin de adaptar los astrovirus salvajes a cultivo celular, se partió de suspensiones fecales al 10% (p/v) positivas para astrovirus. Previamente a la infección de células CaCo-2, se descontaminaba la muestra siguiendo el siguiente protocolo:

1. Añadir un 30% (v/v) de cloroformo a la suspensión fecal
2. Mixotubar vigorosamente durante 1'
3. Incubar a RT durante 10'
4. Centrifugar durante 20' a RT a 10,000 xg
5. Separar el sobrenadante y airearlo con la ayuda de una micropipeta para eliminar posibles restos de cloroformo. Dicho sobrenadante se utilizaba como inóculo para una infección

### 8.7 Preparación de extractos celulares

La preparación de extractos celulares para su posterior análisis por electroforesis en SDS-PAGE y *western blotting* (ver apartado 8.11) se realizaba a partir de cultivos de aproximadamente  $2 \times 10^6$  células CaCo-2:

1. Recuperar las células a analizar por tripsinización
2. Centrifugar las células a 1,000 xg durante 10' a 4 °C
3. Lavar las células en 1 ml de tampón PBS y centrifugar a 1,000 xg 10' a 4 °C
4. Resuspender el *pellet* celular en tampón RIPA a una concentración final de  $10^7$  células/ml

Entre muestras, la concentración de proteínas se equiparaba en relación a las medidas de espectrofotometría, atendiéndose a la siguiente fórmula:

$$\text{- Concentración de proteínas (mg/ml)} = (1.55 \times A_{280}) - (0.76 \times A_{260})$$

• **Soluciones necesarias:**

*Tampón RIPA:*

Tris-HCl.....	50 mM
NaCl.....	150 mM
Nonidet NP-40.....	1% (v/v)
SDS.....	0.1% (p/v)

*pH 7.8*  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a RT*

### 8.8 Preparación de suspensiones de membranas celulares

Para la obtención de extractos de membranas celulares a partir de cultivos infectados de  $2 \times 10^6$  células CaCo-2, se seguía el siguiente protocolo:

1. Recuperar las células a analizar por tripsinización
2. Centrifugar las células a 1,000 xg durante 10' a 4 °C
3. Lavar las células en 2 ml de tampón PBS y centrifugar a 1,000 xg 10' a 4 °C
4. Resuspender el *pellet* celular en tampón TNE 1% NP40 a una concentración final de  $10^7$  células/ml
5. Mixotubar vigorosamente e incubar durante 1 h a 4 °C
6. Centrifugar durante 10' a RT a 7,000 xg
7. Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 50  $\mu$ l de tampón TNE

• **Soluciones necesarias:**

*Tampón TNE:*

Tris-HCl.....	50 mM
NaCl.....	100 mM
EDTA.....	10 mM

*pH 7.4*  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a 4 °C*

## 8.9 Inmunoprecipitación

El día anterior al experimento de inmunoprecipitación, se preparaba la solución de proteína A con *Protein A-Agarose* (Roche), realizando 3 lavados del volumen necesario de reactivo con tampón proteína A después de centrifugar durante 10' a 10,000 xg y se guardaba a 4 °C hasta su utilización. La inmunoprecipitación se realizaba sobre extractos celulares procedentes de  $1 \times 10^7$  células infectadas y no infectadas, y se partía de células crecidas sobre frascos T-75. El protocolo utilizado para el procesamiento de las muestras, antes de realizar la electroforesis SDS-PAGE y el análisis por *western blotting* (ver apartado 8.11), se detalla a continuación:

1. Recuperar las células del cultivo por centrifugación durante 10' a 1,000 xg a 4 °C
2. Lavar las células en tampón PBS centrifugando durante 10' a 1,000 xg a 4 °C
3. Resuspender el *pellet* en tampón TNE 1% NP40 a razón de  $2 \times 10^7$  células/ml
4. Mixotubar 1' e incubar durante 1 h a 4 °C
5. Centrifugar durante 5' a 10,000 xg a RT y recuperar el sobrenadante
6. Diluir las muestras en tampón TNE hasta rebajar la concentración de NP40 al 0.2%
7. Añadir el anticuerpo primario a una dilución 1/75 en 0.5 ml de muestra
8. Incubar durante 4 h a 37 °C en agitación orbital
9. Añadir 40  $\mu$ l de proteína A-agarosa e incubar toda la noche a 4 °C en agitación orbital
10. Centrifugar a 10,000 xg durante 1'
11. Resuspender el pellet en 0.7 ml de tampón TNE 0.1% NP40 e incubar durante 1 h a 4 °C en agitación orbital
12. Centrifugar a 10,000 xg durante 1'
13. Resuspender el pellet en 1 ml de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) 0.1% NP40 e incubar durante 1 h a 4 °C en agitación orbital
14. Centrifugar a 10,000 xg durante 1'
15. Resuspender el pellet en 50  $\mu$ l de tampón TNE y conservar a 4 °C hasta realizar la electroforesis en geles de SDS-acrilamida

### • Soluciones necesarias:

*Tampón Proteína A:* K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....50 mM  
NaCl.....0.2 M  
pH 8.2-9  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a RT*

*Tampón TNE:* Tris-HCl..... 50 mM  
 NaCl..... 100 mM  
 EDTA..... 10 mM  
*pH 7.4*  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a 4 °C*

*Tampón Tris-HCl 10 mM:* Disolver 0.12 g de Tris-HCl en 100 ml de agua bidestilada  
*pH 8.0*  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a RT*

### 8.10 Fraccionamiento subcelular

Con el fin de analizar la redistribución del citocromo c del espacio mitocondrial al citoplasma celular, a partir de cultivos de aproximadamente  $7 \times 10^6$  células CaCo-2 se purificaban fracciones celulares correspondientes a las mitocondrias y al citosol mediante el siguiente procedimiento:

1. Recuperar las células a analizar por tripsinización
2. Centrifugar las células a 1,000 xg durante 10' a 4 °C
3. Lavar las células en 1 ml de tampón PBS y centrifugar a 1,000 xg durante 10' a 4 °C
4. Resuspender el pellet celular en 0.5 ml de solución de homogenización e incubar en hielo durante 15'
5. Homogenizar la suspensión celular con la ayuda de una jeringuilla
6. Centrifugar durante 10' a 1,000 xg y descartar el pellet con los restos de células no lisadas y núcleos
7. Pasar el sobrenadante a un microtubo nuevo y centrifugar durante 20' a 10,000 xg. El sobrenadante de dicha centrifugación corresponde a la fracción citosólica y el pellet a la fracción mitocondrial
8. Resuspender el pellet en 50 µl de solución de homogenización

Una vez purificadas las distintas fracciones celulares, las muestras se analizaban en geles de acrilamida 12% SDS-PAGE y posterior análisis por *western blotting* (ver apartado 8.11) con un anticuerpo monoclonal comercial anti-citocromo c (Beckton Dickinson Pharmingen).

• **Soluciones necesarias:**

*Solución de homogenización:* HEPES..... 10 mM  
 Sacarosa..... 250 mM  
 EGTA..... 1 mM  
 pH 7.4  
 Esterilizar por filtración 0.22  $\mu$ m  
 Conservar a 4 °C

### 8.11 Electroforesis SDS-PAGE y Western blotting

El protocolo que se describe a continuación está diseñado para la utilización de cubetas de electroforesis verticales para geles de un tamaño de 7 cm x 8 cm x 0.75 mm, como las cubetas *Mini Protean®II* (Bio-Rad). Para la preparación del gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes, se debe mezclar los siguientes componentes:

Solución	Gel 12% Acrilamida	Gel separador
Acrilamida 30%	2 ml	0.33 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.3 ml	-
Tris-HCl 1 M pH 6.8	-	0.25 ml
H <sub>2</sub> O	1.7 ml	1.4 ml
SDS 10%	50 $\mu$ l	20 $\mu$ l
APS 10%	50 $\mu$ l	20 $\mu$ l
TEMED	2 $\mu$	2 $\mu$ l

Una vez polimerizada la acrilamida, se procedía a realizar la electroforesis seguida por una transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher&Schuell) mediante un sistema *semi-dry* empleando un *Trans-blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) y una inmunodetección con anticuerpos específicos, ateniéndose al siguiente protocolo:

1. Mezclar 25  $\mu$ l de muestra con 5  $\mu$ l de tampón Laemli 5X
2. Desnaturalizar la muestra durante 5' a 100 °C y colocar en hielo inmediatamente
3. Llenar la cubeta con tampón de carrera 1X y cargar las muestras en el gel de SDS-acrilamida
4. Electroforesis a 120 V durante aproximadamente 2 h
5. Incubar la membrana de nitrocelulosa en agua destilada durante 2-3'
6. Incubar el gel en agua destilada mientras se realiza el montaje del sistema
7. Colocar el gel y la membrana en el *Trans-blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad), manteniendo el orden siguiente y eliminando las posibles burbujas de aire:

Papel de filtro (x3) mojados en tampón de transferencia

Membrana de nitrocelulosa

Gel acrilamida

Papel de filtro (x3) mojados en tampón de transferencia

8. Transferir a 70 mA durante 70'
9. Desmontar el aparato y bloquear la membrana toda la noche a 4 °C en tampón de bloqueo
10. Incubar durante 2 h a RT en tampón de bloqueo con la dilución correspondiente del anticuerpo primario
11. Tres lavados de 10' a RT en tampón PBS
12. Incubar durante 2 h a RT en tampón de bloqueo con la dilución correspondiente del anticuerpo secundario marcado con fosfatasa alcalina
13. Tres lavados de 10' a RT en tampón PBS
14. Incubar durante 5' a RT en tampón fosfatasa
15. Revelado de la membrana mediante la incorporación de un sustrato precipitante.  
En una placa de Petri se mezclan 10 ml de tampón fosfatasa, 45 µl de NBT (Nitroblue tetrazolium cloruro) (Roche) y 35 µl de X-Fosfato (5-Bromo-4cloro-3indolil-fosfato, 4-toluidina) (Roche). Se incuba la membrana hasta que se obtiene el marcaje deseado y se deja secar

• **Soluciones necesarias:**

<i>30% Acrilamida:</i>	Disolver 29 g de acrilamida y 1 g de N,N'-bis-metilen-acrilamida en un volumen total de 100 ml de agua bidestilada, en un baño a 37 °C. <i>Conservar a 4 °C protegido de la luz</i>
<i>Tris-HCl 1.5 M pH 8.8:</i>	Disolver 18.17 g de Tris base en 50 ml de agua bidestilada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1 N. Enrasar el volumen a 100 ml con agua bidestilada. <i>Conservar a RT</i>
<i>Tris-HCl 1 M pH 6.8:</i>	Disolver 12.11 g de Tris base en 50 ml de agua bidestilada. Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1 N. Enrasar el volumen a 100 ml con agua bidestilada. <i>Conservar a RT</i>
<i>SDS 10% (p/v):</i>	Disolver 10 g de SDS en un volumen final de 100 ml de agua bidestilada. <i>Conservar a RT</i>

*Persulfato amónico 10% (p/v):* Disolver 1 g de persulfato amónico en 10 ml finales de agua bidestilada.

*Conservar a -20 °C*

*Tampón de carrera 5X:* Tris-HCl.....125 mM  
Glicina ..... 1 M  
SDS.....0.5% (p/v)

*Conservar a RT*

*Tampón Laemli 5X:* Tris-HCl 1M (pH 6.8) 25% (v/v)  
Glicerol.....40% (v/v)  
 $\beta$ -mercaptoetanol .....25% (v/v)  
SDS.....1% (p/v)  
Azul de bromofenol...0.025% (p/v)

*Conservar a 4 °C*

*Tampón de transferencia:* Tris-HCl.....50 mM  
Glicina .....40 mM  
SDS.....0.04% (p/v)  
Metanol.....20% (v/v)

*pH 8.3*

*Conservar a RT*

*Tampón TBS:* Tris-HCl.....50 mM  
NaCl.....150 mM

*pH 7.6*

*Conservar a RT*

*Tampón de bloqueo:* TBS 5% de leche descremada en polvo

*Tampón fosfatasa:* Tris-HCl.....100 mM  
NaCl.....100 mM  
MgCl<sub>2</sub>.....50 mM

*pH 9.5*

*Conservar a 4 °C*

## 8.12 Inmunofluorescencia

Después de crecer las células CaCo-2 sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos y haber realizado el tratamiento deseado, se realizaba el protocolo para marcaje por inmunofluorescencia. Todo el procedimiento se llevaba a cabo a temperatura ambiente en la misma placa de 24 pocillos. Las incubaciones con anticuerpo se realizaban colocando el

cubreobjetos al revés sobre una gota depositada sobre papel de parafilm. El marcaje se realizaba ateniéndose al siguiente protocolo:

1. Lavar las células 2 veces con 0.5 ml de PBS
2. Fijar las células con 0.3 ml de PF 3% durante 30' a RT
3. Lavar 5' en 0.5 ml de PBS (x3)
4. Incubar durante 20' en 0.5 ml de solución de lavado
5. Permeabilizar durante 15' en 0.3 ml de solución de permeabilización
6. Lavar 5' en solución de lavado (x3)
7. Bloquear durante 3' en 0.5 ml de solución de bloqueo
8. Incubar con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente en solución de bloqueo durante 1-2 h
9. Lavar 5' en solución de lavado (x3)
10. Incubar con el anticuerpo secundario a la dilución correspondiente en solución de bloqueo durante 1 h, en la oscuridad
11. Lavar 5' en solución de lavado (x3)
12. Incubar durante 15' en solución PBS 1 µg/ml de DAPI (Roche), en la oscuridad
13. Lavar 5' en solución de lavado (x1)
14. Secar suavemente el cubreobjetos y colocarlo al revés sobre una gota de medio de montaje Fluoromont G (Southern Biotechnologies) sobre un portaobjetos de vidrio. Guardar a 4 °C en la oscuridad hasta su observación al microscopio de fluorescencia (Leica DMRB FLUO)

• **Soluciones necesarias:**

*Paraformaldehido (PF) 20%:* Disolver 20 g de PF en 80 ml de agua bidestilada, calentando en un baño a 75 °C y en una campana extractora. Añadir 2-3 gotas de NaOH 5N para ayudar a disolver el PF. Una vez disuelto, enrasar a 100 ml y filtrar a través de papel de filtro, repartir en partes alícuotas y conservar a -20 °C.

*Solución Sacarosa 1M:* Disolver 34.23 g de sacarosa en 100 ml finales de agua bidestilada  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a RT*

*Solución Glicina 1M:* Disolver 0.5 g de glicina en 100 ml de agua bidestilada  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a RT*

- Fosfato monosódico 1M:* Disolver 4.79 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en 80 ml de agua bidestilada. Enrasar a 100 ml.  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a 4 °C*
- Fosfato dipotásico 1M:* Disolver 174.18 g de  $\text{K}_2\text{PO}_4$  en 800 ml de agua bidestilada. Enrasar a 100 ml  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a 4 °C*
- Tampón fosfato PB 1M:* Medir el pH de 800 ml de tampón dipotásico 1M. Añadir fosfato monosódico 1M hasta que el pH sea de 7.4.  
*Conservar a RT*
- Tampón fosfato PB 0.2 M:* Dilución 1:5 del tampón fosfato PB 1M en agua bidestilada  
*Conservar a RT*
- Solución fijación PF 3%:* PF 20%..... 1.5 ml  
Sacarosa 1M..... 0.6 ml  
Tampón fosfato PB 0.2 M..... 5 ml  
H<sub>2</sub>O bidestilada..... 2.9 ml  
*Uso inmediato*
- Solución lavado:* PBS 20 mM Glicina
- Solución permeabilización:* PBS 20 mM Glicina 0.5% Tritón X-100 (v/v)
- Solución bloqueo:* PBS 20 mM Glicina 10% FCS

### 8.13 Microscopía electrónica

Para el análisis de los cambios ultraestructurales en células CaCo-2 producidos por la infección vírica, se partía de cultivos de aproximadamente  $10^7$  células infectadas en ausencia de tripsina. Después de lavar exhaustivamente la monocapa con tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4, las células se fijaban durante 2 h a 4 °C en 2% paraformaldehído + 2.5% glutaraldehído (v/v) en el mismo tampón. A continuación, se sometía a las muestras a una post-fijación con una solución de tetraóxido de osmio al 1% (v/v) en tampón cacodilato 0.1 M pH 7.2. Después de deshidratar las muestras en diferentes concentraciones de acetona, se realizaba la inclusión en Spurr y, finalmente, se teñían los cortes ultrafinos en acetato de uranilo y citrato de plomo. El procesamiento de las muestras se realizó en la *Unitat de Tècniques de Microscòpia Electrònica de Transmissió dels Serveis Cientifictècnics* de la UB. La observación de las muestras se realizaba con un microscopio electrónico de transmisión Hitachi MT 800.

• **Soluciones necesarias:**

*Tampón cacodilato 1M:* Disolver 21.4 g de cacodilato sódico en 100 ml de agua bidestilada  
 pH 7.3-7.4  
 Conservar a 4 °C

### 8.14 Inmunoelectromicroscopía

Para los análisis de inmunoelectromicroscopía, después de una fijación más suave, se siguió un protocolo de criosustitución para conseguir una mejor preservación de los antígenos. Después de lavar exhaustivamente la monocapa con tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4, las células se fijaban durante 1,5 h a 4 °C en 4% paraformaldehído + 0.2% glutaraldehído (v/v) en el mismo tampón. A continuación, se realizaba la crioprotección de la muestra incubando a distintas concentraciones de sacarosa y se procedía al montaje de las muestras sobre los “stubs” de crioultramicrotomía para la congelación en nitrógeno líquido. Finalmente, las muestras se colocaban en el líquido de criosustitución durante 48 h y se incluían en Spurr. El procesamiento de las muestras se realizó en la *Unitat Tècniques de Microscòpia Electrònica de Transmissió dels Serveis Científicotècnics* de la UB. La detección inmunológica se realizaba sobre los cortes ultrafinos de células sobre la rejilla, siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

1. Incubar la rejilla durante 5' en solución de bloqueo
2. Incubar la rejilla en solución de bloqueo con la correspondiente dilución del anticuerpo primario durante 2 h a RT
3. 10 lavados de 5' en solución de bloqueo
4. Incubar la rejilla con anticuerpo secundario marcado con oro de 10 nm de diámetro en solución de bloqueo durante 1 h a RT
5. 5 lavados de 5' en solución de bloqueo
6. 5 lavados de 5' en agua bidestilada
7. Contrastar la rejilla con acetato de uranilo

• **Soluciones necesarias:**

*Tampón cacodilato 1M:* Disolver 21.4 g de cacodilato sódico en 100 ml de agua bidestilada  
 pH 7.3-7.4  
 Conservar a 4 °C

*Solución salina:* Disolver 0.8 g de NaCl en 100 ml de agua bidestilada

*Solución bloqueo:* Solución salina 2% FCS 1% BSA 0.1% Tween-20

### 8.15 Ensayo inmunoenzimático (EIA)

El protocolo que se detalla a continuación corresponde a un ensayo inmunoenzimático de captura y fue previamente descrito por Herrmann y col. (1990). Se utilizaron microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Sarsted).

1. Recubrir los pocillos de la placa de EIA con 50 µl de tampón de recubrimiento con la dilución correspondiente de anticuerpo (MAb 8E7 a una dilución 1:10,000) e incubar durante toda la noche a 4 °C
2. Tres lavados con 100 µl/pocillo de solución de lavado
3. Bloqueo de la placa con 100 µl/pocillo de solución de lavado durante 30' a 37 °C
4. Tres lavados con 100 µl/pocillo de solución de lavado
5. Añadir 50 µl/pocillo de la muestra a analizar e incubar durante 2 h a 37 °C
6. Tres lavados con 100 µl/pocillo de solución de lavado
7. Añadir 50 µl/pocillo de solución de lavado con la dilución pertinente del segundo anticuerpo (anticuerpo policlonal de conejo anti-HAStV-1 a una dilución 1:2,000). Incubar durante 2 h a 37 °C
8. Tres lavados con 100 µl/pocillo de solución de lavado
9. Añadir 50 µl/pocillo de solución de lavado con la dilución pertinente del anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa. Incubar durante 1.5 h a 37 °C
10. Tres lavados con 100 µl/pocillo de solución de lavado
11. Añadir 50 µl/pocillo de tampón citrato-OPD (1,2, fenilendiamine) e incubar durante 10' a 37 °C
12. Neutralizar la reacción cromogénica con 25 µl/pocillo de ácido sulfúrico 1N.
13. Lectura de la absorbancia a 492 nm con un lector automático MULTISKAN PLUS (Labsystems)

Las muestras eran consideradas positivas cuando el valor medio de absorbancia era superior al valor medio de los controles negativos más 2 veces su desviación estándar.

#### • Soluciones necesarias:

*Tampón de recubrimiento:* NaCO<sub>3</sub>.....15 mM  
NaHCO<sub>3</sub>.....35 mM  
*pH 9.6*  
*Conservar a 4 °C durante máximo 15 días*

*Solución lavado:* PBS 0.3% BSA (p/v) 0.3% Tween 20 (v/v)

*Tampón citrato:* Citrato sódico ..... 30 mM  
 Ácido cítrico ..... 20 mM  
 Conservar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

*Tampón citrato-OPD:* OPD ..... 4 mM  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) ..... 0.1% (v/v)  
 En tampón citrato  
 Uso inmediato

*Ácido sulfúrico 1N:* Mezclar 167.5 ml de agua destilada y 32.5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$

### 8.16 Tinción nuclear con DAPI

Para el análisis de la morfología nuclear por microscopía de fluorescencia (Leica DMRB FLUO), se partía de aproximadamente  $2 \times 10^6$  células CaCo-2 crecidas en placas de 60 mm. Después del tratamiento específico, las células de la monocapa se recuperaban por tratamiento con tripsina y se mezclaban con las células que había en el sobrenadante del medio de cultivo y que habían sido recuperadas por centrifugación a baja velocidad. El análisis de esta población celular seguía de la siguiente forma:

1. Centrifugar a 1,000 xg durante 10' a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
2. Lavar el *pellet* celular en 2 ml de tampón PBS por centrifugación a 1,000 xg durante 10' a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
3. Resuspender las células en 0.5 ml de solución de fijación (paraformaldehído 3%) e incubar durante 30' a RT (ver apartado 8.12)
4. Centrifugar a 1,000 xg durante 10' a RT
5. Resuspender las células en 0.5 ml de tampón PBS con 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de DAPI (Roche) e incubar durante 15' a RT
6. Lavar las células en 0.5 ml de tampón PBS, centrifugando a 600 xg durante 10' a RT
7. Eliminar el sobrenadante completamente y resuspender las células en 5  $\mu\text{l}$  de medio de montaje Fluoromont G (Southern Biotechnologies).
8. Montar la preparación en un portaobjetos de vidrio y cubrir con un cubreobjetos. Mantener a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a la oscuridad hasta su observación

### 8.17 Análisis del contenido de ADN celular

Para analizar el contenido de ADN celular de diferentes cultivos de células CaCo-2, se siguió un protocolo previamente descrito, con ligeras modificaciones (Gong *et al.*, 1994). Este análisis permite analizar la fragmentación del ADN celular que tiene lugar durante la apoptosis mediante 2 estrategias. Por un lado, se extrae el ADN de bajo peso molecular y se

analiza por electroforesis en gel de agarosa (*DNA ladder*) y por otro lado, las células se analizan por citometría de flujo para estimar si hay una reducción en su contenido de ADN celular total (técnica del pico subG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>). Para dichos experimentos, se partía de aproximadamente 2x10<sup>6</sup> células CaCo-2 crecidas sobre placas de 60 mm.

1. Recuperar las células a analizar por tripsinización
2. Centrifugar las células a 1,000 xg durante 10' a 4 °C
3. Lavar las células en 1 ml de tampón PBS y centrifugar a 1,000 xg durante 10' a 4 °C
4. Fijar las células en 9 ml de etanol 70% durante toda la noche a -20 °C
5. Centrifugar las células a 1,000 xg durante 10' a RT
6. Eliminar al máximo el etanol y resuspender las células en 40 µl de tampón fosfato-citrato
7. Incubar durante 40' a RT
8. Centrifugar a 1,000 xg durante 5' a RT y pasar el sobrenadante que contiene el ADN de bajo peso molecular a un microtubo nuevo (ver protocolo para *DNA ladder*)
9. Resuspender el *pellet* en 1 ml de tampón PBS suplementado con 0.1% de Tritón X-100, 4 µl de RNAsa libre de DNAsas 500 µg/ml (Roche) y 15 µg/ml de yoduro de propidio (PI).
10. Incubar durante 1 h a RT y analizar entre 7,000-10,000 células por citometría de flujo (citómetro Immunotech Coulter XL)

Para el análisis del *DNA ladder*, se procesaba el sobrenadante que contiene el ADN de bajo peso molecular de la siguiente manera:

1. Concentrar la muestra por centrifugación en Speed Vac (Refrigerated Concentrator Trap RT100, Savant) durante 30' a RT hasta obtener un *pellet*
2. Añadir 3 µl de NP40 0.25% (v/v) y 1 µl de RNAsa libre de DNAsas 500 µg/ml (Roche)
2. Incubar 2 h a 37 °C
  - a. Añadir 3 µl de proteinasa K 1 mg/ml (Roche)
  - b. Incubar 2 h a 37 °C
  - c. Añadir 2 µl de tampón de carga
  - d. Electroforesis del ADN en un gel de agarosa del 1.5% en TBE 1X (ver apartado 8.26)
  - e. Tinción con bromuro de etidio 0.5 µg/ml en TBE 1X y análisis del patrón de electroforesis en un transiluminador *ImageMaster® VDS* (Pharmacia Biotech)

• **Soluciones necesarias:**

*Tampón fosfato-citrato:* Mezclar 192 partes de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2M y 8 partes de ácido cítrico 0.1M pH 7.8

### 8.18 Ensayo de TUNEL

El análisis de la fragmentación del ADN celular durante la apoptosis también se realizó mediante la técnica del TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*) y la utilización de el kit *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Roche), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. A partir de cultivos de aproximadamente  $2 \times 10^6$  células CaCo-2, se seguía el protocolo siguiente:

1. Recuperar las células a analizar por tripsinización
2. Centrifugar las células a 1,000 xg durante 10' a 4 °C
3. Lavar las células en 1 ml de tampón PBS y centrifugar a 1,000 xg durante 10' a 4 °C
4. Fijar las células en 0.5 ml de paraformaldehído 3% en PBS durante 30' a RT (ver apartado 8.12)
5. Resuspender el *pellet* celular en 0.3 ml de solución de permeabilización
6. Lavar las células en 0.5 ml de PBS centrifugando a 1,000 xg durante 10' a RT (x3)
7. Resuspender el *pellet* celular en 40  $\mu\text{l}$  de solución TUNEL e incubar durante 1.5 h a 37 °C
8. Lavar las células en 0.5 ml de PBS centrifugando a 1,000 xg durante 10' a RT (x3)
9. Resuspender las células en 0.5 ml de PBS y analizar entre 7,000-10,000 células por citometría de flujo (citómetro Immunotech Coulter XL)

• **Soluciones necesarias:**

*Solución permeabilización:* PBS 0.1% citrato sódico (p/v) 0.1% Tritón X-100 (v/v)

### 8.19 Análisis de doble marcaje por citometría de flujo

Para analizar una población celular por citometría de flujo mediante un doble marcaje, se partía de cultivos de  $2 \times 10^6$  células CaCo-2 y se realizaba un marcaje por inmunofluorescencia en suspensión con un anticuerpo específico contra un antígeno vírico, seguido de un marcaje de apoptosis mediante el kit *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Roche).

1. Recuperar las células a analizar por tripsinización
2. Centrifugar las células a 1,000 xg durante 10' a 4 °C

3. Lavar las células en 1 ml de tampón PBS y centrifugar a 1,000 xg durante 10' a 4 °C
4. Fijar las células en 0.5 ml de paraformaldehído 3% en PBS durante 30' a RT (ver apartado 8.12)
5. Resuspender el *pellet* celular en 0.3 ml de solución de permeabilización e incubar durante 15' a RT
6. Lavar las células en 0.5 ml de PBS centrifugando a 1,000 xg durante 10' a RT (x3)
7. Resuspender el *pellet* celular en 0.5 ml de solución de bloqueo e incubar durante 30' a RT
8. Centrifugar las células a 1,000 xg durante 10' a RT
9. Resuspender el *pellet* celular en 50 µl de solución de bloqueo con la dilución correspondiente del anticuerpo primario. Incubar durante 1 h a RT
10. Lavar las células en 0.5 ml de PBS centrifugando a 1,000 xg durante 10' a RT (x3)
11. Resuspender el *pellet* celular en 50 µl de solución de bloqueo con la dilución correspondiente del anticuerpo secundario marcado con fluorocromo. Incubar durante 1 h a RT en la oscuridad
12. Lavar las células en 0.5 ml de PBS centrifugando a 1,000 xg durante 10' a RT (x3)
13. Resuspender el *pellet* celular en 40 µl de solución TUNEL e incubar durante 1.5 h a 37 °C
14. Lavar las células en 0.5 ml de PBS centrifugando a 1,000 xg durante 10' a RT (x3)
15. Resuspender las células en 0.5 ml de PBS y analizar entre 7,000-10,000 células por citometría de flujo (citómetro Immunotech Coulter XL)

• **Soluciones necesarias:**

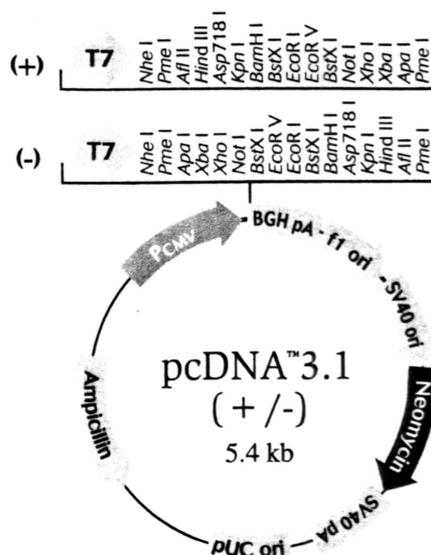
*Solución permeabilización:* PBS 0.1% citrato sódico (p/v) 0.1% Tritón X-100 (v/v)

*Solución bloqueo:* PBS 3% BSA (p/v) 0.1% Tween 20 (v/v)

## 8.20 Obtención de plásmidos recombinantes

Para la construcción de plásmidos recombinantes, se siguieron protocolos habituales de clonaje molecular (Sambrook *et al.*, 1989) y se utilizó el vector pcDNA3.1(+) (Invitrogen), el cual contiene un promotor de citomegalovirus para la expresión de las proteínas clonadas en células eucariotas (Fig. 8.1).

En primer lugar, se amplificó por PCR cada uno de los ORFs a clonar con oligonucleótidos que tenían dianas para las enzimas de restricción *NotI* y *XhoI*. Para estas reacciones de PCR, se utilizó como molde el plásmido pAVIC6 que incorpora el cDNA completo del genoma de astrovirus, construido por Geigenmüller y col. (1997) y que nos fue cedido gentilmente por la Dra. S. Matsui de Stanford University (USA).



**Fig. 8.1** Esquema del plásmido pcDNA3.1 utilizado como vector de expresión en los experimentos de expresión transitoria de distintos ORFs de astrovirus.

Una vez obtenidos los fragmentos a clonar, se digirieron al igual que el plásmido pcDNA3.1(+) con las mismas enzimas y se incubó la reacción de ligación durante toda la noche a 16 °C, siguiendo las siguientes proporciones:

Tampón de ligación 10X.....	1µl
pcDNA3.1.....	50-200 ng
Fragmento.....	100-500 ng
Ligasa T4 (1 U/µl).....	1 µl
H <sub>2</sub> O.....	hasta un volumen final de 10 µl

Posteriormente, se transformaron células competentes *Library Efficiency DH5α Competent Cells* (Life Technologies) con 1 µl de la mezcla de ligación, por tratamiento térmico y se seleccionaron las colonias transformadas en placas de agar con ampicilina 25 µg/ml. Se confirmó la presencia del fragmento clonado por mapaje con enzimas de restricción y posterior secuenciación con el oligonucleótido pcDNA y oligonucleótidos específicos de cada uno de los ORFs.

## 8.21 Purificación del ADN plasmídico a gran escala

Para la obtención de ADN plasmídico a gran escala previa a la electroporación se realizó una extracción mediante lisis alcalina a partir de cultivos de 200 ml de células bacterianas crecidas en medio LB 100 µg/ml de ampicilina, tal como se detalla a continuación:

1. Centrifugar el cultivo a 4,000 xg durante 10' a 4 °C
2. Lavar el *pellet* celular en 100 ml de tampón STE frío y centrifugar la suspensión a 4,000 xg durante 10' a 4 °C
3. Resuspender el *pellet* en 4 ml de Solución I y 0.4 ml de tampón TE con 10 mg/ml de lisozima (50U/μg, Roche)
4. Añadir 8 ml de Solución II e incubar durante 10' a RT
5. Añadir 6 ml de Solución III fría e incubar durante 10' en hielo
6. Centrifugar a 12,000 xg durante 10' a 4 °C
7. Recuperar el sobrenadante y añadir 0.6 volúmenes de isopropanol. Incubar durante 30' a RT
8. Centrifugar a 17,000 xg durante 10' a RT
9. Lavar el *pellet* por difusión con etanol al 70% (v/v)
10. Dejar secar el *pellet* a 37 °C durante 4 h aproximadamente
11. Resuspender el *pellet* en 1 ml de tampón TE con 4 μl de RNAsa libre de DNAsa 500 μg/ml (Roche). Incubar durante 1 h a 37 °C
12. Añadir 0.5 ml de LiCl 5M e incubar 15' a -20 °C
13. Centrifugar a 10,000 xg durante 5' a 4 °C. Recuperar el sobrenadante
14. Repartir en microtubos a razón de 0.5 ml y añadir 1/10 volúmenes de solución III y 2 volúmenes de etanol 100% frío
15. Incubar toda la noche a -20 °C
16. Centrifugar a 10,000 xg durante 10' a 4 °C
17. Lavar el *pellet* con 0.5 ml de etanol al 70% (v/v) centrifugando 5' a 10,000 xg
18. Secar el *pellet* por centrifugación en Speed Vac (Refrigerated Concentrator Trap RT100, Savant) durante 10' a RT
19. Resuspender el ADN en 600 μl de tampón TE

Finalizado el proceso de extracción, se calculaba la concentración y el grado de pureza del ADN plasmídico por espectrofotometría a densidades ópticas de A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, según las siguientes equivalencias:

- 1 unidad de A<sub>260</sub> = 50 μg/ml de ADN de doble cadena
- ADN puro: A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ≥ 1.8

• **Soluciones necesarias:**

*Medio LB:*

Peptona.....	10 g/l
Extracto de levadura.....	5 g/l
NaCl.....	10 g/l

*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a 4 °C*

*Medio LB Agar:* Peptona..... 10 g/l  
 Extracto de levadura..... 5 g/l  
 NaCl..... 10 g/l  
 Agar..... 15 g/l  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Preparar las placas de Petri y dejar solidificar*  
*Conservar a 4 °C*

*Ampicilina 25 mg/ml:* Disolver 0.25 g de ampicilina en 10 ml de agua bidestilada  
*Esterilizar por filtración 0.22 µm*  
*Conservar a -20 °C*

*Solución I:* Glucosa..... 50 mM  
 Tris-HCl..... 25 mM  
 EDTA..... 10 mM  
*pH 8.0*  
*Esterilizar por filtración 0.22 µm*  
*Conservar a 4 °C*

*Solución II:* NaOH..... 0.2 N  
 SDS..... 1 % (p/v)  
*Uso inmediato*

*Solución III:* Acetato sódico..... 3M  
 Ácido acético..... 10% (v/v)  
*pH 4.8 Ajustar con ácido acético glacial*  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a RT*

*Tampón STE:* Tris-HCl..... 10 mM  
 NaCl..... 100 mM  
 EDTA..... 1 mM  
*pH 8.0*  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a 4 °C*

*Tampón TE:* Tris-HCl..... 10 mM  
 EDTA..... 1 mM  
*pH 8.0*  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a RT*

## 8.22 Transfección celular por electroporación

Después de ensayar varios sistemas de transfección sobre células CaCo-2, se vio que la electroporación era el sistema que proporcionaba un porcentaje de células transfectadas más elevado. Entre los otros sistemas analizados, se encuentran varios reactivos comerciales como el DOTAP Liposomal Transfection Reagent (Roche), Fugene™ 6 Transfection Reagent (Roche), Lipofectamine2000 (Invitrogen) o CellFectin (Invitrogen); otros sistemas no comerciales como la precipitación con CaCl<sub>2</sub> o la utilización de DEAE dextrano. No obstante, con ninguno de estos métodos se consiguieron resultados satisfactorios sobre la línea celular CaCo-2, la resistencia de la cual a la transfección es conocida también por otros autores (Geigenmüller *et al.*, 1997).

Para los experimentos de electroporación, se partía de células CaCo-2 crecidas sobre frascos T-175. El día de la electroporación, las placas debían estar entre el 60-80% de confluencia. El electroporador utilizado fue un *Electro Cell Manipulator 600* (BTX) y se utilizaron cubetas de 0.2 cm de abertura con un volumen final de 0.5 ml. El protocolo a seguir para la electroporación, se detalla a continuación:

1. Tripsinizar las células y resuspenderlas en 0.5 ml de tampón HeBS
2. Realizar un conteo del número de células por ml mediante una cámara de Neubauer
3. En cada cubeta de electroporación añadir aproximadamente  $1 \times 10^6$  células y 200 µg de plásmido. Añadir tampón HeBs hasta un volumen final de 0.5 ml. Mantener la cubeta en hielo hasta el momento de la electroporación
4. Electroporar a 280 V y capacitancia de 500 µF. Colocar la cubeta inmediatamente en hielo
5. Resuspender las células en medio de crecimiento completo y sembrarlas en placas de 24 pocillos con cubreobjetos de vidrio estériles a razón de 1 ml por pocillo
6. Incubar las células a 37 °C durante 72 h para obtener niveles máximos de expresión proteica

### • Soluciones necesarias:

*Tampón HeBS:*

Hepes .....	20 mM
NaCl.....	137 mM
KCl.....	5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.7 mM
Dextrosa .....	6 mM

*pH 7.05*  
*Esterilizar por filtración 0.22 µm*  
*Conservar a 4 °C*

### 8.23 Extracción ARN

Para la extracción de ARN es importante trabajar en un ambiente libre de RNAsas y utilizar guantes. El protocolo utilizado ha sido previamente descrito por Boom y col. (1990). La temperatura de conservación del ARN purificado era de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

1. Mezclar en un microtubo 900  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis L6, 40  $\mu\text{l}$  de  $\text{SiO}_2$  y 50  $\mu\text{l}$  de la muestra
2. Mixotubar e incubar 10' a RT
3. Centrifugar a 10,000 xg durante 15"
4. Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 800  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis L2
5. Mixotubar y centrifugar a 10,000 xg durante 15"
6. Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 800  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis L2
7. Mixotubar y centrifugar a 10,000 xg durante 15"
8. Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 800  $\mu\text{l}$  de etanol 70%
9. Mixotubar y centrifugar a 10,000 xg durante 15"
10. Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 800  $\mu\text{l}$  de etanol 70%
11. Mixotubar y centrifugar a 10,000 xg durante 15"
12. Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 800  $\mu\text{l}$  de acetona 100%
13. Mixotubar y centrifugar a 10,000 xg durante 15"
14. Descartar el sobrenadante y secar el *pellet* 10' en una placa calefactora a  $56^{\circ}\text{C}$  manteniendo la tapa del microtubo abierta
15. Añadir 55  $\mu\text{l}$  de tampón de elución TE
16. Mixotubar e incubar 10' en la placa calefactora a  $56^{\circ}\text{C}$  manteniendo la tapa del microtubo cerrada
17. Centrifugar a 10,000 xg durante 5'
18. Recuperar el sobrenadante cuidadosamente

● **Soluciones necesarias:**

*Tampón Tris-HCl 0.1 M:* Disolver 12.11 g de Tris-HCl en 1 l de agua bidestilada  
 pH 6.4  
*Esterilizar por autoclave 45'*  
*Conservar a RT*

*Solución EDTA 0.2 M:* Disolver 7.44 g de EDTA-2 H<sub>2</sub>O (Tritiplex III) en 100 ml de agua bidestilada  
 pH 8.0  
*Esterilizar por autoclave 45'*  
*Conservar a RT*

**Tampón Lisis L2:** Disolver 120 g de tiocianato de guanidina (GuTCN) en 100 ml de tampón Tris-HCl 0.1 M, en un baño a 65 °C  
*Conservar a RT protegido de la luz*

**Tampón Lisis L6:** Añadir 11 ml de EDTA 0.2 M pH 8.0 y 1.22 ml de Tritón X-100 a 100 ml de Tampón Lisis L2  
*Conservar a RT protegido de la luz*

**Solución SiO<sub>2</sub>:** Disolver 60 g de SiO<sub>2</sub> en 500 ml de agua bidestilada. Dejar sedimentar durante 24 h a RT. Descartar 430 ml del sobrenadante y resuspender el sedimento en 500 ml de agua bidestilada. Dejar sedimentar durante 5 h a RT. Descartar 450 ml del sobrenadante y añadir 0.6 ml de HCl 32%.  
*Conservar a RT protegido de la luz*

**Etanol 70%:** Mezclar 70 ml etanol 100% con 30 ml de agua bidestilada previamente autoclavada durante 45'.  
*Conservar a RT*

**Tampón Elución TE:** Tris-HCl..... 10 mM  
EDTA..... 1 mM  
pH 8.0  
*Esterlizar por autoclave 45'*  
*Conservar a RT*

## 8.24 RT-PCR

Durante todo el estudio, las reacciones de RT-PCR fueron realizadas maximizando las precauciones para evitar problemas de contaminación.

Las enzimas utilizadas fueron la *Expand Reverse Transcriptase* (Roche), la cual es una versión modificada de la transcriptasa reversa del *Moloney Murine Leukaemia Virus* (M-MuLV-RT), en la cual se ha mutado su actividad RNasa H, y la *Expand High Fidelity PCR System* (Roche), la cual consiste en una mezcla de *Taq* polimerasa y *Pwo* polimerasa.

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

1. Desnaturalizar 5 µl de la muestra durante 5' a 99 °C y colocar en hielo inmediatamente
2. Preparar en un tubo la mezcla de reacción RT para el número de muestras deseado, manteniendo las siguientes proporciones para una muestra:

Tampón Expand RT 5X.....	2 µl
DTT (100 mM).....	1 µl
dNTP (2 mM).....	1 µl
Oligonucleótido específico - (100 µM) .....	0.2 µl
H <sub>2</sub> O .....	0.6 µl
Inhibidor de ribonucleasas RNAsin® (30 U/µl) .....	0.1 µl
Expand RT (50 U/µl) .....	0.1 µl

- Añadir 5 µl de la mezcla de reacción e incubar durante 60' a 42 °C. Colocar en hielo inmediatamente
- Preparar en un tubo la mezcla de reacción de PCR para el número de muestras deseado, manteniendo las siguientes proporciones para una muestra:

Tampón Expand HiFi 10X.....	5 µl
dNTP (2 mM).....	5 µl
Oligonucleótido específico + (100 µM).....	0.5 µl
Oligonucleótido específico - (100 µM).....	0.5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM).....	4 µl* (2 mM)
H <sub>2</sub> O .....	24.85 µl
Expand HiFi (3.5 U/µl) .....	0.15 µl

\* La concentración de MgCl<sub>2</sub> varía en función de la RT-PCR

- Añadir 40 µl de la mezcla de reacción PCR a cada tubo que contiene los 10 µl del producto de la RT
- Realizar el programa específico de PCR y analizar el resultado por electroforesis en gel de agarosa

### 8.25 Oligonucleótidos

En la Tabla 8.1 se muestra una lista de los oligonucleótidos utilizados en distintas aplicaciones a lo largo de este trabajo. En el Estudio I se utilizaron los oligonucleótidos A1, A1-F, A1-C, A2 y A2-C para la titulación específica de las cadenas de ARN asociadas a membranas de células infectadas por RT-PCR, así como también los oligonucleótidos A4673 y A4844. Los oligonucleótidos A1739 y RFS fueron utilizados para obtener la secuencia completa de la proteína nsP1a/4 de distintas cepas de astrovirus.

En los Estudios II y III se utilizaron los oligonucleótidos A1, A2, A1bis y A2 bis para la detección molecular de astrovirus, así como también la sonda HAstV. Los oligonucleótidos Mon244 y Mon245 fueron utilizados para el serotipado de las muestras positivas, por

secuenciación de una región del extremo N-terminal de la cápside (Noel *et al.*, 1995). Ambos pares de oligonucleótidos fueron utilizados también en los otros estudios.

En el Estudio IV se utilizaron los oligonucleótidos pcDNA, pcORF1a-*NotI*, pcORF1a-*XhoI*, pcORF2-*NotI* y pcORF2-*XhoI* para clonar los distintos ORFs en el vector de expresión eucariota pcDNA3.1(+).

**Tabla 8.1** Oligonucleótidos utilizados a lo largo de la tesis.

Región	Nomenclatura	Sentido	Secuencia	Posición <sup>1</sup>
ORF1a	A1	+	5'-CCTGCCCCGAGAACAACCAAGC-3'	2363-2384
HVR	A2	-	5'-GTAAGATTCCCAGATTGGTGC-3'	2534-2554
	A1bis	+	5'-CCTGCCCCCGTATAATTAAC-3'	2363-2384
	A2bis	-	5'-ATAGGACTCCCATATAGGTGC-3'	2534-2554
	Sonda uniHAstV	-	5'DIG-CCRTARGTYTGTGARTATGG-3'	2510-2529
	A1-A	+	5'-CCTGCCCCTCGGACAATCAAAC-3'	2363-2384
	A1-F	+	5'-CCTGCCCCGAGAACAACCAAT-3'	2363-2384
	A1-C	+	5'-CCTGCCCCGAGAACAATCAAGC-3'	2363-2384
	A2-C	-	5'-ATAAGATTCCCAGATTGGCGC-3'	2534-2554
ORF1a	A1739	+	5'-GGTGCACCAGTTTGTGACA-3'	1739-1758
nsP1a/4	RFS	-	5'-TCTGGGGCCCTTTGTAGTTT-3'	2797-2816
ORF2	Mon244	+	5'-GGTGTACAGGACCAAAACC-3'	4544-4563
N-term	Mon245	-	5'-TTAGTGAGCCACCAGCCATC-3'	4937-4955
	A4673	+	5'-GCTACTGGGAGTACTCACTTTG-3'	4673-4695
	A4844	-	5'-GCACCAAGCCCAGACCA-3'	4844-4861
pcDNA	pcDNA	+	5'-TGGTACCGAGCTCCGGAT-3'	-
ORF1a	pcORF1a- <i>NotI</i>	+	5'-ATAGCGGCCGCAACAAGATGGCA-3' <sup>2</sup>	69-91
	pcORF1a- <i>XhoI</i>	-	5'-TCCCTCGAGCTAATGAGTGGTAA-3' <sup>2</sup>	2835-2857
ORF2	pcORF2- <i>NotI</i>	+	5'-AGGGCGGCCGCAAAGAAGTGTGATC-3' <sup>2</sup>	4306-4330
	pcORF2- <i>XhoI</i>	-	5'-CCCCTCGAGCTACTCGGCGTGGC-3' <sup>2</sup>	6678-6700

<sup>1</sup>Posición de nucleótidos referentes a la secuencia del genoma completo de la cepa HAstV-1 de referencia de Oxford (Núm. Acceso L23513). DIG= Digoxigenina; R= A+G; Y= C+T.

<sup>2</sup>Los nucleótidos subrayados indican la secuencia de la diana para la enzima de restricción.

## 8.26 Electroforesis en gel de agarosa

Los geles de agarosa se preparaban utilizando *SeaKem® LE agarose* (Cambrex) en tampón TBE 1X a la concentración deseada (entre 0.8% y 2.5%). Normalmente, en cada pocillo se analizaban 10 µl de muestra mezclados con 2 µl de tampón de carga 6X. La electroforesis se realizaba a una velocidad constante de 70 V. Posteriormente, los geles eran teñidos en una cubeta con tampón TBE 1X y bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml durante media hora. La fotografía del gel se realizaba utilizando un transiluminador *ImageMaster® VDS* (Pharmacia Biotech).

• **Soluciones necesarias:**

*Tampón TBE 10X:* Tris-HCl.....108 g/l  
 Ácido bórico.....55 g/l  
 EDTA.....0.05 M  
 pH 8.0  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a RT*

*Tampón carga 6X:* Glicerol.....30% (v/v)  
 Azul de bromofenol.....0.25% (p/v)  
*Conservar a 4 °C*

*Bromuro de etidio 10 mg/ml:* Disolver 0.1 g de bromuro de etidio en 10 ml de agua destilada  
*Conservar a RT protegido de la luz*

### 8.27 **Southern blotting e hibridación molecular**

Una vez realizada la electroforesis en gel de agarosa, en un transiluminador de luz UV se recortaba el fragmento de gel a analizar y se proseguía a realizar la transferencia del ADN a una membrana de Nylon cargada positivamente (Roche), en una cubeta de electroforesis *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad):

1. Incubar el fragmento de gel de agarosa en NaOH 150 mM durante 15' en hielo con el fin de desnaturalizar el ADN
2. Incubar el gel de agarosa en TBE 0.5X durante 15' en hielo
3. Equilibrar la membrana de Nylon durante 5' en TBE 0.5X
4. Montar el *cassette* de la cubeta de electroforesis, manteniendo el orden siguiente:
  - electrodo negativo
  - papel de filtro (x3)
  - gel de agarosa
  - membrana de Nylon
  - papel de filtro (x3)
  - electrodo positivo
5. Colocar el *cassette* en la cubeta junto con el acumulador de hielo y rellenarla con tampón TBE 0.5X
6. Electroforesis a 60 V durante 60', en agitación
7. Fijar el ADN a la membrana por iluminación con rayos UV durante 3'
8. Fijar el ADN a la membrana en un horno de vacío a 120 °C durante 15'. La membrana puede guardarse a 4 °C hasta su posterior utilización

9. Prehibridación: Incubar la membrana en solución standard en una bolsa de hibridación sellada durante toda la noche en un baño a 42 °C (20 ml de solución standard por cada 100 cm<sup>2</sup> de membrana)
10. Hibridación: Pasar la membrana a una bolsa de hibridación nueva con solución standard a la que se le ha añadido la sonda uniHAstV (ver Tabla 8.1) a una concentración final de 5 pmol/ml. Incubar durante 3 h a 42 °C (20 ml de solución standard por cada 100 cm<sup>2</sup> de membrana)
11. Incubar la membrana 1' a RT en Tampón 2X SSC
12. Incubar la membrana 15' a RT en agitación en Tampón 2X SSC 0.1% SDS
13. Incubar la membrana 15' a RT en agitación en Tampón 0.5X SSC 0.1% SDS
14. Incubar la membrana durante 1' en Tampón I
15. Bloqueo de la membrana en solución de bloqueo durante 30' a RT en agitación
16. Incubar la membrana en solución de bloqueo a la que se le añade el anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments, Roche) a una dilución 1:20,000 durante 30' a RT
17. Dos lavados de 15' a RT de la membrana en Tampón I suplementado con 0.3% de Tween-20
18. Incubar la membrana en tampón fosfatasa durante 5' a RT
19. Colocar la membrana sobre un plástico y añadir sobre ella tampón fosfatasa con el sustrato quimioluminiscente CSPD® (Roche) a una dilución 1:100. Tapar con plástico y proteger de la luz. Incubar 5' a RT.
20. Sellar los dos plásticos e incubar la membrana protegida de la luz durante 15' a 37 °C
21. Colocar un film de rayos X y la membrana dentro de un *cassette* y realizar una exposición durante 1 h a RT
22. Revelar el film

• **Soluciones necesarias:**

*TBE 0.5X:* Dilución 1:20 de TBE 10X en agua bidestilada

*NaOH 150 mM:* Disolver 3 g de NaOH en 0.5 l de agua destilada

*Tampón SSC 20X:* NaCl ..... 3 M  
Citrato trisódico ..... 0.3 M  
*pH 7.0*  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a 4 °C*

*Solución standard:* Tampón SSC 20X..... 25 ml  
 SDS 10%..... 0.2 ml  
 Blocking Reagent (Roche)..... 1 g  
 N-laurosilsarcosina..... 0.1 g  
 H<sub>2</sub>O bidestilada..... 75 ml  
*Conservar a -20 °C*

*Tampón I:* NaCl..... 150 mM  
 Ácido maleico ..... 100 mM  
 Tween-20..... 0.3% (v/v)  
*pH 7.5*  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a 4 °C*

*Solución de bloqueo:* Disolver 5 g de *Blocking Reagent* (Roche) en 0.5 l de Tampón I  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a 4 °C*

*Tampón fosfatasa:* Tris-HCl..... 100 mM  
 NaCl..... 100 mM  
*pH 9.5*  
*Esterilizar por autoclave 15'*  
*Conservar a 4 °C*

## 8.28 Análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Una vez confirmado por técnicas de hibridación molecular que las muestras eran positivas para astrovirus después de RT-PCR, se procedía a su posterior análisis por RFLP. El producto de ADN obtenido en la RT-PCR se purificaba utilizando el *kit High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La concentración del ADN purificado se estimaba después de realizar una electroforesis en gel de agarosa, comparando la intensidad de la banda a digerir con el marcador de pesos moleculares. Entre 200-500 ng de ADN se digerían durante toda la noche a 37 °C con la enzima de restricción *DdeI* (Roche), mezclando en un tubo los siguientes componentes:

Tampón universal H 10X..... 2 µl  
 ADN..... 200-500 ng  
*DdeI* (10 U/µl) ..... 0.1 µl  
 H<sub>2</sub>O ..... hasta 20 µl

El resultado de la digestión se analizaba mediante un gel de acrilamida del 8% en tampón TBE 1X. Para estos geles de tamaño 14 cm x 24 cm x 1.5 mm, se utilizaba una cubeta de electroforesis vertical *Hoeffer SE 400 Series* (Amersham Pharmacia Biotech). Para hacer el gel, se mezclaban los siguientes componentes y se dejaba polimerizar a RT durante aproximadamente 1 h:

Acrilamida 30% .....	10.6 ml
TBE 10X.....	4 ml
H <sub>2</sub> O.....	25 ml
APS 10%.....	280 µl
TEMED.....	15 µl

Después de mezclar los 20 µl del producto de digestión con 4 µl de tampón de carga 6X, se cargaba el gel y se realizaba la electroforesis durante 6-7 h a 100 V. Una vez finalizada, el gel se teñía durante 20' en TBE 1X con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio y se fotografiaba en un *ImageMaster® VDS* (Pharmacia Biotech). El número y tamaño de los fragmentos resultantes de la digestión se determinaron por comparación con los marcadores de peso molecular pBR322/*HaeIII*, φX174/*HaeIII* (Roche) y φX174/*HinfI* (Promega).

## 8.29 Secuenciación

La secuenciación de los productos de ADN obtenidos por RT-PCR o PCR se realizaba después de purificar el ADN mediante el *kit High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Tras comprobar mediante una electroforesis en gel de agarosa el resultado de la purificación, se proseguía a realizar la reacción de secuenciación. Para cada reacción de secuenciación, se utilizaba el *kit ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0* (PE Biosystems). El análisis de la secuencia mediante el secuenciador automático se realizaba en la *Unitat de Genòmica dels Serveis Científicotècnics* de la UB. El protocolo se detalla a continuación:

### 1. Preparar en un tubo la mezcla de reacción:

Terminator Ready Reaction mix.....	2 µl
Oligonucleótido específico (5 µM).....	0.64 µl
ADN de doble cadena purificado.....	200-500 ng
H <sub>2</sub> O.....	hasta 10 µl

- Realizar el programa de secuenciación durante 25 ciclos, 10'' a 96 °C, 5'' a 50 °C, 4' a 60 °C. Guardar el producto a 4 °C hasta su purificación
- Purificación del producto de extensión por precipitación con etanol:

- i. Mezclar los 10 µl del producto de secuenciación con 64 µl de etanol 95% y 26 µl de agua
  - ii. Mixotubar y dejar precipitar durante 20' a RT
  - iii. Centrifugar a 10,000 xg durante 15'
  - iv. Descartar el sobrenadante al máximo y lavar con 200 µl de etanol 70%
  - v. Centrifugar a 10,000 xg durante 5'
  - vi. Descartar el sobrenadante al máximo y dejar secar el *pellet* a RT
4. Análisis de la muestra en un secuenciador automático del modelo ABI Prism 3700 (PE Biosystems)
  5. Análisis del resultado de la secuenciación mediante el programa Chromas

### 8.30 Números de acceso *Genbank*

Las diferentes secuencias de astrovirus obtenidas durante la realización de esta tesis doctoral fueron sometidas al *Genbank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), bajo los números de acceso siguientes:

- AF348753 al AF348801: Secuencias obtenidas durante el Estudio III, correspondientes a la secuencia de 348 pb de la región del ORF2 de astrovirus, utilizada para serotipar las muestras.
- AY257977: Secuencia obtenida durante el Estudio IV, correspondiente a la región de la proteína nsP1a/4 de la cepa de HAsV-4 adaptada a cultivo celular (p23795).

### 8.31 Análisis computacionales

En la Tabla 8.2 se enumeran los programas bioinformáticos utilizados en los análisis proteómicos y filogenéticos.

### 8.32 Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos, se utilizó el programa Statgraphics.

**Tabla 8.2** Programas bioinformáticos utilizados a lo largo de la tesis y otras páginas web de interés.

Software	Dirección Internet	Referencia	Aplicación
BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>	Altschul <i>et al.</i> , 1990	Búsqueda homologías bases de datos
Chromas	<a href="http://www.basic.nwu.edu/biotools/Chromas.html">http://www.basic.nwu.edu/biotools/Chromas.html</a>		Edición secuencias
Clustal W	<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</a>	Higgins <i>et al.</i> , 1994	Alineamiento secuencias
Coils 2.2	<a href="http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html</a>	Lupas, 1996	Análisis presencia <i>coiled coils</i>
Compute pI/Mw Tool	<a href="http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html">http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html</a>	Bjellqvist <i>et al.</i> , 1993	Cálculo peso molecular proteínas
DNA SP	<a href="http://www.bio.ub.es/~julio/UpdateDnaSP.html">http://www.bio.ub.es/~julio/UpdateDnaSP.html</a>	Rozas & Rozas, 1999	Análisis filogenético
MEGA 2	<a href="http://www.megasoftware.net/">http://www.megasoftware.net/</a>	Kumar <i>et al.</i> , 1993	Análisis filogenético
NetPhos 2.0	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/</a>	Blom <i>et al.</i> , 1999	Análisis fosforilación proteínas
Network Protein Server Analysis	<a href="http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_seccons.html">http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_seccons.html</a>	Combet <i>et al.</i> , 2000	Análisis estructura secundaria proteínas
PredictProtein	<a href="http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein">http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein</a>		Análisis estructura secundaria proteínas y presencia de motivos PROSITE database
ProtScale	<a href="http://us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl">http://us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl</a>	Hopp & Woods, 1981	Análisis hidrofobicidad proteínas
SAPS	<a href="http://www.ebi.ac.uk/saps/">http://www.ebi.ac.uk/saps/</a>	Brendel <i>et al.</i> , 1992	Análisis estadístico secuencias aa
TreeView	<a href="http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html">http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html</a>		Visualización árboles filogenéticos
3D-PSSM v2.6.0	<a href="http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/">http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/</a>	Kelley <i>et al.</i> , 2000	Búsqueda homologías bases de datos
Página Web		Dirección Internet	
ICTVdB (Universal Virus Database of the International Committee on the Taxonomy of Viruses)		<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm</a>	
Astrovirus Homepage (Institute of Animal Health)		<a href="http://www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/Astroviridae/">http://www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/Astroviridae/</a>	
The Big Picture Book of Viruses		<a href="http://www.virology.net/Big_Virology/BVRNAastro.html#genusastro">http://www.virology.net/Big_Virology/BVRNAastro.html#genusastro</a>	

### 8.33 Anticuerpos

En la Tabla 8.3 se enumeran los anticuerpos comerciales y cedidos por diferentes laboratorios que han sido utilizados en los diferentes estudios, así como su aplicación y la dilución de trabajo correspondiente.

**Tabla 8.3** Anticuerpos utilizados a lo largo de esta tesis.

Anticuerpo	Aplicación	Casa comercial	Dilución
Anti-Mouse IgG (H+L)- Cy <sup>TM</sup> 3	IF	Amersham Pharmacia Biotech	1:5,000
Anti-Mouse IgG (H+L)- Cy <sup>TM</sup> 5	IF	Amersham Pharmacia Biotech	1:100
Anti-Mouse IgG (H+L)-FITC	IF	Sigma	1:500
Anti-Rabbit IgG (H+L)-FITC	IF	Roche	1:500
Anti-Mouse IgG-AP	WB	Beckton Dickinson	1:1,000
Anti-Rabbit IgG (H+L)- AP	WB	Sigma	1:2,000
Anti-Rabbit IgG-Peroxidase	EIA	Roche	1:5,000
Anti-Digoxigenin Fab Fragments-AP	Detección ADN	Roche	1:20,000
Anti-Mouse IgG-Au 10 nm	IEM	Sigma	1:25
MAb Anti-Citocromo c	WB	Beckton Dickinson Pharmingen	1:100
Rabbit Anti-Human Caspase-8	WB	Beckton Dickinson Pharmingen	1:1,000
MAb 8E7	IF, EIA	J. E. Herrmann, Univ. of Massachusetts (USA)	1:10,000
Rabbit Anti-HAstV-1	IF, EIA	D. M. Bass, Stanford University (USA)	1:2,000

Cy: cianina; FITC: fluoresceína; AP: fosfatasa alcalina; Au: oro; H+L: cadenas pesadas y ligeras; IF:

Inmunofluorescencia; WB: western blotting; EIA: ensayo inmunoenzimático; IEM: inmunoelectromicroscopía



## **9. BIBLIOGRAFÍA**



---

## Bibliografía

### A

---

**Abad, F. X., R. M. Pintó, C. Villena, R. Gajardo, & A. Bosch.** 1997. Astrovirus survival in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3119-3122.

**Abad, F. X., C. Villena, S. Guix, S. Caballero, R. M. Pintó, & A. Bosch.** 2001. Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:3904-3907.

**Ahlquist, P., A. O. Noueir, W. M. Lee, D. B. Kushner, & B. T. Dye.** 2003. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J. Virol.* 77:8181-8186.

**Al-Molawi, N., V. A. Beardmore, M. J. Carter, G. E. N. Kass, & L. O. Roberts.** 2003. Caspase-mediated cleavage of the feline calicivirus capsid protein. *J. Gen. Virol.* 84:1237-1244.

**Alonso, C., J. M. Oviedo, J. M. Martin-Alonso, E. Diaz, J. A. Boga, & F. Parra.** 1998. Programmed cell death in the pathogenesis of rabbit hemorrhagic disease. *Arch. Virol.* 143:321-332.

**Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, & D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

**Ammendolia, M. G., A. Tinari, A. Calcabrini, & F. Superti.** 1999. Poliovirus infection induces apoptosis in CaCo-2 cells. *J. Med. Virol.* 59:122-129.

**An, S., C. Chen, X. Yu, J. L. Leibowitz, & S. Makino.** 1999. Induction of apoptosis in murine coronavirus-infected cultured cells and demonstration of E protein as an apoptosis inducer. *J. Virol.* 73:7853-7859.

**Appleton, H. & P. G. Higgins.** 1975. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet* 1:1297.

**Arnold, J. J. & C. E. Cameron.** 1999. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) is sufficient for template switching in vitro. *J. Biol. Chem.* 274:2706-2716.

**Aroonprasert, D., J. A. Fagerland, N. E. Kelso, S. Zheng, & G. N. Woode.** 1989. Cultivation and partial characterization of bovine astrovirus. *Vet. Microbiol.* 19:113-125.

## B

---

**Barco, A., E. Feduchi, & L. Carrasco.** 2000. Poliovirus protease 3Cpro kills cells by apoptosis. *Virology.* 266:352-360.

**Bass, D. M. & S. Qiu.** 2000. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. *J. Virol.* 74:1810-1814.

**Bass, D. M. & U. Upadhyayula.** 1997. Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. *J. Virol.* 71:8666-8671.

**Belliot, G., R. L. Fankhauser, & S. S. Monroe.** 2001. Characterization of “Norwalk-like viruses” and astroviruses by liquid hybridization assay. *J. Virol. Methods* 91:119-130.

**Belliot, G., H. Laveran, & S. S. Monroe.** 1997a. Capsid protein composition of reference strains and wild isolates of human astroviruses. *Virus Res.* 49:49-57.

**Belliot, G., H. Laveran, & S. S. Monroe.** 1997b. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *J. Med. Virol.* 51:101-106.

**Belliot, G., H. Laveran, & S. S. Monroe.** 1997c. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch. Virol.* 142:1323-1334.

**Bitzer, M., S. Armeanu, F. Prinz, G. Ungerechts, W. Wybranietz, M. Spiegel, C. Bernlöhner, F. Cecconi, M. Gregor, W. J. Neubert, K. Schulze-Osthoff, & U. M. Lauer.** 2002. Caspase-8 and Apaf-1-independent caspase-9 activation in Sendai virus-infected cells. *J. Biol. Chem.* 277:29817-29824.

**Bjellqvist, B., G. J. Hughes, Ch. Pasquali, N. Paquet, F. Ravier, J.-Ch. Sanchez, S. Frutiger, & D. F. Hochstrasser.** 1993. The focusing positions of polypeptides in

immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14:1023-1031.

**Björkholm, M., F. Celsing, G. Runarsson, & J. Waldenström.** 1995. Successful intravenous immunoglobulin therapy for severe and persistent astrovirus gastroenteritis after fludarabine treatment in a patient with Waldenström's macroglobulinemia. *Int. J. Hematol.* 62:117-120.

**Blom, N., S. Gammeltoft, & S. Brunak.** 1999. Sequence and structure based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294:1351-1362.

**Bon, F., P. Fascia, M. Dauvergne, D. Tenenbaum, H. Planson, A. M. Petion, P. Pothier, & E. Kohli.** 1999. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J. Clin. Microbiol.* 37:3055-3058.

**Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-van Dillen, & J. van der Noordaa.** 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28:495-503.

**Bosch, A., R. M. Pintó, C. Villena, & F. X. Abad.** 1997. Persistence of human astrovirus in freshwater and marine water. *Water Sci. Technol.* 35:243-247.

**Brendel, V., P. Bucher, I. Nourbakhsh, B. E. Blaisdell, & S. Karlin.** 1992. Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2002-2006.

**Brinker, J. P., N. R. Blacklow, & J. E. Herrmann.** 2000. Human astrovirus isolation and propagation in multiple cell lines. *Arch. Virol.* 145:1847-1856.

## C

---

**Caballero, S., S. Guix, W. Morsy El-Senousy, I. Calicó, R. M. Pintó, & A. Bosch.** 2003. Persistent gastroenteritis in astrovirus infected children: association with serotype 3 strains. *J. Med. Virol.* 71:245-250.

**Carter, M. J. & M. M. Willcocks.** 1996. The molecular biology of astroviruses. *Arch. Virol.* 12(Suppl):277-285.

**Castón, J. R., Y de Isidro, A. Sánchez-Fauquier, & J. L. Carrascosa.** 1999. Estructura de virus icosaédricos por criomicroscopía de especímenes vitrificados. Congreso Nacional de Microscopía.

**Caul, E. O. & H. Appleton.** 1982. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses. *J. Med. Virol.* 9:257-265.

**Combet, C., C. Blanchet, C. Geourjon, & G. Deléage.** 2000. NSP@: Network Protein Synthesis Analysis. *Trends Biochem. Sci.* 25:147-150.

**Connolly, J. L. & T. S. Dermody.** 2002. Virion disassembly is required for apoptosis induced by reovirus. *J. Virol.* 76:1632-1641.

**Coppo, P., C. Scieux, F. Ferchald, J. Clauvel, & K. Lassoued.** 2000. Astrovirus enteritis in a chronic lymphocytic leukemia patient treated with fludarabine monophosphate. *Ann. Hematol.* 79:43-45.

**Cruz, J. R., A. V. Bartlett, J. E. Herrmann, P. Caceres, N. R. Blacklow, & F. Cano.** 1992. Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. *J. Clin. Microbiol.* 30:1140-1144.

**Cubitt, D. W., D. K. Mitchell, M. J. Carter, M. M. Willcocks, & H. Holzel.** 1999. Application of electron microscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a paediatric bone marrow transplant unit. *J. Med. Virol.* 57:313-321.

**Cunliffe, N. A., W. Dove, J. S. Gondwe, B. D. M. Thindwa, J. Greensill, J. L. Holmes, J. S. Bresee, S. S. Monroe, R. I. Glass, R. L. Broadhead, M. E. Molyneux, & C. A. Hart.** 2002. Detection and characterisation of human astroviruses in children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J. Med. Virol.* 67:563-566.

## D

---

**Dalton, R. M., E. P. Pastrana, & A. Sánchez-Fauquier.** 2003. Vaccinia virus recombinant expressing an 87-kilodalton polyprotein that is sufficient to form astrovirus-like particles. *J. Virol.* 77:9094-9098.

**Dalton, R. M., E. R. Roman, A. A. Negrodo, I. D. Wilhelmi, R. I. Glass, & A. Sánchez-Fauquier.** 2002. Astrovirus acute gastroenteritis among children in Madrid, Spain. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 21:1038-1044.

---

**Denecker, G., D. Vercammen, W. Declercq, & P. Vandenabeele.** 2001. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:356-370.

## E

---

**Eiros Bouza, J. M., M. R. Bachiller Luque, & R. Ortiz de Lejarazu.** 2003. Astrovirus en la etiología de las gastroenteritis pediátricas. *An. Pediatr. (Barc.)* 58:191-202.

**Eleouet, J-F., S. Chilmonczyk, L. Besnardeau, & H. Laude.** 1998. Transmissible gastroenteritis coronavirus induces programmed cell death in infected cells through a caspase-dependent pathway. *J. Virol.* 72:4918-4924.

**Eleouet, J-F., E. A. Slee, F. Saurini, N. Castagne, D. Poncet, C. Garrido, E. Solary, & S. J. Martin.** 2000. The viral nucleocapsid protein of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) is cleaved by caspase-6 and -7 during TGEV-induced apoptosis. *J. Virol.* 74:3975-3983.

**Englund, L., M. Chriel, H. H. Dietz, & K. O. Hedlund.** 2002. Astrovirus epidemiologically linked to pre-weaning diarrhoea in mink. *Vet. Microbiol.* 85:1-11.

## F

---

**Fernández, A., P. Suárez, J. M. Castro, E. Tabares, & M. Díaz-Guerra.** 2002. Characterization of regions in the GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus required to induce apoptotic cell death. *Virus Res.* 83:103-118.

**Fernández-Arias, A., S. Martínez, & J. F. Rodríguez.** 1997. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. *J. Virol.* 71:8014-8018.

**Foley, B., J. O'Mahony, S. M. Morgan, C. Hill, & J. G. Morgan.** 2000. Detection of sporadic cases of Norwalk-like virus (NLV) and astrovirus infection in a single Irish hospital from 1996 to 1998. *J. Clin. Virol.* 17:109-117.

## G

---

**Gaggero, A., M. O'Ryan, J. S. Noel, R. I. Glass, S. S. Monroe, N. Mamani, V. Prado, & L. F. Avendaño.** 1998. Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 36:3691-3693.

**Gaire, F., Schmitt, C., Stussi-Garaud, C., Pinck, L., & C. Ritzenthaler.** 1999. Protein 2A of Grapevine Fanleaf Nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology* 264:25-36.

**Geigenmüller, U., T. Chew, N. Ginzton, & S. M. Matsui.** 2002a. Processing of nonstructural protein 1a of human astrovirus. *J. Virol.* 76:2003-2008.

**Geigenmüller, U., N. H. Ginzton, & S. M. Matsui.** 1997. Construction of a genome-length cDNA clone for human astrovirus serotype 1 and synthesis of infectious RNA transcripts. *J. Virol.* 71:1713-1717.

**Geigenmüller, U., N. H. Ginzton, & S. M. Matsui.** 2002b. Studies on intracellular processing of the capsid protein of human astrovirus serotype 1 in infected cells. *J. Gen. Virol.* 83:1691-1695.

**Gibson, C. A., J. Chen, S. A. Monroe, & M. R. Denison.** 1998. Expression and processing of nonstructural proteins of the human astroviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 440:387-391.

**Glass, R. I., J. Noel, D. Mitchell, J. E. Herrmann, N. R. Blacklow, L. K. Pickering, P. Dennehy, G. Ruiz-Palacios, M. L. de Guerrero, & S. S. Monroe.** 1996. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch. Virol.* 12(Suppl.):287-300.

**Goldstaub, D., Grady, A., Berkovich, Z, Grossmann, Z., Nophar, Y., Luria, S., Sonenberg, N., & C. Kahana.** 2000. Poliovirus 2A protease induces apoptotic cell death. *Mol. Cell. Biol.* 20:1271-1277.

**Gong, J., Traganos, F., & Darzynkiewicz, Z.** 1994. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem.* 218, 314-319.

**González, G. G., F. H. Pujol, F. Liprandi, L. Deibis, & J. E. Ludert.** 1998. Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela. *J. Med. Virol.* 55:288-292.

**Gough, R. E., M. S. Collins, E. Borland, & I. F. Keymer.** 1984. Astrovirus-like particles associated with hepatitis in ducklings. *Vet. Rec.* 114:279.

**Gray, E. W., Angus, K. W., & D. R. Snodgrass.** 1980. Ultrastructure of the small intestine in astrovirus-infected lambs. *J. Gen. Virol.* 49:71-82.

---

**Guerrero, M. L., J. S. Noel, D. K. Mitchell, J. J. Calva, A. L. Morrow, J. Martínez, G. Rosales, F. R. Velázquez, S. S. Monroe, R. I. Glass, L. K. Pickering, & G. M. Ruiz-Palacios.** 1998. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *Pediatr. J. Infect. Dis.* 17:723-727.

## H

---

**Harbour, D. A., C. R. Ashley, P. D. William, & T. J. Gruffydd-Jones.** 1987. Natural and experimental astrovirus infection of cat. *Vet. Rec.* 120:555-557.

**Hardwick, J. M.** 1998. Viral interference with apoptosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9:339-349.

**Harlow, E. & D. Lane** (Eds). 1988. Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Herrmann, J. E., R. W. Hudson, D. M. Perron-Henry, J. B. Kurtz, & N. R. Blacklow.** 1988. Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus-specific monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 158:182-185.

**Herrmann, J. E., N. A. Nowak, D. M. Perron-Henry, R. W. Hudson, W. D. Cubitt, & N. R. Blacklow.** 1990. Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 161:226-229.

**Herrmann, J. E., D. N. Taylor, P. Echeverria, & N. R. Blacklow.** 1991. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N. Engl. J. Med.* 324:1757-1760.

**Higgins D., J. Thompson, T. Gibson, J. D. Thompson, D. G. Higgins, & T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.

**Hofmann, K., P Bucher, L Falquet, & A Bairoch.** 1999. The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* 27:215-219.

**Hopp T. P. & K. R. Woods.** 1981. Prediction of protein antigenic determinants from aminoacid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3824-3828.

**Hoshino, Y., J. F. Zimmer, N. S. Moise, & F. W. Scott.** 1981. Detection of astroviruses in faeces of a cat with diarrhoea. *Arch. Virol.* 70:373-376.

## I

---

**Imada, T., S. Yamaguchi, & H. Kawamura.** 1979. Pathogenicity for baby chicks of the G-4260 strain of the picornavirus "avian nephritis virus". *Avian Dis.* 23:582-588.

**Imada, T., S. Yamaguchi, M. Mase, K. Tsukamoto, M. Kubo, & A. Morooka.** 2000. Avian Nephritis Virus (ANV) as a new member of the family *Astroviridae* and construction of infectious ANV cDNA. *J. Virol.* 74:8487-8493.

## J

---

**Jan, J-T. & D. E. Griffin.** 1999. Induction of apoptosis by Sindbis Virus occurs at cell entry and does not require virus replication. *J. Virol.* 73:10296-10302.

**Jiang, B., S. S. Monroe, E. V. Koonin, S. E. Stine, & R. I. Glass.** 1993. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10539-10543.

**Jonassen, C. M., T. O. Jonassen, & B. Grinde.** 1998. A common RNA motif in the 3' end of the genomes of astroviruses, avian infectious bronchitis virus and an equine rhinovirus. *J. Gen. Virol.* 79:715-718.

**Jonassen, C. M., T. O. Jonassen, Y. M. Saif, D. R. Snodgrass, H. Ushijima, M. Shimizu, & B. Grinde.** 2001. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *J. Gen. Virol.* 82:1061-1067.

**Jonassen, C. M., T. O. Jonassen, T.M. Sveen, & B. Grinde.** 2003. Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses. *Virus Res.* 91:195-201.

## K

---

**Kang, Y. H., Y. K. Park, J. B. Ahn, J. D. Yeun, & Y. M. Lee.** 2002. Identification of human astrovirus from stool samples with diarrhea in Korea. *Arch. Virol.* 147:1821-1827.

**Kelley, L. A., R. M. MacCallum, & M. J. E. Sternberg.** 2000. Enhanced Genome Annotation using Structural Profiles in the Program 3D-PSSM. *J. Mol. Biol.* 299: 499-520.

- Kiang, D. & S. M. Matsui.** 2002. Proteolytic processing of a human astrovirus nonstructural protein. *J. Gen. Virol.* 83:25-34.
- Kidd, V. J., J. M. Lahti, & T. Teitz.** 2000. Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11:191-201.
- Kimura, M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- Kirkegaard, C. & D. Baltimore.** 1986. The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* 47:433-443.
- Koci, M. D., B. S. Seal, & S. Schultz-Cherry.** 2000. Molecular characterization of an avian astrovirus. *J. Virol.* 74:6173-6177.
- Koev, G., B. R. Mohan, & W. A. Miller.** 1999. Primary and secondary structural elements required for synthesis of Barley Yellow Dwarf Virus subgenomic RNA1. *J. Virol.* 73:2876-2885.
- Koonin, E. V.** 1991. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 71:2197-2206.
- Koopmans, M. P. G., M. H. L. Bijen, S. S. Monroe, & J. Vinjé.** 1998. Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in The Netherlands. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5:33-37.
- Koyama, A. H., T. Fukumori, M. Fujita, H. Irie, & A. Adachi.** 2000. Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. *Microbes Infect.* 2:1111-1117.
- Kriston, S., M. M. Willcocks, M. J. Carter, & W. D. Cubitt.** 1996. Seroprevalence of astrovirus types 1 to 6 in London, determined using recombinant virus antigen. *Epidemiol. Infect.* 117:159-164.
- Kumar, S., K. Tamura, & M. Nei.** 1993. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Pennsylvania State University, University Park, PA.
- Kuo, R. L., S. H. Kung, Y. Y. Hsu, & W. T. Liu.** 2002. Infection with enterovirus 71 or expression of its 2A protease induces apoptotic cell death. *J. Gen. Virol.* 83:1367-1376.

**Kurtz, J. B. & T. W. Lee.** 1978. Astrovirus gastroenteritis age distribution of antibody. *Med. Microbiol. Immunol.* 166:227-230.

**Kurtz, J. B. & T. W. Lee.** 1984. Human astrovirus serotypes. *Lancet* 2:1405.

**Kurtz, J. B. & T. W. Lee.** 1987. Human and animal. Novel Diarrhoea Viruses. Ciba Foundation symposium 128. Chichester: Wiley, 92-107.

**Kurtz, J. B., T. W. Lee, J. W. Craig, & S. E. Reed.** 1979. Astrovirus infection in volunteers. *J. Med. Virol.* 3:221-230.

**Kurtz, J. B., T. W. Lee, & A. J. Parson.** 1980. The action of alcohols on rotavirus, astrovirus and enterovirus. *J. Hosp. Infec.* 1:321-325.

## L

---

**LaStarza, M. W., J. A. Lemm, & C. M. Rice.** 1994. Genetic analysis of the nsP3 region of Sindbis Virus: evidence for roles in minus-strand and subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.* 68:5781-5781.

**Le Guyader, F., L. Haugarreau, L. Miossec, E. Dubois, & M. Pommepuy.** 2000. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3241-3248.

**Lee, T. W. & J. B. Kurtz.** 1981. Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. *J. Gen. Virol.* 57:421-424.

**Lee, T. W. & J. B. Kurtz.** 1994. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-92, with evidence for two new serotypes. *Epidemiol. Infect.* 112:187-193.

**Lemm, J. A., T. Rümenapf, E. G. Strauss, J. H. Strauss, & C. Rice.** 1994. Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. *EMBO J.* 13:2925-2934.

**Lewis, T. L., H. B. Greenberg, J. E. Herrmann, L. S. Smith, & S. M. Matsui.** 1994. Analysis of astrovirus serotype 1 RNA, identification of the viral RNA-dependent RNA polymerase motif, and expression of a viral structural protein. *J. Virol.* 68:77-83.

**Lewis, D. C., N. F. Lightfoot, W. D. Cubitt, & S. A. Wilson.** 1989. Outbreaks of astrovirus type 1 and rotavirus gastroenteritis in a geriatric in-patient population. *J. Hosp. Infect.* 14:9-14.

**Li, G., M. W. LaStarza, W. R. Hardy, J. H. Strauss, & C. M. Rice.** 1990. Phosphorylation of Sindbis virus nsP3 in vivo and in vitro. *Virology* 179:416-427.

**Liste, M. B., I. Natera, J. A. Suarez, F. H. Pujol, F. Liprandi, & J. E. Ludert.** 2000. Enteric virus infections and diarrhea in healthy and human immunodeficiency virus-infected children. *J. Clin. Microbiol.* 38:2873-2877.

**Liu, C., H. Y. Xu, & D. X. Liu.** 2001. Induction of caspase-dependent apoptosis in cultured cells in the Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus. *J. Virol.* 75:6402-6409.

**López, L., F. J. Castillo, M. A. Fernández, A. Clavel, M. C. Rubio, R. Gómez-Lus, & B. Cutillas.** 2000. Astrovirus infection among children with gastroenteritis in the city of Zaragoza, Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19:545-547.

**López-Guerrero, J.A., M. Alonso, F. Martín-Belmonte, & L. Carrasco.** 2000. Poliovirus induces apoptosis in the human U937 promonocytic cell line. *Virology* 272:250-256.

**Lukashov, V. V. & J. Goudsmit.** 2002. Evolutionary relationships among *Astroviridae*. *J. Gen Virol.* 83:1397-1405.

**Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, & X. Wang.** 1998. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.

**Lupas, A.** 1996. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.* 21:375-382.

## M

---

**Madeley, C. R. & B. P. Cosgrove.** 1975. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 2:451-452.

**Maldonado, Y., M. Cantwell, M. Old, D. Hill, M. L. Sanchez, L. Logan, F. Millan-Velasco, J. L. Valdespino, J. Sepulveda, & S. Matsui.** 1998. Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants. *J. Infect. Dis.* 178:334-339.

- Marczinke, B., A. J. Bloys, D. K. Brown, M. M. Willcocks, M. J. Carter, & I. Brierley.** 1994. The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase coding region is expressed by ribosomal frameshifting. *J. Virol.* 68:5588-5595.
- Marx, F. E., M. B. Taylor, & W. O. K. Grabow.** 1998. The application of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction-oligonucleotide probe assay for the detection of human astroviruses in environmental water. *Water Res.* 32:2147-2153.
- Matsui, M., H. Ushijima, M. Hachiya, J. Kakizawa, L. Wen, M. Oseto, K. Morooka, & J. B. Kurtz.** 1998. Determination of serotypes of astroviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and homologies of the types by the sequencing of Japanese isolates. *Microbiol. Immunol.* 42:539-547.
- Matsui, S. M. & H. B. Greenberg.** 2001. Astroviruses, p.875-893. In B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, M. A. Martin, R. A. Lamb, B. Roizman, and S. E. Strauss (ed.), *Fields virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia. Pa.
- Matsui, S. M., D. Kiang, N. Ginzton, T. Chew, & U. Geigenmüller-Gnirke.** 2001. Molecular biology of astroviruses: selected highlights. *Gastroenteritis viruses*. Novartis Foundation Symposium. 238:219-236.
- Matsui, S. M., J. P. Kim, H. B. Greenberg, L. M. Young, L. S. Smith, T. L. Lewis, J. E. Herrmann, N. R. Blacklow, K. Dupuis, & G. R. Reyes.** 1993. Cloning and characterization of human astrovirus immunoreactive epitopes. *J. Virol.* 67:1712-1715.
- McIver, C. J., E. A. Palombo, J. C. Doultree, H. ustapha, J. A. Marshall, & W. D. Rawlinson.** 2000. Detection of astrovirus gastroenteritis in children. *J. Virol. Methods* 84:99-105.
- Medina, S. M., M. F. Gutierrez, F. Liprandi, & J. E. Ludert.** 2000. Identification and type distribution of astroviruses among children with gastroenteritis in Colombia and Venezuela. *J. Clin. Microbiol.* 38:3481-3483.
- Méndez, E. M. P. E. Salas-Ocampo, M. E. Munguía, & C. F. Arias.** 2003. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. *J. Virol.* (En prensa).
- Méndez, E., T. Fernández-Luna, S. López, M. Méndez-Toss, & C. Arias.** 2002. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J. Virol.* 76:7996-8002.

- Méndez-Toss, M., P. Romero-Guido, M. E. Munguía, E. Méndez, & C. F. Arias.** 2000. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. *J. Gen. Virol.* 81:2891-2897.
- Mermod, N., E. A. O'Neil, T. J. Kelly, & R. Tjian.** 1989. The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell* 58:741-753.
- Miller, W. A. & G. Koev.** 2000. Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology* 273:1-8.
- Mitchell, D. K., D. O. Matson, X. Jiang, T. Berke, S. S. Monroe, M. J. Carter, M. M. Willcocks, & L. K. Pickering.** 1999. Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers. *J. Infect. Dis.* 180:514-517.
- Mitchell, D. K., S. S. Monroe, X. Jiang, D. O. Matson, R. I. Glass, & L. K. Pickering.** 1995. Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 172:1437-1444.
- Mitchell, D. K., R. Van, A. L. Morrow, S. S. Monroe, R. I. Glass, & L. K. Pickering.** 1993. Outbreaks of astrovirus gastroenteritis in day care centers. *J. Pediatr.* 123:725-732.
- Molberg, O., E. M. Nilsen, L. M. Sollit, H. Scott, P. Brandtzaeg, E. Thorsby, & K. E. Lundin.** 1998. T cells with specific reactivity against astrovirus isolated from human small intestine. *Gastroenterology* 114:115-122.
- Monroe, S. S., M. J. Carter, J. E. Herrmann et al.** 1995. Family *Astroviridae*. In.. Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DL, et al. eds. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. New York: Springer-Verlag 364:367.
- Monroe, S. S., J. L. Holmes, & G. M. Belliot.** 2001. Molecular epidemiology of human astroviruses. *Novartis Foundation Symposium.* 238:237-249.
- Monroe, S. S., S. E. Stine, L. Gorelkin, J. E. Herrmann, N. R. Blacklow, & R. I. Glass.** 1991. Temporal synthesis of proteins and RNAs during Human Astrovirus infection of cultured cells. *J. Virol.* 65:641-648.
- Mustafa, H., E. A. Palombo, & R. F. Bishop.** 1998. Improved sensitivity of astrovirus-specific RT-PCR following culture of stool samples in CaCo-2 cells. *J. Clin. Virol.* 11:103-107.

**Mustafa, H., E. A. Palombo, & R. F. Bishop.** 2000. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J. Clin. Microbiol.* 38:1058-1062.

**Muthumani, K., D. S. Hwang, B. M. Desai, D. Zhang, N. Dayes, D. R. Green, & D. B. Weiner.** 2002. HIV-1 Vpr induces apoptosis through caspase 9 in T cells and peripheral blood mononuclear cells. *J. Biol. Chem.* 277:37820-37831.

## N

---

**Nadan, S., J. E. Walter, W. O. K. Grabow, D. K. Mitchell, & M. B. Taylor.** 2003. Molecular characterization of astroviruses by reverse transcriptase PCR and sequence analysis: comparison of clinical and environmental isolates from South Africa. *App. Environ. Microbiol.* 69:747-753.

**Naficy, A. B., M. R. Rao, J. L. Holmes, R. Abu-Elyazeed, S. J. Savarino, T. F. Wierzba, R. W. Frenc, S. S. Monroe, R. I. Glass, & J. D. Clemens.** 2000. Astrovirus diarrhea in Egyptian children. *J. Infect. Dis.* 182:685:690.

**Nagy, P. D., J. Pogany, & A. E. Simon.** 1999. RNA elements required for RNA recombination function as replication enhancers in vitro and in vivo in a plus-strand RNA virus. *EMBO J.* 18:5653-5665.

**Nagy, P. D. & A. E. Simon.** 1997. New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology.* 235:1-9.

**Nagy, P. D., C. Zhang, & A. E. Simon.** 1998. Dissecting RNA recombination in vitro: role of RNA sequences and the viral replicase. *EMBO J.* 17:2392-2403.

**Nei, M. & T. Gojobori.** 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3:418-426.

**Noel, J. S., T. W. Lee, J. B. Kurtz, R. I. Glass, & S. S. Monroe.** 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 33:797-801.

## O

---

**O'Brien, V.** 1998. Viruses and apoptosis. *J. Gen. Virol.* 79, 1833-1845.

---

**Oh, D., G. Gaedicke, & E. Schreier.** 2003. Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence and molecular diversity. *J. Med. Virol.* 71:82-93.

**Oh, D. & E. Schreier.** 2001. Molecular characterization of human astroviruses in Germany. *Arch. Virol.* 146:443-455.

**Oishi, I., K. Yamazaki, T. Kimoto, Y. Minekawa, E. Utagawa, S. Yamazaki, S. Inouye, G. S. Grohmann, S. S. Monroe, S. E. Stine, C. Carcamo, T. Ando, & R. I. Glass.** 1994. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *J. Infect. Dis.* 170: 439-443.

**Oliver, A. R. & A. D. Phillips.** 1988. An electron microscopical investigation of faecal small round viruses. *J. Med. Virol.* 24:211-218.

## P

---

**Pager, C. T. & A. D. Steele.** 2003. Astrovirus-associated diarrhea in South African adults. *Clin. Inf. Dis.* 35:1452-1453.

**Palombo, E. A. & R. F. Bishop.** 1996. Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *J. Clin. Microbiol.* 34:1750-1753.

**Pang, X. L. & T. Vesikari.** 1999. Human astrovirus-associated gastroenteritis in children under 2 years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Acta Paediatr.* 88:532-536.

**Pintó, R. M., F. X. Abad, R. Gajardo, & A. Bosch.** 1996. Detection of infectious astroviruses in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1811-1813.

**Pintó, R. M., J. M. Díez, & A. Bosch.** 1994. Use of the colonic carcinoma cell line CaCo-2 for *in vivo* amplification and detection of enteric viruses. *J. Med. Virol.* 44:310-315.

**Prihod'ko, G. G., E. A. Prihod'ko, A. G. Pletnev, & J. I. Cohen.** 2002. Langat flavivirus protease NS3 binds caspase-8 and induces apoptosis. *J. Virol.* 76:5701-5710.

## Q

---

**Qureshi, M. A., Y. M. Saif, C. L. Heggen-Peay, F. W. Edens, & G. B. Havenstein.** 2001. Induction of functional defects in macrophages by a Poult Enteritis and Mortality Syndrome-associated Turkey Astrovirus. *Avian Dis.* 45:853-861.

## R

---

**Ricchi, P., S. Pignata, A. Di Popolo, A. Memoli, A. Apicella, R. Zarrilli, & A. M. Acquaviva.** 1997. Effect of aspirin on cell proliferation and differentiation of colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Int. J. Cancer* 73:880-884.

**Risco, C., J. L. Carrascosa, A. M. Pedregosa, C. D. Humphrey, & A. Sánchez-Fauquier.** 1995. Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. *J. Gen. Virol.* 76:2075-2080.

**Román, E., I. Wilhelmi, J. Colomina, J. Villar, M. L. Cilleruelo, V. Nebreda, M. Del Alamo, & A. Sánchez-Fauquier.** 2003. Acute viral gastroenteritis: proportion and clinical relevance of multiple infections in Spanish children. *J. Med. Microbiol.* 52:435-440.

**Roulston, A., R. C. Marcellus, & P.E. Branton.** 1999. Viruses and apoptosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:577-628.

**Rozas, J. & R. Rozas.** 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15:174-175.

## S

---

**Saitou, N. & M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.

**Sakamoto, T., H. Negishi, Q. Wang, S. Akihara, B. Kim, S. Nishimura, K. Kaneshi, S. Nakaya, Y. Ueda, K. Sugita, T. Motohiro, T. Nishimura, & H. Ushijima.** 2000. Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1 to 8). *J. Med. Virol.* 61:326-331.

**Sakon, N., K. Yamazaki, E. Utagawa, Y. Okuno, & I. Oishi.** 2000. Genomic characterization of human astrovirus type 6 Katano virus and the establishment of a rapid and effective reverse transcription-polymerase chain reaction to detect all serotypes of human astrovirus. *J. Med. Virol.* 61:125-131.

- Salemi, M. & A. M. Vandamme.** 2003. The phylogenetic handbook. A practical approach to DNA and protein phylogeny. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, & T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sánchez-Fauquier, A., A. L. Carrascosa, J. L. Carrascosa, A. Otero, R. I. Glass, J. A. López, C. San Martín, & J. A. Melero.** 1994. Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. *Virology* 201:312-320.
- Saraste, A. & K. Pulkki.** 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovas. Res.* 45:528-537.
- Schultz-Cherry, S., N. Dybdahl-Sissoko, G. Neuman, Y. Kawaoka, & V. S. Hinshaw.** 2001. Influenza virus NS1 induces apoptosis in cultured cells. *J. Virol.* 75:7875-7881.
- Schultz-Cherry, S., D. R. Kapczynski, V. M. Simmons, M. D. Koci, C. Brown, & H. J. Barnes.** 2000. Identifying agent(s) associated with poult enteritis mortality syndrome: Importance of the thymus. *Avian Dis.* 44:256-265.
- Shastri, S., A. M. Doane, J. Gonzales, U. Upadhyayula, & D. M. Bass.** 1998. Prevalence of astroviruses in a children's hospital. *J. Clin. Microbiol.* 36:2571-2574.
- Shimizu, M., J. Shirai, M. Narita, & T. Yamane.** 1990. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. *J. Clin. Microbiol.* 28:201-206.
- Snodgrass, D. R., K. W. Angus, E. W. Gray, J. D. Menzies, & G. Paul.** 1979. Pathogenesis of diarrhoea caused by astrovirus infections in lambs. *Arch. Virol.* 60:217-226.
- Sol, N., J. Le Junter, I. Vassias, J. M. Freyssinier, A. Thomas, A. F. Prigent, B. B. Rudkin, S. Fichelson, & F. Morinet.** 1999. Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor alpha pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19. *J. Virol.* 73:8762-8770.
- Steele, A. D., H. R. Basetse, N. R. Blacklow, & J. E. Herrmann.** 1998. Astrovirus infection in South Africa: a pilot study. *Ann. Trop. Paediatr.* 18:315-319.

**Stewart, S. A., B. Poon, J. Y. Song, & I. S. Y. Chen.** 2000. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis through caspase activation. *J. Virol.* 74:3105-3111.

**Svenungsson, B., A. Lagergren, E. Ekwall, B. Evengard, K. Olof Hedlund, A. Kärnell, S. Löfdahl, L. Svensson, & A. Weintraub.** 2000. Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: a 1-year prospective study in a Swedish clinic for infectious diseases. *Clin. Inf. Dis.* 30:770-778.

---

## T

---

**Taylor, M. B., N. Cox, M. A. Very, & W. O. K. Grabow.** 2001a. The occurrence of hepatitis A and astroviruses in selected river and dam waters in South Africa. *Water Res.* 35:2653-2660.

**Taylor, M. B., W. O. K. Grabow, & W. D. Cubitt.** 1997a. Propagation of human astrovirus in the PLC/PRF/5 hepatoma cell line. *J. Virol. Methods* 67:13-18.

**Taylor, M. B., F. E. Marx, & W. O. K. Grabow.** 1997b. Rotavirus, astrovirus and adenovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in a South African child care centre. *Epidemiol. Infect.* 119:227-230.

**Taylor, M. B., J. Walter, T. Berke, D. W. Cubitt, D. K. Mitchell, & D. O. Matson.** 2001b. Characterisation of a South African human astrovirus as type 8 by antigenic and genetic analyses. *J. Med. Virol.* 64:256-261.

**Thornberry, N. A., T. A. Rano, E. P. Peterson, D. M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V. M. Houtzager, P. A. Nordstrom, S. Roy, J. P. Vaillancourt, K. T. Chapman, & D. W. Nicholson.** 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. *J. Biol. Chem.* 272:17907-17911.

**Traore, O., G. Belliot, C. Mollat, H. Piloquet, C. Chamoux, H. Laveran, S. S. Monroe, & S. Billaudel.** 2000. RT-PCR identification and typing of astroviruses and Norwalk-like viruses in hospitalized patients with gastroenteritis: evidence of nosocomial infections. *J. Clin. Virol.* 17:151-158.

---

## U

---

**Unicomb, L. E., N. N. Banu, T. Azim, A. Islam, P. K. Bardhan, A. S. G. Faruque, A. Hall, Ch. L. Moe, J. S. Noel, S. S. Monroe, M. J. Albert, & R. I. Glass.** 1998. Astrovirus

---

infection in association with acute, persistent and nosocomial diarrhea in Bangladesh. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17:611-614.

## V

---

**Vihinen, H., T. Ahola, M. Tuittila, A. Merits, & L. Kääriäinen.** 2001. Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest Virus replicase protein nsP3. *J. Biol. Chem.* 276:5747-5752.

## W

---

**Walter, J. E. & D. K. Mitchell.** 2000. Role of astroviruses in childhood diarrhea. *Curr. Opin. Pediatr.* 12:275-279.

**Walter, J. E., J. Briggs, M. L. Guerrero, D. O. Matson, L. K. Pickering, G. Ruiz-Palacios, T. Berke, & D. K. Mitchell.** 2001a. Molecular characterization of a novel recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children. *Arch. Virol.* 146:2357:2367.

**Walter, J. E., D. K. Mitchell, M. L. Guerrero, T. Berke, D. O. Matson, S. S. Monroe, L. K. Pickering, & G. Ruiz-Palacios.** 2001b. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a periurban community of Mexico city. *J. Inf. Dis.* 183:681-686.

**Wang, Q., J. Kakizawa, L. Weng, M. Shimizu, O. Nishio, Z. Fang, & H. Ushijima.** 2001. Genetic analysis of the capsid region of astroviruses. *J. Med. Virol.* 64:245-255.

**Weber, C. H. & C. Vincenz.** 2001 The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem. Sci.* 26:475-481.

**Wilhelmi, I., E. Roman, & A. Sánchez-Fauquier.** 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Infect.* 9:247-262.

**Willcocks, M. M., N. Ashton, J. B. Kurtz, W. D. Cubitt, & M. J. Carter.** 1994a. Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion. *J. Virol.* 68:6057-6058.

**Willcocks, M. M., A. S. Boxall, & M. J. Carter.** 1999. Processing and intracellular location of human astrovirus non-structural proteins. *J. Gen. Virol.* 80:2607-2611.

**Willcocks, M. M., T. D. Brown, C. R. Madeley, & M. J. Carter.** 1994b. The complete sequence of a human astrovirus. *J. Gen. Virol.* 75:1785-1788.

**Willcocks, M. M. & M. J. Carter.** 1992. The 3' terminal sequence of a human astrovirus. *Arch. Virol.* 124:279-289.

**Willcocks, M. M., M. J. Carter, F. R. Laidler, & C. R. Madeley.** 1990. Growth and characterization of human faecal astrovirus in a continuous cell line. *Arch. Virol.* 113:73-82.

**Willcocks, M. M., M. J. Carter, J. G. Silcock, & C. R. Madeley.** 1991. A dot-blot hybridization procedure for the detection of astrovirus in stool samples. *Epidemiol. Infect.* 107:405-410.

**Williams, F. P.** 1980. Astrovirus-like, coronavirus-like, and parvovirus-like particles detected in the diarrheal stools of beagle pups. *Arch. Virol.* 66:216-226.

**Williams, F. P.** 1989. Electron microscopy of stool-shed viruses: retention of characteristic morphologies after long-term storage at ultralow temperatures. *J. Med. Virol.* 29:192-195.

**Wood, D. J., T. J. David, I. L. Chrystie, & B. Totterdell.** 1988. Chronic enteric virus infection in two T-cell immunodeficient children. *J. Med. Virol.* 24:435-444.

**Woode, G. N. & J. C. Bridger.** 1978. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J. Med. Microbiol.* 11:441-452.

**Woode, G. N., Pohlenz, J. F., Kelso Gourley, N. E., & J. A. Fagerland.** 1984. Astrovirus and brenda virus infections of dome cell epithelium of bovine ileum. *J. Clin. Microbiol.* 19:623-630.

## **Z**

---

**Zhirnov, O. P., T. E. Konakova, W. Garten, & H. D. Klenk.** 1999. Caspase-dependent N-terminal cleavage of influenza virus nucleocapsid protein in infected cells. *J. Virol.* 73:10158-10163.

## **10. ÍNDICE TEMÁTICO**



## Índice temático

Acrilamida, 152, 153  
 Adenovirus, 1, 92, 96, 97, 98, 102  
*Aeromonas spp.*, 97, 98  
 Albania, 73, 104, 109  
 Alemania, 10, 104, 109, 110  
 Alfavirus, 15, 51, 60, 65, 66  
 Ampicilina, 165  
 Apaf-1, 42  
 Apoptosis, 37, 41, 117, 159, 161  
 Apoptosoma, 42  
 Argentina, 104  
 ARN subgenómico, 7, 8, 11, 15, 17, 23, 51, 62, 65, 67, 68  
 Aspirina (ASA), 119  
 Astrovirus de oveja (ShAstV), 9, 10, 15  
 Astrovirus de pavo (TAsV), 5, 9, 10, 118  
 Astrovirus de visón (MAstV), 10  
 Astrovirus felino (FAstV), 9, 12, 14, 107, 112  
 Astrovirus porcino (PAstV), 9, 10, 14, 15  
 Australia, 31, 104, 110, 111  
 Avastrovirus, 8  
 Baculovirus, 3, 14  
 Bax, 42  
 Bcl-2, 41, 135  
 BHK-21, 8, 9, 10, 11, 16, 17, 66  
 BLAST, 54, 60, 76  
*Blebbing*, 37, 39  
 Bromuro de etidio, 171  
 Bymovirus, 13  
 CaCl<sub>2</sub>, 166  
 Cacodilato, tampón, 157  
*Caliciviridae*, 1, 7, 12, 13, 134  
 Calicivirus, 1, 2, 6, 12, 13, 29, 30, 31, 32, 52  
*Campylobacter spp.*, 97, 98  
*Candida albicans*, 98  
 Carga, tampón, 171  
 Carrera, tampón, 154  
 Caseína kinasa II (CKII), 60  
 Caspasas, 38, 40, 121, 127, 128, 132, 135, 136, 137  
*Caspase recruitment domain* (CARD), 40, 132  
 CD95 (Fas), 41  
 CellFectin, 166  
 Chile, 110

China, 104  
Chromas, 175, 176  
Citocromo c, 39, 41, 42, 120, 127, 135, 151, 177  
Citrato, tampón, 159  
CK, 10  
Cloro, 20, 35  
Cloroformo 20, 55, 148  
Cloruro de Cesio (CsCl), 19  
ClustalW, 55, 77, 78, 97, 176, 187  
*Coiled coil (CC)*, 52, 54, 59  
COILS 2.2, 54, 176  
Coinfección, 31  
Colitis ulcerosa, 99  
Colombia, 71, 104, 110  
*Comoviridae*, 61, 65  
Competentes, células, 163  
Compute pI/Mw Tool, 176  
*copy-choice*, 90  
Coronavirus, 2, 14, 135, 136  
Coronavirus aviar de la bronquitis infecciosa, 136  
Coronavirus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), 135, 136  
Coronavirus murino, 135  
*Cryptosporidium*, 97, 98  
*Cystein proteases*, 38  
DAPI, 119, 124, 159  
Deae dextrano, 166  
*Death domain (DD)*, 132, 133, 135, 136  
*Death effector domain (DED)*, 40, 132  
*Death Inducing signaling complex (DISC)*, 40, 135  
Diarreas persistentes, 30, 32, 72, 104  
*DNA ladder*, 124, 160  
DnaSP, 77, 176  
DOTAP, 166  
*Dot blot*, 23, 24  
Egipto, 30, 31, 33, 110, 111  
Electroforesis, 152, 170  
Electroporación, 122, 133, 166  
Ensayo inmunoenzimático (EIA), 2, 18, 19, 22, 23, 24, 95, 97, 122, 131, 132, 136, 158  
Entamoeba, 97  
*Enterococcus spp.*, 97  
Enterovirus, 6, 135  
España, 95, 104, 110  
Estaurosporina, 127  
Etanol, 35, 160, 168, 174  
Factor de Necrosis Tumoral (TNF), 34, 41  
FADD, 40, 41  
Fas (CD95), 41  
FasL (CD95L), 41  
Fijación, solución, 156  
Finlandia, 31  
Flavivirus Langat, 135  
Fludarabina, 32  
*Fomites*, 35  
Fosfatasa, tampón, 154  
Fosfatidil serina, 39  
Fosfato dipotásico, tampón, 156  
Fosfato-citrato, tampón, 161  
Fosfato monosódico, tampón, 156

Fosfato PB, tampón, 156  
Fosforilación, 54, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68  
Francia, 24, 26, 29, 32, 33, 73, 105, 109, 110  
Freund, adyuvante, 147  
Fugene, 166  
Gammaglobulinas, 32  
*Giardia*, 97  
Glicina, solución, 155  
Glicosilación, 59, 60  
*Green Fluorescent Protein (GFP)*, 23  
Guatemala, 31, 110  
HeBS, tampón, 166  
HEK, 2, 9, 90  
Helicasa, 7, 8, 51  
Hepatitis, 5  
Heterotípica, inmunidad, 33, 100  
Hi-Fi, Expand, 168  
Hibridación, 19, 23, 24, 26, 96, 171  
Hidrofobicidad, 18, 147, 176  
Holanda, 33, 73, 105, 109  
Homogenización, solución, 152  
Homotípica, inmunidad, 33  
HT-29, 9  
ICTV, 7, 8, 11, 176  
IDEIA™ Astrovirus, 22  
*Indels*, 55, 61, 66, 77, 78, 79, 82, 84, 88  
India, 32, 111  
Inmunolectromicroscopía (IEM), 8, 18, 19, 21, 57, 58, 157, 177  
Inmunofluorescencia (IF), 8, 13, 17, 19, 22, 53, 57, 66, 121, 122, 123, 130, 133, 154, 161, 177  
Interferón, 34, 42  
Intususcepción, 1  
Irlanda, 25, 110  
Isopropanol, 35, 164  
Japón, 25, 26, 29, 34, 105, 110  
Ka, 77, 78, 79, 90, 92  
Korea, 24  
Ks, 77, 78, 79, 90, 92  
Ks/Ka, 77, 78, 79, 90, 92  
Laemli, tampón, 154  
LB, agar, 165  
LB, medio, 164  
Lipofectamine2000, 166  
Lisis L2, tampón, 168  
Lisis L6, tampón, 168  
Lisozima, 164  
LLCMK2, 9, 10, 19  
*Luteoviridae*, 91  
MA104, 9  
MAb 3B2, 18, 19  
MAb 5B7, 18, 19  
MAb 7C2, 18, 19  
MAb 8E7, 8, 18, 19, 22, 92, 121, 123, 130, 133, 158, 177  
MAb 8G4, 18, 19  
MAb PL2, 18, 19  
Mamastrovirus, 8  
Marin County, 22  
MEGA 2, 77, 97, 176  
MEM, 145, 147

Metanol, 20, 35  
Metiltransferasa, 13  
México, 10, 25, 26, 31, 105, 107, 110, 111  
Microscopía electrónica (ME), 2, 6, 21, 53, 57, 58, 95, 120, 125, 156  
Mieloma múltiple, 99  
*Moloney Murine Leukaemia virus*, 168  
Necrosis, 37, 38, 39  
Nefritis intersticial aguda, 5  
NetPhos 2.0, 54, 176  
Network Protein Server Analysis, 54, 176  
Neutralización (NT), 8, 19  
NLS, 12, 13, 16, 51, 52, 59, 60, 66, 133  
Norovirus, 1  
Nosocomial, 30, 32, 33, 98  
Organización Mundial de la Salud (OMS), 30  
*pairwise deletion*, 77  
Papilomavirus, 14  
Paraformaldehído, 155  
Parvovirus, 6  
*Parvovirus-like*, 6  
PBS, tampón, 146  
PcDNA3.1, 122, 162, 163  
p-dist, 77, 78, 79, 82, 84, 90, 97, 107  
Persulfato amónico, 154  
Picobirnavirus, 2  
*Picornaviridae*, 7, 15, 34  
Picornavirus, 13, 60, 65  
PLC/PRF/5, 9  
Poliovirus, 35, 135  
Potyvirus, 13  
*Poult enteritis and mortality syndrome (PEMS)*, 5, 118  
PredictProtein, 54, 122, 132, 176  
Proteinasa K, 160  
ProtScale, 147, 176  
Proteasa, 12, 15, 16, 17, 21, 38, 51, 52, 59, 66, 72, 76, 79, 90, 118, 133, 136, 137  
Proteína A, tampón, 150  
Proteína quinasa C (PKC), 60  
3D-PSSM v2.6.0, 122, 176  
RNAsin, 169  
Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR), 41  
Recombinación, 15, 27, 72, 91  
Recubrimiento, tampón, 158  
Reino Unido, 2, 26, 31, 73, 104  
Reoviridae, 1  
Reovirus, 135  
RFLP, 73, 78, 82, 83, 85, 87, 88, 89, 92, 103, 141, 173  
*Ribosomal Frameshifting (RFS)*, 7, 12, 91  
RIPA, tampón, 120, 149  
RNAsa libre de DNAsas, 160, 164  
RT Expand, 168  
RT-PCR, 24, 26, 168  
s2m, 12, 14  
Sacarosa, 19, 155  
*Salmonella spp.*, 97, 98, 102  
Sapovirus 1  
SAPS, 54, 176  
*Serine proteases*, 12  
Seroprevalencia, 31, 33, 95, 112

SIDA, 32, 135  
SiO<sub>2</sub>, solución, 168  
*Southern blotting*, 96, 171  
SSC, tampón, 172  
Standard, solución, 173  
*Staphylococcus spp.*, 97  
STE, tampón, 165  
sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, 119, 124, 159  
Sudáfrica, 26, 31, 77, 105, 110, 111  
Suspensión, tampón, 148  
T84, 9  
Tailandia, 31, 110  
TBE, tampón, 171  
TBS, tampón, 154  
TE, tampón, 165  
TNE, tampón, 151  
Torovirus, 2  
TRADD, 40, 41  
Transferencia, tampón, 154  
Transiciones, 77, 78, 79, 91  
Transplante médula ósea, 32, 99  
Transversiones, 77, 78, 79, 91  
TreeView, 78, 97, 176  
Tripsina, 8, 9, 10, 17, 118, 137, 146  
TUNEL, 119, 121, 125, 130, 131, 133, 134, 136, 161  
Uganda, 111  
USA, 1, 107  
3'UTR, 11, 26  
5'UTR, 11  
Vacuna, 1, 35, 113  
Venezuela, 26, 32, 71, 105, 109, 110  
Virus de la diarrea bovina (BVDB), 16, 52  
Virus de la enfermedad bursal infecciosa (IBDV), 135  
Virus de la enfermedad hemorrágica de conejos (RHDV), 12  
Virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), 135, 136  
Virus del sarcoma de Rous, 23  
Virus del SIDA (HIV), 135  
Virus *grapevine fanleaf virus*, 60, 65  
Virus Mayaro, 61,  
Virus porcino del síndrome reproductivo y respiratorio (PRRSV), 135  
Virus Sendai, 135, 136  
Virus Sindbis, 66, 135  
Virus vaccinia, 3  
*Virus like particles* (VLPs), 3  
VPg, proteína, 13  
*Western blotting*, 16, 19, 54, 58, 120, 127, 129, 135, 152  
*Yersinia spp.*, 97  
Z-IETD-FMK, 120  
Z-LEHD-FMK, 120  
Zoonosis, 6, 112