



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Mejora de la producción del virus de la hepatitis A mediante selección genómica y cruce molecular de cuasiespecies

Francisco Javier Pérez Rodríguez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Programa de Doctorado Microbiología Ambiental y Biotecnología
Departamento de Microbiología
Facultad de Biología

Mejora de la producción del virus de la hepatitis A mediante selección genómica y cruce molecular de cuasiespecies

Memoria presentada por Francisco Javier Pérez Rodríguez para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Barcelona

V.º B.º de la directora

V.º B.º de la tutora

V.º B.º del director

Rosa M. Pintó Solé

Rosa M. Pintó Solé

Albert Bosch Navarro

El doctorando

Francisco Javier Pérez Rodríguez

Barcelona, Noviembre de 2015

ÍNDICE

Agradecimientos	v
Abreviaturas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El virus de la hepatitis A.....	3
1.2 Organización genómica.....	3
1.3 Características de las partículas víricas	4
1.4 Ciclo replicativo.....	6
1.5 Uso de codones	12
1.6 Cuasiespecies y evolución molecular.....	15
1.7 Ciclo en el huésped y transmisión	19
1.8 Respuesta inmune y mecanismos de evasión.....	21
1.9 Manifestaciones clínicas.....	22
1.10 Epidemiología.....	25
1.11 Profilaxis	26
1.12 Adaptación a cultivo celular.....	28
1.13 Aplicaciones biotecnológicas de la producción del virus de la hepatitis A mediante cultivo celular.....	30
1.13.1 Producción de vacunas	30
1.13.2 Diagnóstico.....	31
1.14 Estrategias para incrementar la producción de antígeno viral en cultivo celular.....	31
2 PRÓLOGO	35
3 OBJETIVOS	39
4 CAPÍTULO 1	43
4.1 ANTECEDENTES.....	45
4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55

Índice

4.2.1	Diversidad del IRES en las poblaciones largamente adaptadas a multiplicar en presencia de AMD: las mutaciones U359C, U726C y U590C se encuentran presentes en un 37.5 %, 31.25 % y 25 % de haplotipos....57
4.2.1.1	Predicción de la estructura secundaria del RNA de los haplotipos del IRES encontrados en las poblaciones adaptadas a multiplicar en presencia de AMD: la mutación U590C produce un cambio en la estructura secundaria predicha del IRES59
4.2.1.2	La mutación U→C en la posición 726 cumple criterios para afectar a la actividad del IRES.....66
4.2.2	La combinación de las mutaciones U359C, U590C y U726C aumenta la actividad del IRES en células FRhK-4.....67
4.2.3	Efecto de las mutaciones U359C, U590C y U726C sobre la replicación vírica.....70
4.2.4	Diversidad de la región intermedia de VP1 (nucleótidos 2418-2834, correspondientes a los aminoácidos 71 a 209) en las poblaciones largamente adaptadas a multiplicar en presencia de AMD: varios haplotipos presentan un uso de codones más optimizado que la secuencia consenso.....74
4.2.5	Determinación de la velocidad de traducción de distintos haplotipos presentes en la región intermedia de VP1 de las poblaciones largamente adaptadas a AMD: la velocidad de traducción del haplotipo λ7 es superior a la de la secuencia consenso de F0.05LA79
4.2.6	Relación entre la velocidad de traducción y el RCDI de los haplotipos presentes en la región intermedia de VP1 de las poblaciones largamente adaptadas a AMD.....82
5	CAPÍTULO 2.....85
5.1	ANTECEDENTES.....85
5.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN97
5.2.1	Cruce molecular entre F0.05LA y F0.2LA: las poblaciones mixtas producen mayor cantidad de partículas infecciosas que las poblaciones de partida.....99
5.2.2	Cruce molecular entre F0.05LA y F0.2LA: existe una relación entre producción y porcentaje inicial de F0.2LA..... 101
5.2.3	El <i>fitness</i> relativo de F0.2LA es superior en condiciones de baja MOI: fenotipo colonizador 103
5.2.4	Las mutaciones U359C, U590C y U726C aumentaron su frecuencia en las poblaciones mixtas..... 105

5.2.5	Diversidad del IRES en el pasaje 30 de la población mixta 1:1 (F0.05LA:F0.2LA): predominio del haplotipo ϕ 16.....	107
5.2.6	Diversidad de la región intermedia de VP1 en el pasaje 30 de la población mixta 1:1 (F0.05LA:F0.2LA): predominio del haplotipo λ 7	109
5.2.7	Determinación del efecto de las mutaciones U359C, U590C y U726C sobre la velocidad de traducción de los haplotipo λ 6 y λ 7	114
5.2.8	La secuencia consenso del pasaje 30 de la población mixta 1:1: población HM-175-HP	116
6	DISCUSIÓN GENERAL	123
7	CONCLUSIONES	129
8	MATERIALES Y MÉTODOS	133
8.1	Poblaciones víricas	135
8.2	Líneas celulares	136
8.3	Secuenciación masiva ultra-profunda de los fragmentos de 5'NCR y VP1	137
8.3.1	RT-PCR.....	139
8.3.2	Precipitación del DNA con etanol	141
8.3.3	Adición de los identificadores para la construcción de la librería	142
8.4	Predicción de la estructura secundaria del RNA.....	143
8.5	Estudio del grado de conservación de los nucleótidos implicados en la posible formación de estructuras secundarias en el IRES	143
8.6	Análisis de la actividad del IRES mediante el uso de vectores bicistrónicos	144
8.6.1	Obtención de los plásmidos bicistrónicos mutagenizados	146
8.6.2	Preparación de plásmidos a altas concentraciones	153
8.6.3	Transfección transitoria de células FRhK-4 con plásmidos bicistrónicos.....	153
8.6.4	Medición de la actividad bioluminiscente	154
8.7	Análisis de la replicación de transcritos que contienen el genoma completo del HAV	156
8.7.1	Obtención de RNA infeccioso mediante transcripción <i>in vitro</i>	157
8.7.2	Transfección de células FRhK-4 y AGMK GL37 con transcritos de RNA.....	160

Índice

8.7.3	Cuantificación de la cadena negativa del genoma del HAV en células transfectadas	161
8.8	Obtención de poblaciones del HAV a partir de distintas mezclas de las poblaciones F0.05LA y F0.2LA	165
8.9	Cuantificación del título infeccioso de las suspensiones del HAV: cálculo de la TCID50/célula	166
8.10	Análisis del tamaño de las calvas.....	167
8.11	Amplificación de VP0 y de la región 5'NCR para estudiar la proporción de F0.05LA y F0.2LA y de las mutaciones U359C, U590C y U726C en las poblaciones mixtas.....	169
8.12	Cálculo de la entropía normalizada de Shannon	170
8.13	Obtención de la secuencia consenso del genoma completo de la población HP	170
8.14	Análisis estadístico.....	172
9	BIBLIOGRAFÍA	173

Agradecimientos

Estas líneas —las únicas que con seguridad leerá alguien aparte de los miembros del tribunal y mis directores— son una modesta ofrenda, escrita de la forma más sincera que he podido, hacia aquellos con los que me siento en deuda en relación con esta tesis.

First and foremost, tengo que dar las gracias a mis padres y mi hermana. Su apoyo, ánimos y cariño han sido fundamentales, siempre.

Albert y Rosa me han permitido llevar a cabo el ciclo de vida de una tesis, desde la matrícula hasta la defensa. Les agradezco especialmente que me hayan dado la oportunidad de seguir en el lab un par de años postbeca y las horas que han invertido durante estos últimos meses en aconsejarme y ayudarme a corregir los dislates que iba colando en la redacción de este texto. No fueron pocas las horas ni pocos los errores.

Debo mucho a la gente del grupo, con la que he compartido cabinas, enzimas y muchas horas de lab. A Luitxi, de quien heredé los materiales y los métodos que son los cimientos de esta tesis y que me sirvieron para descubrir que aborrezco la criptografía. A Mari y Daisuke, mis primeros mentores en el grupo, que fueron siempre tolerantes con mis torpezas. A Nerea, una mujer fuerte y honesta, le agradeceré siempre que me brindara su amistad cuando era un recién llegado. Cristina, una de las personas más inteligentes y sensibles que he tenido el privilegio de conocer. Gracias por todos tus consejos y tu ayuda altruista. Anna, todos te debemos algo en este grupo. Gracias por tus incesantes esfuerzos durante estos años y por preguntarme cómo llevaba la tesis de una manera casi igual de incesante. Lucía, amiga y confidente durante años. Compañera de mesada, fiestas, viajes y actividades variopintas. Tardaría días en contar todo lo que hizo por mí o las experiencias que vivimos juntos. Aurora, tu sentido del humor y dulzura me han resultado siempre tan familiares como agradables. Gracias también a Montse, Noemí, Susana y el resto de miembros y exmiembros del grupo por haber aguantado con tanta paciencia y educación las canciones horteras, los comentarios

Agradecimientos

inapropiados y tantos otros sonidos que salieron innecesariamente de mi boca durante estos años.

Patxi, gracias por compartir conmigo tu despacho... y tu cultura, paseos, salidas nocturnas, platillos, vinillos y emotivas conversaciones, en las que, despojados de toda formalidad, nos movíamos con naturalidad desde los temas más banales hasta los más profundos. ¡Viva la numeración!

A los josos (Pedro, Albert Jr., Chano y el Chino), cuyo cóctel de buen humor e inteligencia tanto me ha divertido, les deseo el mayor de los éxitos en lo que se propongan: hacer la revolución, conquistar el mundo, enseñar ciencia a díscolos adolescentes, romper corazones...

A la gente del laboratorio 4, que por azar me tuvo que soportar, y por gusto me ayudó cuando lo necesité (Juanda, Jorge, Marta, las Sonias, Tania, Mario, Paula, Carlos...) le guardo mucho respeto, aunque pueda parecer que lo guardo bajo llave. Gente *güena*, mayormente. En cuanto a la gente de otros labos, no puedo dejar de nombrar a Chus, otra *rara avis*, cuya compañía siempre me resultó tan reconfortante.

También quiero dar las gracias a los VS, con los que tanto me he divertido durante estos últimos dos años a base de memes, audios, anécdotas, anecdotillas y hachepés. Gracias a Davichocos, Piston, Romen, Cuñi y su cuñyvada, Guy y Memelito. Y también a Pajedo. ¿Por qué no? Y a los melafitos, por supuesto.

A la gente que he conocido en esta ciudad (fuera del entorno científico) y ha hecho que mis días en ella resultaran mucho más agradables. Algunos compañeros de piso, de los tantos pisos, fueron y son también mis amigos. Recuerdo con especial cariño a La Tana y a Pablo, ahora a un océano de distancia. Mucho más cerca, en espacio y tiempo, a Amai y a Alessandro. Muchas mesas en el barrio nos han visto reír y lamentarnos juntos, empezando por la mesa del Salón. ¿Y cómo olvidarme de Claudia, Elisa, Lavinia y Cathaysa? Ojalá pudiera dedicarle un libro de poemas a cada una.

Quiero terminar con unas palabras para aquellos que nunca podrán saber que les estoy agradecido, porque no son personas, sino disciplinas, artes, sustancias,

personajes de ficción u objetos, pero cuya ayuda ha sido crucial para mí: el yoga, la música, la capsicina y otros compuestos químicos, Héctor el de Príamo y la figura de acción de Robin con sus múltiples articulaciones.

Abreviaturas

3D^{pol}: RNA polimerasa RNA dependiente
5'NCR: región 5' no codificante
aa: aminoácidos
AGMK: células de riñón de mono verde africano
AMD: actinomicina D
cDNA: DNA complementario
C-terminal: carboxilo terminal
cre: elemento cis-regulador
ECP: efecto citopático
eHAV: partículas del HAV pseudoenvueltas
eIF2: factor de iniciación eucariota 2
eIF4A: factor de iniciación eucariota 4A
eIF4G: factor de iniciación eucariota 4 gamma
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HAV: virus de la hepatitis A
HAVcr-1: receptor celular del HAV de tipo 1
IFN: interferón
IRES: sitio interno de entrada del ribosoma
FLuc: *firefly luciferase*
FMDV: virus de la fiebre aftosa
FRhK-4: células de riñón fetal de mono Rhesus
IgA: inmunoglobulina A
IgG: inmunoglobulina G
IgM: inmunoglobulina M
MBL: *multibranch loop*
MEM: medio esencial mínimo
MID: *multiplex identifier*
MOI: multiplicidad de infección
mRNA: RNA mensajero
NEAA: aminoácidos no esenciales

Abreviaturas

N-terminal: amino terminal

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pIgR: receptor polimérico de inmunoglobulinas

poli-A: poliadenina

PTB: proteína de unión a trectos de polipirimidinas

pY: tracto pirimidínico

qPCR: PCR cuantitativa

RBD: dominio de unión a RNA

RCDI: índice relativo de deoptimización de codones

RLuc: *Renilla luciferase*

RT: retrotranscripción

SFB: suero fetal bovino

SFBi: suero fetal bovino inactivado

TCID₅₀: dosis infecciosa que provoca la destrucción del 50% de las monocapas celulares

tRNA: RNA de transferencia

U: unidad enzimática

UT₅₀: tiempo necesario para conseguir la desencapsidación del 50% de los virus

wt: *wild type*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El virus de la hepatitis A

Se ha considerado clásicamente al virus de la hepatitis A (VHA o, en inglés, HAV) como un virus no envuelto y se ha adscrito al género *Hepatovirus* (el único miembro del género descrito hasta el momento), de la familia *Picornaviridae*, orden *Picornavirales* [1]. Recientemente se ha descrito que el virus sale de la célula envuelto en membranas provenientes de la misma, que le protegen de la neutralización mediada por anticuerpos, y circula de esta manera por la sangre [2]. Estas membranas no poseen glicoproteínas codificadas por el virus, y es por eso que se ha propuesto que estas partículas son pseudoenvueltas. El virus que es excretado en las heces se encuentra, sin embargo, en forma de virión no envuelto. Estas partículas no envueltas son estables a pH bajo y resistentes a calor y desecación, lo cual permite al virus sobrevivir en el ambiente [3]. Esta doble estrategia de vida, pseudoenvuelto durante su paso por la sangre y libre de membranas pero resistente en el ambiente, le otorga grandes posibilidades de transmitirse dentro y entre huéspedes [4].

1.2 Organización genómica

El genoma del virus de la hepatitis A (HAV) consiste en un RNA de cadena sencilla y sentido positivo. La longitud del genoma es de 7.5 kilobases aproximadamente [5]. No contiene *cap* y se encuentra unido covalentemente a una proteína VPg en su extremo 5'. Consta de una región 5' no codificante, que alberga el IRES (sitio interno de entrada del ribosoma), un único marco de lectura abierto y una región 3' no codificante que termina en una cola poli-A. El IRES del HAV se considera tan distinto al del resto de IRES de picornavirus como para ser el único representante del tipo III en la clasificación de IRES de los picornavirus. Recientemente se ha descrito en focas un picornavirus, emparentado con el HAV, cuyo IRES conserva estructuralmente una región que es clave en el IRES del tipo III [6]. El IRES del HAV resulta muy poco eficiente dirigiendo la traducción [7][8]. Se ha postulado que al principio de la región codificante existen regiones de parada de los ribosomas, por lo que se ha sugerido que la presencia de un IRES más eficaz sería contraproducente, puesto que los ribosomas disponibles se concentrarían en unas pocas moléculas de RNA [9].

Introducción

El tercio aminoterminal de la región codificante (P1) contiene la información para producir las proteínas de la cápside, mientras que el resto (P2 y P3) codifica para proteínas no estructurales, requeridas para la replicación del virus: 2B, 2C, 3A, 3B (es la proteína VPg) 3C^{pro} (una cisteín-proteasa responsable de la mayoría de cortes postraduccionales en la poliproteína) y 3D^{pol} (la RNA polimerasa RNA dependiente) (ver **Figura 1**).

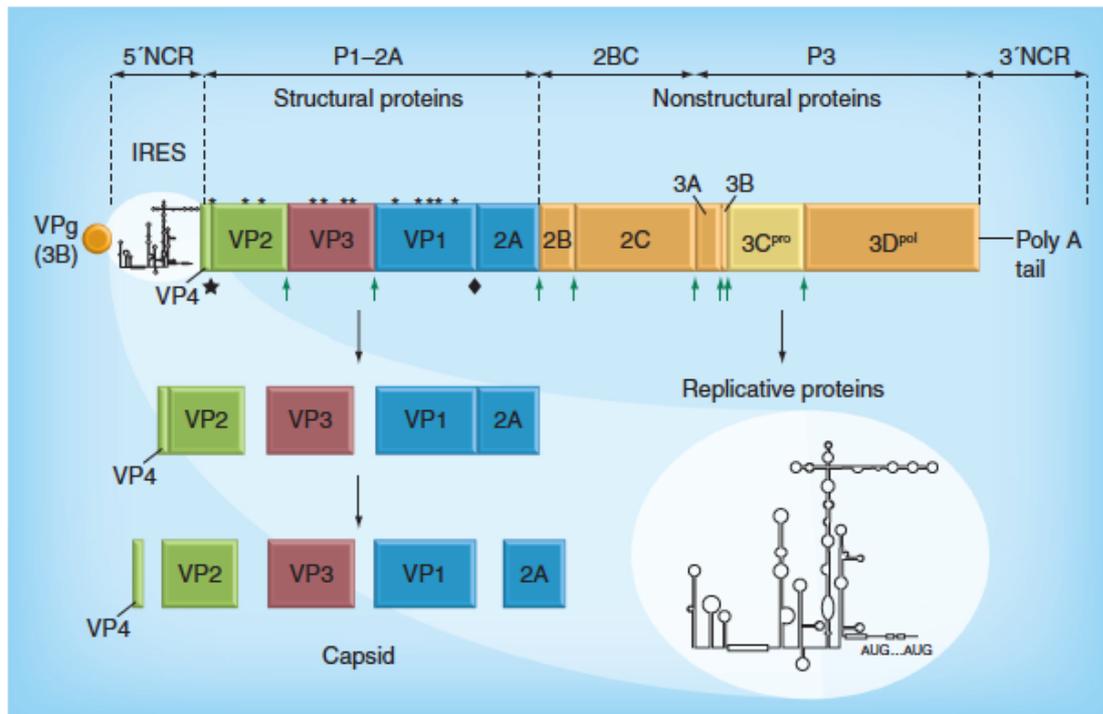


Figura 1 Organización genómica del HAV y procesamiento proteolítico de la poliproteína. La proteasa vírica (3C^{pro}) es la encargada de clivar todos los puntos de corte de la poliproteína (flechas verdes) salvo dos: una proteasa celular escinde 2A de la cápside (diamante), en un paso tardío del proceso de morfogénesis, y una actividad proteolítica desconocida produce el corte entre VP4 y VP2 (estrella), último paso en el proceso de maduración de la cápside. Los asteriscos indican la ubicación de los clusters de codones raros que se localizan en la región codificante de la cápside. Imagen extraída de [10].

1.3 Características de las partículas víricas

El coeficiente de sedimentación de las partículas víricas es de 156-160 S y su densidad de flotación en cloruro de cesio de 1.33-1.34 g/cm³. La cápside, con simetría icosaédrica, se construye a partir de cuatro proteínas: VP1, VP2, VP3 y VP4 (75). Se han descrito tres tipos diferentes de partículas del HAV con capacidad antigénica: los viriones contienen RNA unido covalentemente a la proteína VPg

envuelto por una cápside compuesta por las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4; los proviriones (viriones inmaduros) también contienen RNA, pero la cápside que lo rodea está compuesta por las proteínas VP1, VP0 y VP3; las procápsides (cápsides vacías) tienen la misma composición proteica que los proviriones, pero no albergan RNA en su interior [11].

Se dudaba de que VP4, extremadamente pequeña en HAV en comparación con otros picornavirus y esencial para la formación del virión, se encontrase en las partículas maduras [12]. Sin embargo, recientemente se ha detectado VP4 en viriones maduros mediante cristalografía de rayos X [13]. La determinación estructural mediante rayos X también ha revelado características de la superficie externa del HAV diferentes a las observadas en otros picornavirus. La superficie de aquél es bastante lisa; no presenta ni bolsillo hidrofóbico en VP1, ni factor de bolsillo (una molécula no proteica que se encuentra en algunos enterovirus y rinovirus y que se une a la cápside, dándole estabilidad. Su liberación del bolsillo es un requisito para la desencapsidación). Este hecho, junto a la extrema resistencia que presenta el virus a la degradación por pH bajo y altas temperaturas, sugiere que ha adoptado un mecanismo de desencapsidación diferente a los descritos hasta ahora en su familia [14]. Los rino- y enterovirus cuyos receptores celulares pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas presentan, en la superficie de su cápside, una depresión o cañón alrededor de cada eje quinario, la cual se une al receptor celular. Esta unión provoca cambios conformacionales, desestabilizando el virus, iniciándose de esta manera el proceso de desencapsidación. La liberación del factor de bolsillo es un requisito para la desencapsidación en estos virus [15][16]. La cápside del virus de la hepatitis A muestra características intermedias entre las de dicistrovirus, una familia de virus que infectan a insectos y las de picornavirus de mamíferos.

Para llegar hasta su tejido diana el virus debe superar condiciones muy adversas. Durante la fase inicial del ciclo infeccioso, el virión debe resistir el pH ácido del estómago y la acción de las proteasas intestinales y detergentes (especialmente las sales biliares). Durante su tránsito a través de la circulación portal hepática, debe escapar a los mecanismos de limpieza del huésped, como la eliminación por unión a eritrocitos [17] o la neutralización mediada por

Introducción

anticuerpos, lo cual le resulta más sencillo en su forma pseudoenvuelta [2]. Durante la fase de salida a través de las vías biliares y el intestino, vuelve a encontrarse con proteasas y sales biliares. Y, efectivamente, el HAV es un virus altamente resistente a pH bajo, detergentes y proteasas [18], lo que nos indica que la cápside es altamente estable y cohesiva, fruto de un plegamiento preciso, al cual contribuye la lenta y controlada cinética de traducción de las proteínas estructurales [19]. Además, la cápside tiene una conformación a pH neutro que le permite escapar de la unión a la glicoforina presente en la membrana eritrocitaria [20].

El virus presenta poca variedad antigénica, habiéndose encontrado un único serotipo y unos pocos sitios antigénicos [10]. Mediante el uso de anticuerpos monoclonales y el análisis de mutantes de escape se han detectado varios determinantes antigénicos. Algunos residuos de las proteínas VP1 y VP3, en su conformación nativa, forman un epítipo inmunodominante [21][22]. Éste está compuesto por múltiples epítopos discontinuos, definidos por diferentes anticuerpos monoclonales. Existe otro sitio antigénico independiente en VP1, identificado a partir de mutantes en el residuo 221 de esta proteína, y reconocido por el anticuerpo H7C27 [21][22]. Este anticuerpo, junto con uno policlonal anti-VP3 (103-121) reconoce el sitio de unión a glicoforina A, una sialoglicoproteína presente en las membranas de los eritrocitos, y a través de la cual el virus puede hemaglutinar eritrocitos (se ha sugerido que las glicoproteínas de los eritrocitos podrían cumplir la función de receptores señuelo, de manera que mantendrían a los patógenos alejados de sus tejidos diana [23]) [20]. Otro epítipo permanece indefinido, pues no se han encontrado mutantes que no sean neutralizados por el anticuerpo 4E7 [21][22]. Haciendo uso de péptidos sintéticos que representan partes de la secuencia primaria de las proteínas de la cápside se definió un epítipo continuo en VP3, diferente a los mencionados anteriormente [24].

1.4 Ciclo replicativo

El virus de la hepatitis A replica en hepatocitos, aunque se han detectado antígenos del virus en diferentes células y órganos de primates, como células de Kupffer [25], en células epiteliales de las criptas intestinales y en las células de la

lámina propia del intestino delgado [26]. Para la interacción del virus con la superficie de la célula y entrada en la misma se han planteado varios mecanismos. El receptor celular del HAV de tipo 1 (HAVcr-1/TIM-1/KIM-1), una glicoproteína transmembrana, media la entrada del HAV en células de riñón de mono verde africano [27]. El dominio extracelular del receptor HAVcr-1 contiene una región N-terminal rica en cisteínas (D1), que presenta homología con la superfamilia de las inmunoglobulinas, seguida de una región rica en treonina, serina y prolina (TSP-rich), lo cual es característico de las glicoproteínas tipo mucinas [27]. Proteínas de fusión que contienen la región D1 del receptor HAVcr-1 se unen a partículas del HAV y las alteran [28][29]. Recientemente se ha descrito que HAVcr-1 media en el proceso de entrada de algunos virus envueltos [30]. El homólogo humano (huHAVcr-1) fue identificado y caracterizado como un receptor humano del HAV [31]. Debido a que esta molécula se expresa en una gran variedad de tejidos, es probable que se requieran otros correceptores para la unión y la entrada del HAV en hígado. Por ejemplo, se ha propuesto que la proteína humana Tim-3 (que muestra homología significativa con huHAVcr-1) promueve la entrada del virus en las células dianas, pero sin ser ella misma un receptor del virus [32]. En otro mecanismo de entrada propuesto, las partículas infecciosas del HAV recubiertas de IgA se unirían al receptor de asialoglicoproteína (ASGPR, el cual se encuentra principalmente en el hígado), que las internalizaría [33]. En ratones que son inoculados de forma intravenosa e intraperitoneal con el virus ligado a IgA o en forma libre, los complejos HAV-IgA alcanzan el hígado en mayores cantidades [34]. Sin embargo, la presencia de IgA anti-HAV no es necesaria para que se produzca infección. Un ejemplo de ello es que la transfección directa de hígados de primates con cDNA/cRNA del HAV infeccioso en ausencia de anticuerpos anti-HAV dio como resultado hepatitis aguda en los primates [35]. Teniendo en cuenta que la IgA también se une a HAVcr-1, y que esta unión potencia a su vez la unión entre el virus y el receptor HAVcr-1, ambos mecanismos podrían explicar cómo entra en los hepatocitos el virus envuelto en IgA.

Se ha sugerido que, tras interactuar con el receptor o receptores celulares, la partícula vírica es internalizada mediante endocitosis mediada por receptor, ya que la infección por HAV puede ser inhibida por la cloroquina, un

Introducción

inhibidor de la acidificación del endosoma. Sin embargo, el hecho de que otros inhibidores de la bajada de pH en el endosoma no inhiban la replicación del virus, y que las partículas del HAV sean estables en condiciones acídicas, han hecho dudar de esta vía de entrada [36][37][38]. La interacción del virus con el receptor desestabiliza la partícula [29], lo que da comienzo al proceso de desencapsidación y liberación del RNA vírico en el citoplasma de la célula hospedadora. Además, la exposición del virus a condiciones acídicas provoca cambios conformacionales en las partículas del HAV, dando lugar a partículas más hidrofóbicas, y ayuda al clivaje de VP0, que convierte los proviriones inmaduros en viriones [36]. En HAV la desencapsidación es un proceso muy lento, al menos en estudios *in vitro* con cepas adaptadas a cultivo celular, en comparación con la mayoría de picornavirus (varias horas frente a 30-60 minutos) [37][11][39]. Además, la cinética de desencapsidación del virus es asincrónica. Esto puede deberse a que, normalmente, en los inóculos existe una mezcla de partículas víricas infecciosas (viriones y proviriones) que presentan distintos tiempos de desencapsidación [11]. El clivaje de VP0 podría tener relevancia en el proceso, ya que se cree que solo los viriones son capaces de desencapsidar en la célula huésped [40]. Esta podría ser la causa última de la asincronía en la desencapsidación del virus. Por otra parte, la proteína de la cápside VP4, que a diferencia de lo que ocurre en otros picornavirus no requiere ser miristoilada [41], produce poros en liposomas con una composición lipídica parecida a la de los endosomas tardíos, por lo que se ha propuesto que esta proteína podría ayudar al genoma del virus a escapar del endosoma [42].

Una vez que el RNA se encuentra en el citoplasma, tiene lugar una traducción del genoma vírico, que en el caso del HAV es independiente de *cap* gracias a un IRES (sitio interno de entrada del ribosoma) situado en la región 5' no codificante. La mayoría de picornavirus provocan un corte proteolítico en el factor de iniciación eucariótico 4G (eIF4G), con lo que interfieren en la síntesis de proteínas celulares. Esto no ocurre en HAV, por lo que el virus tiene que competir con los mRNA celulares a la hora de traducir su genoma. La traducción da lugar a una única poliproteína que es procesada co- y postraduccionalmente. Este procesamiento es necesario para liberar las proteínas estructurales y no

estructurales y que se puedan llevar a cabo la replicación genómica y el ensamblaje de la cápside. La proteína 2A no presenta actividad proteolítica, siendo 3C^{pro} la única proteinasa conocida codificada por el virus, lo cual es único entre los picornavirus conocidos [43].

El clivaje primario de la poliproteína tiene lugar en la intersección de las proteínas 2A y 2B, dando lugar a P1-2A (en otros picornavirus el clivaje primario ocurre entre P1 y 2A), y es llevado a cabo por 3C^{pro} [44][45]. La proteína precursora de la cápside resultante (P1-2A) es clivada a continuación por la misma proteasa, originando las proteínas VP0, VP3 y VP1-2A (también llamada PX) [46], que se asocian formando pentámeros [47], proceso en el cual la proteína 2A juega un papel importante [43]. Las proteínas no estructurales también son liberadas mediante la acción de 3C^{pro}. El corte de VP1-2A, producido por una proteasa celular (se ha descrito que la proteasa lisosomal catepsina L es capaz de cortar VP1-2A *in vitro* [48]) en un paso tardío del proceso de morfogénesis, libera la proteína madura VP1, lo cual no parece ser un paso esencial para la formación de las partículas, pero sí para que éstas sean altamente infecciosas [43][49]. Este corte genera proteínas VP1 con pequeñas diferencias en su extremo C terminal. Así, en los viriones maduros existiría una mezcla de diferentes VP1 [50]. Recientemente, Feng y colaboradores [2] han propuesto que VP1 forma parte de la cápside de los viriones desnudos, mientras que VP1-2A se encuentra en las eHAV, y la disociación de VP1 y 2A se produciría una vez que el virus ha perdido la membrana. El clivaje de VP0, que da lugar a VP4 y VP2, y transforma los proviriones en viriones maduros, incrementando la infectividad específica de las partículas víricas, es producto de una actividad proteolítica desconocida [51] (ver **Figura 1**).

El mismo RNA que da lugar a las proteínas víricas es utilizado como molde por la RNA polimerasa viral para la producción de copias complementarias de sentido negativo. Por tanto, la traducción y la síntesis de la cadena negativa son procesos que compiten y se ejecutan en direcciones opuestas. Determinados cortes producidos por la proteasa vírica podrían ayudar a que se produzca principalmente la síntesis de RNA a expensas de la traducción vírica. 3C^{pro} corta la proteína celular proteína de unión a la cola de poli-A (PABP), separando el dominio

Introducción

N-terminal (de unión a RNA), del C-terminal (de interacción con proteínas). *In vitro*, el dominio N-terminal tiene un efecto negativo sobre la traducción que depende del IRES del HAV, y una mayor afinidad por pY1 (el primer tracto polipirimidínico de la región 5' no codificante del RNA del virus), un elemento estructural que es esencial para la replicación del HAV [52]. PCBP2 (*poly(rC) binding protein 2*), una proteína celular con múltiples funciones en el control postranscripcional de la expresión génica, también interacciona con pY1 y es clivada por 3C^{pro}. Este corte, que modifica la afinidad de PCBP2 por pY1, también podría ayudar a dar paso a la síntesis de RNA vírico [53].

La replicación del genoma vírico se lleva a cabo en complejos de replicación, que consisten en membranas celulares reordenadas, que contienen proteínas víricas y celulares. Las proteínas víricas 2C y 2BC juegan un papel importante en la reorganización de las membranas para dar lugar a los complejos de replicación [54][55]. Estos complejos se han descrito como redes vesicular-tubulares, y existe controversia sobre su origen, pues unos lo han situado en el retículo endoplasmático [54][55] y otros sugieren que la replicación podría tener lugar en la membrana mitocondrial externa [56]. En cualquier caso, en estos complejos se produce la transcripción del genoma vírico en RNA antisentido, que a su vez sirven de molde para la producción de nuevos genomas víricos, que servirán para comenzar nuevos ciclos de replicación y/o para sintetizar más proteínas víricas. Estas transcripciones son llevadas a cabo por 3D^{pol}, con la ayuda de otras proteínas, tanto víricas como celulares, y el elemento *cis*-regulador (*cre*, de *cis-acting RNA element*, una pequeña horquilla de RNA localizada cerca del extremo 5' de la secuencia codificante 3D^{pol} [57]). La proteína 3AB interacciona con membranas a través de la región carboxi-terminal de 3A. Se ha sugerido que, de esta manera, 3A serviría para anclar a membranas las proteínas y el RNA que forman parte del complejo de replicación [58]. El proceso comienza con la nucleotidilación de una tirosina de la proteína VPg (3B) por parte de 3D^{pol}, usando el elemento *cre* como molde. Esto proporciona un grupo hidroxilo libre que puede ser prolongado por la RNA polimerasa vírica. 2C es otra proteína vírica que podría estar implicada en el proceso, anclando las moléculas de RNA antisentido a las membranas del complejo de replicación [59].

En la formación de la cápside vírica las dos regiones terminales de la proteína precursora P1-2A cumplen funciones distintas. Por un lado, como se ha dicho, 2A interviene en el ensamblaje de los protómeros para formar pentámeros. En varios picornavirus, la formación de la cápside parece depender de la N-miristoilación de VP4 [60][61]. En HAV, esta proteína es necesaria para que se ensamble la cápside a partir de 12 pentámeros [12], a pesar de que el virus no requiere la miristoilación de la misma para crecer en cultivo celular [41]. Un modelo del ensamblaje en picornavirus propone que los pentámeros se condensan alrededor del RNA vírico [62][63]. Un modelo alternativo sugiere que primero se forma una cápside vacía a partir del ensamblaje de los pentámeros y luego penetra el RNA en ella [64].

El mecanismo de liberación del virus parece depender del tipo de célula infectada. En Caco-2 (células que, aunque derivadas de un carcinoma de colon, se diferencian y polarizan de manera que se asemejan a las células epiteliales del intestino delgado al ser cultivadas bajo condiciones específicas [65]) los virus se liberan casi exclusivamente a través de la superficie apical [66]. Mientras que en otro estudio realizado en hepatocitos humanos polarizados, más del 95% de la progenie vírica fue exportada a través de la membrana basolateral (hacia el torrente sanguíneo), siendo minoritaria la excreción a través de la membrana apical (hacia los canalículos biliares) [67]. Se piensa que puede estar implicada, bien una ruta celular normal de transporte de proteínas mediada por vesículas, bien un mecanismo específicamente hepatocelular de transporte de proteínas que forma parte de la secreción de bilis. Según Feng y colaboradores, los proviriones se envuelven en membranas (de 1 a 3 por vesícula), en un proceso que depende de proteínas celulares asociadas con el complejo ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*) y abandonan la célula como partículas pseudoenvueltas (eHAV) [2]. En cualquier caso, los mecanismos de entrada y salida celular del virus de la hepatitis A continúan siendo objeto de controversia e investigación. Un esquema general del ciclo replicativo del virus puede verse en la **Figura 2**.

Introducción

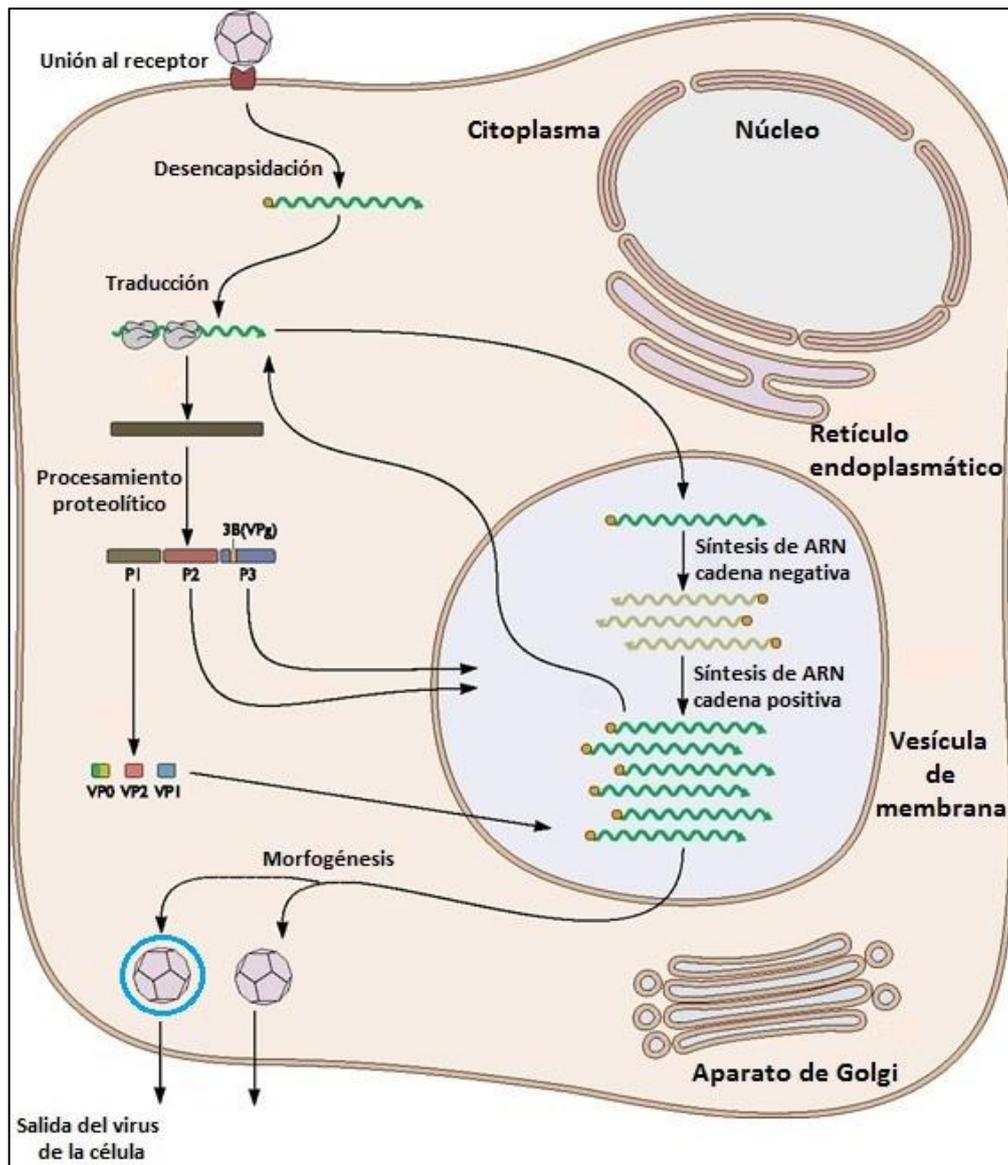


Figura 2 Esquema del ciclo replicativo celular del HAV. Imagen adaptada de [68], adaptada a su vez de [69]

1.5 Uso de codones

Relacionado con la ausencia de bloqueo de la traducción celular y la consiguiente competencia del RNA del HAV con el traslatoma celular por los tRNA cargados con sus correspondientes aminoácidos, está otra de las diferencias entre el HAV y la mayoría de picornavirus: su uso de codones. El HAV presenta un uso de codones sesgado y antagónico al de las células humanas [19]. Dentro de cada familia de codones sinónimos, el codón más utilizado por la célula no coincide con el más utilizado por el HAV, siendo aquél utilizado como raro por el virus en algunos casos. Inversamente, los codones más abundantes en el genoma del HAV

no lo son en el conjunto de transcritos expresados por el genoma humano [19]. Se ha interpretado esta deoptimización en el uso de codones como una estrategia para minimizar la competición por los tRNA [19]. Esta deoptimización puede ser otro de los factores que contribuyan a la lenta replicación y baja productividad del virus (**Tabla 1**). Recientemente se ha descubierto en focas un picornavirus filogenéticamente relacionado con el HAV que comparte con él, entre otras características genéticas y fenotípicas, esta estrategia en el uso de codones [6].

Los codones raros, en lugar de repartirse al azar, suelen concentrarse en clústeres [70]. Estos acúmulos de codones infrecuentes pueden provocar paradas transitorias de la maquinaria traduccional, debido a que los tRNA que aparean con estos codones se encuentran en concentraciones bajas dentro del pool de tRNA (existe una fuerte correlación entre la frecuencia de uso de un codón y el nivel de su tRNA cognato) [71][72][73]. Además, los codones situados en regiones del mRNA de traducción lenta tienden a formar estructuras secundarias que podrían alargar estas pausas traduccionales [74]. Dichas pausas permitirían asegurar un correcto plegamiento y formación cotraduccional de estructuras, antes de que surjan del ribosoma secuencias situadas más cerca del extremo C-terminal que puedan interferir negativamente en la generación de las mismas [75]. Se ha propuesto que esto se cumple también en el caso del HAV, ya que la región que codifica para la cápside presenta clústeres de codones raros altamente conservados localizados en los extremos carboxilo de elementos estructurados [19] (ver **Figura 1**). La necesidad de asegurar un plegamiento correcto de las proteínas estructurales del virus podría estar relacionada con la alta estabilidad y cohesividad que presenta su cápside. Éstas características son beneficiosas (si no necesarias) para un virus de transmisión fecal-oral que ha de sobrevivir durante tiempos prolongados fuera del hospedador [9].

Introducción

Tabla 1 Porcentajes de cada codón con respecto a su sinónimo más abundante, calculado a partir de tablas de uso de codones de HAV y humano. Adaptada de [19]

Aminoácido	Codón	HAV	Célula humana
ARG	AGA	100	100
	AGG	29	99
	CGC	3	87
	CGU	3	38
	CGA	3	51
	CGG	1	95
LEU	UUG	100	32
	UUA	52	19
	CUU	46	33
	CUG	25	100
	CUA	9	17
	CUC	7	49
SER	UCU	100	77
	UCA	84	62
	AGU	32	62
	UCC	28	91
	UCG	5	22
	AGC	5	100
THR	ACU	100	69
	ACA	91	79
	ACC	18	100
	ACG	4	32
PRO	CCU	100	88
	CCA	89	85
	CCC	20	100
	CCG	2	26
ALA	GCU	100	66
	GCA	61	56
	GCC	30	100
	GCG	1	26
GLY	GGA	100	73
	GGU	58	48
	GGG	34	73
	GGC	28	100
VAL	GUU	100	39
	GUG	46	100
	GUA	18	25
	GUC	13	52
LYS	AAA	100	76
	AAG	59	100
ASN	AAU	100	88
	AAC	19	100
GLN	CAA	88	35
	CAG	100	100
HIS	CAU	100	71
	CAC	22	100
GLU	GAA	100	72
	GAG	77	100
ASP	GAU	100	86
	GAC	19	100
TYR	UAU	100	79
	UAC	26	100
CYS	UGU	100	83
	UGC	26	100
PHE	UUU	100	85
	UUC	27	100
ILE	AUU	100	76
	AUA	32	35
	AUC	16	100

1.6 Cuasiespecies y evolución molecular

Durante el proceso de replicación se genera variabilidad genética mediante los mecanismos de mutación, recombinación y reasociación de fragmentos. En el caso de virus de RNA, la replicación es llevada a cabo por polimerasas que presentan altas tasas de mutación, debido a que carecen de actividad correctora de errores. Dado que el tamaño de los genomas de estos virus es cercano al inverso de su tasa de mutación, es improbable que la progenie de un virus de RNA sea idéntica a su genoma parental, incluso en el caso de una célula infectada con un único genoma [76]. Las tasas de replicación de estos virus son altísimas, de manera que sus poblaciones están formadas por un gran número de individuos. Ambos hechos (altas tasas de mutación y de replicación) son los responsables de que las poblaciones de virus RNA estén formadas por complejas distribuciones de mutantes diferentes, pero relacionados, llamadas cuasispecies (para una revisión actual de las cuasispecies víricas, leer [76]), y que su evolución pueda ser de cientos a millones de veces más rápida que la de los organismos basados en ADN [77][78]. Estas nubes de mutantes se encuentran sujetas a continuos procesos de variación genética, cooperación y competencia entre las variantes generadas y selección de las distribuciones que mejor se adapten a un ambiente determinado [76]. Por lo tanto, las cuasispecies víricas no son una simple colección de mutantes diversos, sino un grupo de variantes que interactúan.

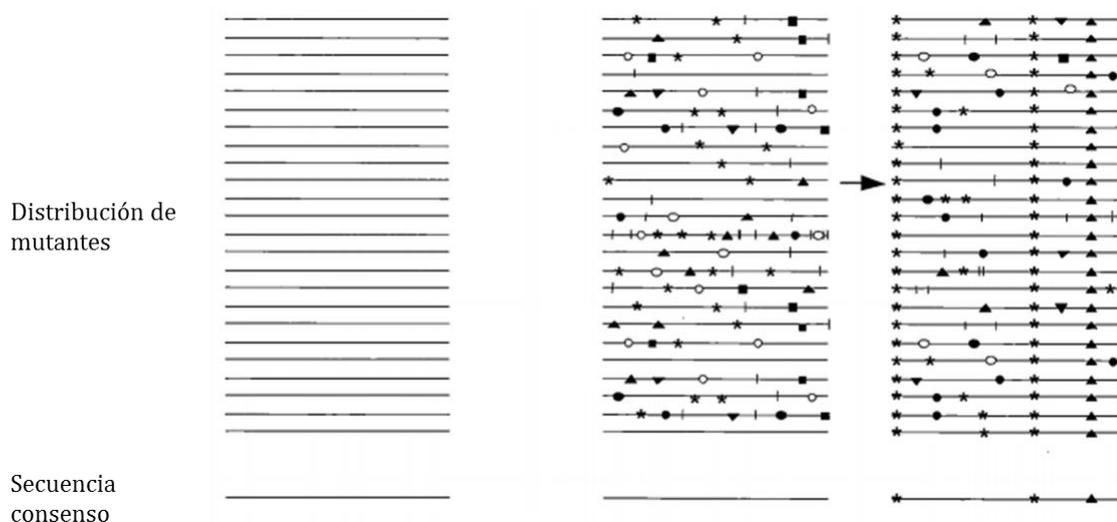


Figura 3 Representación esquemática de cuasispecies víricas. Los genomas individuales se representan mediante rayas horizontales y los símbolos sobre estas rayas representan mutaciones.

Introducción

La distribución de la izquierda es homogénea, mientras que las otras dos son genéticamente heterogéneas, como ocurre en las cuasiespecies víricas. Las líneas inferiores representan la secuencia consenso o promedio de la población, la que se obtiene de asignar a cada posición el residuo más frecuente en la distribución. Obsérvese que la distribución del centro y la de la izquierda tienen la misma secuencia consenso. La flecha indica la formación de una nueva distribución (la de la derecha) a partir de uno de los genomas de la distribución central, ya sea debido a un muestreo aleatorio o a un proceso selectivo. Esta nueva distribución se caracteriza por presentar una secuencia consenso distinta, debido a las mutaciones que contenía el genoma parental. Adaptado de [79].

Todos los miembros de la cuasiespecie contribuyen a perpetuar la población, debido a las interacciones entre los mismos. El conjunto de mutantes constituye, por tanto, la unidad de selección [80]. Mientras que, según el modelo clásico darwiniano, la secuencia silvestre sería la que predomina en una población, ya que prolifera más eficientemente bajo las condiciones en que vive, en un cuasiespecie no existe un genoma definido de forma preciso, sino una secuencia consenso que representa la media de todos los mutantes (ver **Figura 3**) [80]. Las poblaciones virales pueden ser tan complejas que la secuencia consenso podría incluso no encontrarse en el espectro de mutantes. Las interacciones entre los miembros de una cuasiespecie pueden ser de dos tipos: negativas (o interferentes), en las que algunos genomas afectan negativamente a la replicación de otros genomas del mismo conjunto, y positivas (o complementación), en las que unos genomas ayudan a otros a alcanzar tasas de replicación más altas [76].

La organización genética de las cuasiespecies a veces se describe usando el concepto de espacio de secuencias, una representación geométrica de todas las posibles secuencias en la que las distancias físicas reflejan las similitudes genéticas. Las replications sucesivas de un genoma, durante las cuales se van produciendo mutaciones, crean una distribución de mutantes que se va expandiendo por el espacio de secuencias. Esta nube de variantes, al mismo tiempo, va siendo limitada por la selección natural [81].

La eficacia biológica o *fitness* es la habilidad de los organismos, poblaciones o especies de sobrevivir y reproducirse en el ambiente en que se encuentren [82]. Aplicado a un virus (un individuo o una cuasiespecie) se puede definir como la capacidad replicativa que tiene el mismo bajo unas condiciones ambientales determinadas. La transmisión repetitiva, de huésped a huésped, de tamaños poblaciones altos de un virus RNA en un ambiente constante (por ejemplo, al

realizar pasajes seriados de un virus en un cultivo celular) permite aumentos significativos de la eficacia biológica de la población [83]. Esto es debido a que la competición replicativa permite operar a la selección natural, acumulándose genomas más eficaces, que contienen mutaciones ventajosas, y perdiéndose los de menor valor adaptativo [84], . Según el paradigma de los paisajes adaptativos o paisajes de *fitness*, las mutaciones adaptativas se seleccionan porque permiten a los organismos (las nubes de mutantes o cuasiespecies en este caso) ascender por los paisajes adaptativos hacia regiones de mayor *fitness* (picos), alejándose de las regiones menos adaptativas (valles o llanuras) [80]. Sin embargo, tras muchos pasajes, la tasa de incremento de *fitness* se estanca [85][86].

Un espectro de mutantes podría inhibir la replicación de variantes que presenten un *fitness* más alto [87]. Estos individuos minoritarios de mayor *fitness* podrían convertirse en dominantes en determinadas condiciones en las que su frecuencia supere un cierto umbral, a partir del cual se supera el efecto inhibitorio que la cuasiespecie ejerce sobre ellos. El modelo de interferencia clonal explica la existencia de este umbral de dominancia de la siguiente manera: si los clones de alto *fitness* se encuentran en una frecuencia muy baja es probable que en los genotipos más frecuentes aparezcan mutaciones beneficiosas que mejoren su *fitness*. Mientras que, si la frecuencia inicial del clon de alto *fitness* es lo suficientemente alta puede incrementar su frecuencia en la población antes de que los genotipos más frecuentes tengan la oportunidad de encontrar la mutación o mutaciones beneficiosas adecuadas, por lo que la variante de alto *fitness* puede llegar a dominar. [88]. También se puede producir una situación en la que dentro de una cuasiespecie existan, en una proporción baja, individuos más virulentos (que matan antes a las células) que aquellos que predominan en la misma. El que estos individuos no abundan en la población se ha explicado desde un punto de vista ecológico, considerando al cultivo celular como un hábitat estructurado espacialmente. Los virus más virulentos son considerados colonizadores, ya que al matar antes a las células se propagan y colonizan nuevos hábitats (células) más rápidamente. Los virus que predominan serían mejores competidores, ya que son más eficientes explotando los recursos dentro de cada hábitat. Esta situación depende de la densidad de virus. En condiciones de baja multiplicidad de infección

Introducción

(MOI), los colonizadores tienen ventaja, mientras que a MOI altas, es más frecuente el número de coinfecciones, por lo que la ventaja es para los competidores [89].

En las coinfecciones, distintos virus compiten entre sí por los recursos intracelulares, que son limitados, y comparten sus productos entre sí (proteínas estructurales, polimerasas...). Esto crea un conflicto de intereses entre los distintos individuos, lo cual puede llevar a estrategias cooperativas o egoístas, que se han analizado a la luz de la teoría del juego [90]. Un virus que induce a las células a producir mucha cantidad de un producto compartido, se puede definir como cooperador, porque otros genotipos se pueden beneficiar de estos productos. Mientras que un virus que induce a la célula a sintetizar menos y utiliza en mayor medida productos codificados por otros genotipos, reciben el nombre de desertores (cuyo ejemplo extremo serían las partículas defectivas interferentes, las cuales no poseen algún gen esencial, y dependen de que otros virus sintetizen por ellos las proteínas que necesitan). Cuando los virus desertores son poco frecuentes, en las infecciones mixtas coincidirán habitualmente en la misma célula con virus cooperadores. Mientras que, a medida que vayan aumentando su frecuencia dentro de la población, coinfectarán con otros desertores, con lo que su beneficio será menor. Así que el *fitness* de un cooperador y el de un desertor pueden cambiar, dependiendo de cuántos individuos en la población utilicen cada estrategia y de la tasa de encuentros entre los distintos individuos [90].

Como hemos comentado, también puede darse complementación entre distintos genomas, pudiendo observarse situaciones en las que el *fitness* de una población es mayor que la media del *fitness* de los individuos que la componen [91]. En baculovirus (virus que, a pesar de tener un genoma formado por DNA, pueden llegar a mostrar grados de heterogeneidad similares a los virus de RNA [92]) se ha demostrado que se producen interacciones mutualistas entre distintos genotipos de una población que incrementan la patogenicidad de la misma [93]. En un virus, el mutualismo puede darse a través de la cooperación extracelular de distintos individuos que replican independientemente, es decir, en células diferentes (por ejemplo, cuando una variante modula la respuesta inflamatoria, y esto beneficia a otras variantes) o a través de interacciones directas entre variantes diferentes [94]. Cuando se producen coinfecciones, el *fitness* de un virus

puede aumentar mediante recombinación genética o complementación en trans [94]. La diversidad de una cuasiespecie o amplitud del espectro de mutantes es esencial para su adaptación y supervivencia en ambientes cambiantes [95]. Esto se debe a que la diversidad puede dar lugar la coexistencia de distintas variantes que interaccionen cooperativamente [95]. El neurotropismo en poliovirus, por ejemplo, se ha relacionado con un incremento generalizado en la diversidad de secuencias en una población, en lugar de con un conjunto específico de mutaciones [95].

En resumen, las fuerzas que promueven y mantienen la diversidad genética en las poblaciones víricas son complejas, ya que pueden incluir diferencias entre los distintos individuos en su capacidad para eludir o inhibir la respuesta inmune; para replicar dentro de una célula y transmitirse a otras; para interaccionar positiva o negativamente con otros individuos, etc. Como, además, en cada ciclo replicativo surgen nuevos genomas, la caracterización de dichas fuerzas es una tarea extremadamente compleja. En palabras de H. Allen Orr: “la evolución real se parece menos a un intento de desplazarse cuesta arriba a través de un paisaje adaptativo, que a intentar mantenerse en pie en un paisaje constantemente cambiante [96]”.

Como en el caso de otros picornavirus, el virus de la hepatitis A existe en forma de cuasiespecie, habiéndose documentado la creación, en cultivo celular, de un espectro de mutantes a partir de la replicación de un clon biológico del virus [97]. A pesar de la baja variabilidad antigénica del virus, su variabilidad nucleotídica es similar a la de otros picornavirus. En base a análisis filogenéticos de secuencias de la proteína VP1, el HAV se encuentra dividido actualmente en 6 genotipos (I-VI) [98][99]. Los genotipos I-III son humanos, y cada uno de ellos se subdivide en diversos subgenotipos: el genotipo I en a, b y c, y los genotipos II y III en a y b, mientras que los genotipos IV-VI son de origen simio [100]. Los genotipos I y III son los que se aíslan más frecuentemente en muestras humanas [101].

1.7 Ciclo en el huésped y transmisión

El virus es transmitido principalmente por la ruta fecal-oral, ya sea a través del contacto persona a persona o por ingestión de alimentos o agua contaminados [102]. En raras ocasiones la infección ha sido transmitida mediante la transfusión

Introducción

de sangre o hemoderivados procedentes de donantes que se encontraban en la fase virémica de su infección, contacto sexual (p. ej. contacto anal-oral con personas infectadas), uso compartido de jeringuillas entre usuarios de drogas inyectables, tatuajes y prácticas dentales poco higiénicas [103].

En el caso más frecuente de infección, los viriones, después de ser ingeridos, llegan al hígado a través de la circulación portal hepática y, tras infectar a las células de Kupffer (macrófagos residentes en el hígado), penetran en los hepatocitos [26][25][104]. Allí las partículas víricas replican y son secretadas a los canalículos biliares, desde donde pasan a las vías biliares y al intestino delgado. Desde allí salen del cuerpo a través de las heces, o bien son reabsorbidos y transportados de nuevo hacia el hígado, con lo que se constituye un ciclo enterohepático, que continúa hasta que los anticuerpos neutralizantes y otros mecanismos del sistema inmune lo interrumpen [105]. Se ha propuesto que estas reinfecciones endógenas del hígado se producen gracias a complejos HAV/IgA, hasta que grandes cantidades de IgG de alta avididad desplazan a la IgA en estos complejos [105]. En este modelo, las reinfecciones dependerían del estado de desarrollo de la respuesta IgG, y podrían ser la causa de los casos de recidivas y de aquellos en los que la enfermedad se prolonga más allá del lapso de tiempo habitual. En estos casos, las IgA anti-HAV ayudarían al virus a alcanzar el hígado incluso en presencia de IgG neutralizantes [34].

El mecanismo por el cual los virus acceden al torrente sanguíneo no se conoce exactamente. En infecciones *in vitro* de células epiteliales intestinales humanas polarizadas, el virus sale por la membrana apical, por lo que, según estos resultados, tras la replicación en el intestino, los virus serían excretados al lumen [66]. Se han planteado dos modelos para explicar el paso del virus a la circulación sanguínea. Uno de ellos es la transcitosis de los virus en el intestino a través de las células M, encargadas de captar antígenos en las placas de Peyer, en el íleon terminal, como ocurre en poliovirus [66][106]. El otro mecanismo consistiría en la transcitosis de partículas víricas asociadas a IgA a través del epitelio intestinal, mediante el receptor polimérico de inmunoglobulinas (pIgR) [105]. Esto, junto al hecho de que la IgA pueda ayudar al HAV a entrar en los hepatocitos [33], ha llevado a postular que este tipo de inmunoglobulina juega un papel de

transportador del virus en su ciclo enterohepático, como se ha comentado anteriormente [105].

En las heces de un individuo infectado se excreta un gran número de viriones, que pueden sobrevivir en objetos inanimados o en las manos de las personas, pudiendo así comenzar un nuevo ciclo de infección en otra persona [107].

1.8 Respuesta inmune y mecanismos de evasión

Los virus de RNA inducen la síntesis de interferón (IFN), moléculas que activan los mecanismos antivíricos de la célula. El receptor tipo Toll 3 (TLR3) y las helicasas citosólicas tipo RIG-I detectan RNA víricos y activan vías de señalización que inducen la síntesis de IFN a través de proteínas adaptadoras específicas: TRIF y MAVS, respectivamente. La respuesta de interferón tipo I intrahepática que provoca HAV es muy limitada en chimpancés [108]. Se han descrito varios mecanismos que podrían explicar esta respuesta reducida. La proteína 3ABC del virus cliva MAVS, mientras que la 3CD hace lo propio con TRIF, interrumpiendo la activación de factores reguladores de la expresión de IFN de tipo I [109][56]. Tanto 3ABC como 3CD derivan del procesamiento proteolítico de 3ABCD, y son precursores de la proteasa madura del virus 3C^{pro}. Además, se ha descrito que 3C^{pro} cliva a NEMO, un factor requerido para la expresión de IFN- β [110]. Las células dendríticas plasmocitoides, que expresan TLR7 y TLR9, a través de los cuales reconocen DNA y RNA virales, producen interferón de tipo I en grandes cantidades cuando entra en contacto con partículas pseudoenvueltas. No obstante, estas células no se encuentran en el hígado durante el pico de la infección por HAV [111].

Alrededor de 4-5 semanas después de la infección, comienza a haber respuestas inmunes celulares y humorales específicas contra HAV. En el momento del establecimiento de los síntomas se detectan, normalmente, IgM, IgA e IgG. El desarrollo de anticuerpos frente a HAV coincide con un descenso en la viremia y en la cantidad de virus excretados en heces. Los títulos de IgM alcanzan un máximo durante el primer mes de enfermedad, y disminuyen hasta niveles indetectables en unos tres meses, aproximadamente [112]. Durante la

Introducción

fase aguda de la enfermedad se detectan células secretoras de anticuerpos que producen IgM, tanto específicas frente al virus como no específicas [113]. Los mayores niveles de IgA en sangre se alcanzan 50 días tras la exposición y pueden durar hasta 5 años [114]. La mayor parte permanece en circulación, y no es secretada al tracto intestinal a través de la ruta del pIgR. Pero una fracción significativa puede pasar a los intestinos vía bilis, mediante el receptor hepatocelular de asialoglicoproteína (ASGPR). El papel neutralizante de la IgA secretada al tracto intestinal parece ser limitado [115]. Las IgG persisten en el organismo durante años, proporcionando protección frente a la reinfección [116]. Por tanto, el análisis de la IgG anti-HAV sirve para determinar el estado inmune de un individuo tras haber sido infectado o vacunado.

Las partículas pseudoenvueltas no son reconocidas por los anticuerpos anti-HAV, que sí neutralizan a los virus no envueltos. Las membranas de estas partículas tienen que romperse para que el virus pueda ser neutralizado, lo cual debe ocurrir, probablemente, tras la endocitosis de las mismas [2].

Tanto el daño hepático agudo como la disminución de la viremia se han relacionado con la respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8+. Sin embargo, recientemente se le ha adjudicado un papel más relevante a los linfocitos T CD4+ en el control inmune del HAV, ya que, en chimpancés, estas células muestran una respuesta más temprana, amplia y funcional que la de las células CD8+ [117]. Durante las hepatitis agudas causadas por hepatitis A, la muerte por apoptosis de los linfocitos T reguladores aumenta y su actividad supresora se ve atenuada. La severidad del daño hepático se ha relacionado de manera inversa con la frecuencia y la función de linfocitos T reguladores [118]. Esta activación de las células T reguladoras contrasta con lo que ocurre en la mayoría de patógenos, que las activan para minimizar el daño tisular mediado por el sistema inmune, previniendo la eliminación del patógeno y promoviendo la cronificación de la infección [119].

1.9 Manifestaciones clínicas

La hepatitis A es una infección aguda del hígado producida por el virus de la hepatitis A. El espectro clínico de una infección por este virus abarca desde una

infección asintomática hasta una hepatitis fulminante. El virus no produce enfermedad hepática crónica ni infección crónica. Las manifestaciones clínicas dependen de la edad del paciente. Los síntomas aparecen con mayor frecuencia en adultos que en niños. En niños menores de cinco años, el 80-95% de las infecciones por HAV son asintomáticas, mientras que el 70-95% de los adultos infectados desarrollan los síntomas de la enfermedad, que suele durar varias semanas y puede requerir hospitalización (Berge y colaboradores estimaron que, de los adolescentes y adultos que padecieron infección sintomática en 1997 en EEUU, un 13% requirieron cuidados hospitalarios) [120][121]. Sin embargo, los niños podrían ser más susceptibles de lo que se pensaba a desarrollar síntomas clínicos cuando son infectados con cepas del genotipo IIIA [122]. El que la severidad de la enfermedad dependa de la edad podría estar relacionado con la respuesta de anticuerpos IgA, que no alcanza su máximo hasta la pubertad [34].

El periodo de incubación varía de 2 a 7 semanas. La fase prodrómica, caracterizada por la aparición de síntomas no específicos, dura desde varios días hasta una semana antes de la aparición de la ictericia. Los síntomas típicos de esta fase son: fiebre, malestar, inapetencia, cansancio, náuseas, mialgia y vómitos. Los síntomas observados en esta fase tienden a disminuir con la llegada de la ictericia, aunque la inapetencia y el malestar suelen persistir [123]. La fase ictericia comienza con el oscurecimiento de la orina debido a la bilirrubina, la presencia de deposiciones pálidas y el amarilleamiento de la piel y las membranas mucosas. La ictericia no se observa en todos los casos de hepatitis A sintomáticos. Los síntomas clínicos suelen durar unos dos meses. Sin embargo, en algunos casos (1,5-15%), la enfermedad puede prolongarse o presentar recidivas hasta seis meses después del comienzo de los síntomas. El que la enfermedad curse de forma normal o se presente alguna de estas dos variantes podría depender de múltiples factores: las condiciones fisiológicas de cada individuo, la cantidad de progenie vírica, la cantidad de anticuerpos IgA e IgG producidos como respuesta al virus y la actividad de los linfocitos encargados de controlar la infección [34].

Se puede detectar la presencia del virus en el suero desde antes de la aparición de los síntomas hasta una media de 6 semanas después del comienzo de los mismos, alcanzándose valores máximos de 10^6 copias genómicas/ml

Introducción

[124][125]. En heces pueden llegar a detectarse hasta 10^{11} copias genómicas/g, justo antes del comienzo de los síntomas, momento en el cual el individuo es más contagioso (el período de contagio comienza alrededor de 2-3 semanas antes de la aparición de los síntomas y se mantiene hasta 1-2 semanas después) (ver **Figura 4**). El virus persiste en el hígado durante meses, por lo que la cinética de eliminación del virus es diferente en este órgano que en la sangre y el intestino [108]. La alanina aminotransferasa (ALT), la aspartato aminotransferasa (AST), la fosfatasa alcalina y la bilirrubina total suelen encontrarse elevadas en pacientes sintomáticos, aunque solo ALT es específica para hepatitis [126] (ver **Figura 4**).

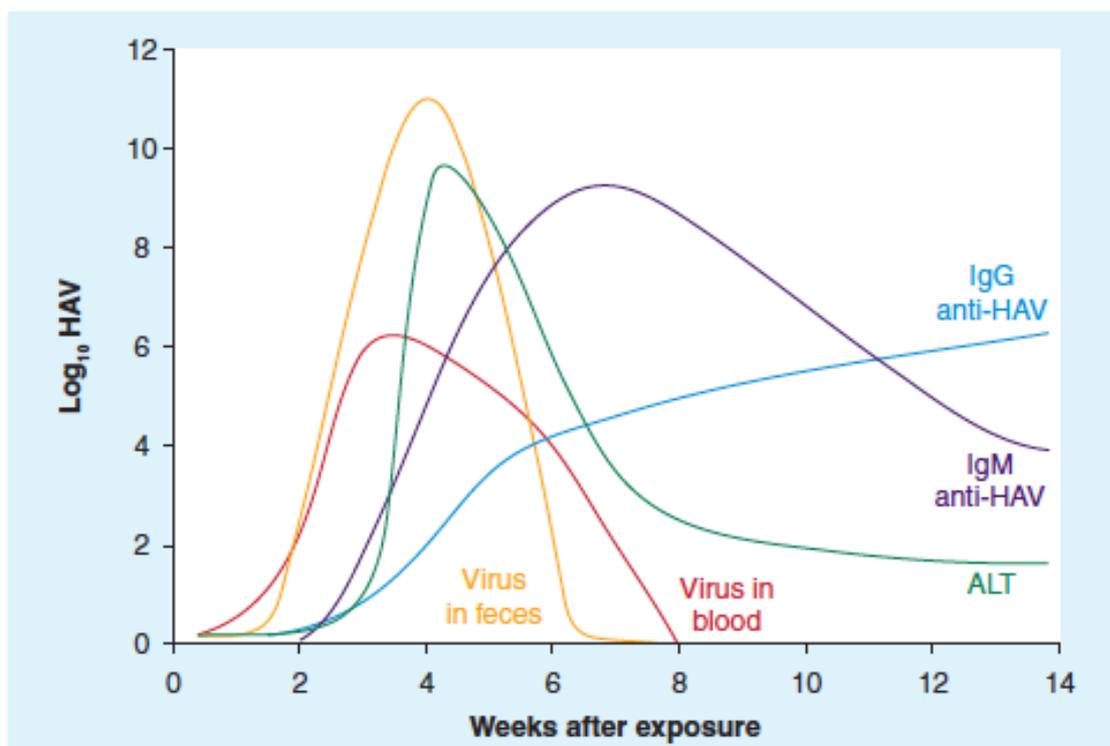


Figura 4 Evolución de los títulos víricos, alanina aminotransferasa (ALT) y la respuesta inmunológica durante la hepatitis A. Imagen extraída de [10]

La hepatitis fulminante es una complicación poco común de la hepatitis A que ocurre en menos del 0,5% de los casos [127]. En la hepatitis fulminante, la rápida necrosis hepática conduce a encefalopatía hepática y coagulopatía. Un porcentaje muy alto de los pacientes que la sufren debido a la infección por hepatitis A mueren o requieren un transplante de hígado urgente, considerándose la tasa de supervivencia de un 60% [128]. La hepatitis fulminante se ha asociado

con niveles significativamente altos de bilirrubina y bajos de RNA vírico en suero, lo cual sugiere que el fallo hepático relacionado con el virus de la hepatitis A es debido a una fuerte respuesta inmune, responsable de la reducción observada en la carga viral, más que a un efecto vírico directo [129]. Las manifestaciones severas de la enfermedad se han asociado a una inserción de seis aminoácidos en la proteína HAVcr-1, identificada como receptor celular del HAV [130]. En cuanto a posibles factores víricos relacionados con la hepatitis fulminante, se ha relacionado ésta con variaciones nucleotídicas en la región 5' no codificante del genoma del virus [131].

Según un estudio realizado en Italia, en pacientes con hepatitis C crónica la infección con hepatitis A crea un riesgo elevado de fallo hepático fulminante (41%) y muerte (35%) [132]. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con los de otros investigadores [133].

1.10 Epidemiología

Cada año se declaran alrededor de 1,4 millones de nuevos casos de hepatitis A en todo el mundo [134]. Se estima que en 2005 fueron infectados con el virus 119 millones de individuos, hubo 31 millones de casos sintomáticos y se produjeron 34.000 muertes debidas a la enfermedad [135]. Existen varios motivos por los cuales solo se declara como hepatitis A un cierto porcentaje del total de infecciones sintomáticas: que los individuos enfermos no busquen asistencia médica, que se produzca un diagnóstico incorrecto o que la información no llegue hasta las autoridades sanitarias correspondientes [120].

La prevalencia de infección por HAV es mayor en aquellas regiones que cuentan con un suministro de agua inadecuado y estándares higiénicos y sanitarios bajos, donde la seroprevalencia puede exceder el 90% a la edad de 10 años [136][121]. Así, el patrón epidemiológico en un país o región dependerá del grado de desarrollo socioeconómico e higiénico-sanitario del mismo.

En las regiones industrializadas, debido a la mejora de las condiciones higiénicas y sanitarias, se ha producido un desplazamiento de la curva de seroprevalencia hacia edades superiores (desde el 10% en la adolescencia media hasta el 70% en la edad adulta tardía [121]), de manera que hay un gran número

Introducción

de individuos en riesgo de infección durante la adolescencia y la edad adulta (por ejemplo, al viajar hacia áreas de alta endemicidad o mediante el consumo de alimentos provenientes de estas regiones), lo que conlleva, paradójicamente, un incremento en la morbilidad, la mortalidad y los costes asociados a la enfermedad (los derivados de los tratamientos, pago al personal sanitario y por otros servicios ofrecidos por las instituciones sanitarias, días de trabajo perdidos, intervenciones adicionales de las autoridades sanitarias en los casos de brotes, etc.) [137].

Estudios seroepidemiológicos demuestran que la prevalencia de anticuerpos anti-HAV varía geográficamente. Las regiones de altos ingresos (Europa Occidental, Australia, Nueva Zelanda, Canadá, Estados Unidos, Japón, Corea del Sur y Singapur) tienen niveles de endemicidad del HAV muy bajos y una alta proporción de adultos susceptibles. El riesgo de adquirir hepatitis A en estas regiones es bajo, porque apenas hay circulación del virus. Sin embargo, a veces se producen brotes de origen alimentario [121].

En las regiones de bajos ingresos (África subsahariana y partes de Asia del Sur) la población presenta elevados niveles de endemicidad y casi no existen adolescentes y adultos susceptibles. Por tanto, la mayoría de infecciones que se producen en esas áreas son asintomáticas [121].

En las regiones con ingresos intermedios (algunas regiones de Asia, Latinoamérica, Europa del Este y Oriente Medio) existe una mezcla de niveles de endemicidad medios e intermedios. En estas regiones, en las que el virus puede circular, existe una proporción importante de adultos susceptibles a la infección. Es por ello que se producen brotes a escala comunitaria de forma regular.

1.11 Profilaxis

La inmunoglobulina anti-HAV se obtiene a partir de plasma de donantes procesado mediante el método de fraccionamiento de Cohn [102]. La inyección intramuscular de la misma proporciona protección pre-exposición frente a la enfermedad en una alta proporción de individuos. Una dosis de 0.02 ml/kg confiere protección durante menos de 3 meses, mientras que una dosis de 0.06 ml/kg protege durante 3-5 meses [102].

Para la profilaxis postexposición solía administrarse inmunoglobulina durante los 14 días posteriores a la exposición. La duración de la protección es corta y dosis dependiente. Incluso dosis altas no protegen durante más de 4 a 6 meses [123]. Actualmente, para la profilaxis se prefiere usar la vacuna, la cual presenta ciertas ventajas frente a la inmunoglobulina, como la protección a largo plazo o la mayor abundancia de suministros [138].

La administración de inmunoglobulina aún se recomienda en el caso de niños menores de dos años, por la persistencia de anticuerpos anti-HAV adquiridos pasivamente de la madre, que podrían interferir con la inmunogenicidad de la vacuna.

Existen en el mercado vacunas efectivas frente a la hepatitis A desde el año 1992, las cuales proporcionan inmunidad a largo plazo frente a la infección. Las vacunas que se han desarrollado cubren todos los genotipos descritos hasta ahora ya que, como hemos comentado, a pesar de la diversidad genética del virus, existe un único serotipo [10]. Se ha comprobado la utilidad de las campañas de vacunación a la hora de reducir la incidencia de la enfermedad mediante la prevención de la transmisión [137].

Aproximadamente la mitad de las infecciones por hepatitis A ocurre en pacientes que no presentan factores de riesgo, por lo que vacunar exclusivamente a los grupos de alto riesgo no parece una buena estrategia para reducir la incidencia de la enfermedad [139][140]. Los niños tienen las mayores tasas de infección y son el reservorio de virus más importante dentro de la comunidad [141]. De hecho, la mayoría de brotes de hepatitis A ocurren en niños, adolescentes y adultos jóvenes que viven en comunidades de endemicidad intermedia, y estos brotes tienden a extenderse a otras comunidades [140]. Por ello, vacunar a los niños de forma rutinaria, no solo les protege de futuras infecciones, sino que es una forma de eliminar una de las fuentes principales de infección en adultos que, como hemos comentado, tienen unas consecuencias clínicas más graves.

La Organización Mundial de la Salud recomienda que se vacunen los individuos con un riesgo elevado de contraer la infección por el HAV en áreas de baja endemicidad, así como realizar campañas de vacunación infantil masiva en

Introducción

países de endemicidad intermedia [121]. Entre los grupos en riesgo de contraer la infección están: las personas que viajan a países con endemicidad alta (la tasa de incidencia para viajeros no protegidos se estima en 3 casos por cada 1000 viajeros por mes de estancia en países en desarrollo [142]), las que trabajan en contacto con aguas residuales, los prisioneros, las personas con problemas físicos y mentales internadas, los drogadictos y las personas promiscuas y que mantienen prácticas sexuales oroanales [143]. Aunque no formen parte de un grupo de riesgo per se, la ACIP recomienda la vacunación a personas con hepatopatías crónicas, ya que poseen un riesgo más elevado de sufrir complicaciones relacionadas con la hepatitis A e incluso de morir, como ya se mencionó [102].

Se han implementado programas de vacunación infantil masiva en diferentes países y regiones (Cataluña (España) [144], Puglia (Italia)[144], Israel [145], varios estados de Estados Unidos [146], Bielorrusia [147]). El alto coste debido a los brotes que se producen en los países industrializados ha hecho que las estrategias de vacunación infantil resulten rentables, a niveles de muchas intervenciones médicas aceptadas [141] [148].

No existen recomendaciones por parte de organismos internacionales en cuanto a la administración de dosis de recuerdo de la vacuna frente a la hepatitis A. Los anticuerpos anti-HAV persisten en el organismo más de 17 años, estimándose una pervivencia de los mismos de más de 25 años [149]. Las vacunas inactivadas frente al HAV, además de anticuerpos, inducen respuestas proliferativas de linfocitos T a largo plazo [150].

1.12 Adaptación a cultivo celular

La adaptación de virus patogénicos humanos a cultivos celulares mediante pasajes repetidos en líneas celulares se ha empleado en virología desde hace varias décadas. Este método conduce al incremento de la patogenicidad en la línea celular en la que se haya adaptado en comparación al virus *wild type* (wt). Estas cepas adaptadas a cultivo celular han facilitado el estudio de los virus y las enfermedades que estos causan. De la misma manera, dichas cepas han contribuido al desarrollo de algunas de las vacunas más exitosas producidas (polio, sarampión, rubeola, paperas) [151]. Al mismo tiempo, el pase de estos virus en cultivos celulares

reduce su potencial para causar enfermedades en humanos, lo cual recibe el nombre de atenuación [152].

A diferencia de otros picornavirus, las cepas wt del virus de la hepatitis A no multiplican bien en ningún tipo celular durante el aislamiento primario, y se deben adaptar a multiplicar en células de primates (como por ejemplo células renales de mono verde africano, AGMK [153], o células renales de fetos de mono rhesus, FRhK-4 [154]) antes de alcanzar un nivel de replicación vírica adecuado para la producción de antígeno vírico con fines industriales (p. ej. vacunas y pruebas diagnósticas) [155]. También se ha conseguido multiplicar el HAV en células de origen humano [156] (como por ejemplo, en la línea celular MRC-5, utilizada para la producción de todas las vacunas inactivadas frente al HAV que se comercializan), e incluso en otras procedentes de animales no primates [157]. El crecimiento del HAV en células de simio como las CV-1, las FRhK-4 (una línea celular derivada de riñón de macaco rhesus fetal), las FRhK-6 (otra línea celular obtenida a partir de riñón de macaco rhesus fetal) y las Vero ha sido variable dependiendo de la cepa y del pasaje del virus, pero generalmente ha sido subóptimo [158]. En cualquier caso, el crecimiento del virus de la hepatitis A en cultivo celular es lento, lo que hace que la producción de antígeno para su uso en vacunas o test diagnósticos resulte en un proceso lento y costoso [159]. Varios pasos en el ciclo replicativo del virus, como la desencapsidación, el comienzo de la traducción, la replicación y la maduración de las partículas, contribuyen a que la multiplicación del HAV en cultivo celular sea restringida [160].

Se han asociado ciertas mutaciones en el genoma del HAV a un mayor crecimiento en cultivo celular. Éstas mutaciones se localizan principalmente en la región P2 (especialmente en 2B y 2C [161]) y en la 5' no codificante [162][163], aunque también en otras partes del genoma [164]. Como se ha observado en otros virus, las cepas adaptadas a cultivo celular son atenuadas *in vivo*, ya que no producen enfermedad en primates inoculados experimentalmente [165][166]. Algunas de estas cepas producen efecto citopático en cultivo celular [167][168][169]. Este efecto depende del tipo celular en que replique el virus, y se produce principalmente en las líneas FRhK-4 y BS-C-1. El ciclo replicativo de estas cepas es más corto y producen mayor cantidad de virus que las no citopáticas

Introducción

[167]. Al parecer, estas cepas producen apoptosis a través de la degradación del RNA ribosómico mediada por la RNasa L, y la consiguiente activación de las caspasas [170] [171].

1.13 Aplicaciones biotecnológicas de la producción del virus de la hepatitis A mediante cultivo celular

1.13.1 Producción de vacunas

A partir de variantes del virus de alta eficiencia se han producido diferentes vacunas inactivadas: Avaxim (Sanofi Pasteur), Epaxal (Crucell), HAVRIX (GlaxoSmithKline) y Vaqta (Merck) (a partir de las cepas GBM, RG-SB, HM-175 y CR-326F', respectivamente). Avaxim, HAVRIX y Vaqta hacen uso del aluminio como adyuvante, mientras que en Epaxal el virus se encuentra adsorbido a la superficie de virosomas de influenza reconstituidos (IRIVs). La seguridad y el alto grado de inmunogenicidad de estas vacunas han sido demostrados [172][173][174][175].

También se han desarrollado vacunas combinadas. Twinrix (GlaxoSmithKline) sirve para prevenir la hepatitis B y A, y está basada en la cepa HM-175 del HAV y el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) [176]. Vivaxim (Sanofi Pasteur) protege frente a la hepatitis A y la fiebre tifoidea, y se basa en la cepa GBM del HAV y el polisacárido capsular Vi-AG de *Salmonella typhi* [177].

Para la preparación de todas las vacunas que se han nombrado, el virus se cultiva en células diploides humanas MRC-5. El bajo *split ratio* requerido por estas células, los bajos títulos víricos alcanzados y los prolongados tiempos de cultivo (de hasta dos semanas) necesarios para conseguir una producción máxima de antígeno vírico hacen que la producción de dichas vacunas resulte cara [158].

Existe también una vacuna atenuada basada en la cepa H2 [178], que también presenta alta inmunogenicidad, eficacia, duración de la protección y seguridad. Una de las ventajas de estas vacunas respecto a las inactivadas es que son relativamente baratas, aunque las vacunas inactivadas frente al virus de la hepatitis A presentan alta eficacia protectora, inmunogenicidad y seguridad [179].

1.13.2 Diagnóstico

Ni los síntomas de la enfermedad ni los tests bioquímicos que evalúan la función hepática permiten diferenciar la hepatitis A de otras formas de hepatitis víricas agudas. El diagnóstico de la hepatitis A se basa principalmente en la detección de anticuerpos relacionados con la infección. La detección de IgM anti-HAV (detectable desde el comienzo de la aparición de los síntomas hasta unos meses más tarde) es el método de referencia para confirmar el diagnóstico de infección aguda por HAV (a pesar de que la detección del RNA viral es clínicamente efectiva [180]). Ya que las inmunoglobulinas G anti-HAV persisten durante años, la combinación de la detección de anticuerpos IgM anti-HAV y anticuerpos anti-HAV totales (IgG, IgM e IgA) permite distinguir entre una infección actual y una pasada [181]. La detección de anticuerpos anti-HAV totales también puede usarse en estudios epidemiológicos de prevalencia de la infección por HAV en una población, así como para evaluar la respuesta a la vacunación [126]. Tanto los anticuerpos IgM anti-HAV como los totales pueden detectarse mediante inmunoensayos, que en forma de kits comerciales se utilizan habitualmente en los laboratorios clínicos para identificar una infección por el virus de la hepatitis A. En estos inmunoensayos (enzimáticos y quimioluminiscentes, principalmente) se hace uso de antígenos del virus preparados a partir de cultivo celular.

1.14 Estrategias para incrementar la producción de antígeno viral en cultivo celular

Un cambio en cualquiera de los componentes que conforman el sistema de producción de un virus mediante cultivo celular (el medio de cultivo, las células, el propio virus...) puede afectar a su rendimiento. En cuanto a las células empleadas, se pueden observar diferencias en la productividad, no solo entre las distintas líneas celulares en las cuales el virus puede multiplicar, sino también entre distintos subclones pertenecientes a una misma línea celular. Por ejemplo, Funkhouser et al. [182] obtuvieron un subclón de FRhK-4 (el 11-1) que permite un mayor crecimiento del virus de la hepatitis A que la línea celular parental, mediante selección con G418 tras haber transfectado con un vector que contenía un gen de resistencia a neomicina. Existen muchos otros métodos para seleccionar,

Introducción

dentro de una población de células pertenecientes a una línea, clones altamente productivos [183].

Como hemos visto, una forma de conseguir que una población vírica aumente su *fitness* es transfiriendo repetidamente grandes cantidades de virus en cultivo celular [84], en un ambiente constante. Cuando el tamaño de la población vírica transferida es elevado, tiene lugar una selección entre las variantes que compiten, de manera que aumenta el *fitness* promedio de la población. Esto es debido a que se van seleccionando gradualmente mutaciones que resultan adaptativas para la multiplicación *in vitro* [91].

La mayoría de picornavirus inhibe la traducción de mRNA dependiente de *cap*, con lo cual la maquinaria de traducción celular es utilizada casi exclusivamente en la producción de proteínas víricas [184]. La interrupción de la síntesis proteica celular en estos virus se consigue gracias al clivaje del factor de inicio de la traducción eIF4G [185]. El virus de la hepatitis A, como hemos mencionado, no posee la capacidad de producir este clivaje, por lo que no dispone de ventaja frente a los mRNA celulares [186]. Con el objetivo de favorecer la traducción del RNA vírico en células infectadas con HAV se han utilizado inhibidores de la transcripción de mRNA celulares, como el DRB (5,6 dicloro-1-B-D-ribofuranosilbenzimidazol, un inhibidor de la RNA polimerasa II), cuyo uso aumenta la producción del HAV [187] (algo que no ha sido confirmado por otros investigadores [188]) o la AMD [189] (actinomicina D, la cual se intercalaría en el DNA, entorpeciendo el progreso de las RNA polimerasas [190]). En presencia de AMD, y durante los primeros pasajes seriados que se realizaron en células FRhK-4, el virus perdió *fitness*. No obstante, el virus se adaptó a esas condiciones tras muchos pasajes, dando lugar a progenies de un tamaño poblacional equivalente a las que producía en ausencia de AMD [189]. Durante la adaptación a la droga se produjo una re-deoptimización en el uso de codones en la región de la cápside, lo cual sugiere que el HAV necesita que la traducción de las proteínas de la cápside proceda lentamente, al menos en ciertas regiones. Por tanto, no se habría seleccionado la cinética de traducción más rápida posible, sino una que permitiera controlar el tráfico de los ribosomas mediante una combinación adecuada de codones abundantes y raros [189]. Esta adaptación vendría a demostrar la

importancia de los clústeres de codones raros en la regulación de la velocidad de elongación de la traducción de la cápside del virus, con el objetivo de asegurar un correcto plegamiento de las proteínas que la conforman, como ya se ha mencionado.

2 PRÓLOGO

En estudios previos realizados en el grupo de Virus Entéricos se adaptó el HAV a replicar en condiciones de silenciamiento de la transcripción celular mediante el uso de la actinomicina D (AMD). Tanto en la población adaptada a multiplicar en presencia 0.05 µg/ml de AMD como en la que se adaptó a una concentración de 0.2 µg/ml de AMD se repitió el mismo patrón. Como se comentó en la introducción, en los primeros pasajes la producción vírica cayó, pero posteriormente fue aumentando de manera progresiva. Cuando se permite que grandes poblaciones de virus de RNA repliquen en un ambiente definido, la tasa de incremento de *fitness* puede reducirse después de muchos pasajes, de manera que entre en una fase de estancamiento. Esto ocurrió durante la adaptación del virus a la AMD: en las poblaciones largamente adaptadas a estas condiciones (entre los puntos LA y LLA de la **Figura 5**) se entró en una fase estática en cuanto a la productividad.

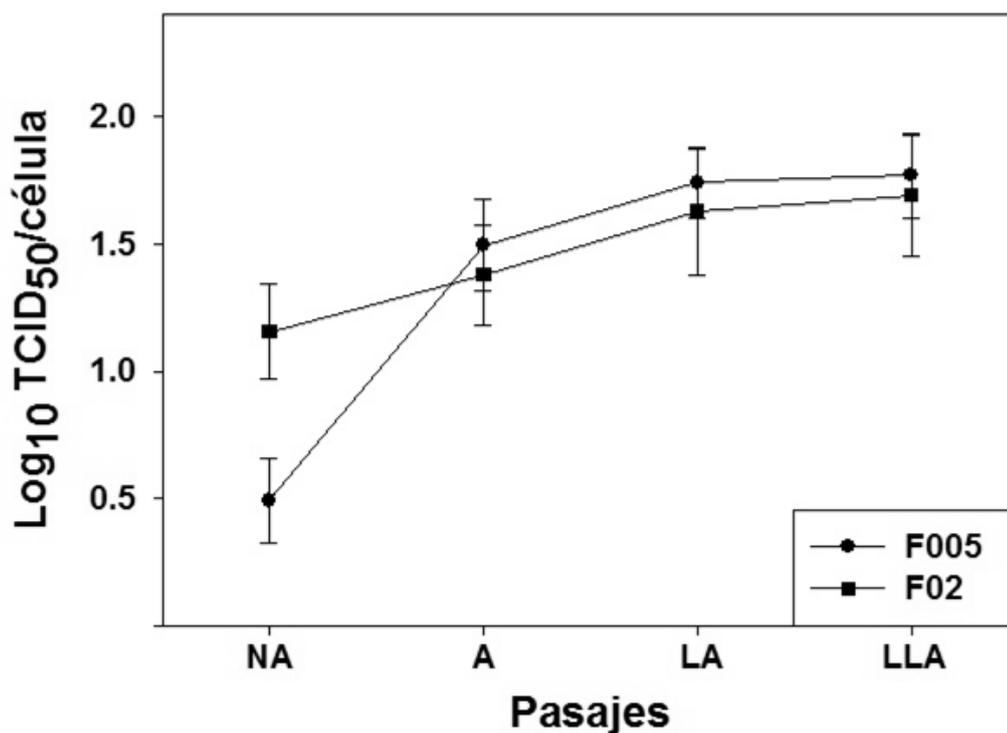


Figura 5 Evolución de la producción (expresada en logaritmos decimales del valor de TCDI₅₀ por célula, siendo la TCID₅₀ la dosis vírica que provoca efecto citopático en el 50 % de las monocapas celulares inoculadas) de las poblaciones del HAV adaptadas a multiplicar en presencia de 0.05 (serie F005, círculos) y 0.2 µg/ml de AMD (serie F02, cuadrados). En cada punto se representa la producción promedio ± el error estándar de diez pasajes. En la serie F005 se utilizaron los siguientes pasajes: NA: 1-10; A: 56-65; LA: 111-120; LLA: 141-150. En la serie F02 los pasajes utilizados fueron: NA: 1-10; A: 35-44; LA: 57-66; LLA: 80-89. La serie F02 comienza con una población que había sido pasada 65 veces en presencia de 0.05 µg/ml de AMD [189].

Prólogo

Una población vírica puede quedar atrapada en el paisaje adaptativo alrededor de un pico de *fitness*, hasta que un mutante presente en la población cruce una barrera de *fitness* hasta un pico cercano más alto. En una cuasiespecie pueden existir individuos con un *fitness* superior al promedio de la población, pero que se encuentren suprimidos por ésta. El estudio de los componentes minoritarios de un espectro de mutantes puede tener un valor predictivo, anticipando futuras secuencias dominantes.

3 OBJETIVOS

1) Estudiar si, entre los individuos presentes de forma minoritaria en dos poblaciones largamente adaptadas a la AMD (F0.05LA y F0.2LA), existen algunos con características indicativas de una capacidad replicativa superior, que pudieran encontrarse suprimidos en la cuasiespecie. Para ello se seguirán los siguientes pasos:

- Secuenciación masiva ultra-profunda de dos fragmentos del genoma del virus, pertenecientes a las regiones 5'NCR y VP1, en cada población.
- Predicción de la estructura secundaria del RNA de la región 5'NCR los diversos haplotipos.
- Análisis de la actividad del IRES de haplotipos de 5'NCR mediante el uso de plásmidos bicistrónicos.
- Evaluación del efecto que producen distintos haplotipos de la región 5'NCR sobre la replicación del HAV en cultivo celular.
- Determinación de la velocidad de traducción de distintos haplotipos encontrados en VP1 en presencia de silenciamiento celular moderado.

2) Producir un cambio en la composición de la cuasiespecie, mediante la introducción de desequilibrios en la misma, para dar la oportunidad a los individuos minoritarios con superior potencial replicativo de aumentar su frecuencia en la población, con la finalidad de que la población resultante muestre una cinética de replicación más rápida y/o mayores valores de producción. Para ello se seguirán los siguientes pasos:

- Mezcla de las poblaciones F0.05LA y F0.2LA en distintas proporciones y realización de pasajes seriados a partir de ellas.
- Comparación de la productividad y la velocidad de replicación de varias poblaciones resultantes con la de sus poblaciones parentales.
- Secuenciación masiva ultra-profunda de dos fragmentos del genoma del virus, pertenecientes a las regiones 5'NCR y VP1, en una de las poblaciones resultantes para determinar la composición de la cuasiespecie en relación a sus poblaciones parentales.
- Caracterización de la población HM-175/HP de rápida replicación.

4 CAPÍTULO 1:

Caracterización molecular de dos poblaciones del HAV como parte de un proceso de selección genómica

4.1 ANTECEDENTES

Para evaluar las posibilidades que presentan las poblaciones F0.05LA y F0.2LA de aumentar su producción, decidimos realizar una prospección de los genomas que componen ambas cuasiespecies, con el objetivo de identificar individuos que, aun estando presentes de forma minoritaria, presenten unas características indicativas de que puedan poseer un *fitness* mayor que el de la secuencia consenso.

La selección asistida por marcadores (MAS, *Marker-Assisted Selection*) es un proceso de selección indirecto utilizado en programas de mejora de especies de interés agropecuario. En este método se seleccionan los caracteres de interés (por ejemplo, productividad, calidad, resistencia a enfermedades o tolerancia al estrés abiótico) basándose, no en el carácter en sí mismo, sino en marcadores asociados a él. De manera que, cuando se utilizan marcadores genéticos, los individuos se seleccionan en base a su genotipo y no a su fenotipo, lo cual ha sido el fundamento de los sistemas de mejora clásicos [191]. La mayoría de caracteres de interés en plantas y animales son controlados por un gran número de genes (junto con factores ambientales) y cada uno de ellos es responsable de solo una limitada proporción de la varianza genotípica total (la variación en el carácter causada por diferencias genéticas) [192][193]. Por ello se han desarrollado estrategias como la selección genómica, una variante de MAS en la que se analiza una gran cantidad de marcadores que cubren segmentos de gran longitud o incluso el genoma entero para estimar el valor de cría de cada individuo, sumando los efectos de todos los genes que codifican para un carácter determinado [194].

Los genomas eucariotas son mucho mayores que los de virus de RNA. El genoma del maíz (*Zea mays*) y el de la vaca (*Bos taurus*), por ejemplo, son 3.1×10^5 y 3.7×10^5 veces mayor que el del HAV [195][196]. Por otra parte, los virus de RNA presentan una gran capacidad de evolucionar debido a sus grandes tamaños poblacionales, altas tasas de mutación y tiempos cortos de generación, por lo que sus poblaciones están formadas por un conjunto complejo de mutantes [197]. La aplicación en un virus de RNA de una estrategia análoga a la selección genómica requeriría priorizar la profundidad a la amplitud a la hora de realizar un *screening* de los genotipos presentes en una población. Una técnica adecuada para ello es la secuenciación masiva profunda o ultra-profunda, en la cual el número de total de

Capítulo 1 Antecedentes

lecturas es muchas veces mayor que la longitud de la secuencia en estudio. Por ello, en este estudio decidimos realizar pirosecuenciación masiva ultra-profunda (UDPS) de dos regiones que seleccionamos por tener importancia en la velocidad a la que se traduce el genoma, ya que la traducción puede limitar la tasa de replicación en el HAV [182]: el IRES (sitio interno de entrada del ribosoma) y la cápside.

El inicio de la traducción independiente de *cap* es un aspecto importante en la replicación del HAV y tiene una gran influencia en el crecimiento de HAV en cultivo celular [198]. Se ha predicho que la región 5' no codificante del HAV forma estructuras complejas que se dividen en seis dominios. Los dominios I y II (de las base 1 a la 95) contienen una serie de *stem-loops* con potencial para formar *pseudoknots*. Entre los dominios II y III hay un tracto polipirimidínico (pY1, de las base 96 a la 154). El resto del 5'NCR, que comprende los dominios III a VI (e incluye las bases 155 a 734) contiene varios *stem-loops* complejos, dos posibles *pseudoknots* y una región altamente conservada que contiene un segundo tracto polipirimidínico (pY2 que comprende las posiciones 712-726) [199]. Como en otros picornavirus, en la región 5' no codificante del HAV se encuentra el sitio interno de entrada del ribosoma (IRES), como ya se comentó en la introducción (ver **Figura 6**) [200][201]. El IRES abarca, aproximadamente, desde la posición 151 hasta la 735, aunque se ha sugerido que el tracto pY1 podría también jugar cierto papel en la traducción del HAV, ya que resultó necesario para la traducción en células COS-7 [202]; sin embargo, otros estudios sugieren que las 150 primeras bases no contribuyen a la actividad del IRES [200].

El comienzo de la traducción mediada por IRES en picornavirus requiere algunos de los factores de inicio que intervienen en el inicio de la traducción dependiente de *cap*. En el caso del HAV se sabe que participan eIF4A y eIF4G, aunque existe controversia sobre si este proceso requiere o no que eIF4G permanezca intacto [203][186].

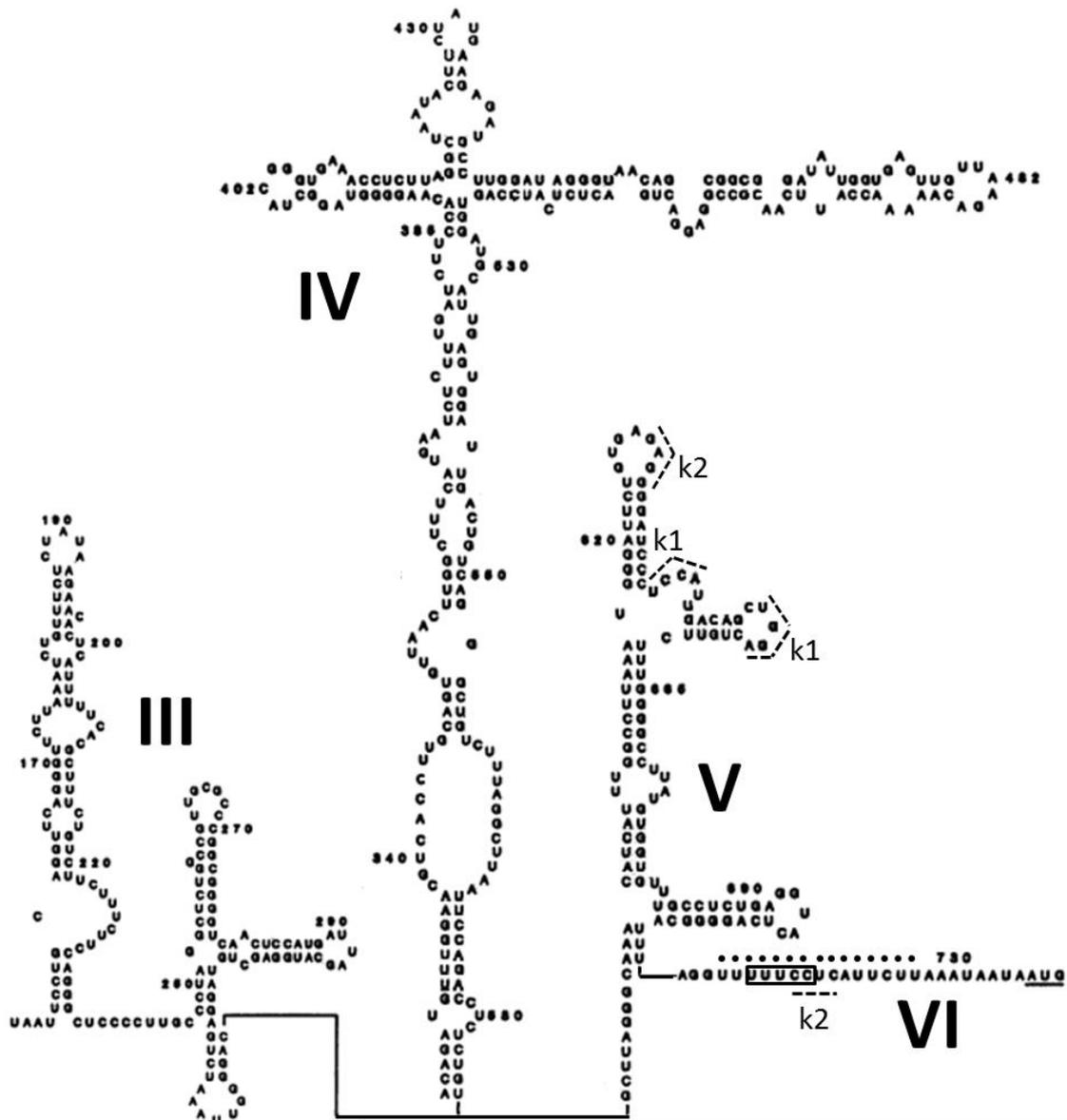


Figura 6 Representación de la estructura secundaria del IRES del HAV (posiciones 151-735). Se señalan los cuatro dominios que lo forman (del III al VI). Con líneas punteadas se señalan las bases que formarían parte de *pseudoknots*, tanto el predicho por Brown et al. [199] (k1), como el predicho por Le et al. [204] (k2). En el dominio VI, una línea de puntos sobre las bases indica el tracto pY2, mientras que un pequeño rectángulo enmarca la caja A descrita por Pilipenko et al. [205]. Imagen adaptada de Brown et al. [199].

Además de los factores de iniciación canónicos, hay factores auxiliares llamados ITAF (de *IRES-transacting factors*) que se requieren o contribuyen a modular (estimulando o reprimiendo) la actividad del IRES, aunque su rol preciso no se conoce [206]. La distribución y abundancia de estos factores varía en diferentes células [207]. El IRES del HAV interacciona con varias proteínas celulares, como la proteína de unión a trectos de polipirimidinas (PTB) o la

Capítulo 1 Antecedentes

gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). PTB se une preferentemente a RNAs con regiones ricas en pirimidinas y potencia la traducción dirigida por el IRES de HAV [208]. GAPDH tiene afinidad por distintas partes de la región 5'NCR de HAV [198]. La sobreexpresión de esta proteína en FRhK-4 produce un efecto negativo en la actividad del IRES de una cepa wt del HAV. Este efecto es menor en el caso de un IRES adaptado a cultivo celular (el de la cepa HM175-P16) [209]. En FRhK-4 se ha detectado GAPDH (pero no PTB) en ensayos de unión de sondas formadas por distintas partes del 5'NCR del HAV a extractos proteicos celulares [210]. El autoantígeno La (también conocido como antígeno B relacionado con el síndrome de Sjögren) se une con alta afinidad a dos regiones del IRES de HAV (entre las posiciones 151-354 y 533-744). En cuanto al impacto que dicha proteína produce en la traducción mediada por el IRES del HAV, se han comunicado situaciones contrapuestas. En un caso, la inhibición de La inhibió la traducción y la replicación de HAV [211], mientras que en otro, la regulación a la baja de La mediante RNA interferente tuvo un efecto positivo sobre la traducción [212].

Las mutaciones en 5'NCR que se acumulan durante la adaptación a crecer en cultivo celular y se asocian a una mayor replicación del virus lo hacen de una manera específica para la línea celular en la que han sido adaptadas [162]. Sin embargo, hay mutaciones que han surgido durante la adaptación del virus a crecer en líneas celulares diferentes a FRhK-4 que incrementan de manera detectable la tasa de crecimiento del virus en esta línea.[213].

Nuestro estudio de caracterización por secuenciación masiva de los distintos individuos presentes en las poblaciones se basó en una parte de la región 5'NCR que incluye casi todo el dominio IV y los dominios V y VI [200]. El dominio IV es indispensable para que se produzca la traducción mediada por IRES [200]. En el dominio VI se localiza el segundo tracto polipirimidínico pY2, directamente *upstream* del codón de inicio de la traducción. El tracto pY2 parece ser crítico para la iniciación interna de la traducción, ya que se requiere la región comprendida entre los nucleótidos 694 y 739 para que pueda tener lugar la traducción [200]. Contiene la caja A descrita por Pilipenko [205], un pentanucleótido (UUUCC) conservado en picornavirus, cuya presencia y distancia al codón de inicio de la traducción parece ser crucial para que se lleve a cabo la unión del ribosoma en esta

familia de virus [205]. En pY2 se han encontrado secuencias conservadas complementarias a una región del RNA ribosomal 18S rica en purinas [205]. Los modelos de la estructura secundaria de los IRES de picornavirus habían predicho que este tracto está en una región no estructurada [214][199][215]. Sin embargo, en una serie de modelos revisados de la estructura secundaria del IRES de distintos picornavirus se ha propuesto que una parte de este tracto participa en la formación de un *pseudoknot*, que en HAV incluiría la interacción de las posiciones 717 y 720 (localizadas en este tracto) con un loop situado en el dominio V (nucleótidos 629-632) [216][204]. Estas estructuras podrían ser importantes componentes del IRES [217]. En cualquier caso, la importancia de los trectos polipirimidínicos en la función del IRES de picornavirus ha sido respaldada por diversos estudios mutacionales [218][219][205].

La actividad del IRES puede ser modulada por estructuras secundarias que se forman en la región codificante. Estas regiones pueden unirse a proteínas celulares o participar en interacciones RNA-RNA. Pueden producirse, por ejemplo, interacciones de larga distancia entre el 5'NCR y la región codificante que afecten a la traducción independiente de *cap*, como ocurre en el virus de la hepatitis C [220]. También puede ocurrir que estas secuencias, cuando se localizan cerca del codón de inicio de la traducción, dificulten el paso de los ribosomas, influyendo positiva o negativamente en la traducción. Por ejemplo, en el virus Sindbis una horquilla downstream del codón de inicio permite la traducción mediada por el IRES de forma independiente al estado de activación del factor eIF2 [221]. En el caso del HAV, se ha sugerido que la ausencia de estructura secundaria en el extremo 5' de la región codificante estimula la traducción in vitro mediada por el IRES [222].

La importancia de la secuencia codificante en la síntesis proteica no se limita a la modulación del inicio de la traducción ni a la topología del RNA en esa región. Existe una relación entre el uso de codones de los mRNA y la cantidad y calidad de las proteínas que codifican, lo cual se pone de manifiesto en el papel crucial que ha tenido el uso de codones en un campo tan importante en biotecnología como la expresión de genes heterólogos [223]. La velocidad a la que se incorpora un aminoácido a un polipéptido naciente (velocidad de elongación) depende, entre otras cosas, de la abundancia de los tRNA que pueden aparearse con

Capítulo 1 Antecedentes

el codón que va a ser traducido. En general, los mRNA que codifican para las proteínas más abundantes en una célula tienen un sesgo pronunciado en su uso de codones, de manera que tienden a usar más frecuentemente los tRNA más abundantes (existe una correlación positiva entre el uso de codones y la abundancia de tRNA [224][225][226]). El uso de codones abundantes permite no solo aumentar la velocidad de elongación, sino también reducir la probabilidad de incorporar aminoácidos erróneos, reducir la probabilidad de que se produzcan desplazamientos del marco de lectura por parte de los ribosomas y reducir la probabilidad de que se produzcan terminaciones tempranas de la traducción (fenómenos revisados en [227]). Aunque el sesgo mutacional y la deriva genética jueguen un papel en la elección de codones, ésta también es el resultado de la selección natural [228][229]. Cuando existe una selección negativa hacia los codones raros y una positiva hacia los codones abundantes, se habla de selección traduccional.

La estructura de las proteínas también se encuentra relacionada con la elección de codones sinónimos [230]. Numerosos experimentos indican que la velocidad a la que se traduce una proteína se relaciona con la formación de su estructura nativa, lo cual puede afectar de forma crucial a su función. Se ha propuesto que los clústeres de codones raros forman regiones de traducción lenta, llegando a originar pausas temporales de los ribosomas que permitirían separar temporalmente la traducción de distintos segmentos de una proteína, coordinando su plegamiento cotraduccional [231]. Esta separación permitiría que se produjeran interacciones beneficiosas y evitaría interacciones indeseadas en el péptido nascente. Una mutación sinónima en el gen de resistencia a multidrogas (MDR1) afectó a su capacidad de interaccionar con un inhibidor [232]. Los niveles de mRNA y proteínas fueron similares entre la proteína wt y la mutante, pero presentaban conformaciones proteicas diferentes. Los autores propusieron que la presencia de un codón raro afectó a la coordinación temporal del plegamiento de esa proteína. Existe, pues, otro tipo de selección que optimiza la estructura y la función de las proteínas, conservando codones no óptimos en regiones estructuralmente determinantes. Esta selección, que recibe el nombre de selección por una velocidad de traducción controlada (*fine-tuning translation selection*), es especialmente importante en el caso del virus de la hepatitis A, un virus con un uso

de codones muy sesgado, pero en el sentido opuesto al de los genes altamente expresados, es decir, presenta abundancia de codones que la célula usa de forma poco frecuente, como se comentó en la introducción [189]. La región que codifica para la cápside de este virus contiene clústeres de codones raros asociados con los extremos carboxilo de los elementos estructurados [19]. Estos clústeres asegurarían un correcto plegamiento de las proteínas que conforman la cápside. La necesidad de la presencia de estas zonas de traducción lenta para que se produzca una eficiente multiplicación del HAV se puso de manifiesto mediante el uso de actinomicina D (AMD), una droga que inhibe la transcripción dependiente de las RNA polimerasas celulares y como consecuencia aumenta la cantidad de tRNA disponibles para la traducción del genoma vírico. La adaptación del virus a la AMD conllevó una deoptimización incrementada del uso de codones en la región que codifica para la cápside [189].

Una vez que el virus ha adaptado el uso de codones en las regiones de la cápside estructuralmente sensibles (o paralelamente a esta adaptación) a una mayor abundancia de moléculas de tRNA, podría ocurrir un proceso de selección traduccional en aquellas otras regiones que no están implicadas en el control del plegamiento cotraduccional. Es decir, podrían surgir (y tal vez seleccionarse) individuos que presentasen mutaciones que aprovecharan las condiciones creadas por la AMD para sintetizar más rápidamente proteínas estructurales de la cápside, sin que éstas resultasen disfuncionales.

4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1 Diversidad del IRES en las poblaciones largamente adaptadas a multiplicar en presencia de AMD: las mutaciones U359C, U726C y U590C se encuentran presentes en un 37.5 %, 31.25 % y 25 % de haplotipos

En el estudio mediante secuenciación masiva del IRES de las poblaciones F0.05LA y F0.2LA se encontraron dieciséis haplotipos diferentes, denominados de $\phi 1$ a $\phi 16$. En la población F0.05LA están presentes todos los haplotipos, mientras que en F0.2LA solo se encuentran cuatro. El que los haplotipos de la población F0.2LA sean un subconjunto de los que aparecen en F0.05LA es coherente con el hecho de que ambas poblaciones tienen un origen común (ambas derivan de una población que había sido pasada 65 veces en presencia de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD; ver **materiales y métodos**) y con que el ambiente en el que multiplica F0.2LA sea más restrictivo. El alto grado de silenciamiento celular inducido por la presencia de 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de AMD (superior al 80 %) provoca una reducción importante en la viabilidad celular (90 % a los 4 días) [189], lo cual supone unas condiciones más selectivas para la multiplicación del virus, que llevarían a la selección de un número menor de variantes.

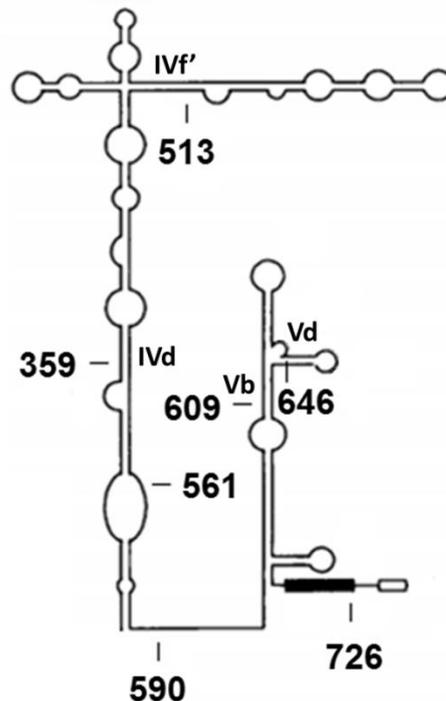


Figura 7 Localización de las distintas mutaciones encontradas en los dominios IV, V y VI del IRES con respecto a la secuencia consenso de L0, la población parental. Se indican las hélices

Capítulo 1 Resultados y discusión

en las que se localizan las mutaciones que forman apareamientos con otras bases. El rectángulo negro representa el tracto polipirimidínico pY2 y la caja blanca, el primer codón de inicio de la traducción.

En la **Tabla 2** se pueden ver las diferencias nucleotídicas encontradas en cada uno de los haplotipos con respecto a la secuencia consenso de L0 (población predecesora de F0.05LA y F0.2LA) y la frecuencia con que se encontró cada uno de ellos en cada población. En el conjunto de haplotipos se encuentran solo 7 mutaciones con respecto a la secuencia consenso de L0, que es igual a $\phi 1$, el haplotipo mayoritario en la población F0.05LA. Dichas mutaciones son: U359C, A513G, U561C, U590C, C609U, G646A y U726C. En la **Figura 7** se representa la localización de cada una de estas mutaciones en el IRES. Algunos haplotipos presentan combinaciones de estas mutaciones. U561C y G646A solo se encuentran una vez, mientras que el resto de mutaciones aparece en más de un haplotipo (de 3 a 6 veces), siendo la mutación U359C la que se encuentra en una mayor cantidad de haplotipos (37.5 %), seguida de U726C (31.25 %) y U590C (25 %).

Tabla 2 Diferentes haplotipos encontrados en el IRES en las poblaciones F0.05LA y F0.2LA mediante secuenciación masiva. Los cambios representan sustituciones nucleotídicas con respecto a la secuencia consenso de L0, la población parental. Entre paréntesis se indican a qué haplotipos corresponden las secuencias consenso de las poblaciones L0, F005LA y F02LA. N: número total de secuencias obtenidas en la muestra correspondiente.

HAPLOTIPO	CAMBIO(S)	FRECUENCIA	
		F0.05LA (N=6768)	F0.2LA (N=7402)
$\phi 1$ (L0, F005LA)	-	39,10	12,24
$\phi 2$	C609U	19,99	3,15
$\phi 3$	U359C	10,79	0
$\phi 4$ (F02LA)	A513G	6,96	80,05
$\phi 5$	U590C	4,52	0
$\phi 6$	U359C, C609U	4,15	0
$\phi 7$	U726C	3,47	0
$\phi 8$	U561C	1,55	0
$\phi 9$	G646A	1,14	0
$\phi 10$	U590C, U726C	1,58	0
$\phi 11$	C609U, U726C	1,57	0
$\phi 12$	A513G, C609U	1,37	4,57
$\phi 13$	U359C, U590C	1,20	0
$\phi 14$	U359C, A513G	1,14	0
$\phi 15$	U359C, U726C	0,75	0
$\phi 16$	U359C, U590C, U726C	0,72	0

4.2.1.1 Predicción de la estructura secundaria del RNA de los haplotipos del IRES encontrados en las poblaciones adaptadas a multiplicar en presencia de AMD: la mutación U590C produce un cambio en la estructura secundaria predicha del IRES

En los casos en que el RNA tiene actividad reguladora (como sucede con los IRES y su papel en el inicio de la traducción), ésta puede estar relacionada con secuencias específicas y/o depender de su estructura [233]. Por ello, si nuestro objetivo es sondear las mutaciones presentes en la cuasiespecie en la región del 5'NCR en busca de aquellas que puedan provocar cambios en la traducción del RNA del HAV, es importante estudiar los cambios estructurales que estas mutaciones puedan provocar en el IRES. Para ello en nuestro estudio utilizamos Mfold, un algoritmo de predicción de la estructura secundaria del RNA que usa el método de la minimización de la energía libre [234]. En este método, la secuencia de interés se pliega en todas las conformaciones de estructura secundaria posibles y se calcula la energía para cada una de ellas. El plegamiento con la energía libre más baja es la que se predice que predomina en solución. Aparte de esta conformación, Mfold computa aquellas que presenten una energía libre por debajo de un cierto umbral. Nuestro estudio fue realizado manteniendo el punto de corte por defecto, que es del 5 % de la energía libre mínima.

Para cada uno de los haplotipos hallados en la secuenciación masiva de F0.05LA y F0.2LA se modeló la estructura de los dominios IV, V y VI. Para que el programa pudiera plegar el dominio IV entero, se añadieron los nucleótidos 324 a 331 de la secuencia consenso (este tramo es igual en la secuencia consenso de F0.05LA y F0.2LA). Las restricciones que se introdujeron en el Mfold (que ayudan a mejorar la eficacia de la predicción) se basan en la información sobre sustituciones covariantes y puntos de corte de RNAsas específicas de RNA de cadena sencilla o doble publicadas en [199]. Salvo el modelo revisado de Le et al [204], que se hizo a partir de las secuencias que se encontraban en aquel momento en las bases de datos, no tenemos constancia de la existencia de un modelo más reciente de la estructura secundaria del IRES del HAV.

En todos los haplotipos, la secuencia termodinámicamente más estable que se obtuvo es similar a la publicada por Brown et al [199] (ver **Figura 8A** y

Capítulo 1 Resultados y discusión

compararla con **Figura 6**). De las 7 mutaciones encontradas en nuestro estudio: 4 (U359C, A513G, C609U y G646A) producen cambios en la estabilidad de las hélices donde se encuentran ubicadas (IVd, IVf, Vb y Vd) pero no en la estructura, 2 no afectan ni a la estabilidad ni a la estructura (U561C y U726C) y solo una (U590C) provoca cambios en la estructura secundaria predicha.

C609U cambia un apareamiento C-G por uno U•G en la hélice Vb, lo que hace disminuir la estabilidad de la misma (+2.7 kcal/mol). U359C, que reemplaza un apareamiento U•G por uno C-G, ayuda a estabilizar la hélice IVd con respecto a L0 (-2.0 kcal/mol). La mutación A513G afecta a un extremo de la hélice IVf. Esta mutación, que conlleva un intercambio de un emparejamiento U-A por uno U•G, es estabilizadora de la hélice que la contiene (-0.3 kcal/mol). Con la mutación G646A, que se localiza en la hélice Vd, se da el caso opuesto: la sustitución de un par G•U por otro A-U hace aumentar la energía libre (+0.4 kcal/mol). U726C y U561C afectan a regiones no estructuradas y no tienen consecuencias ni en la estructura predicha ni en la estabilidad de la misma (ver **Figura 7** y **Tabla 3**).

Tabla 3 Efecto predicho sobre la estructura secundaria del IRES del HAV de las mutaciones encontradas en el estudio mediante secuenciación masiva del IRES de las poblaciones F0.05LA y F0.2LA

Mutación	Localización en la estructura secundaria ^a	Efecto predicho sobre la estructura secundaria
U359C	IVd	-2 kcal/mol
A513G	IVf	-0.3 kcal/mol
U561C	Bucle interno en el dominio IV	Ninguno
U590C	Segmento desestructurado entre los dominios IV y V	Aparición de una estructura alternativa
C609U	Vb	+2.7 kcal/mol
G646A	Vd	+0.4 kcal/mol
U726C	pY2	Ninguno

^a Según el modelo publicado por Brown et al. [199]

La mutación U590C también se sitúa en un segmento desestructurado según el modelo de Brown. A pesar de ello, es la única mutación que provoca la aparición de una conformación alternativa a la que resulta común a todos los

haplotipos (ver **Figura 8**). En esta estructura alternativa, el dominio V es más largo y está menos ramificado, ya que desaparece la horquilla Ve. Además, la región que conecta los dominios IV y V se reduce a 2 nucleótidos, lo que convertiría ambos dominios en uno solo, al transformarse el bucle interno que se encuentra entre las hélices IVa y IVb en lo que en la literatura científica se conoce como un *multiloop*, *multibranch loop* o *helical junction*. Este *multiloop* de tres ramas (*multibranch loop* o MBL) conectaría los dominios IV y V, además de una pequeña hélice, cuyos extremos 5' y 3' continúan hacia los dominios III y VI, respectivamente

Durante la adaptación del virus a multiplicar en FRhK-4 y otras líneas celulares se ha descrito repetidamente la mutación U687G, lo que indica la importancia de esta mutación en el proceso de adaptación a cultivo celular [162][169][168][182]. Esta mutación también está presente en la cepa HM-175/43c y en las poblaciones derivadas de la misma que hemos utilizado en este estudio. U687G introduce un *mismatch* en la hélice Ve. Si a la secuencia presente en L0 se le introduce la retromutación G687U, que restaura la secuencia *wild type* en ese *stem-loop*, y se predice la estructura de esta nueva secuencia usando el Mfold, Ve resulta más estable (-1,9 kcal/mol). Esto era de esperar, ya que quedan enfrentadas dos guaninas, en lugar de una guanina y un uracilo, moléculas que sí pueden formar puentes de hidrógeno entre sí (ver **Figura 9A**). Si se hace lo mismo con la secuencia $\phi 5$ (que contiene la mutación U590C), la conformación alternativa que hemos descrito ya no aparece (ver **Figura 9B**). El resultado de ambas pruebas *in silico* parece indicar que la desestabilización del *stem-loop* Ve podría estar favorecida durante la adaptación en células FRhK-4. Además, la aparición de cambios estructurales debido a una mutación (como los que predictivamente provoca U590C) podría depender de la existencia previa de otra mutación (U687G en nuestro caso), de manera que el valor adaptativo de una serie de mutaciones sea dado por el orden en que aparecen. En palabras de A. Wagner: el efecto de una mutación depende de la historia evolutiva del genotipo que la porta [235].

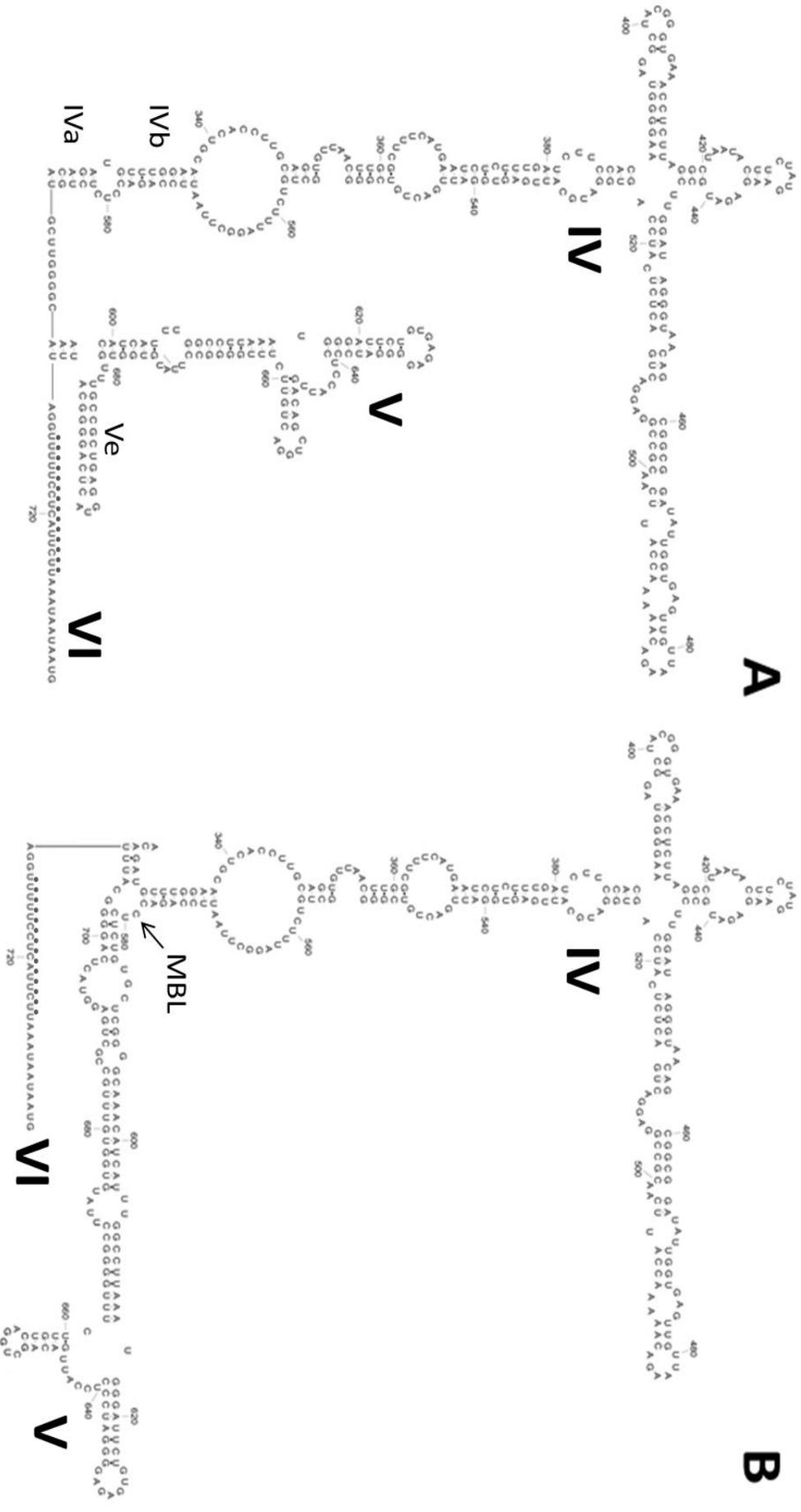


Figura 8 Estructuras secundarias de los dominios IV, V y VI predichas con el Mfold. (A) Conformación más estable en todos los haplotipos encontrados. Se indican las hélices IVa, IVb y Ve. (B) Conformación alternativa predicha en los haplotipos que presentan la mutación U590C. La flecha que sigue a las letras MBL señala el *multiloop* que aparece en esta estructura. El trazo pY2 (en el dominio VI) se señala mediante una línea de puntos situada sobre las bases. La representación de las estructuras se realizó mediante el programa xRNA.

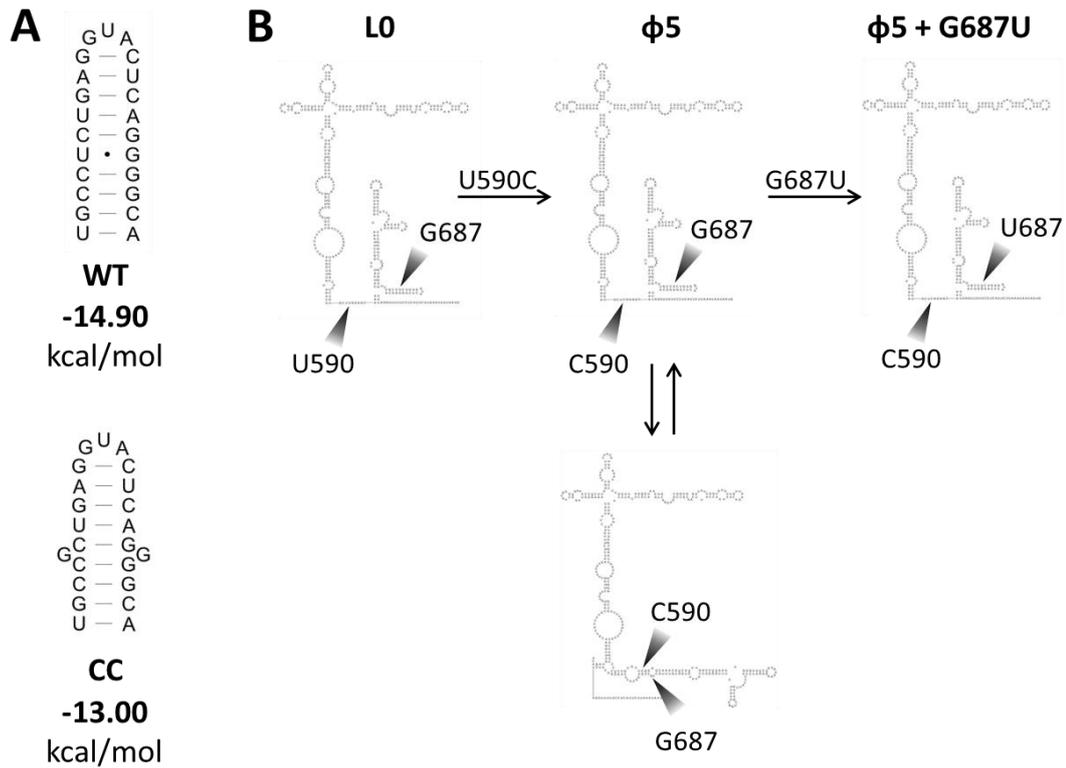


Figura 9 Efecto de la mutación U687G en la formación de la estructura alternativa descrita. **(A)** Representación de la horquilla de la que forma parte Ve. Arriba, la secuencia que se encuentra en la cepa wt HM175 WT. Abajo la secuencia que presentan L0 y todas las poblaciones víricas con las que hemos trabajado, que derivan de ésta (CC). Debajo de cada estructura se representa la variación de energía libre que representa la formación de cada una de ellas. **(B)** La mutación U590C, que diferencia a la secuencia consenso de L0 (izquierda) del haplotipo φ5 (centro), permite la aparición de una estructura alternativa en este último (centro, abajo). Si al haplotipo φ5 se le sustituye la G por una U en la posición 687, la formación de esta estructura alternativa ya no está favorecida energéticamente (derecha).

En la conformación alternativa que hemos descrito, el segundo tracto polipirimidínico (pY2) sigue estando desestructurado (ver **Figura 8 B**). Por lo tanto, la caja A continúa expuesta y sigue existiendo la posibilidad de formación del pseudoknot K2, aspectos que podrían ser importantes para que pueda tener lugar el comienzo de la traducción [205][217].

El modelo de la estructura de la región 5'NCR del HAV vigente fue publicado en 1991 [199]. Para desarrollarlo utilizaron una combinación de técnicas enzimáticas de clivaje de regiones de cadena doble o sencilla y un análisis comparativo de secuencias para encontrar sustituciones covariantes, indicadoras de potenciales estructuras conservadas. Para realizar este análisis utilizaron 9 secuencias. Desde entonces se han añadido muchas otras secuencias a las bases de

datos. En el presente trabajo se incluyeron 81 secuencias del GenBank pertenecientes al menos a 4 genotipos diferentes (I, II, III y V) y se realizó un alineamiento de las mismas. Los nucleótidos que forman el supuesto pseudoknot k2 (ver **Figura 6**) se encuentran conservados en todas las secuencias estudiadas. Además, los cuatro pares de bases que forman la hélice que conecta el *multiloop* (señalado como MBL en la **Figura 8 B**) con el dominio VI en la estructura alternativa que aparece cuando se encuentra presente la mutación U590C (ver **Figura 8 B**), se pueden formar en cada una de las 81 secuencias.

Dado el escaso conocimiento que se tiene acerca del funcionamiento del IRES del virus de la hepatitis A, resulta difícil imaginar qué beneficio podría aportarle una mutación que facilita una reestructuración importante en varios de sus dominios clave. Recientemente se ha descrito que el mecanismo de inicio de la síntesis proteica en picornavirus es dual: al inicio de la infección, la traducción del RNA es llevada a cabo de una forma que depende de que eIF2 esté activo, mientras que más tarde el factor eIF2 activo no participa en el proceso [236]. La proteína quinasa PKR, cuando se activa, fosforila el factor eIF2, inactivándolo, en respuesta a infecciones víricas, bloqueando el inicio de la traducción celular y vírica. Esta proteína se activa durante la infección de hepatocitos por el virus de la hepatitis A, tras formarse RNA de doble cadena durante la replicación vírica [237]. Se ha comprobado que la traducción dependiente del IRES de HAV también puede tener lugar cuando eIF2 ha sido inactivado por fosforilación [203]. Entre los virus existen varios mecanismos mediante los cuales se consiguen posicionar los ribosomas en el codón de inicio para comenzar la traducción independientemente del estado de activación del factor eIF2 [238][239][221]. Que en el caso de picornavirus esto se consiga mediante cambios en la conformación del IRES, es algo que, hasta donde tenemos conocimiento, no se ha estudiado. Dejando aparte esta elucubración, Martínez-Salas [240] ha señalado que en el interior de las células infectadas por picornavirus se producen cambios fisiológicos que podrían inducir la reorganización de la estructura de sus IRES, lo cual podría tener consecuencias importantes en su capacidad de reclutar factores que actúan en *trans*, modulando con ello la eficiencia de la traducción. Por tanto, cierta flexibilidad estructural podría ser beneficiosa para el IRES del HAV, y dicha

flexibilidad puede ser favorecida mediante una o unas pocas sustituciones nucleotídicas.

Los cambios encontrados con ayuda del Mfold en los haplotipos con dos o tres mutaciones con respecto a la secuencia de L0 fueron simplemente la suma de los cambios provocados por cada una de las mutaciones, sin que se encontrasen nuevas estructuras ni interacciones entre las distintas mutaciones. Por tanto, la estructura alternativa descrita en los párrafos anteriores también está presente en los haplotipos $\phi 10$, $\phi 13$ y $\phi 16$, puesto que incluyen el cambio U590C.

El sistema de secuenciación que hemos empleado (454 GS Junior, de Roche) permite analizar amplicones de menos de 500 pares de bases (incluyendo los cebadores, que no aportan información acerca de las posiciones donde hibridan). Parte de la secuencia del IRES (que tiene una longitud de unas 580 bases, aunque algunos autores sostienen que su longitud es aún mayor [201]) no ha sido analizada: el dominio III y los primeros nucleótidos del dominio IV. El extremo 3' del IRES sí que ha sido cubierto, ya que el cebador *reverse* que utilizamos hibrida más allá del primer codón de inicio de la traducción. Por tanto, se estudió casi todo el dominio IV y los dominios V y VI, que en conjunto representa aproximadamente un 75 % de la longitud total del IRES.

La capacidad de una secuencia de RNA para funcionar como IRES obedece a estructuras que operan a múltiples niveles, desde la secuencia primaria hasta estructuras tridimensionales que se forman al interaccionar de forma dinámica con proteínas [241]. Por tanto, si se pretende predecir las consecuencias que pueden tener ciertas mutaciones puntuales en la región 5'NCR sobre la actividad del IRES, se ha de hacer acopio de la mayor cantidad de información posible con respecto a dicha región y dicha actividad. Por ello, en un apartado posterior se analizará la actividad del IRES de distintos haplotipos y la relación con su estructura.

4.2.1.2 La mutación U→C en la posición 726 cumple criterios para afectar a la actividad del IRES

Todas las mutaciones encontradas ocurren en regiones descritas como que participan en la actividad del IRES, salvo G646A (el uso de mutantes con deleciones ha indicado que el fragmento 638-666 no es esencial para la actividad del IRES [200]).

Varias mutaciones que se han seleccionado en el 5'NCR de cepas del HAV adaptadas a cultivo celular y que han potenciado su traducción han eliminado uracilos de potenciales sitios de unión con GAPDH [163][198]. Esta proteína redujo la actividad del IRES de una cepa wt en mayor medida que la de uno "adaptado a cultivo celular" [209]. Debido a que esta molécula se une preferentemente a secuencias de RNA ricas en U, las mutaciones que disminuyen el número de uracilos podrían reducir la afinidad entre el RNA y GAPDH [209][198]. En nuestro estudio hemos encontrado 4 mutaciones que resultan en la pérdida de uracilos: U359C, U561C, U590C y U726C. En los cuatro casos el cambio es a citosina y, curiosamente, en el caso de las mutaciones U359C, U590C y U726C, el nucleótido que cambia se encuentra en el centro de una secuencia CUURR. Mientras GAPDH interacciona con la región 597-746 del HAV, no se ha demostrado su unión entre las posiciones 359 y 590 [198], por lo que U726C (que además se sitúa en el tracto polipirimidínico pY2, rico en uracilos y posiblemente crítico en la traducción mediada por IRES, como ya se dijo) es la única de las mutaciones encontradas que podría reducir la unión al RNA de GAPDH.

Además, se ha propuesto que la posición 726 podría interactuar con el rRNA 18S [204], y el cambio de U a C haría disminuir la afinidad del IRES por dicho RNA ribosomal. Algunos estudios muestran que en el inicio de la traducción están implicados ciertos emparejamientos de bases entre el rRNA 18S y la región 5' no traducida (5'UTR) de los mRNA [242][243][244]. Esta complementariedad, que se cree que puede ser importante en el reclutamiento de ribosomas por parte del IRES de poliovirus y otros picornavirus [245], puede regular la traducción de ciertos mRNA. En el caso del mRNA que codifica para la proteína de homeodominio Gtx de ratón, la tasa de traducción disminuyó conforme aumentaba el grado de complementariedad entre su 5'UTR y el rRNA 18S [246]. Por tanto, un cierto grado

de complementariedad podría ser importante para reclutar la subunidad ribosomal 40S, pero demasiada complementariedad disminuiría las probabilidades de traducción, debido que los ribosomas podrían ser secuestrados de una manera improductiva [247]. De hecho, el lento crecimiento en HAV se ha relacionado con una mayor extensión, en comparación con otros picornavirus, del posible apareamiento de bases entre pY2 y el extremo 3' del rRNA 18S [245]. Un cambio en esta complementariedad, como el que puede suponer una mutación puntual, podría afectar a la capacidad del mRNA del HAV para competir por los ribosomas con los mRNA celulares, un aspecto clave en la multiplicación del HAV. La capacidad competitiva de un mRNA también podría ser variable según en qué línea celular se encuentre. Esto podría deberse a la distinta presencia y/o abundancia de proteínas que se unen a las regiones 5' no codificantes en distintas líneas celulares y que influyen en su traducción [247].

4.2.1 La combinación de las mutaciones U359C, U590C y U726C aumenta la actividad del IRES en células FRhK-4

Partiendo del plásmido bicistrónico G1RC, se creó una serie de vectores mediante mutagénesis dirigida para comparar la actividad del IRES asociada con algunos de los haplotipos encontrados tras secuenciar la región 5'NCR de las poblaciones F0.05LA y F0.2LA, y así averiguar si alguna de las mutaciones halladas puede influir positivamente en la traducción mediada por IRES en células FRhK-4. El plásmido G1RC posee una copia del gen que codifica para la luciferasa de *Photinus pyralis* (FLuc) y otra del gen de la luciferasa de *Renilla reniformis* (RLuc). El gen FLuc es traducido a partir del IRES del HAV, mientras que la traducción del gen RLuc es dependiente de *cap*. De esta manera, la relación FLuc/RLuc representa la actividad del IRES normalizada con respecto a la cantidad de RNA transcrito a partir del plásmido presente en la célula. Tras aplicar un enfoque basado en el conocimiento que se tiene de las regiones del IRES del HAV que juegan un papel importante en el inicio de la traducción, concluimos que la mutación U726C es una de las que podría afectar a la actividad del IRES. Por otra parte, según el estudio realizado sobre la predicción de los cambios en la estructura secundaria, la mutación U590C podría provocar una reestructuración notable en la estructura de la región 3' del IRES. Por tanto, como resultado de nuestro estudio previo,

Capítulo 1 Resultados y discusión

seleccionamos como haplotipos de interés a $\phi 5$ y $\phi 7$, ya que contienen las mutaciones U590C y U726C, respectivamente.

No encontramos diferencias significativas al comparar la relación FLuc/RLuc de los IRES más comunes de la población F0.05LA (plásmido G1RL0, que es el correspondiente al haplotipo $\phi 1$, que es también el más común en L0) y la población F0.2LA (plásmido G1R $\phi 4$, correspondiente al haplotipo $\phi 4$) con la de los haplotipos $\phi 5$ y $\phi 7$ (plásmidos G1R $\phi 5$ y G1R $\phi 7$), aunque este último muestra una tendencia a presentar mayor actividad (ver **Figura 10**). A pesar de que en la estructura secundaria de los haplotipos con dos y tres mutaciones no se apreciaron efectos epistáticos, se ha descrito que, en general, los cambios fenotípicos que conducen a una mejor adaptación del HAV a replicar *in vitro* se asocian a clústeres de mutaciones, en lugar de a mutaciones individuales [248][161][182][249]. Decidimos, por tanto, testar la actividad del IRES de los haplotipos en los que se encuentran juntas ambas mutaciones: $\phi 10$ y $\phi 16$ (este último además cuenta con la mutación U359C). La construcción plasmídica que contiene las mutaciones U590C y U726C juntas (G1R $\phi 10$) presenta una actividad ligeramente superior a los mutantes que solo presentan U590C o U726C, aunque esta diferencia no es significativa. Sin embargo, la actividad de G1R $\phi 10$ sí es significativamente superior a la de G1RL0 (ver **Figura 10**). De manera sorprendente, la relación FLuc/RLuc de G1R $\phi 16$, el triple mutante U590C, U726C, U359C, es aún mayor y de forma significativa con respecto al resto de plásmidos ensayados. En concreto, G1R $\phi 16$ presenta una actividad 1.53 veces mayor que G1R $\phi L0$, el plásmido correspondiente a la secuencia más abundante en F0.05LA. Este incremento en la actividad del IRES se encuentra en el mismo rango (1.5-5 veces mayor) que el provocado por una mutación puntual en el IRES del virus de la fiebre aftosa (FMDV) asociada a un fenotipo hipervirulento [250].

Como la diferencia existente entre G1R $\phi 16$ y G1R $\phi 10$ a nivel de secuencia es la mutación U359C, decidimos probar también la capacidad de iniciar la traducción de FLuc que posee $\phi 3$ (el haplotipo que contiene exclusivamente la mutación U359C), para ver si la mayor actividad de G1R $\phi 16$ se debe exclusivamente a la presencia de esta mutación. Como se puede apreciar en la

Figura 10, la relación FLuc/RLuc de G1R ϕ 3 es inferior a la de G1R ϕ 16. Por tanto, la elevada actividad de G1R ϕ 16 en comparación con G1RL0 se debe a la combinación de dos o tres mutaciones, y no a los efectos provocados por una única mutación. Así, en consonancia con la bibliografía, parece que las mutaciones que afectan de manera importante a la traducción dependiente del IRES lo hacen cuando se presentan en grupo, y no de forma individual [248][182][87].

La mutación U359C produce un efecto positivo cuando se encuentra en combinación con U590C y U726C. Como hemos visto, esta mutación ayuda a estabilizar la hélice IVd, pero no provoca cambios en la estructura predicha. Por otra parte, algunas de las mutaciones que han potenciado la traducción del virus en cultivo celular han eliminado uracilos de potenciales sitios de unión con GAPDH [8] [58]. Sin embargo, aunque la mutación U359C elimina un uracilo, no se ha demostrado que la proteína GAPDH se una al IRES en esa región. Cuando el IRES se encontrase en la estructura alternativa que hemos descrito U359C podría provocar un cambio en la afinidad y/o accesibilidad del IRES por algún factor necesario para su funcionamiento, como por ejemplo el eIF4G.

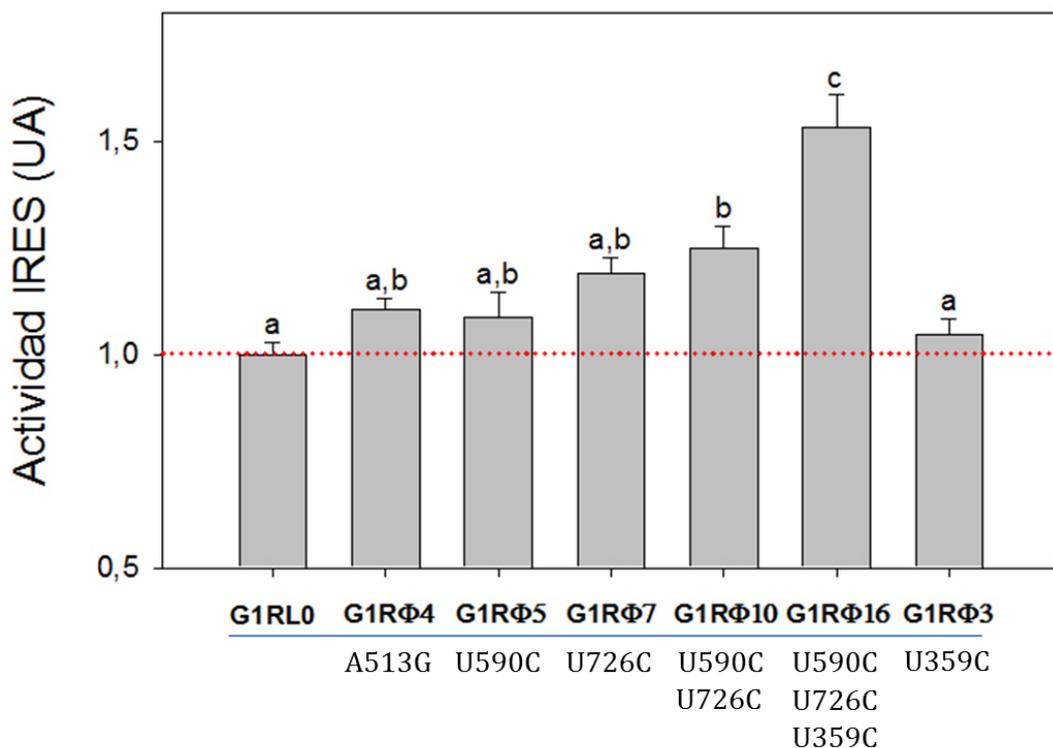


Figura 10 Actividad del IRES (FLuc/RLuc) medida tras transfectar de forma transitoria células FRhK-4 con plásmidos derivados de G1RC, expresada como unidades arbitrarias

Capítulo 1 Resultados y discusión

(UA). Se representa la media \pm el error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) se señalan utilizando el criterio de letras a=a,b; a,b=b; a**≠**b; etc. Debajo del nombre de cada plásmido se han anotado los cambios de secuencia de cada uno con respecto a la secuencia consenso de L0. Este análisis se realizó para cada plásmido al menos 2 veces de forma independiente con 3 réplicas en cada caso.

El análisis de la traducción de luciferasa dependiente del IRES del HAV indica que en la población F0.05LA existen unos genomas en proporciones muy pequeñas (1,58 % y 0,72 % del total en los casos de ϕ 10 y ϕ 16, respectivamente) que poseen un IRES más eficiente que el del haplotipo mayoritario ϕ 1 (representado por el plásmido G1RL0). Aún en el caso de que los haplotipos que están presentes en F0.05LA y cuya actividad no se testó tuvieran un IRES tan activo o más que G1R ϕ 16, la proporción de IRES más eficientes que ϕ 1 no llegaría al 50 %, ya que solamente ϕ 1, ϕ 4, ϕ 5, ϕ 7 y ϕ 3 (todos ellos con una actividad estadísticamente indistinguible) suman el 64.8 % del total. En el caso de la población F0.2LA, no sabemos si existen IRES más activos que el que se encuentra de forma mayoritaria, ya que los dos haplotipos minoritarios (ϕ 2 y ϕ 12) no se testaron, puesto que los cambios existentes en estos haplotipos no presentaron características especiales.

La diferencia entre la actividad de G1RL0 y G1R ϕ 16 (1.5 veces) podría ser una subestimación del efecto que las mutaciones que diferencian a ambos plásmidos producen realmente en la traducción del virus. Mientras que en nuestro sistema de traducción la cantidad de RNA molde disponible para la traducción se va acumulando de forma lineal como producto de la transcripción del plásmido, los virus se acumulan de forma exponencial en la célula durante la fase de maduración [251].

4.2.2 Efecto de las mutaciones U359C, U590C y U726C sobre la replicación vírica

Se ha descrito una relación entre la eficiencia del IRES del HAV y la replicación del HAV en cultivo celular [163][182]. Por este motivo, decidimos evaluar el impacto que las mutaciones que hemos visto que incrementan la actividad del IRES del HAV en células FRhK-4 pueda tener sobre la replicación del virus en las mismas células. Para ello, partiendo de un plásmido que contiene una

copia del genoma completo de la cepa HAV/7 (pHAV/7, que puede ser transcrito en RNA capaz de iniciar una infección mediante transfección [166]), un virus adaptado a cultivo celular, construimos dos mutantes modificando su secuencia en la región 5'NCR, de manera que el IRES coincidiera con los de L0 y ϕ 16, mediante la introducción de una serie de mutaciones, tal y como se describe en la sección de Materiales y métodos.

El RNA infeccioso producido a partir de la transcripción de estos dos plásmidos (pL0 y p ϕ 16) fue transfectado en monocapas de células FRhK-4 contenidas en placas de 24 pocillos. Siete días después de la transfección, se cuantificó el RNA de cadena negativa del HAV intracelular.

En la replicación del HAV se genera un intermediario de cadena negativa. La detección de esta cadena sirve, por tanto, como indicativo de la replicación del virus [252]. Muchos de los métodos que se han utilizado para detectar la cadena negativa de virus de RNA han dado resultados conflictivos debido a la falta de especificidad de cadena [253]. Se han empleado diversas estrategias para mejorar la especificidad de estas técnicas, como la síntesis de cDNA a altas temperaturas (mediante transcriptasas reversas termoestables) o el uso de cebadores que contienen etiquetas [254]. En este estudio se desarrolló una técnica para detectar y cuantificar el intermediario de cadena negativa del HAV mediante RT-qPCR. Tras la transcripción reversa, en la que se empleó un cebador que contiene una etiqueta en el extremo 5', se realizó una digestión de RNA, para reducir la probabilidad de amplificación de RNA de cadena positiva. A continuación, el producto de la digestión se amplificó mediante una qPCR usando la etiqueta del cebador de la RT como cebador directo y un cebador reverso específico (para más detalles, consultar Materiales y métodos). Mediante pruebas preliminares observamos que este método detecta específicamente cadena negativa. Para la cuantificación se preparó un estándar de RNA de cadena negativa a partir de un plásmido en el que había sido clonada la región 68-240 del HAV (pHM-175/43c) [124].

En el momento en que decidimos desarrollar el método de detección de cadena negativa del HAV y emplearlo en este estudio, ya había otros métodos publicados con el mismo fin [255][252][256]. Uno de ellos también se basa en la

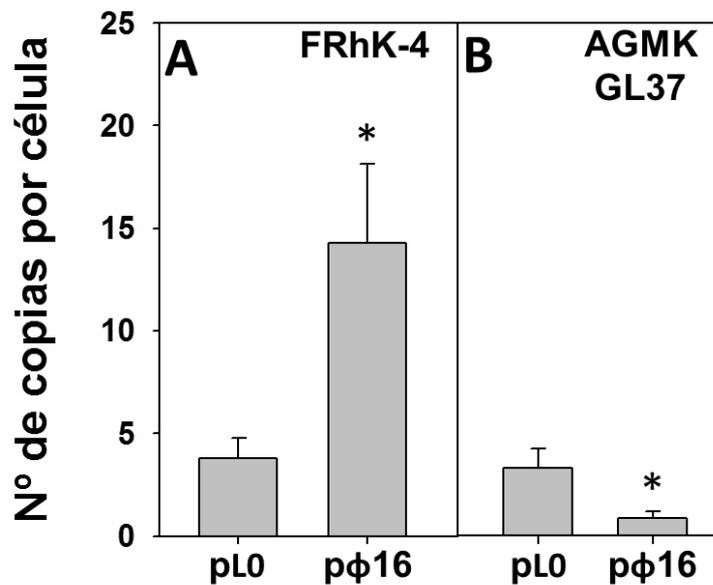


Figura 11 Niveles intracelulares de RNA de cadena negativa del HAV, 7 días después de haber transfectado células FRhK-4 (A) o AGMK GL37 (B) con RNA transcritos a partir de los plásmidos pL0 y pφ16. Antes de extraer el RNA se hizo un recuento del número de células para calcular el número de copias presentes en cada célula. Se representa la media de 2 experimentos realizados de forma independiente con 2 réplicas en cada caso \pm el error estándar. El símbolo * indica que existe significancia estadística, $P < 0.05$.

RT-qPCR, aunque empleando la transcriptasa reversa termoestable *rTth* de *Thermus thermophilus* como estrategia para alcanzar una elevada especificidad de cadena [256]. Nuestro método consistió en una modificación de un ensayo para cuantificar el HAV en muestras clínicas y de marisco mediante RT-qPCR que fue desarrollado por nuestro grupo de investigación [124]. Como el método de Costafreda et al. [124], que se emplea habitualmente en nuestro laboratorio, y el método aquí utilizado hacen uso del mismo kit de PCR a tiempo real y la misma sonda (aunque uno detecta cadena positiva y el otro, negativa), fue relativamente sencillo desarrollar el método para detectar la cadena negativa del HAV.

El RNA con la secuencia de φ16 produjo más RNA con sentido negativo al ser transfectado en células FRhK-4 que el transcrito derivado de pL0 (3.8 veces más, 7 días después de la transfección) (ver **Figura 11A**). Estos resultados sugieren que en el pool de F0.05LA existen genomas con un IRES con mayor capacidad de permitir la replicación vírica que el IRES mayoritario. Como hemos mencionado anteriormente, hay varias proteínas celulares que se unen al IRES del

HAV y participan en la traducción del virus. Las mutaciones U359C, U590C y U726C, que influyen positivamente en la replicación del HAV en FRhK-4, podrían actuar aumentando o reduciendo la afinidad de esta región por una o varias proteínas celulares de unión al RNA.

La importancia de la traducción en el caso del HAV podría depender del tipo de célula en que multiplique [182]. Funkhouser et al. [182] sugirieron que la replicación del HAV en el caso concreto de FRhK-4 no está limitada por la eficiencia de la traducción del virus. Una serie de mutaciones que afectan a la región 5'NCR, necesarias para la eficiente replicación de HM175 en células MRC-5 [257], no produjo un impacto apreciable sobre la replicación del virus en células FRhK-4 [182]. Por otra parte, se ha descrito otro conjunto de mutaciones presentes en el 5'NCR, que incrementa tanto la traducción como la replicación del HAV en células BS-C-1 pero no en FRhK-4 [162][163]. En ambos casos, estas mutaciones se seleccionaron en virus que habían sido adaptados a crecer en células distintas a las FRhK-4 (MRC-5, AGMK y BS-C-1), mientras que las mutaciones que se han puesto a prueba en este estudio se detectaron en poblaciones víricas que fueron pasadas muchas veces en células FRhK-4. En nuestro caso, unas mutaciones localizadas en el IRES y que aumentaron la traducción de un gen reportero en FRhK-4, aumentaron también la tasa de replicación en estas células. Por tanto, nuestros estudios sugieren que una traducción limitada podría contribuir a la baja replicación del HAV en FRhK-4. Aunque lo descrito en los citados estudios concluía lo contrario, tal vez se debió a que se estudiaron unas mutaciones diferentes. Con objeto de averiguar si el efecto sobre la replicación que provocan las mutaciones presentes en $\phi 16$ depende la línea celular en que multiplique el virus, transfectamos células AGMK GL37 con los mismos transcritos (procedentes de la transcripción *in vitro* de $\phi L0$ y $\phi 16$). Las células AGMK GL37 permiten el crecimiento óptimo del HAV [258]. De igual modo que con las células FRhK-4, se extrajo el RNA presente en las células 7 días después de su transfección y se cuantificó la cantidad de RNA de cadena negativa del HAV presente, normalizando los valores según el número de células presentes en cada pocillo en el momento previo a la extracción del RNA. La cantidad de RNA producida por el transcrito derivado de $\phi L0$ en las células AGMK GL37 fue muy parecida a la producida en

FRhK-4 (3.29 y 3.89 copias por célula, ver **Figura 11**). Sin embargo, el RNA con la secuencia del haplotipo $\phi 16$ produjo en células AGMK GL37 una cantidad muy inferior de RNA de cadena negativa con respecto a su transfección en FRhK-4 (0.88 frente a 14.27 copias por célula, ver **Figura 11**). Por tanto, estos resultados sugieren que las mutaciones U359C, U590C y U726C afectan positivamente a la replicación del HAV si el virus está multiplicando en FRhK-4 y perjudicialmente si lo está haciendo en AGMK GL37. Estos resultados están en la línea de otros que indican que el efecto que producen sobre la replicación del HAV las mutaciones que afectan a la traducción es dependiente del tipo de célula en que se encuentre multiplicando el virus [182][162][163].

4.2.3 Diversidad de la región intermedia de VP1 (nucleótidos 2418-2834, correspondientes a los aminoácidos 71 a 209) en las poblaciones largamente adaptadas a multiplicar en presencia de AMD: varios haplotipos presentan un uso de codones más optimizado que la secuencia consenso

El índice relativo de deoptimización de codones (RCDI) mide la deoptimización del uso de codones de un gen con respecto al uso de codones de un genoma de referencia [259]. En virología indica cuán desadaptado (o adaptado, según se mire) está el uso de codones de un virus al de la célula hospedadora. Un valor de RCDI de 1 indica que el uso de codones del virus es idéntico al de la célula hospedadora, y cuanto mayor es el valor, mayor es la diferencia con respecto a la célula hospedadora. El HAV tiene un uso de codones bastante deoptimizado en comparación con el de otros picornavirus (el RCDI de la región codificante de la cápside del HAV es de 1.73 frente a 1.14 en el caso de Poliovirus tipo 1 Mahoney, por ejemplo) [189][259]. Al analizar el RCDI de distintos fragmentos solapantes (usando una ventana deslizante de 100 codones, que se desplazó en pasos de 15 codones) de la región que codifica para la cápside del HAV, se observa que unas regiones se encuentran más deoptimizadas que otras (**Figura 12**). El análisis de las secuencias consenso de las poblaciones L0, F0.05LA y F0.2LA muestra dos zonas más optimizadas (con valores de RCDI más bajos) que el resto: en torno a los codones 361-475 (aa 116-230 de VP3) y 556-715 (aa 65-224 de VP1). En la

segunda de estas zonas se puede apreciar que las poblaciones largamente adaptadas a multiplicar en presencia de AMD (F0.05LA y F0.2LA) alcanzan valores de RCDI claramente más bajos que L0 (**Figura 12**). En base a esta observación, seleccionamos la región intermedia de VP1 (codones 574-620, que abarca los aminoácidos 71 a 209, de un total de 300) para estudiar la composición de las cuasiespecies de F0.05LA y F0.2LA mediante secuenciación masiva, en busca de haplotipos que presenten un uso de codones más cercano al uso de codones celular que las secuencias consenso.

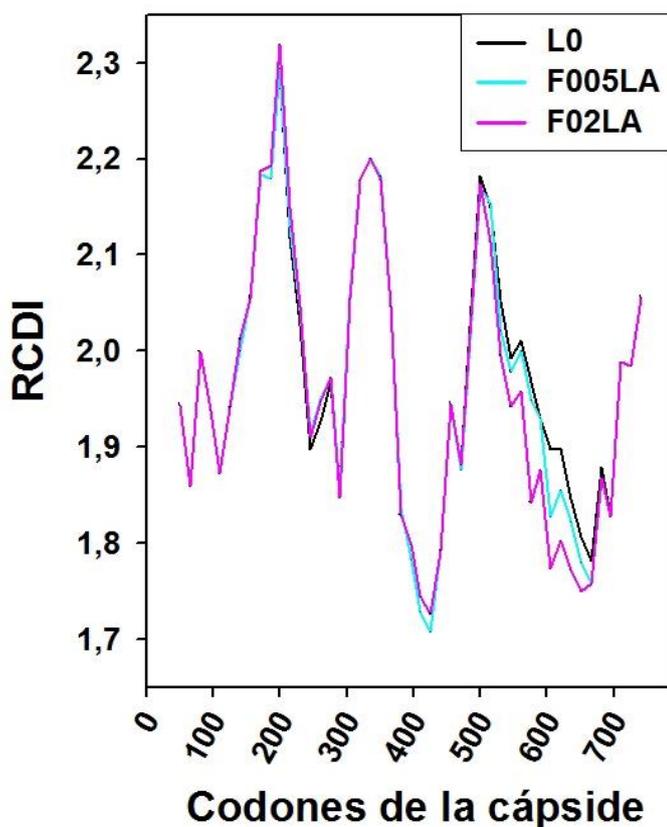


Figura 12. RCDI (Índice Relativo de Deoptimización de Codones) de la región codificante de la cápside de las secuencias consenso de las poblaciones L0, F005LA y F02LA. Se usó una ventana deslizante de 100 codones, que se desplazó en pasos de 15 codones.

Mediante la secuenciación masiva de la región intermedia de la secuencia codificante de VP1 de las poblaciones F005LA y F02LA se hallaron trece haplotipos diferentes, denominados con la letra λ seguida de un número (ver **Tabla 4**). Se detectaron diez haplotipos diferentes en F0.05LA y solamente cinco en F0.2LA. Como en el caso del IRES, la presencia de una mayor cantidad de AMD en el medio

Capítulo 1 Resultados y discusión

Tabla 4 Haplotipos encontrados mediante secuenciación masiva en la región de VP1 analizada en las poblaciones F005LA y F02LA. Los cambios son con respecto a la secuencia consenso de L0, la población parental. Frecuencia de uso hace referencia al porcentaje en el cual se encuentra el codón con respecto al codón sinónimo más abundante en humanos (ver introducción, **Tabla 1**). N: número total de secuencias obtenidas en la muestra correspondiente.

HAPLOTIPO	CAMBIOS DE CODÓN Y FRECUENCIA DE USO	POSICIÓN EN VP1 (aa)	FRECUENCIA HAPLOTIPO		RCDI
			F0.05LA (N=3120)	F0.2LA (N=2860)	
λ_1 (L0)	-	-	0,99	0	1.716
λ_4 (F005LA)	ATC (I) (100 %) → GTC (V) (53 %)	85	21,67	24,27	1.704
	ATT (I) (61 %) → GTT (V) (34 %)	146			
λ_5	ATT (I) (61 %) → GTT (V) (34 %)	146	12,02	0	1.698
λ_6 (F02LA)	ATC (I) (100 %) → GTC (V) (53 %)	85	36,25	63,57	1.674
	TTG (L) (26 %) → TTC (F) (100 %)	123			
	ATT (I) (61 %) → GTT (V) (34 %)	146			
λ_7	TTG (L) (26 %) → TTC (F) (100 %)	123	25,87	0	1.668
	ATT (I) (61 %) → GTT (V) (34 %)	146			
λ_{11}	ATC (I) (100 %) → GTC (V) (53 %)	85	0	3,99	1.689
	ATT (I) (61 %) → GTT (V) (34 %)	146			
	GTA (V) (19 %) → GTT (V) (34 %)	162			
λ_{24}	ATC (I) (100 %) → GTC (V) (53 %)	85	0	0,91	1.721
	ACC (T) (100 %) → ACT (T) (55 %)	116			
	ATT (I) (61 %) → GTT (V) (34 %)	146			
λ_{15}	ATC (I) (100 %) → GTC (V) (53 %)	85	0,58	0	1.683
	TTG (L) (26 %) → TTC (F) (100 %)	123			
	ATT (I) (61 %) → GTT (V) (34 %)	146			
	AGC (S) (100 %) → ACC (T) (100 %)	197			
λ_{16}	TTG (L) (26 %) → TTC (F) (100 %)	123	0,64	0	1.676
	ATT (I) (61 %) → GTT (V) (34 %)	146			
	AGC (S) (100 %) → ACC (T) (100 %)	197			
λ_{17}	ATC (I) (100 %) → GTC (V) (53 %)	85	0,64	0	1.722
λ_{18}	ATC (I) (100 %) → GTC (V) (53 %)	85	0,61	0	1.713
	ATT (I) (61 %) → GTT (V) (34 %)	146			
	AGC (S) (100 %) → ACC (T) (100 %)	197			
λ_{19}	CCT (P) (78 %) → CCC (P) (100 %)	110	0,74	0	1.670
	ATT (I) (61 %) → GTT (V) (34 %)	146			
λ_{20}	ATC (I) (100 %) → GTC (V) (53 %)	85	0	7,27	1.659
	TTG (L) (26 %) → TTC (F) (100 %)	123			
	ATT (I) (61 %) → GTT (V) (34 %)	146			
	GTA (V) (19 %) → GTT (V) (34 %)	162			

de cultivo (0.2 $\mu\text{g/ml}$ frente a 0.05 $\mu\text{g/ml}$) pudo haber contribuido a que se produjese una selección más intensa, dando como resultado una menor diversidad genotípica.

El haplotipo mayoritario es el mismo en ambas poblaciones (λ_6). Sin embargo, aunque la secuencia consenso (determinada mediante secuenciación Sanger) de F0.2LA sí coincide con el haplotipo mayoritario, la secuencia consenso de F0.05LA se corresponde con λ_4 . λ_1 es igual a la secuencia consenso en L0. Este haplotipo y otros siete (λ_5 , λ_7 , λ_{15} , λ_{16} , λ_{17} , λ_{18} y λ_{19}) se encuentran exclusivamente en F0.05LA. A diferencia de lo observado en el estudio del IRES, se hallaron varios haplotipos exclusivamente en F0.2LA (λ_{11} , λ_{24} y λ_{20}) (ver **Tabla 4**). Como se puede ver en la **Tabla 4**, entre los trece haplotipos solo se encontraron siete sustituciones nucleotídicas diferentes, que afectan a las posiciones 85, 110, 116, 123, 146, 162 y 197 de la proteína VP1. Los cambios en 110, 116 y 162 son sinónimos, mientras que los que afectan a las posiciones 85, 123, 146 y 197 son no sinónimos. En los cambios no sinónimos están involucrados aminoácidos con propiedades similares: hay sustituciones entre aminoácidos hidrófobos (L→F e I→V) y entre aminoácidos polares (S→T). Algunos de estos cambios se encuentran exclusivamente en la población F0.05LA (110 y 197), otros están presentes en individuos de ambas poblaciones (85, 123 y 146) y otros son exclusivos de haplotipos hallados en F0.2LA (116 y 162). En cuanto a su localización en la estructura de la proteína, los cambios se localizan en hélices α (85), láminas β (110, 146 y 197), giros (162) y zonas carentes de un tipo definido de estructura (116 y 123) (**Figura 13**).

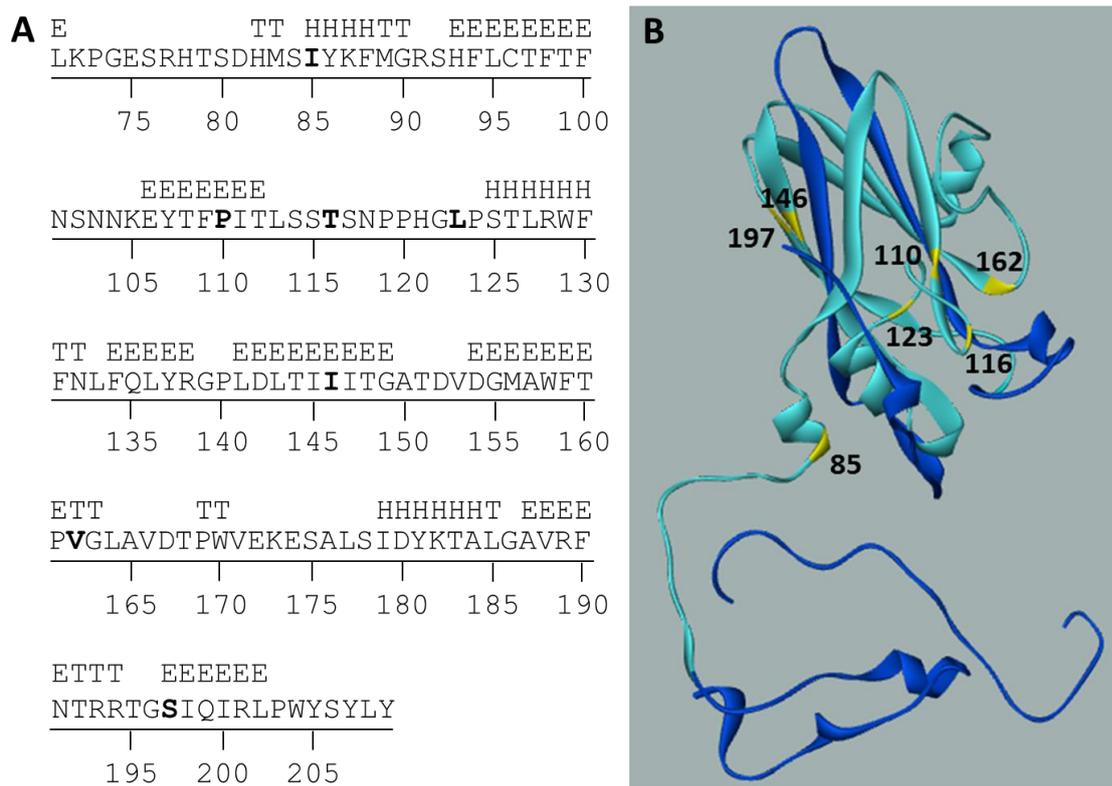


Figura 13 (A) Secuencia aminoacídica de la región de VP1 estudiada (posiciones 71-209). Sobre la secuencia se indica la estructura secundaria, calculada a partir de la estructura tridimensional de la proteína, según el método de Kabsch and Sander [260]. H: hélice α ; E: lámina β ; T: giro. Se encuentran resaltados en negrita los residuos en los que se han detectado cambios en las poblaciones F0.05LA y F0.2LA **(B) Representación de la estructura tridimensional de la proteína VP1 del HAV.** En azul celeste se representa la región analizada de VP1 (y la región no estudiada, en azul). En amarillo aparecen señaladas las posiciones que presentan cambios en alguno de los haplotipos encontrados en las poblaciones F0.05LA y F0.2LA. Imagen adaptada de [13].

Para cada uno de los haplotipos encontrados en las poblaciones F0.05LA y F0.2LA se determinó su RCDI (**Tabla 4** y **Figura 14**). Como puede observarse en la **Figura 14**, en la población F0.05LA hay seis haplotipos (λ_5 , λ_{15} , λ_{16} , λ_6 , λ_{19} y λ_7) con un RCDI más bajo que el que presenta su secuencia consenso (λ_4). Dos de ellos (λ_{19} y λ_7) presentan un valor de RCDI inferior al de la secuencia mayoritaria (λ_6). En F0.2LA, el haplotipo λ_{20} también tiene un RCDI más bajo que el de la secuencia mayoritaria y consenso en dicha población (λ_6).

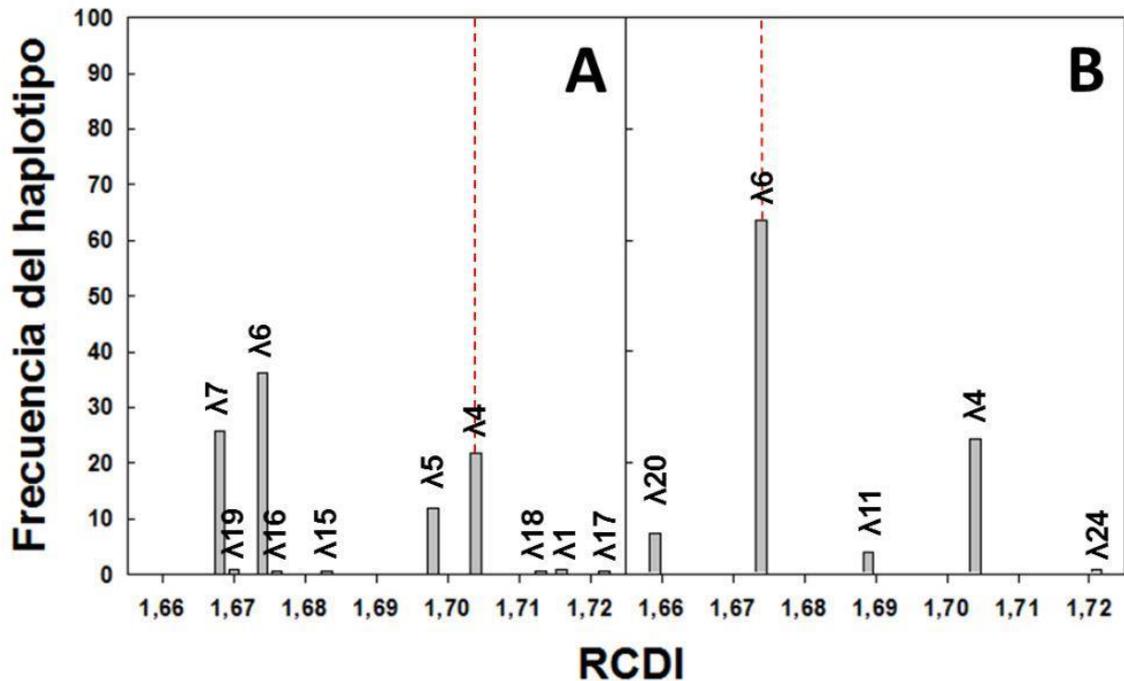


Figura 14 RCDI y frecuencia en que se encuentra cada uno de los haplotipos hallados en la secuenciación masiva de la región intermedia de VP1 de las poblaciones F0.05LA (A) y F0.2LA (B). Una línea discontinua vertical señala el haplotipo que coincide con la secuencia consenso en cada caso.

4.2.4 Determinación de la velocidad de traducción de distintos haplotipos presentes en la región intermedia de VP1 de las poblaciones largamente adaptadas a AMD: la velocidad de traducción del haplotipo λ7 es superior a la de la secuencia consenso de F0.05LA

Para estimar la velocidad de traducción de los distintos haplotipos λ (y averiguar si alguno de los haplotipos minoritarios se traduce más eficientemente), se hizo uso nuevamente del vector bicistrónico G1RC. En esta ocasión se realizó una fusión traduccional clonando el haplotipo correspondiente entre el IRES del HAV y el gen que codifica para la luciferasa de *Photinus pyralis* (FLuc). Así, la cantidad de proteína luminiscente producida depende de la velocidad a la que se traduce el fragmento de VP1 que la precede (ver **Figura 15**). De manera similar a las pruebas que se realizaron para analizar la actividad de distintos IRES, los plásmidos que contenían distintos haplotipos de VP1 en fase con FLuc se transfectaron en células FRhK-4 y se midieron los valores de FLuc/RLuc un día después de la transfección. En este caso, como la velocidad de elongación depende

del grado de silenciamiento celular [68], se repitieron los experimentos utilizando distintas concentraciones de actinomicina D (0.0, 0.05 y 0.2 $\mu\text{g/ml}$). Estos clonajes fueron realizados por Lucía D'Andrea, y se pueden encontrar más detalles de estos experimentos en su tesis doctoral [68].

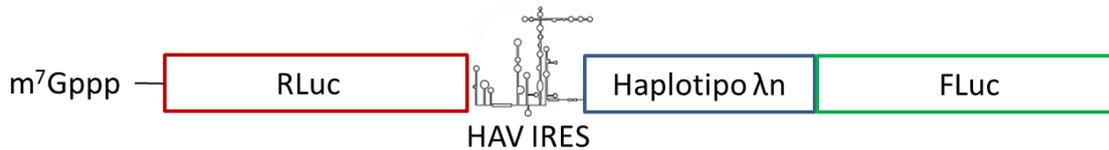


Figura 15 Representación de un transcrito producido a partir de los plásmidos utilizados para medir la velocidad de traducción de distintos haplotipos encontrados en VP1. La traducción de RLuc depende de *cap*, mientras que la traducción de la proteína de fusión haplotipo λ -FLuc depende del IRES del HAV.

En ausencia de AMD, dos de los haplotipos minoritarios encontrados en F005LA y F02LA ($\lambda 7$ y $\lambda 11$) mostraron una velocidad de traducción mayor tanto al haplotipo mayoritario $\lambda 6$ como a $\lambda 4$, los haplotipos que coinciden con las secuencias consenso de las poblaciones F005LA y F02LA, respectivamente, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas (ver **Figura 16, A**). En presencia de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD (bajo silenciamiento celular), la velocidad de traducción de $\lambda 7$ sí fue significativamente superior a las del resto (**Figura 16, B**). Por tanto, existen en el seno de la cuasiespecie individuos (los portadores del haplotipo $\lambda 7$, presentes en la población F0.05LA) capaces de generar proteínas capsídicas más rápidamente que la mayoría ($\lambda 6$ y $\lambda 4$ suman el 57.9 % del total de secuencias en F0.05LA). En condiciones de elevado silenciamiento celular (0.2 $\mu\text{g/ml}$ de AMD), las tasas de traducción de $\lambda 7$ y $\lambda 11$ fueron mayores que la del haplotipo mayoritario ($\lambda 6$), aunque no significativamente en el caso de $\lambda 11$ (**Figura 16, C**). Como la tasa de traducción de $\lambda 11$ fue superior a las de $\lambda 4$ en condiciones de alto silenciamiento celular, pero similar a las de este haplotipo en presencia de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD, podemos concluir que las diferencias fenotípicas entre los distintos haplotipos dependen del grado de silenciamiento celular. Al comparar las secuencias correspondientes a los haplotipos $\lambda 4$, $\lambda 6$, $\lambda 7$ y $\lambda 11$ (**Tabla 4**) vemos que la única diferencia común entre $\lambda 7$ y los otros tres haplotipos es un cambio en la posición 85 (ATC→GTC), siendo ésta la única diferencia entre $\lambda 6$ y $\lambda 7$. Como la tasa de traducción de $\lambda 7$ en presencia de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD casi triplica a

las de $\lambda 4$, $\lambda 6$ y $\lambda 11$ (0.63 frente a 0.23, 0.23 y 0.21, **Figura 16B**), podemos concluir que la posición 85 de VP1 es importante en el control de la velocidad de síntesis de esta proteína.

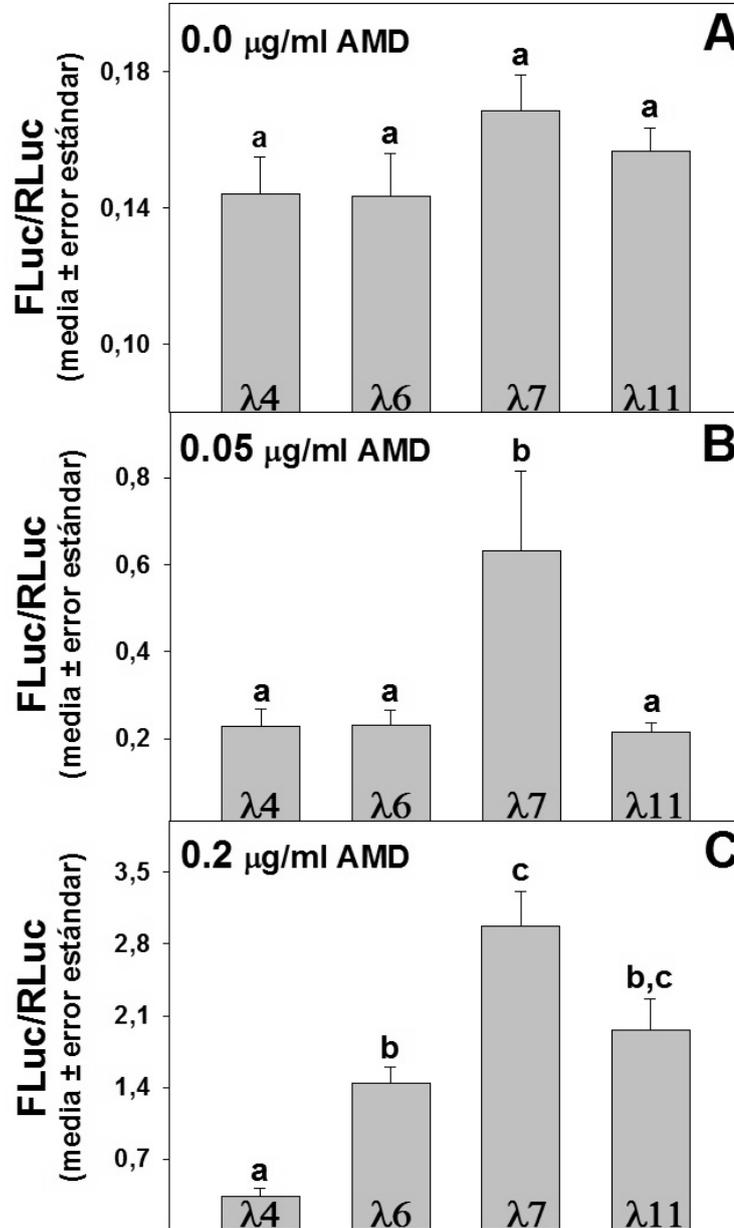


Figura 16 Tasa de traducción expresada como la relación FLuc/RLuc de algunos haplotipos de la región de VP1 presentes en las poblaciones F0.05LA y F0.2LA en ausencia de AMD (A), en presencia de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ (B) y 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD (C). Las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) se señalan utilizando el criterio de letras b=b,c; b,c=c; b \neq c; etc. Para cada haplotipo se realizaron estos análisis al menos 3 veces de forma independiente, con 2 réplicas en cada caso y para cada una de las condiciones de silenciamiento celular estudiadas.

4.2.5 Relación entre la velocidad de traducción y el RCDI de los haplotipos presentes en la región intermedia de VP1 de las poblaciones largamente adaptadas a AMD

Aplicamos un modelo de regresión lineal simple para estudiar si el RCDI (una medida de la deoptimización del uso de codones) es un buen indicador de la velocidad de traducción de una secuencia. En presencia de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD existe correlación negativa entre la tasa de traducción de los distintos haplotipos ensayados y el RCDI de sus secuencias ($R = -0.64$, **Figura 17, A**). Sin embargo, entre los haplotipos con valores de RCDI superiores a 1.67 no hay demasiadas diferencias de velocidad. En cambio, el haplotipo $\lambda 7$, que presenta el mínimo valor de RCDI, se traduce a una velocidad sensiblemente superior al resto. Este análisis sugiere que la velocidad de traducción de estos haplotipos se incrementa cuando el valor de RCDI es inferior a 1.67, aunque no hay haplotipos suficientes para confirmarlo. Se podría pensar que, en este caso, que el haplotipo se traduzca más o menos rápidamente depende solamente del codón que presente en la posición 85 (ver apartado 4.2.4). Sin embargo, el haplotipo $\lambda 1$ (RCDI = 1.72, Fluc/Rluc = 0.24) presenta el mismo codón que $\lambda 7$ (RCDI = 1.67, Fluc/Rluc = 0.63) en la posición 85 y una velocidad de traducción baja, similar a la del resto de haplotipos con valores de RCDI altos. En cuanto a la tasa de traducción de los haplotipos en condiciones de alto silenciamiento celular, la relación entre ambas variables es más evidente, con una buena correlación negativa ($R = -0.71$, **Figura 17, B**).

Existe, por tanto una correlación negativa entre el RCDI y la velocidad de traducción cuando estos haplotipos son traducidos en presencia de AMD. Sin embargo, algunas secuencias son traducidas más rápido que otras que presentan un uso de codones más optimizado (un RCDI menor) (ver **Figura 17**). Hay diversas razones biológicas que pueden explicar este hecho. El efecto modulador de un codón sobre la tasa de traducción depende no solo de su abundancia, sino de la posición que ocupe en el mRNA y de otros codones que se localicen próximos a él [68]. La presencia de codones poco abundantes puede reducir o cancelar el efecto

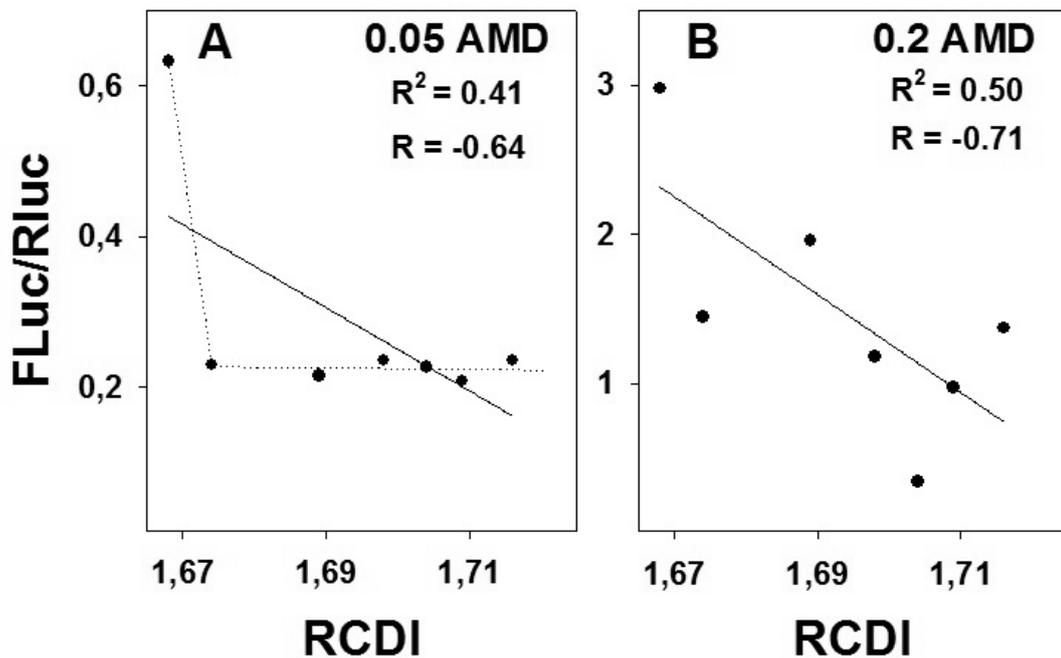


Figura 17 Representación de la velocidad con que se traducen distintos haplotipos (expresada como la relación FLuc/Rluc) encontrados en F005LA y F02LA en presencia de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD (A) y 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de AMD (B) en función de su RCDI. Las líneas continuas corresponden a las rectas de regresión. La línea discontinua en (A) resalta el comportamiento diferencial del haplotipo $\lambda 7$ respecto al resto. R^2 : coeficiente de determinación. R: coeficiente de correlación de Pearson.

positivo sobre la velocidad de elongación de un codón abundante cercano [68]. En ocasiones, dos codones abundantes que por separado aumentan la velocidad de la traducción, interfieren entre sí cuando se encuentran juntos en un haplotipo, de forma que no producen ningún efecto positivo en estos haplotipos [68]. Además, la autocorrelación o reutilización de un mismo codón en un gen podría incrementar la eficiencia de la elongación mediante el reciclaje de moléculas de tRNA, lo cual es un efecto independiente de la abundancia del codón del que se trate [261]. Finalmente, no se puede olvidar que la estructura secundaria del mRNA puede afectar a la velocidad de la síntesis proteica, provocando retrasos en el paso del ribosoma, aunque solo en contadas ocasiones [262], como cuando se forman *pseudoknots* estables [263].

Capítulo 1 Resultados y discusión

En base al estudio de las características genéticas de dos poblaciones del HAV, predecimos que en la población F0.05LA existen individuos minoritarios con un fenotipo de rápida replicación en comparación con los individuos mayoritarios de F0.05LA y los individuos de la población F0.2LA.

5 CAPÍTULO 2:

Selección de una población de rápido crecimiento mediante el cruce molecular de dos poblaciones del HAV

5.1 ANTECEDENTES

En el capítulo anterior se realizó un estudio a nivel de cuasiespecie de dos poblaciones adaptadas a multiplicar bajo condiciones de silenciamiento celular moderado y alto (F0.05LA y F0.2LA, respectivamente). La secuenciación masiva de una región de la proteína estructural VP1 y posterior análisis de la velocidad con la que se traducen los haplotipos encontrados, llevó a concluir que un 26 % de los individuos que forman la población F0.05LA contienen una secuencia (el haplotipo $\lambda 7$) que es traducida a una velocidad superior a la de la mayoría de los individuos, tanto de F0.05LA como de F0.2LA, en presencia de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. En F0.2LA no se encontró ningún haplotipo que fuera traducido tan rápidamente como $\lambda 7$ en condiciones de moderado silenciamiento celular.

Así mismo, una parte de la región 5'NCR también fue analizada mediante secuenciación masiva y varios de los haplotipos hallados fueron testados para comprobar su capacidad de promover el inicio de la traducción independiente de *cap*. En este caso también se encontraron haplotipos que, hallándose de forma minoritaria en la población F0.05LA y ausentes en F0.2LA, mostraron una capacidad para iniciar el proceso de traducción superior a la mayoría de individuos presentes en ambas poblaciones. En este caso, la proporción en la que se encontró el haplotipo más eficiente ($\phi 16$) en F0.05LA fue muy baja: 0.72 %.

Partiendo de esta información, nuestro objetivo es provocar un desequilibrio en la cuasiespecie de F0.05LA (elegida adaptando a las cuasiespecies víricas la estrategia conocida como selección genómica), favoreciendo que los individuos que presentan haplotipos indicativos de una cinética de crecimiento vírico más rápida y una mayor producción (como $\phi 16$ o $\lambda 7$) puedan aumentar su frecuencia en la cuasiespecie.

Una población de virus de RNA puede estar formada por diversos individuos con diferente capacidad para actuar como competidores y como colonizadores, de manera similar a lo que ocurre en otros sistemas ecológicos [89]. Si durante un proceso infeccioso hay pocos virus en relación al número de células (baja multiplicidad de infección o MOI), los virus que sean más rápidos completando su ciclo de replicación colonizarán antes otras células, de manera que se extenderán más rápidamente. Estos virus más rápidos, que habrán infectado un

Capítulo 2 Antecedentes

mayor número de células al final del proceso, siguen una estrategia de colonización [264]. En caso de que haya una gran cantidad de partículas infecciosas en comparación con el número de células (alta MOI), se producirán coinfecciones de forma frecuente y apenas habrá células que puedan ser infectadas en un segundo ciclo replicativo, ya que la gran mayoría habrán sido infectadas durante el primer ciclo, a excepción de que se produjesen sobreinfecciones. En las coinfecciones se producen tres tipos principales de interacciones: competición por los recursos, cooperación en la producción de “bienes públicos” e interferencia [265]. Los virus que en las coinfecciones aventajan al resto, es decir, que tienen una mayor capacidad competitiva intracelular, siguen una estrategia de competición [264]. Cuando se da una situación en la que una población está formada por unos virus que son buenos colonizadores y por otros que son buenos competidores, el que la selección favorezca a unos u otros dependerá de la densidad inicial de partículas víricas. A baja densidad (MOI baja), los colonizadores se verán favorecidos, mientras que altas densidades (MOI alta) benefician a los competidores [264]. De esta manera, las estrategias de colonización y competición están sometidas a selección dependiente de densidad, fenómeno que ha sido observado y demostrado en diversos virus [87][266][267][89][268].

La población F0.05LA fue producida tras una serie de pases masivos, en los que la MOI promedio fue de 8.11 ± 2.91 (en los 10 pasajes anteriores a F0.05LA) [189]. En esta población podría haber actuado la selección dependiente de densidad, si los virus mayoritarios (aquellos con haplotipos $\phi 1$ y $\phi 2$ en la región 5' no codificante, haplotipos $\lambda 6$, $\lambda 7$ y $\lambda 4$ en VP1 y sus combinaciones) fueran mejores competidores que otros más rápidos o mejores colonizadores (los que presenten los haplotipos $\phi 16$ y $\lambda 7$), lo cual explicaría por qué estos últimos se mantienen en una frecuencia baja dentro de la población F0.05LA. En este caso, realizar uno o unos pocos pases de la población F0.05LA a condiciones iniciales de densidad baja (baja MOI) podría favorecer la selección de virus que fueran mejores colonizadores, pero que se encuentran a baja frecuencia dentro de la población, al reducir la probabilidad de que sucedan coinfecciones y, con ello, la ventaja que los competidores tienen sobre los colonizadores. En ensayos de competición entre dos subpoblaciones del FMDV, una colonizadora y otra competidora, la colonizadora

(más virulenta) ganó la competición cuando la MOI fue de 0.1 PFU/célula y la perdió cuando la MOI fue de 9.4 [264].

De la Torre y Holland [87] aislaron, a partir de una población del virus de la estomatitis vesicular (VSV) que había sido pasada 254 veces sin diluir (a MOI alta), un clon de alta productividad y rápida replicación que se encontraba en una proporción baja dentro de la población. Reintrodujeron el clon, en distintas proporciones, en la población de la que había sido aislado y realizaron unos pocos pasajes seriados, controlando la multiplicidad de infección. A alta multiplicidad (MOI: 100), la proporción del clon reintroducido disminuyó con cada pasaje. A baja multiplicidad (MOI: 1), cuando la fracción inicial del clon reintroducido fue de 10^{-1} (10 %), llegó a ser dominante tras 5 pasajes. Sin embargo, fue rápidamente desplazado cuando inicialmente estaba en una proporción de 10^{-3} (0.1 %) [87]. Por tanto, aún realizando los pases a baja multiplicidad de infección, el destino del clon reintroducido dependió de la proporción en que se encontrara inicialmente. La conclusión a la que llegan estos autores es que los clones colonizadores que se encuentran suprimidos por clones competidores deben estar presentes en una proporción superior a cierto nivel umbral para poder sobrepasar al resto de la población durante pases a baja multiplicidad [87]. En nuestro caso, el haplotipo $\phi 16$ se encuentra en F0.05LA en una fracción de 7.2×10^{-3} (0.72 %). Por tanto, sería probable que, simplemente realizando pasajes seriados a baja MOI, no se consiguiera aumentar la proporción de individuos portadores de este haplotipo. Si bien la MOI se puede controlar fácilmente, la proporción a la que se encuentra una subpoblación dentro de una población no se puede modificar de forma directa. Por tanto, deberemos buscar otros mecanismos para rescatar a estos individuos colonizadores que se encuentran de forma minoritaria en la población F0.05LA, aparte de modificando la MOI.

El estudio de las distintas poblaciones adaptadas a replicar en presencia de actinomicina D reveló que esta adaptación conllevó cambios en la estabilidad y la función de la cápside, causados probablemente por cambios en su plegamiento [39]. Estos cambios no afectaron a la capacidad de unión al receptor de las células FRhK-4, pero sí a la eficiencia con la que las distintas poblaciones desencapsidan su RNA (**Tabla 5**). La adaptación a altos (pero no a moderados) niveles de

Capítulo 2 Antecedentes

silenciamiento celular correlacionó con un descenso importante en el tiempo de desencapsidación. Así, mientras que para L0 y F0.05LA el tiempo necesario para conseguir la desencapsidación del 50 % de los virus (UT_{50}) fue de entre 17 y 18 horas, la UT_{50} de la población F0.2LA fue de solo 8 horas. La reversión de la población F0.2LA a condiciones de 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de AMD se acompañó de un aumento no significativo en su tiempo de desencapsidación, ya que éste fue de 12 horas, pero aún significativamente más corto del de la población F0.05LA (**Tabla 5**).

Tabla 5 Características biológicas asociadas a la cápside de distintas poblaciones del HAV. La unión al receptor expresa el porcentaje de virus adheridos a células FRhK-4 una hora después de añadir el inóculo. La UT_{50} indica el tiempo (en horas) que tarda en desencapsidar el 50% de los virus. R0.05NA es un pasaje temprano de la reversión de 0.2 a 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (serie R0.05) que aún no presentaba cambios en el uso de codones con respecto a F0.2LA, la población con la que se inició la reversión. Todos los valores se expresan como la media \pm el error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) se señalan utilizando el criterio de letras $a \neq b$. Datos publicados en [39].

Población	Unión al receptor	Desencapsidación (UT_{50})
L0	65.9 \pm 5.0 ^a	18.5 \pm 0.5 ^a
F0.05LA	73.1 \pm 3.6 ^a	17.5 \pm 1.8 ^a
F0.2LA	70.9 \pm 3.4 ^a	8.2 \pm 2.8 ^b
R0.05NA (F0.2LA en 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de AMD)	63.5 \pm 4.2 ^a	12.1 \pm 1.1 ^b

En una hipotética infección mixta con virus procedentes de F0.05LA y F0.2LA en presencia de 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de AMD se producirá una variedad de situaciones en cuanto al número de partículas que infectan cada célula y a la naturaleza de estos virus. Durante la primera ronda de replicación, algunas células permanecerán sin infectar, otras serán infectadas por un solo virus y otras serán coinfectadas por dos o más virus. La medida en la que ocurra cada una de estas situaciones dependerá de la MOI utilizada en la infección [269]. Las coinfecciones podrán tener lugar entre virus procedentes de la misma población o de distintas poblaciones. La relación entre la ocurrencia de ambos tipos de coinfección dependerá de la proporción en que se mezclen ambas poblaciones antes de la

infección. Los virus de haplotipo $\phi 16$ (cuyo IRES presenta mayor actividad), minoritarios en F0.05LA, se encontrarán en estas infecciones mixtas con los siguientes escenarios, principalmente: (a) coinfección con individuos mayoritarios de F0.05LA; (b) infección en solitario; (c) coinfección con individuos mayoritarios de F0.2LA. Las situaciones (a) y (b) son desventajosa y ventajosa, respectivamente, para dichos individuos minoritarios de la población F0.05LA si asumimos que son peores competidores y mejores colonizadores que los mayoritarios de F0.05LA. Sin embargo, la situación (b) es muy poco probable teniendo en cuenta la baja proporción de los individuos con el haplotipo $\phi 16$.

Aunque los individuos mayoritarios de F0.05LA y F0.2LA son similares en la región estudiada de VP1 (solo los haplotipos $\lambda 6$ y $\lambda 4$ representan el 58 % y el 88 % en F0.05LA y F0.2LA, respectivamente), en otras regiones de la cápside la composición de haplotipos difiere significativamente (**Figura 18**), lo cual explica que ambas poblaciones presenten diferencias fenotípicas. Como hemos señalado, los individuos de F0.2LA multiplicados en condiciones de 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de AMD poseen cápsides con una UT_{50} mucho más baja que los de F0.05LA multiplicados en 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD (8 horas frente a 17 horas). En una primera infección a partir de la mezcla de ambas poblaciones, podría darse la coinfección de $\phi 16$ procedente de F0.05LA e individuos mayoritarios de F0.2LA. El IRES más activo de $\phi 16$ combinado con el tiempo de desencapsidación corto de los individuos de F0.2LA, permitiría simultanear el ciclo replicativo, y así generar progenie vírica mucho antes. Además, en esta situación, los individuos $\phi 16$ originarán moléculas de RNA progenie que en algunos casos serán encapsidadas en cápsides producidas parcial o totalmente a partir de genomas de F0.2LA, dando lugar a virus fenotípicamente mixtos o a pseudotipos, respectivamente. Algunos de estos virus estarán formados por una cápside que libera antes el genoma (UT_{50} de 12 horas) y por un RNA que es traducido más activamente, gracias a las mutaciones en el IRES, por lo que podrían ser considerados muy buenos colonizadores. Estos colonizadores quimera permitirían amplificar el título de $\phi 16$.

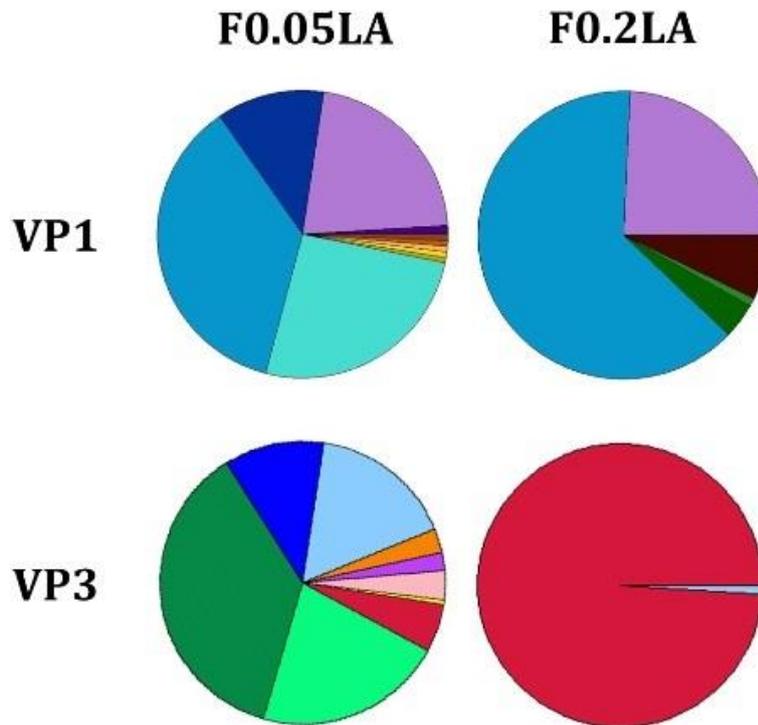


Figura 18 Distribuciones de haplotipos encontradas mediante secuenciación masiva en las regiones de VP1 y VP3 de las poblaciones F0.05LA y F0.2LA.

Como contrapartida, el hecho de mezclar las poblaciones F0.2LA y F0.05LA hará que el porcentaje de colonizadores procedentes de F0.05LA presente en la mezcla inicial sea aún menor. Una proporción demasiado alta de F0.2LA en la mezcla podría diluir demasiado los virus colonizadores presentes en F0.05LA. Por otra parte, usar una fracción de F0.2LA demasiado pequeña, minimizaría las ocasiones en que se puedan producir coinfecciones entre colonizadores de F0.2LA y colonizadores de F0.05LA y, por tanto, mezclas fenotípicas. Por tanto, la proporción en la que se mezclen ambas poblaciones debería ser un factor importante a tener en cuenta si se pretende, con la ayuda de F0.2LA, rescatar a los miembros minoritarios, pero de mayor *fitness*, de la población F0.05LA, es decir, aumentar su número con respecto al resto de haplotipos en la cuasiespecie.

La caracterización de haplotipos descrita en el capítulo anterior nos indicó que en la población F0.05LA existen individuos colonizadores, en muy baja proporción, que presentan marcadores genéticos indicativos de una cinética de replicación rápida. Estos individuos son susceptibles de ser seleccionados

mediante cruce con la población F0.2LA, aprovechando sus componentes colonizadores, asociados a su corto tiempo de desencapsidación.

5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se mezclaron las poblaciones F0.05LA (el pasaje 127 del linaje adaptado a multiplicar en presencia de 0.05 µg/ml de AMD o serie F0.05) y F0.2LA (el pasaje 62 del linaje adaptado a multiplicar en presencia de 0.2 µg/ml de AMD o serie F0.2) en distintas proporciones (100:1, 1:1 y 1:100, siguiendo la relación F0.05:F0.2LA). Con estas mezclas se infectaron células FRhK-4 con una MOI (multiplicidad de infección) de 2 en el caso de la proporción 1:1 y de 1 en el resto, añadiendo 0.05 µg/ml de AMD al medio de cultivo. Las suspensiones víricas producidas a partir de estas infecciones se utilizaron para realizar pasajes seriados (32 en cada caso) en células FRhK-4 en presencia de 0.05 µg/ml de AMD. Cada pasaje seriado se inoculó con un volumen fijo de suspensión vírica, por lo que la MOI dependió en cada pasaje de la cantidad de partículas infecciosas producidas en el pasaje anterior. A estas series de pasajes, obtenidos a partir de mezclas de F0.05LA y F0.2LA, las llamaremos poblaciones mixtas.

5.2.1 Cruce molecular entre F0.05LA y F0.2LA: las poblaciones mixtas producen mayor cantidad de partículas infecciosas que las poblaciones de partida

Se cuantificó el título vírico infeccioso de cada pasaje de las poblaciones mixtas calculando la TCID₅₀/célula. Al principio de este trabajo se comentó que la producción vírica de las series F0.05 y F0.2 entró en una fase de estancamiento tras muchos pasajes en presencia de AMD. En la **Figura 19** puede apreciarse que no hubo diferencias significativas en la producción vírica de la serie F0.05 entre los grupos de pasajes 111 a 120 (LA) y 141 a 150 (LLA). Sin embargo, salvo en el caso de la mezcla 1:100, la producción promedio de las poblaciones mixtas entre los pasajes 14 y 23 fue significativamente mayor que la de los pasajes equivalentes en las series F0.05 (pasajes 141 a 150) y R0.05 (linaje obtenido a partir de la población F0.2LA, haciéndola replicar en presencia de 0.05 µg/ml de AMD, pasajes 14 a 23) (ver **Figura 19** y **Tabla 6**). Por tanto, se produjo una mayor cantidad de partículas infecciosas a partir de las mezclas de las poblaciones F0.05LA y F0.2LA que al hacerlas multiplicar por separado (F0.05 LLA y R0.05, **Figura 19**). En pasajes posteriores, los niveles de producción de las poblaciones mixtas 100:1 y 1:1 se mantuvieron, mientras que la producción de la 1:100 aumentó hasta

resultar comparable a las producciones de las otras dos poblaciones mixtas (ver **Tabla 6**).

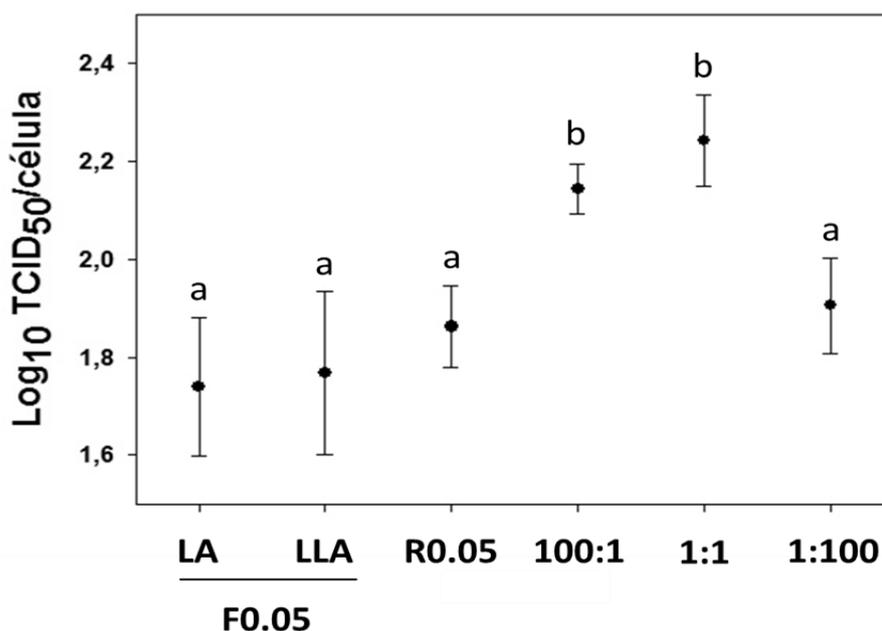


Figura 19 Producción promedio de virus infecciosos producidos por célula en distintas poblaciones del HAV. F0.05, LA: pasajes 111-120 de la serie F0.05 (virus multiplicando en presencia de 0.05 µg/ml de AMD); F0.05, LLA: pasajes 141 a 150 de la serie F0.05; R0.05: pasajes 14 a 23 de la serie R0.05 (población F0.2LA transferida nuevamente a un ambiente de 0.05 µg/ml de AMD); 100:1, 1:1 y 1:100: pasajes 14 a 23 de las mezclas de las poblaciones F0.05LA y F0.2LA en proporciones 100:1, 1:1 y 1:100 (F0.05LA:F0.2LA), respectivamente, puestas a replicar en presencia de 0.05 µg/ml de AMD. La producción de partículas infecciosas por célula está expresada como promedio del logaritmo decimal del número de TCID₅₀/célula. Las barras verticales representan el error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre poblaciones se señalan utilizando el criterio de letras a≠b.

Tabla 6 Producción vírica por célula promedio de varias poblaciones mixtas. La producción de virus por célula está expresada como promedio del logaritmo del valor de TCID₅₀/célula ± el error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre poblaciones se señalan utilizando el criterio de letras a≠b.

	100:1	1:1	1:100
Pasajes 14-23	2.14±0.05 ^a	2.24±0.09 ^a	1.91±0.10 ^b
Pasajes 24-32	2.29±0.08 ^a	2.22±0.03 ^a	2.14±0.06 ^a

Con el objetivo de observar posibles diferencias en la velocidad de replicación de las poblaciones mixtas entre sí y con respecto a las poblaciones parentales, se realizó un ensayo de formación de calvas. Se infectaron placas de 6 pocillos que contenían monocapas confluentes de FRhK-4 con el pasaje 30 de las

poblaciones mixtas 100:1, 1:1 y 1:100, y se incluyó AMD en el medio postinfección a una concentración de 0.05 µg/ml. Diez días después de la infección se fijaron las células con formaldehído y se tiñeron con cristal violeta. En estos ensayos, los virus van infectando células adyacentes a medida que se van produciendo ciclos de infección y lisis celular. De esta manera, el tamaño de las calvas, que aumenta con el número de células infectadas, resulta una medida de la velocidad de difusión de los virus, es decir, de su habilidad para colonizar nuevas células.

Tabla 7 Diámetro de las calvas generadas por distintas poblaciones en presencia de 0.05 µg/ml de AMD, expresado como la media (en centímetros) ± el error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las poblaciones se señalan utilizando el criterio de las letras a=a,b; a,b=b; a≠b; etc.

Población	Diámetro de calva (cm) en presencia de AMD
F0.05LA	0.61 ± 0.04 ^a
F0.2LA	0.71 ± 0.04 ^{a,b}
100:1 p30	0.90 ± 0.10 ^{b,c}
1:1 p30	1.07 ± 0.05 ^c
1:100 p30	0.95 ± 0.16 ^c

Las calvas de mayor diámetro se formaron a partir de la mezcla 1:1, existiendo diferencias significativas con respecto a las poblaciones parentales de las mezclas (F0.05LA y F0.2LA) (**Tabla 7**). Las otras dos poblaciones mixtas también formaron calvas más grandes que sus poblaciones parentales en presencia de 0.05 µg/ml de AMD, aunque las diferencias entre las calvas de la población 100:1 y las de F0.2LA no fueron significativas.

5.2.2 Cruce molecular entre F0.05LA y F0.2LA: existe una relación entre producción y porcentaje inicial de F0.2LA

Como se ha explicado en el apartado anterior, las poblaciones mixtas 100:1 y 1:1 produjeron una mayor cantidad de partículas víricas que la población 1:100 durante los pasajes 14 a 23. Esta última población era la que tenía una menor cantidad inicial de la población F0.05LA, la que ya estaba adaptada a las condiciones experimentales, es decir, a un silenciamiento celular moderado. Además, es en F0.05LA donde se encontraron los haplotipos $\phi 16$ y $\lambda 7$, asociados a

Capítulo 2 Resultados y discusión

una mayor eficiencia promoviendo el inicio de la traducción y a una mayor tasa de síntesis proteica en presencia 0.05 µg/ml de AMD, respectivamente. Podría ser que el hecho de que las poblaciones 100:1 y 1:1 alcanzasen antes que la población 1:100 una productividad mayor que las poblaciones de las que partían se debiera exclusivamente a que la mezcla inicial de la población 1:100 contenía una menor cantidad de la población F0.05LA. Alternativamente, es posible que la presencia de F0.2LA contribuyera a la alta productividad de las poblaciones mixtas, aunque no cuando la proporción inicial de F0.2LA es tan alta como en el caso de la mezcla 1:100. Para tratar de determinar si la inclusión de F0.2LA en las mezclas produce un efecto positivo sobre la productividad de las poblaciones mixtas, se mezclaron de nuevo las poblaciones F0.05LA y F0.2LA en distintas proporciones: 1:2, 2:1, 3:1, 10:1, 20:1 y 50:1 (siguiendo la relación F0.05LA:F0.2LA). Estas mezclas se utilizaron como inóculo para infectar monocapas de células FRhK-4 con valores de MOI entre 1 y 1.5, añadiendo 0.05 µg/ml de AMD en el medio postinfección. A partir de las suspensiones víricas obtenidas se realizaron pasajes seriados (20 en cada caso), del mismo modo que con las poblaciones mixtas 100:1, 1:1 y 1:100. Cada pasaje fue titulado calculando la TCID₅₀/célula.

Al comparar el promedio de la producción de partículas infecciosas por célula entre los pasajes 6 y 20 en todas las poblaciones mixtas se observa que la mezcla 1:100, que contenía la mayor proporción inicial de F0.2LA, es la que presentó una producción promedio más baja (ver **Figura 20**). Sin embargo, al realizar un análisis de regresión sin tener en cuenta la mezcla 1:100, existe una excelente correlación positiva ($R=+0.91$) entre la proporción de F0.2LA presente inicialmente en cada mezcla y la productividad de estas poblaciones entre los pasajes 6 y 20 (medida como el promedio del logaritmo del TCID₅₀/célula) (ver **Figura 20**). Esto sugiere que la presencia de la población F0.2LA en la mezcla inicial es beneficiosa de una manera dosis-dependiente, pero solo hasta un cierto punto, ya que la mezcla con una mayor cantidad de F0.2LA dio lugar a la población mixta menos productiva entre los pasajes 6 y 20. Por tanto, es posible que la población F0.2LA haya ayudado a rescatar a los individuos más productivos que se encontraban en F0.05LA de forma minoritaria.

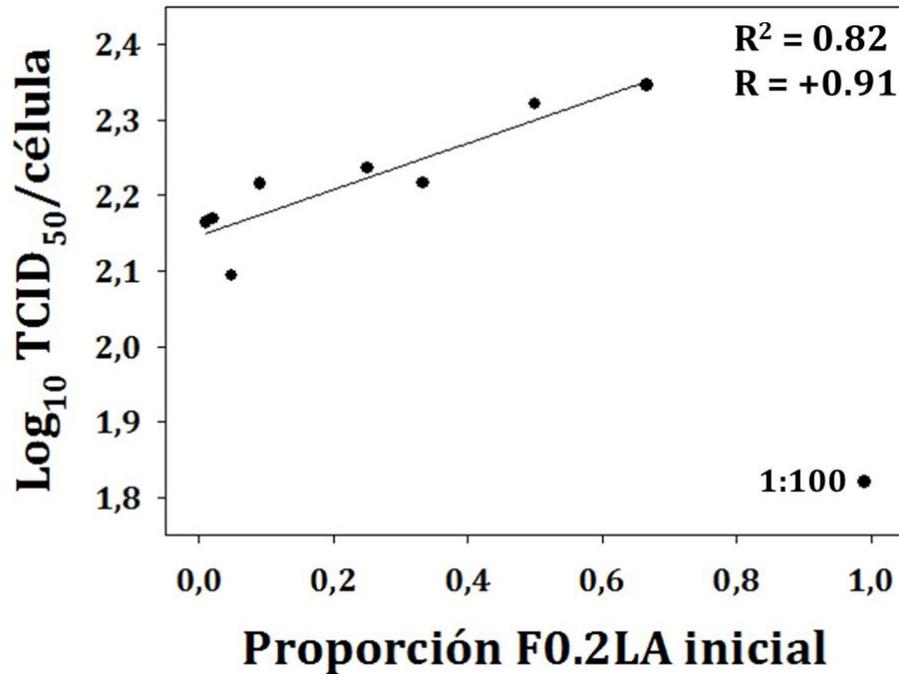


Figura 20 Producción media (expresada como el logaritmo decimal del TCID₅₀/célula) de los pasajes 6 a 20 de las distintas poblaciones mixtas ensayadas. La línea corresponde a la recta de regresión lineal simple. R²: coeficiente de determinación. R: coeficiente de correlación de Pearson. Se excluyó a la población 1:100 del análisis.

5.2.3 El *fitness* relativo de F0.2LA es superior en condiciones de baja MOI: fenotipo colonizador

Se realizó un seguimiento de la variación de la proporción de F0.05LA y F0.2LA a lo largo de los pases de las poblaciones mixtas 100:1, 1:1 y 1:100, mediante el estudio de dos marcadores en VP0 que distinguen a F0.05LA de F0.2LA (F0.05LA posee una citosina en las posiciones 1298 y 1409, mientras que F0.2LA presenta un uracilo en estas posiciones). En las mezclas 100:1 y 1:1, durante los primeros pasajes, en los que la MOI presentó valores bajos (**Tabla 8**), la población F0.2LA aumentó su proporción (**Figura 21**). Por tanto, el *fitness* de F0.2LA es superior con respecto al de F0.05LA en condiciones de baja densidad vírica, por lo que F0.2LA presenta características de colonizador, algo que concuerda con su tiempo de desencapsidación con respecto al de F0.05LA (**Tabla 5**). En pasajes posteriores, sin embargo, la población F0.05LA fue incrementando su proporción hasta desplazar a F0.2LA (**Figura 21**). En cuanto a la población 1:100, durante los primeros pasajes el marcador de F0.05LA permanece

Capítulo 2 Resultados y discusión

indetectable, por lo que no podemos determinar si esta población aumentó o disminuyó con respecto a F0.2LA.

Tabla 8 MOI de distintos pasajes de las poblaciones mixtas 100:1, 1:1 y 1:100, calculada en función de la TCID₅₀/célula.

	100:1	1:1	1:100
P1	1.00	2.00	1.00
P2	0.14	0.10	0.07
P3	1.06	1.76	1.47
P7	10.63	7.70	4.17

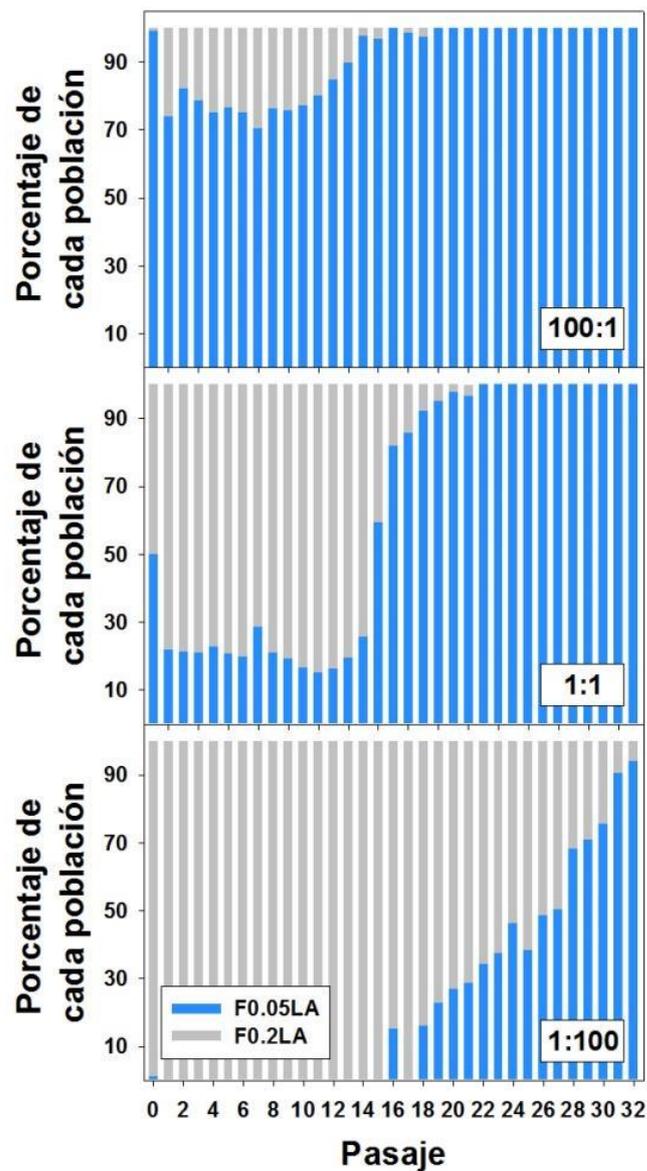


Figura 21 Proporción de las poblaciones F0.05LA y F0.2LA en las poblaciones mixtas 100:1, 1:1 y 1:100 (F0.05:F0.2LA).

5.2.4 Las mutaciones U359C, U590C y U726C aumentaron su frecuencia en las poblaciones mixtas

Según los resultados obtenidos en el capítulo anterior, las mutaciones U359C, U590C y U726C, que se presentan de forma muy minoritaria en la población F0.05LA, producen un efecto positivo sobre la replicación del virus (HAV/7) en células FRhK-4. Para saber si en las poblaciones mixtas había aumentado el porcentaje de individuos portadores de estas mutaciones, elegimos varios pasajes de las mismas y estudiamos en qué proporciones se hallaban presentes dichas mutaciones en cada uno de ellos mediante secuenciación de Sanger, midiendo la altura relativa de los picos de cada nucleótido en los cromatogramas de las secuencias consenso. En las tres poblaciones los picos de citosina superan el 20% en cada una de las tres posiciones (359, 590 y 726) en los pasajes más avanzados, llegando a encontrarse valores superiores al 80% en algunos casos (ver **Figura 22**). En las poblaciones mixtas 1:1 y 1:100, las mutaciones tardan más en aumentar su proporción (especialmente en 1:100), pero alcanzan porcentajes más altos (ver **Figura 22**). La aparición y aumento de estas mutaciones concuerda bastante bien con el aumento en la frecuencia de las subpoblaciones F0.05LA y F0.2LA (comparar **Figura 21** **Figura 22**).

Las mutaciones U359C, U590C y U726C estaban presentes en el pasaje 30 de la población 100:1 en menor proporción que en las poblaciones 1:1 y 1:100 (**Figura 22**). Según estos resultados, en la población 100:1 debe haber una menor proporción de individuos con genotipo $\phi 16-\lambda 7$. Además, las calvas producidas por el pasaje 30 de la población 100:1 son ligeramente inferiores a las del pasaje equivalente de la población 1:1 (**Tabla 7**), lo que corrobora que la proporción de buenos colonizadores ($\phi 16-\lambda 7$ o algún otro genotipo no testado) es inferior. Esto sugiere que la presencia de una cierta proporción de individuos procedentes de F0.2LA en la mezcla inicial ayuda a que se seleccionen individuos colonizadores procedentes de F0.05LA.

El que estas mutaciones tarden más en detectarse y aumentar su proporción en las poblaciones mixtas 1:1 y 1:100 es un resultado esperado, ya que los individuos que las portan solo se detectaron en la población F0.05LA, población que estaba presente en una menor cantidad en estas mezclas.

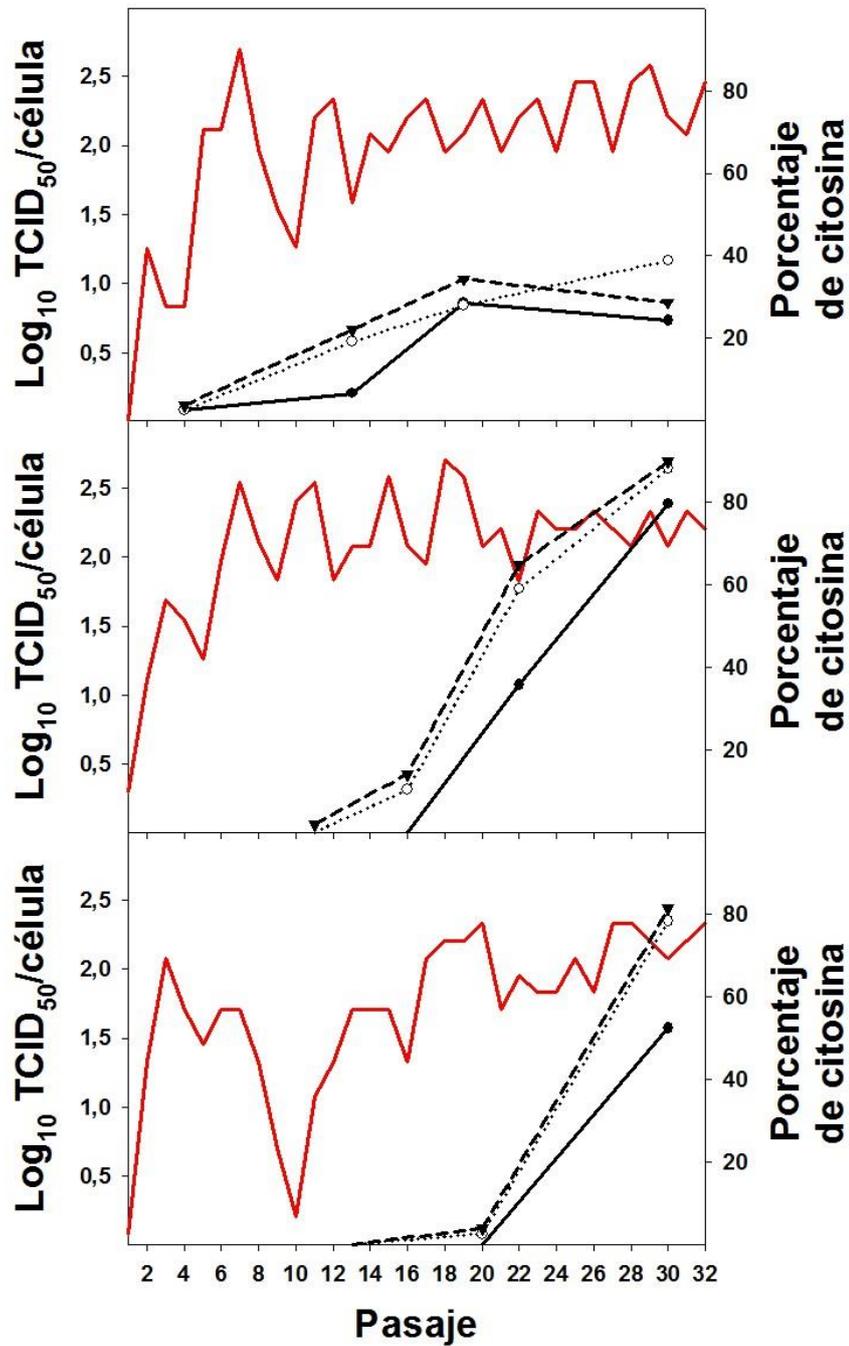


Figura 22 Porcentaje de citosina en las posiciones 359 (—●—), 590 (···○···) y 726 (—▼—) de las secuencias consenso de distintos pasajes de las poblaciones mixtas 100:1, 1:1 y 1:100. La línea roja representa la cantidad de partículas infecciosas producidas en cada pasaje, expresada como el promedio del logaritmo decimal del número de $\text{TCID}_{50}/\text{célula}$.

De entre todas las poblaciones analizadas, el pasaje 30 de la población mixta 1:1 es el que contiene las mutaciones U359C, U590C y U726C en una mayor proporción. Por este motivo decidimos analizar la composición de la cuasiespecie de este pasaje mediante secuenciación masiva de los mismos fragmentos que se

seleccionaron en el estudio de las poblaciones parentales F0.05LA y F0.2LA: el IRES y la región de VP1 que codifica para las posiciones 71 a 209.

5.2.5 Diversidad del IRES en el pasaje 30 de la población mixta 1:1 (F0.05LA:F0.2LA): predominio del haplotipo ϕ 16

En el estudio del IRES se encontraron siete haplotipos diferentes (ver **Tabla 9**). De ellos, el más abundante es el haplotipo ϕ 16, que se corresponde con el 88.68 % de las secuencias. Este haplotipo se halló en la población F0.05LA y se diferencia de la secuencia consenso de L0 en que contiene las mutaciones U359C, U590C y U726C. Hay otros dos haplotipos presentes en la población mixta (ϕ 18 y ϕ 19) que también presentan estas 3 mutaciones. En suma, alrededor del 90 % de las secuencias de la mezcla 1:1 las presentan. El 10 % restante (haplotipos ϕ 10, ϕ 13, ϕ 15, presentes también en F0.05LA, y ϕ 17) contiene dos de ellas, presentándose todas las combinaciones posibles (U359C-U590C, U359C-U726C y U590C-U726C). Teniendo en cuenta todas las secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva, el 95.4 %, 96.3 % y 98.2 % de las mismas contienen las mutaciones U359C, U590C y U726C, respectivamente, mientras que, según las alturas de los picos de los cromatogramas de la secuencia consenso, las frecuencias de estas mutaciones en la población son del 79.7 %, 88.2 % y 90 % (comparar **Figura 22** y **Tabla 9**). Los picos en un cromatograma obtenido a partir de una reacción de secuenciación de Sanger presentan cierta heterogeneidad. Por tanto, cuando existe un polimorfismo de nucleótido simple, la altura de cada pico no refleja con exactitud la frecuencia en la que se encuentre cada nucleótido en la muestra secuenciada. Esto puede explicar las diferencias entre las proporciones de las mutaciones U359C, U590C y U726C encontradas con ambos métodos. No obstante, la presencia de citosina en lugar de uracilo en cada una de las tres posiciones es mayoritaria en esta población, independientemente del método utilizado para cuantificar estos polimorfismos.

Tabla 9 Diferentes haplotipos encontrados mediante secuenciación masiva del IRES en el pasaje 30 de la población mixta 1:1. Los cambios representan sustituciones nucleotídicas con respecto a la secuencia consenso de L0. N: número total de secuencias obtenidas.

HAPLOTIPO	CAMBIO(S)	FRECUENCIA (N=12857)
$\phi 10$	U590C, U726C	4.58
$\phi 13$	U359C, U590C	1.78
$\phi 15$	U359C, U726C	2.72
$\phi 16$	U359C, U590C, U726C	88.68
$\phi 17$	U359C, C609U, U726C	0.94
$\phi 18$	U359C, A513G, U590C, U726C	0.79
$\phi 19$	U359C, U590C, C609U, U726C	0.51

Se encontraron otras dos mutaciones con respecto a la secuencia consenso de L0 en los haplotipos $\phi 17$, $\phi 18$ y $\phi 19$: C609U y A513G (**Tabla 9**). Las poblaciones F0.05LA y F0.2LA ya presentaban ambas mutaciones, aunque en unos haplotipos diferentes a éstos. Por tanto, no se encontró ninguna mutación que no hubiera sido observada con anterioridad en las poblaciones parentales. Sin embargo, algunos de los haplotipos hallados en la población mixta son nuevos ($\phi 17$, $\phi 18$ y $\phi 19$, **Figura 23**). Para que se formen estos haplotipos a partir de otros presentes en la población F0.05LA solo se necesita una mutación puntual, mientras que se requiere un mínimo de dos y tres mutaciones para obtener los haplotipos $\phi 17$ y $\phi 18$ y $\phi 19$, respectivamente, a partir de alguno de los haplotipos que componen la población F0.2LA. De hecho, de los siete haplotipos hallados en la población mixta, no se observó ninguno en F0.2LA. En resumen, algunos haplotipos encontrados en el IRES del pasaje 30 de la mezcla 1:1 estaban presentes en la población F0.05LA y otros son nuevos y genéticamente más cercanos a F0.05LA que a F0.2LA.

Para cuantificar la heterogeneidad de un espectro de mutantes en una cuasiespecie se utiliza, entre otros parámetros, la entropía normalizada de Shannon (S_n), una medida de la proporción de secuencias idénticas en una distribución [270][97]. Los valores de la entropía normalizada de Shannon pueden variar de 0 (nula diversidad) a 1 (diversidad máxima) [271]. La diversidad genética, medida según este índice, es menor en la población mixta que en sus

poblaciones parentales ($S_n = 0.43$, 0.15 y 0.09 en F0.05LA, F0.2LA y 1:1 p30, respectivamente), en el fragmento de la región 5'NCR estudiado mediante secuenciación masiva (ver **Figura 23**). Además, la diversidad en F0.2LA es mucho menor que en F0.05LA, debido probablemente a que la presencia de una alta concentración de AMD da lugar a un ambiente más restrictivo, en el que podrá mantenerse un número menor de variantes víricas.

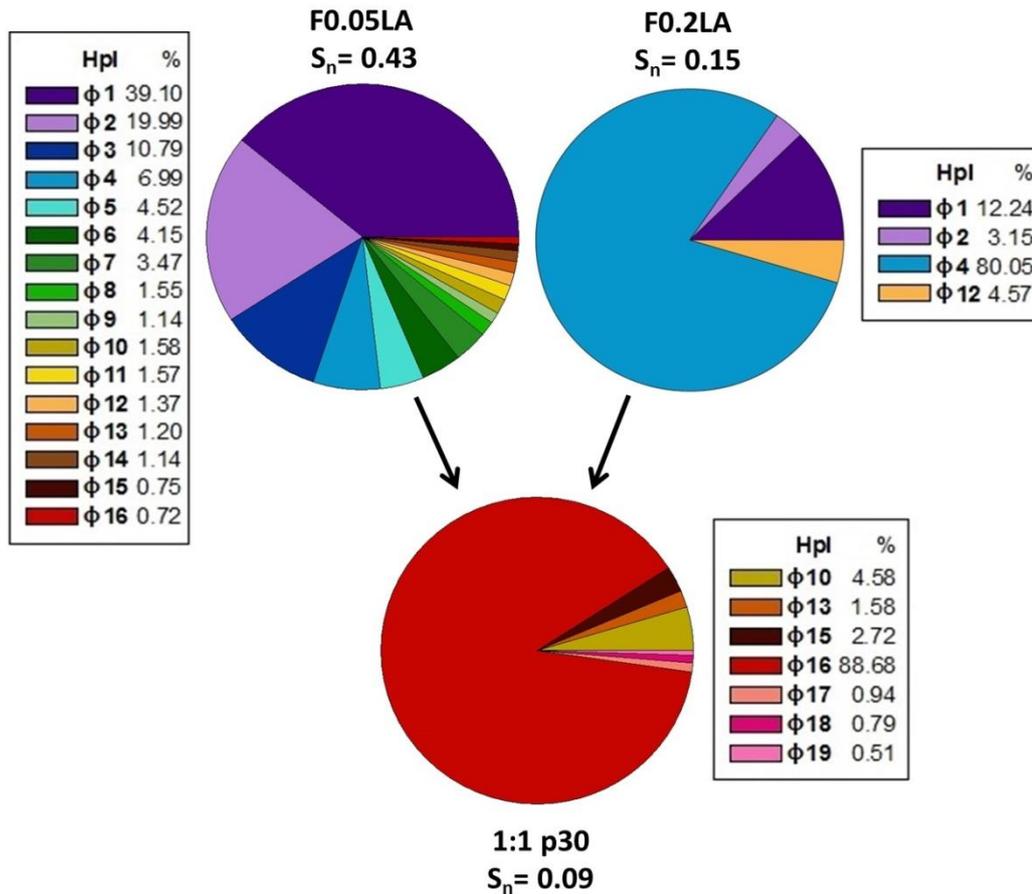


Figura 23 Proporciones de los distintos haplotipos detectados mediante la secuenciación masiva del IRES de las poblaciones F0.05LA, F0.2LA y 1:1 p30. Se indica el valor de la entropía de Shannon normalizada (S_n) de cada cuasiespecie.

5.2.6 Diversidad de la región intermedia de VP1 en el pasaje 30 de la población mixta 1:1 (F0.05LA:F0.2LA): predominio del haplotipo $\lambda 7$

Mediante el estudio por secuenciación masiva de la región correspondiente a los aminoácidos 71 a 209 de VP1 (nucleótidos 2418-2834) del pasaje 30 de la población mixta 1:1 se detectaron 7 haplotipos diferentes (ver **Tabla 10**). El más

Capítulo 2 Resultados y discusión

abundante ($\lambda 7$) representó el 88.67 % de las secuencias. Éste y otros dos haplotipos ($\lambda 5$ y $\lambda 19$) se encontraron también en la población F0.05LA, pero no en F0.2LA. El haplotipo $\lambda 6$ sí está presente en ambas poblaciones parentales. Por último, hay una serie de haplotipos ($\lambda 21$, $\lambda 22$ y $\lambda 23$) que no se hallaban presentes en ninguna de las poblaciones de partida (ver **Figura 24**). Solo una mutación puntual diferencia a estos haplotipos de otros presentes en F0.05LA, mientras que se necesita un mínimo de dos sustituciones para transformar cualquiera de los haplotipos hallados en F0.2LA en $\lambda 21$, $\lambda 22$ o $\lambda 23$ (ver **Tabla 10**). Por lo tanto, también en este fragmento la cuasiespecie de la población mixta es genéticamente más cercana a F0.05LA que a F0.2LA.

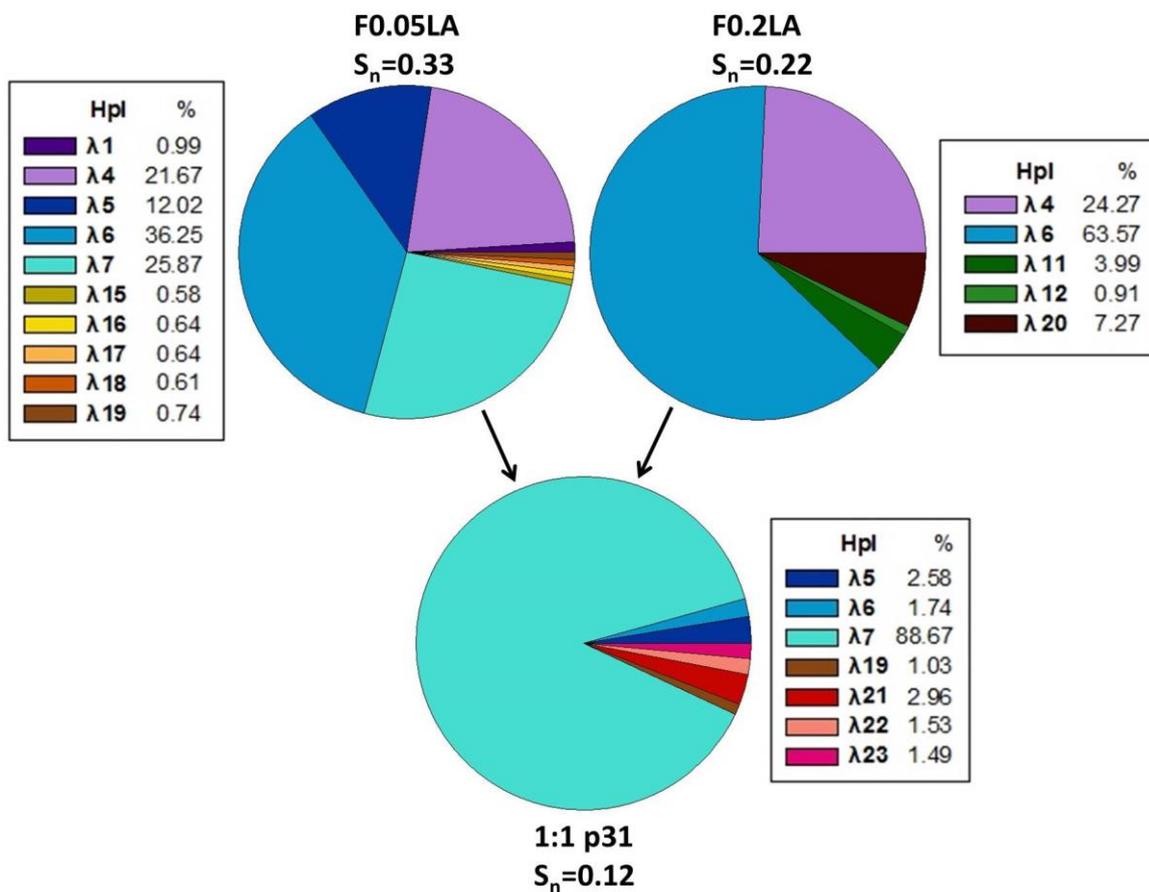


Figura 24 Proporciones de los distintos haplotipos detectados mediante la secuenciación masiva de la región VP1 correspondiente a los aminoácidos 71 a 209 de las poblaciones F0.05LA, F0.2LA y 1:1 p30. Se indica el valor de la entropía de Shannon normalizada (S_n) de cada cuasiespecie.

De las seis mutaciones diferentes que se encontraron con respecto a la secuencia consenso de L0, tres estaban presentes en F005LA y F02LA (las que

afectan a las posiciones aminoacídicas 85, 123 y 146), una solamente en F0.05LA (en la posición 110) y dos de ellas no se encontraron en ninguna de las poblaciones parentales (las que atañen a las posiciones 76 y 157) (**Tabla 10**). Los haplotipos encontrados en la población mixta que resultan diferentes a los encontrados en F0.05LA y F0.2LA contienen, o bien una combinación diferente de mutaciones que ya se habían observado en estas otras poblaciones (en el caso de λ_{22}), o bien un par de mutaciones presentes y una no presente en las poblaciones parentales (λ_{21} y λ_{23}).

Tabla 10 Diferentes haplotipos encontrados en la región intermedia de VP1 (codones 71 a 209) en el pasaje 30 de la población mixta 1:1 (F0.05LA:F0.2LA). Los cambios son con respecto a la secuencia consenso de L0. Frecuencia de uso hace referencia al porcentaje en el cual se encuentra el codón con respecto al codón sinónimo más abundante en humanos (ver introducción, Tabla 1). N: número total de secuencias obtenidas.

HAPLOTIPO	CAMBIOS DE CODÓN Y FRECUENCIA DE USO	POSICIÓN EN VP1 (aa)	FRECUENCIA (N= 3212)	RCDI
λ_5	ATT (I) (61 %) → GTT (V) (34 %)	146	2.58	1.698
λ_7	TTG (L) (26 %) → TTC (F) (100 %)	123	88.67	1.668
	ATT (I) (61 %) → GTT (V) (34 %)	146		
λ_6 (F02LA)	ATC (I) (100 %) → GTC (V) (53 %)	85	1.74	1.674
	TTG (L) (26 %) → TTC (F) (100 %)	123		
	ATT (I) (61 %) → GTT (V) (34 %)	146		
λ_{19}	CCT (P) (78 %) → CCC (P) (100 %)	110	1.03	1.670
	ATT (I) (61 %) → GTT (V) (34 %)	146		
λ_{21}	TCC (S) (91%) → TCT (S) (77%)	76	2.96	1.693
	TTG (L) (26%) → TTC (F) (100%)	123		
	ATT (I) (61%) → GTT (V) (34%)	146		
λ_{22}	CCT (P) (78%) → CCC (P) (100%)	110	1.53	1.639
	TTG (L) (26%) → TTC (F) (100%)	123		
	ATT (I) (61%) → GTT (V) (34%)	146		
λ_{23}	TTG (L) (26%) → TTC (F) (100%)	123	1.49	1.664
	ATT (I) (61%) → GTT (V) (34%)	146		
	GCC (A) (100%) → GTC (V) (53%)	157		

Al comparar los haplotipos encontrados en el IRES del pasaje 30 de la población mixta 1:1 (**Tabla 9**), vemos que solo un nucleótido diferencia al haplotipo mayoritario ϕ_{16} del resto, con la excepción de ϕ_{17} , que se distingue de

$\phi 16$ en dos posiciones. Lo mismo ocurre en el caso de VP1. La diferencia entre el haplotipo mayoritario en la población mixta ($\lambda 7$) y el resto de haplotipos encontrados en dicha población es de un único nucleótido, y de dos en el caso de $\lambda 19$. Dada la cercanía genética entre las distintas secuencias que se encontraron en el pasaje 30 de la población mixta 1:1, es posible que los individuos minoritarios que se encuentran en esta población procedan de otros que presentaban la combinación de haplotipos $\lambda 7$ y $\phi 16$, es decir, estaríamos al inicio de una nueva cuasiespecie.

En esta región, la diversidad genética, medida según la entropía de Shannon normalizada, también es menor en la población mixta que en las poblaciones de las que procede ($S_n = 0.33, 0.22$ y 0.12 en F0.05LA, F0.2LA y 1:1 p30, respectivamente) (**Figura 24**). Como se comentó en la introducción, la diversidad en una cuasiespecie puede ser fundamental para la supervivencia de una población vírica en un ambiente cambiante, como es el caso de las infecciones de organismos, en las que los virus tienen que hacer frente a condiciones diversas y cuellos de botella, como la replicación en distintos tipos de célula que difieren en sus propiedades fisiológicas y bioquímicas o la transmisión de un individuo a otro [95]. La diversidad se mantiene más fácilmente cuando la heterogeneidad ambiental es acusada, de manera que ningún genotipo es el mejor adaptado a todas las condiciones que la población tiene que soportar [272]. Teóricamente, en cada uno de los nichos o ambientes se seleccionarían unos especialistas diferentes, que podrían coexistir en la cuasiespecie vírica, previniéndose de esta manera la exclusión competitiva [273]. El cultivo celular supone un ambiente más estable que las infecciones de organismos, lo que debería permitir que los virus que son pasados repetidas veces en un único tipo celular evolucionen hacia una mayor especialización, purgándose las variantes con un *fitness* menor en esas condiciones [274]. Sin embargo, la adición de AMD en nuestros experimentos representa una presión selectiva muy fuerte, tanto más cuanto mayor es la concentración de la droga. Ello se ve claramente en la menor entropía de Shannon en la población F0.2LA frente a F0.05LA, en las dos regiones estudiadas. La entropía más baja observada en la población mixta 1:1 es posiblemente debida a la selección de unas

pocas variantes mejor adaptadas, que finalmente desplazaron al resto de variantes presentes en la mezcla.

La región 5'NCR está altamente conservada entre los distintos genotipos del HAV, debido a que su compleja estructura está implicada en los procesos de traducción y replicación [124], siendo la divergencia máxima encontrada en esta región del 5 % [124]. Por otra parte, la región que codifica para la proteína VP1 es más variable, encontrándose diferencias genéticas a nivel de nucleótidos desde el 10.6 y hasta el 23.5 % entre genotipos [99]. Esto concuerda con que en el IRES de la población mixta no se encontrase ninguna nueva mutación con respecto a las poblaciones parentales F0.05LA y F0.2LA, mientras que en VP1 se hallasen dos (en las posiciones 76 y 157). Sin embargo, al comparar en las distintas poblaciones la diversidad entre las dos regiones estudiadas utilizando la entropía de Shannon normalizada (S_n) no se observan diferencias consistentes. La diversidad del fragmento de VP1 con respecto al del IRES es mayor en la población F0.2LA (0.22 frente a 0.15), y en el pasaje 30 de la población mixta 1:1 (0.12 frente a 0.09), pero menor en F0.05LA (0.33 frente a 0.43) (comparar **Figura 23**, y **Figura 24** y **Tabla 11**).

Tabla 11 Ratio entre las entropías de Shannon en la regiones VP1 y 5'NCR estudiadas, en las poblaciones F0.05LA, F0.2LA y el pasaje 30 de la población mixta 1:1

	F0.05LA	F0.2LA	1:1 p30
S_n VP1/ S_n 5'NCR	0.77	1.47	1.33

El que la entropía en la región 5'NCR sea mayor que en VP1 en la población F0.05LA representa un resultado inesperado. Ello se podría explicar porque la adaptación a AMD implica una adaptación en varias etapas: durante los primeros pases, una deoptimización en el uso de codones en aquellas zonas estructuralmente sensibles, como se observó en la población F0.05A, precursora de F0.05LA [189]; posteriormente, una optimización en zonas sin constricciones estructurales, como se observa en la población F0.05LA [39], y por último se podría seleccionar un IRES más eficiente que aprovechara el aumento en la velocidad de elongación propiciado por la optimización.

En el capítulo anterior se mostró que la presencia del codón ATC en lugar de GTC en la posición 85 aumenta la tasa de traducción de la proteína VP1. Mientras que el 40.3 % y el 0 % de las secuencias en las poblaciones F0.05LA y F0.2LA, respectivamente, presentaban ATC en esta posición, en la población mixta estudiada este valor es del 98.3 %. También se puso de manifiesto que la combinación de las mutaciones U359C, U590C y U726C aumenta la actividad del IRES en células FRhK-4. La combinación de estas tres mutaciones en el IRES, ausente en la población F0.2LA, solo se presentó en un 0.7% de las secuencias de F0.05LA, mientras que alrededor del 90 % de las secuencias de la población mixta la portaba.

Los haplotipos, $\lambda 7$ y $\phi 16$, que presentan ATC en la posición 85 y las mutaciones U359C, U590C y U726C, respectivamente, están presentes en un 88.7% de los individuos en la población mixta 1:1 p30. Aún suponiendo que la asociación entre ambos haplotipos sea la mínima posible, es decir, que los genomas que contienen los haplotipos ϕ minoritarios (10, 13, 15, 17, 18 y 19) presenten $\lambda 7$, y que los haplotipos λ minoritarios (5, 6, 19, 21, 22 y 23) coincidan en genomas que contienen el haplotipo $\phi 16$, un 66.1% de los individuos de la población deben presentar la combinación $\phi 16$ - $\lambda 7$. Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados de ambos capítulos, en comparación con las poblaciones F0.05LA y F0.2LA, la mayoría de los individuos de la población mixta 1:1 p30 se caracteriza por tener un IRES más eficaz acompañado de una secuencia codificante de una región de VP1 que es traducida más rápidamente.

5.2.7 Determinación del efecto de las mutaciones U359C, U590C y U726C sobre la velocidad de traducción de los haplotipo $\lambda 6$ y $\lambda 7$

Dado que la mayoría de individuos de la población mixta estudiada deben contener las secuencias correspondientes a $\phi 16$ y $\lambda 7$ estudiamos el efecto que las mutaciones que caracterizan a $\phi 16$, que confieren una mayor eficacia al IRES del HAV en células FRhK-4, producen sobre la velocidad de traducción del haplotipo $\lambda 7$, y si este efecto es similar en el haplotipo $\lambda 6$, que se encontraba de forma mayoritaria en las poblaciones parentales F0.05LA y F0.2LA y se caracteriza por presentar una tasa de traducción más baja que $\lambda 7$. Para ello se introdujeron las

mutaciones U359C, U590C y U726C en el IRES de los dos vectores bicistrónicos derivados de G1RC que contienen los haplotipos $\lambda 6$ y $\lambda 7$ entre el IRES del HAV y el gen que codifica para la luciferasa de *Photinus pyralis* (FLuc) y que se usaron en el capítulo anterior. En estos plásmidos, la cantidad de proteína luminiscente producida depende de la velocidad a la que se traduce el haplotipo correspondiente. Una vez construidos estos plásmidos, se transfectaron en células FRhK-4, añadiendo AMD al medio post-transfección en una concentración de 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se midieron los valores de FLuc/RLuc un día después de la transfección. La construcción de estos dos plásmidos fue realizada por Lucía D'Andrea, y se pueden encontrar más detalles de estos experimentos en su tesis doctoral [68].

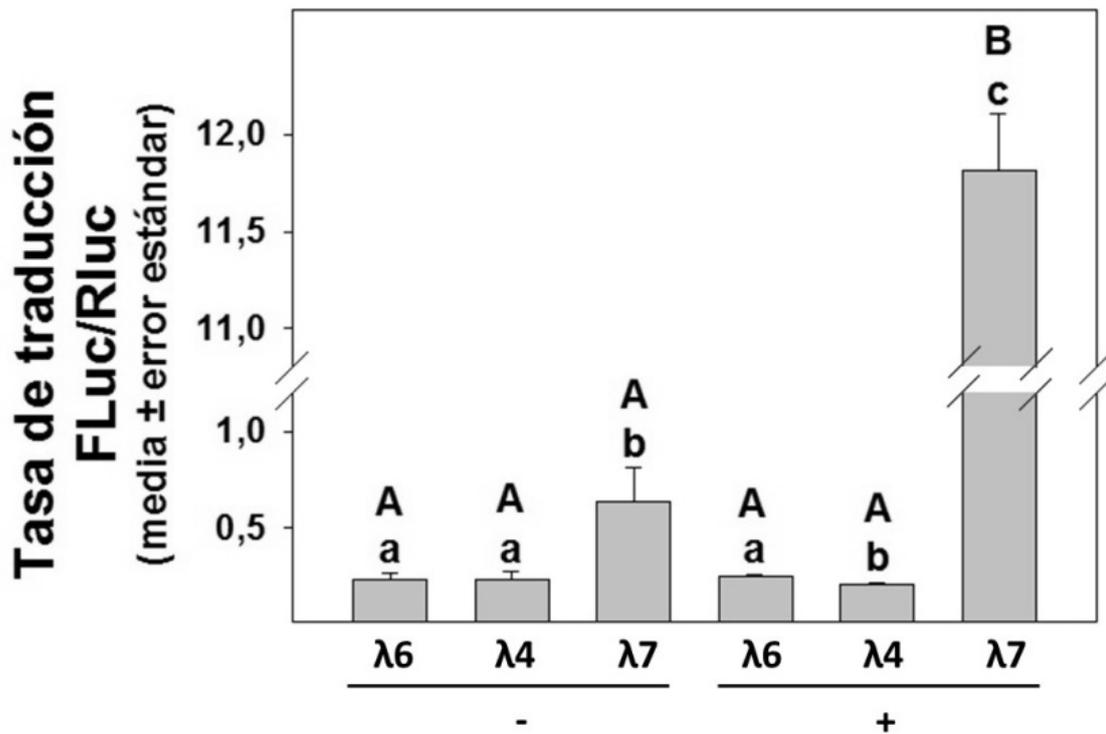


Figura 25 Tasa de traducción, expresada como la relación FLuc/RLuc, de los haplotipos $\lambda 4$, $\lambda 6$ y $\lambda 7$, clonados en el plásmido G1RC (columnas de la izquierda, signo -) o en el mismo plásmido con las mutaciones U359C, U590C y U726C (columnas de la derecha, signo +), en presencia de 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de AMD. Los datos de FLuc/RLuc sin las mutaciones (columnas de la izquierda) fueron presentados en el capítulo anterior, pero se han incluido también en esta gráfica para compararlos con los datos de FLuc/RLuc con mutaciones. Existen diferencias significativas ($P < 0.05$) cuando las letras son diferentes. Se indican dos análisis diferentes: en minúscula cuando se comparan los valores entre distintos haplotipos clonados en el mismo plásmido, y en mayúsculas cuando se comparan los valores de un mismo haplotipo sin y con las mutaciones U359C, U590C y U726C.

Las velocidades de traducción de $\lambda 6$ y $\lambda 4$ no se ven afectadas por las mutaciones introducidas en el IRES (Figura 25), mientras que $\lambda 7$, que ya poseía

una velocidad de traducción mayor a las de λ_6 y λ_4 en ausencia de estas mutaciones, ve incrementada su tasa de traducción 18.7 veces cuando las mutaciones U359C, U590C y U726C se encuentran presentes (**Figura 25**). Por tanto, estas mutaciones afectan de manera diferencial a la traducción de distintas secuencias codificantes de la proteína VP1 de la cápside del HAV. Recordamos que la diferencia entre λ_6 y λ_7 es únicamente una sustitución en la posición 85. Como habíamos señalado, la presencia en esta posición del codón ATC en lugar de GTC hace aumentar la velocidad de traducción, en presencia de actinomicina D, del fragmento de VP1 que estamos estudiando. Este aumento se ve potenciado por la presencia de las tres mutaciones en el IRES.

Como hemos visto, el pasaje 30 de la población mixta 1:1 debe estar constituido por una mayoría de individuos de genotipo $\phi_{16-\lambda_7}$ y esta combinación se caracteriza por conferir una mayor eficiencia de traducción. Es probable que estos individuos, al ser traducidos más rápidamente, puedan producir antes nuevas partículas infecciosas, que serán liberadas al espacio extracelular y podrán infectar nuevas células a una velocidad mayor que en el caso de otros genotipos de traducción más lenta. Esto explicaría que las calvas de la población mixta 1:1 sean más grandes que las de F0.05LA y F0.2LA, ya que la población mixta estaría constituida mayoritariamente por individuos que son buenos colonizadores. El aumento en la proporción de genomas con genotipo $\phi_{16-\lambda_7}$ detectado en la población mixta 1:1 pudo ser propiciado en parte por la baja MOI utilizada en el primer pasaje, ya que en estas condiciones los colonizadores tienen ventaja sobre los competidores, al ser menos frecuente el número de coinfecciones y al quedar una proporción de células no infectadas en un primer ciclo que podrán serlo por la progenie de los virus colonizadores [89]

5.2.8 La secuencia consenso del pasaje 30 de la población mixta 1:1: población HM-175-HP

Como se ha mencionado, la productividad promedio de las poblaciones mixtas fue superior, tras varios pasajes, a la de las poblaciones de las que procedían. Esto podría deberse al aumento de la proporción de individuos de genotipo $\phi_{16-\lambda_7}$. No obstante, es probable que otras regiones del genoma también

participen en este aumento del título. Con el fin de obtener información sobre estas otras regiones, se realizó la secuenciación mediante la técnica de Sanger (secuencia consenso) de la totalidad del genoma del pasaje 30 de la población mixta 1:1. Para abreviar, llamaremos HM-175-HP (de *High Productivity*) a este pasaje.

Las secuencias consenso de F0.05LA (número de acceso GenBank: KF724019) y F0.2LA (número de acceso GenBank: KF724021) se diferencian entre sí en 14 nucleótidos (ver **Tabla 12**). En la secuencia consenso de HM-175-HP, algunas de estas posiciones coinciden con F0.05LA (9), otras con F0.2LA (4), mientras que en un caso (posición 1504) hay un nucleótido diferente, que coincide con el que presenta la población L0 (número de acceso GenBank: KF724017). Además de estos marcadores, hay otra serie de posiciones (8) en las que F0.05LA y F0.2LA coinciden y HM-175-HP presenta un nucleótido distinto (**Tabla 12** y **Figura 26**). En uno de estos casos (posición 2460), HM-175-HP y L0 coinciden. En el resto, HP presenta un nucleótido diferente al de estas tres poblaciones. En resumen, 12 mutaciones diferencian a HM-175-HP de la población estándar L0.

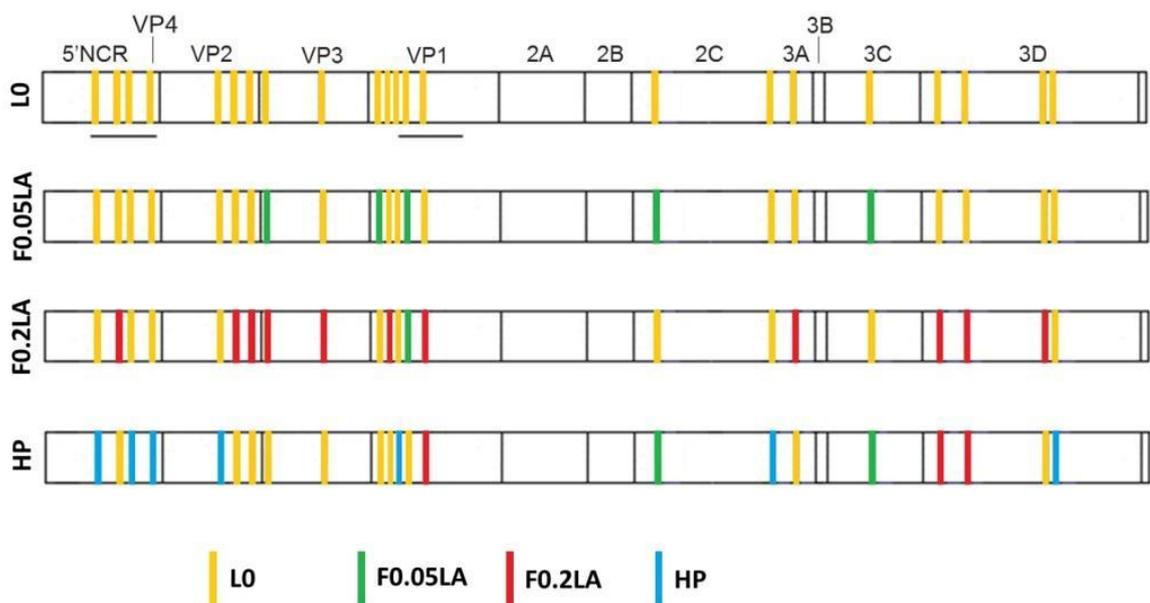


Figura 26 Representación de los cambios de la secuencia consenso de HP con respecto a las poblaciones L0, F0.05LA y F0.2LA. Las dos zonas estudiadas mediante secuenciación masiva se encuentran subrayadas bajo la figura que representa a L0.

Las mayores acumulaciones de diferencias entre la secuencia consenso de HP y las de sus poblaciones parentales F0.05LA y F0.2LA se dan en 5'NCR, en la mitad 3' de la región que codifica VP2 más el extremo 5' de VP3 y en la mitad 5' de

VP1 (ver **Figura 26**). La acumulación de mutaciones en estas regiones puede indicar la importancia del uso de codones de la cápside en el proceso de adaptación a distintas concentraciones de AMD [189], así como la importancia de la región 5'NCR en la adaptación a cultivo celular [162][163]. Estas regiones han sido parcialmente secuenciadas mediante pirosecuenciación, como se ha descrito anteriormente. Los resultados de la secuenciación de Sanger y la secuenciación masiva coinciden en la mayoría de las posiciones. Es destacable, sin embargo, la existencia de disparidad en la posición aminoacídica 123 de VP1 en la población F0.05LA. El 63.3 % y el 36.7 % de las secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva contienen UUC y UUG, respectivamente. Sin embargo, según la secuencia consenso, F0.05LA presenta UUG en esa posición. Esta incongruencia probablemente sea debida a diferencias en los tamaños de los picos de los cromatogramas causadas por la heterogeneidad de la técnica de Sanger, y no por diferencias reales en la composición de la cuasiespecie. Así, la secuenciación de Sanger puede dar una información incorrecta sobre cuál es el nucleótido más abundante en una cuasiespecie cuando éste no está presente en un porcentaje lo suficientemente alto de secuencias en la población.

Según el estudio de secuenciación masiva de los fragmentos pertenecientes a las regiones 5'NCR y VP1, es probable que el origen de la mayoría de individuos que conforman la población HP se encuentre en ciertos individuos que formaban parte de F0.05LA de forma minoritaria y que incrementaron su frecuencia, con la ayuda en parte de individuos procedentes de F0.2LA. Sin embargo, no podríamos llegar a esa conclusión limitándonos a analizar la información contenida en las secuencias consenso. Primero, porque la secuencia consenso no aporta información sobre los genotipos individuales que componen una población, ni siquiera podemos saber cuál es la secuencia dominante [275]. Y, en segundo lugar, porque en nuestro caso, algunos marcadores en HP coinciden con F0.2LA y no con F0.05LA, como ya hemos comentado (**Figura 26**). Un ejemplo de lo engañoso que puede resultar el uso de la secuencia consenso con el fin de inferir el origen de una población lo encontramos en el fragmento de VP1 estudiado mediante secuenciación masiva. En él, el 88.7 % de las secuencias de HP son idénticas a un haplotipo que está en una frecuencia del 25.9 % en F0.05LA y ausente en F0.2LA

(λ7), mientras que en el mismo fragmento secuenciado mediante la técnica de Sanger, encontramos un marcador nuevo (en la posición aminoacídica 85 de VP1) y otro que coincide con F0.2LA (en 123), por lo que concluiríamos que, en ese fragmento, la población HP es más parecida a F0.2LA (**Tabla 12**). La información contenida en la secuencia consenso puede resultar útil para trazar el origen de las cepas del HAV circulantes [100], o interpretar procesos de selección y deriva genética en los casos en los que no sea necesaria la información sobre el espectro de mutantes [276]. Sin embargo, la secuencia consenso no da una información fiable sobre el origen de la población HP, originada a partir de la mezcla de dos poblaciones genéticamente estrechamente relacionadas.

Tabla 12 Cambios de la secuencia consenso del pasaje 30 de la población mixta 1:1 con respecto a las poblaciones F0.05LA y F0.2LA. Se sigue la numeración de la cepa wt HM175 (número de acceso GenBank: M14707). aa: aminoácido de la proteína correspondiente.

Región	Nucleótido	aa	L0	F0.05LA	F0.2LA	1:1 p30	Cambios de codón
5'NCR	359	-	U	U	U	C	-
5'NCR	513	-	A	A	G	A	-
5'NCR	590	-	U	U	U	C	-
5'NCR	726	-	U	U	U	C	-
VP2	1203	134	A	A	A	G	AGC (S) / GGC (G)
VP2	1298	165	C	C	U	C	UAC (Y) / UAU (Y)
VP2	1409	202	C	C	U	C	CUC (L) / CUU (L)
VP3	1504	12	C	G	A	C	GGG (G) /GAG (E) / GCG (A)
VP3	1895	142	A	A	G	A	AUA (I) / AUG (M)
VP1	2280	25	A	G	A	A	GUA (V) / AUA (I)
VP1	2334	43	U	U	C	U	UCA (S) / CCA (P)
VP1	2385	60	U	U	U	C	UUA (L) / CUA (L)
VP1	2460	85	A	G	G	A	GUC (V) / AUC (I)
VP1	2576	123	G	G	C	C	UUG (L) / UUC (F)
2C	4156	54	A	G	A	G	AGA (R) / AAA (K)
2C	4931	312	C	C	C	U	CUC (L) / CUU (L)
3A	5088	29	G	G	A	G	GGC (G) / AGC (S)
3C	5607	106	A	C	A	C	CAA (Q) / AAA (K)
3D	6064	39	C	C	U	U	GCU (A) / GUU (V)
3D	6242	98	G	G	A	A	GGG (G) /GGA (G)
3D	6779	277	U	U	A	U	GCU (A) / GCA (A)
3D	6836	296	C	C	C	U	GTC (V) / GTT (V)

Capítulo 2 Resultados y discusión

De las 9 posiciones que en la secuencia consenso de HP son diferentes a F0.05LA y F0.2LA, 4 (las correspondientes a las posiciones 359, 590, 726 y 2460) se encuentran en las regiones analizadas mediante secuenciación masiva. En todos los casos, las mutaciones que forman parte de la secuencia consenso de HP ya se encontraban presentes, de forma minoritaria, en el *pool* de haplotipos que componen F0.05LA. Los otros 5 marcadores que distinguen a HP de F0.05LA y F0.2LA (posiciones 1203, 1504, 2385, 4931 y 6836) podrían también encontrarse en la cuasiespecie de F0.05LA de forma minoritaria. No obstante, no podemos descartar que estos marcadores tengan su origen en la aparición de nuevas mutaciones durante las sucesivas rondas de replicación.

Los marcadores que, en las regiones que no hemos estudiado mediante secuenciación masiva, son iguales en las secuencias consenso de F0.2LA y HP y distintos en F0.05LA (posiciones 2280, 6064 y 6242) también podrían tener su origen en secuencias minoritarias de la población F0.05LA. Alternativamente, se podrían haber adquirido mediante mutación o mediante intercambio genético con individuos provenientes de F0.2LA. Se han observado procesos de recombinación entre distintas cepas del HAV en cultivo celular [277][160]. Se ha propuesto que el proceso de recombinación en el HAV es similar al que ocurre en otros picornavirus: durante la síntesis de la cadena negativa el complejo de replicación cambia de molde y continúa copiando otra molécula de RNA vírico [160]. Existen diversos métodos para detectar recombinación entre genomas e identificar puntos calientes de entrecruzamiento. La mayoría de estos métodos son mejores cuanto mayor es la divergencia entre las secuencias, porque habrá más información disponible para reconocer las huellas de la recombinación [278]. Incluso la prueba de homoplasia [279], un método desarrollado para detectar recombinación en secuencias poco divergentes, deja de ser fiable si las secuencias difieren en menos del 1 % de los nucleótidos. Teniendo en cuenta que las secuencias consenso de F0.05LA y F0.2LA se diferencian en un 0.19 %, no podemos saber si ha habido recombinación entre individuos de ambas poblaciones.

En la secuencia consenso aparecen las mutaciones que permiten a HP tener un IRES más eficiente (U359C, U590C y U726C) y una mutación en la región codificante de VP1 que es importante para aumentar la tasa de producción de esta

proteína (GTC→ATC en la posición 85). La secuencia consenso puede ser útil para detectar otros marcadores presentes en HP en regiones que no se estudiaron por secuenciación masiva y que pueden contribuir al fenotipo de dicha población mixta, como los que se encontraron exclusivamente en HP, en las regiones que codifican para 2C, 3D y VP2 (ver **Figura 26** y **Tabla 12**). Una de estas mutaciones (C4931U) es un cambio sinónimo en el gen de la proteína no estructural 2C, uno de los puntos calientes de acumulación de mutaciones durante la adaptación a cultivo celular [161]. Esta proteína, altamente conservada entre los picornavirus, realiza múltiples funciones: se une a membranas, induciendo la formación de vesículas [280][281], interacciona con la región 3' terminal de la cadena negativa del RNA del virus [59] y funciona como ATPasa y GTPasa [282].

En HP se encontró una mutación sinónima (C6836T) en la región que codifica para la polimerasa (3D^{pol}), una región que contiene determinantes que controlan la cinética de replicación del HAV [283]. 3D^{pol} se encarga tanto de copiar el genoma infeccioso, de sentido positivo, creando cadenas negativas complementarias, como de sintetizar nuevos genomas a partir de estas cadenas negativas. La replicación del RNA del HAV es ineficiente, siendo uno de los factores que restringen la multiplicación del virus [160]. Sin embargo, ciertas mutaciones en la polimerasa pueden aumentar la eficiencia de la replicación del HAV. Por ejemplo, la mutación T6069G, que produce el cambio de aminoácido F42L, incrementó la tasa de replicación del RNA en células FRhK-4, aunque no la producción final de virus [283]. Por otra parte, Konduru et al. [283] publicaron que un cambio no sinónimo en la posición 7027 potenció el efecto de la mutación T6069G. El único cambio no sinónimo que se detectó en la secuencia consenso de la población HP en 3D^{pol}, y que comparte con F0.2LA, es la sustitución C6064T, que produce el cambio aminoacídico A39V. A pesar de que esta mutación se localiza cerca de F42L, no se encontró una correlación entre esta mutación y un incremento de la replicación del RNA o entre dicha mutación y los cambios en la infectividad específica observados durante la adaptación a distintos niveles de silenciamiento celular [39]. Además, el cambio A39V mantiene un motivo conservado en la familia *Picornaviridae*, que pasa de PAA a PAV.

Capítulo 2 Resultados y discusión

Otra de las mutaciones exclusivas de HP (con respecto a L0, F0.05LA y F0.2LA) es un cambio aminoacídico en la proteína estructural VP2 (S134G). Esta mutación se localiza cerca de uno de los dominios tardíos de dicha proteína. Estos dominios participan en la unión a ALIX, una proteína que está implicada en la inclusión del virus en cuerpos multivesiculares y su liberación en forma de eHAV [2]. La mutación S134G podría afectar a la interacción con la proteína ALIX, propiciando una introducción más eficiente del virus en los cuerpos multivesiculares. El estudio de esta hipótesis forma parte de los objetivos de otra tesis doctoral que actualmente se está desarrollando en el grupo de Virus Entèrics.

6 DISCUSIÓN GENERAL

La producción vírica continúa siendo un punto crítico para el sector de la producción de antígenos. Debido al pequeño tamaño de los virus es difícil conseguir las cantidades de antígeno requeridas para producir vacunas inactivadas y kits de diagnóstico. Un claro ejemplo de ello es la producción de cápsides del virus de la hepatitis A (HAV), debido a que es un virus que replica ineficientemente en cultivo celular, y solo unas pocas cepas han sido adaptadas a replicar *in vitro*. Por ello, los costes de producir lotes del HAV a escala industrial resultan muy elevados.

El fenotipo de lenta replicación del HAV puede explicarse por tres factores clave interrelacionados. Primero, el sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) es muy ineficiente dirigiendo la traducción [7][200]. Segundo, este virus es incapaz de inhibir la síntesis de proteínas celulares [284]. Tercero, presenta un uso de codones altamente deoptimizado [19]. Recientemente se ha empleado la biología sintética para recodificar genomas de virus de RNA. Se ha demostrado que la deoptimización a gran escala del uso de codones (y de pares de codones) en la región codificante de la cápside reduce de forma efectiva la tasa de traducción vírica, al perjudicar a los genomas víricos en su competición con los mRNA celulares en condiciones de limitada disponibilidad de aminoácidos y tRNA [259][285][286]. Se podría pensar que, de manera inversa, podría generarse un genoma del HAV con una alta tasa de traducción mediante una optimización general de su uso de codones. Sin embargo, los estudios realizados en el seno de nuestro grupo sugieren que aplicar esta estrategia resultaría contraproducente en el caso del HAV, ya que el correcto funcionamiento de la cápside de este virus depende de la regulación de la velocidad de la traducción, lo cual se logra por la presencia de ciertos codones raros.

De forma alternativa a la creación de virus artificiales, la obtención de virus con mayores tasas de traducción puede alcanzarse mediante la selección de variantes minoritarias presentes de forma natural en una cuasiespecie. El uso de la variación genética que ocurre naturalmente es el fundamento no solo de los sistemas tradicionales de mejora vegetal y animal, basados en el fenotipo, sino de estrategias más modernas como la selección genómica. En estas últimas técnicas, la selección de los individuos destinados a la reproducción se realiza en función de

Discusión general

los genes o regiones genómicas que afectan a las características de interés [287]. En este trabajo se han aplicado conceptos de la selección genómica a las cuasiespecies víricas, como parte de un proceso de “mejora vírica”. La selección genómica se basa en el uso de información genómica para predecir los valores de cría para características fenotípicas particulares. Sin embargo, mientras en organismos superiores la selección genómica se fundamenta en el estudio de largas regiones genómicas debido a la naturaleza poligénica de las características de interés, en el caso de las cuasiespecies víricas la secuenciación profunda de ciertas regiones genómicas también puede presentar importancia predictiva.

Con el objetivo de obtener una población del HAV de replicación rápida, utilizamos como material de partida dos poblaciones (F0.05LA y F0.2LA) que presentaban cambios en su uso de codones, obtenidas tras adaptar la cepa HM-175/43c a replicar en presencia de moderados y altos niveles de silenciamiento celular. La predicción de los valores de “cría” o mejora de productividad de estas poblaciones se realizó mediante secuenciación masiva ultra-profunda de dos fragmentos genómicos (parte de la región 5’NCR y la región codificante de la proteína VP1). La elección del fragmento de 5’ NCR (posiciones 332-762) se basó en que contiene la mayor parte del IRES, región responsable del reclutamiento de la maquinaria traduccional. Por otro lado, la región de VP1 situada entre las posiciones 2394-2852 fue escogida porque mostraba unos valores de RCDI (índice relativo de deoptimización de codones) de los más bajos de la cápside y que mostraron un descenso adicional en las poblaciones adaptadas a actinomicina D, en comparación con la población no adaptada. En la población F0.05LA se detectaron individuos minoritarios (0.72% del total de la población) con tres mutaciones en el IRES que le conferían una actividad significativamente superior. Por otro lado, en esta misma población un 26 % de los individuos mostraban cambios en algunos codones en la región de VP1 que se asociaron a una mayor actividad de traducción. En cuanto a la población F0.2LA, ésta no presentaba individuos predeciblemente de alta productividad en condiciones de moderado silenciamiento celular, pero presentaban una estrategia poblacional de tipo colonizador, mediada por un muy corto tiempo de desencapsidación en comparación con la población F0.05LA. En contraposición, esta última era

mayormente de estrategia competidora, aunque los individuos minoritarios de rápida replicación podrían considerarse de estrategia colonizadora.

Por consiguiente, se puede concluir que una minoría de individuos presentes en la población F0.05LA mostraba valores de predicción de alta productividad vírica. Para favorecer la amplificación de esta fracción minoritaria de individuos se siguió una doble estrategia. Por un lado, se realizó el cruce molecular de la población F0.05LA, que contiene las variantes de interés, con la población F0.2LA, con el objetivo de que los individuos de replicación rápida presentes en F0.05LA pudiesen ser rescatados por la población F0.2LA. Además, como la selección de los individuos minoritarios podría depender de las condiciones de multiplicidad de infección, se usó una MOI baja. Los primeros pases de las mezclas realizadas en condiciones de baja MOI mostraron que F0.2LA es una población colonizadora, tal y como habíamos predicho. Mediante esta doble estrategia se consiguió seleccionar un clon minoritario en F0.05LA que presentaba un IRES más activo (haplotipo $\phi 16$) y la región VP1 que se traduce más rápidamente (haplotipo $\lambda 7$). Estos experimentos de *molecular breeding* representarían una aplicación biotecnológica del concepto general de selección dependiente de densidad, en combinación con conceptos de dinámica de poblaciones [87][266][267][89].

Como resultado, se seleccionó una población con un fenotipo de rápido crecimiento y mayor productividad que las poblaciones de partida y, por tanto, de un gran valor añadido desde un punto de vista biotecnológico.

7 CONCLUSIONES

1. Las mutaciones U359C, U590C y U726C otorgan una mayor actividad al IRES del HAV en células FRhK-4.
2. El valor del RCDI de la región P1 del HAV es un predictor adecuado de la eficiencia de traducción.
3. La secuenciación masiva de las regiones 5' NCR (posiciones 332-762) y VP1 (posiciones 2394-2852) de las poblaciones F0.05LA y F0.2LA del HAV, adaptadas a moderados y altos niveles de silenciamiento celular respectivamente, ha permitido identificar distintas composiciones de haplotipos tanto a nivel cualitativo como cuantitativo.
4. La secuenciación masiva de fragmentos de las regiones 5'NCR (posiciones 332-762) y VP1 (posiciones 2394-2852) de poblaciones del HAV se ha usado como parte de un proceso selección genómica por marcadores para predecir la rapidez de replicación de los individuos de dichas poblaciones.
5. La secuenciación masiva en 5'NCR muestra que la proporción del haplotipo $\phi 16$ (que contiene las mutaciones U359C, U590C y U726C, y por ello un IRES más activo) es de 0.72 % y 0 % en F0.05LA y F0.2LA, respectivamente.
6. La secuenciación masiva en VP1 muestra que la proporción del haplotipo $\lambda 7$ (con un valor de RCDI de 1.67 y una mayor tasa de traducción) es de 26 % y 0 % en F0.05LA y F0.2LA, respectivamente.
7. El cruce molecular entre las poblaciones parentales F0.05LA y F0.2LA, que tienen características de población competidora y colonizadora respectivamente, ha permitido rescatar los individuos altamente minoritarios presentes en la población F0.05LA con genotipo $\phi 16$ - $\lambda 7$, dando lugar a la población HM-175-HP.
8. El fenotipo de la población HM-175-HP es de rápida replicación y mayor productividad que sus poblaciones parentales y por ello de alto interés biotecnológico.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Poblaciones víricas

En este estudio se hizo uso de algunas poblaciones víricas derivadas de la cepa citopatógena HM-175/43c del HAV (número de acceso GenBank: M59809, [168]) que habían sido producidas en el grupo de Virus Entèrics [189]. Mediante pasajes seriados a intervalos de 7 días en células FRhK-4, se hizo multiplicar el virus en ausencia de actinomicina D (AMD, Sigma) o en presencia de 0.05 µg/ml o 0.20 µg/ml de AMD. Se realizaron 155 pasajes en presencia de 0.05 µg/ml de AMD (serie F0.05). Tras 65 pasajes en 0.05 µg/ml de AMD se sometió a la población vírica a una concentración mayor de la droga (0.20 µg/ml) durante 90 pasajes (serie F0.2) [189] (ver **Figura 27**). A partir del pasaje 62 de la serie F0.2 se inició una nueva serie de pasajes haciendo replicar de nuevo el virus en presencia de 0.05 µg/ml durante 20 pasajes (serie R0.05) [189].

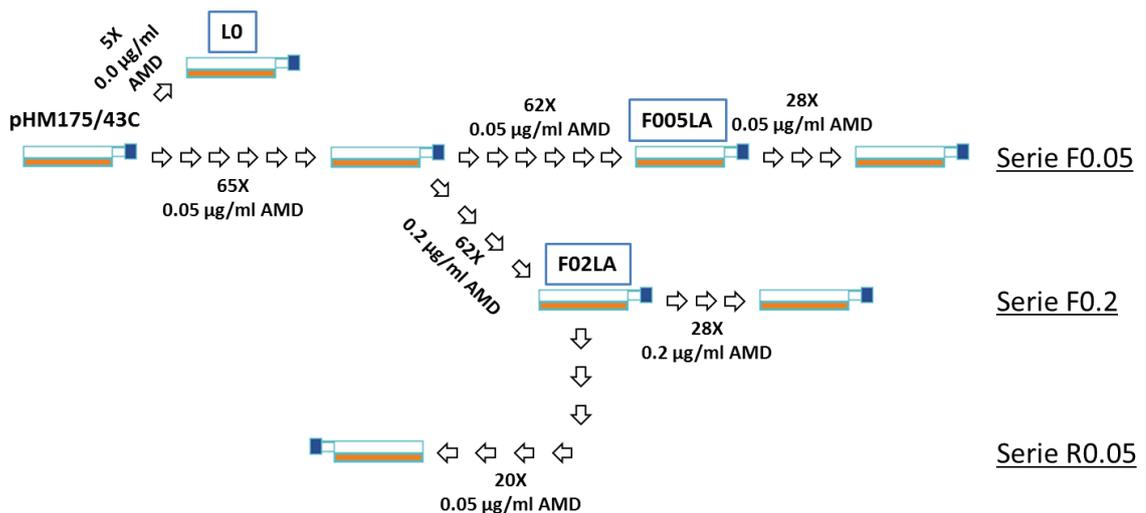


Figura 27 Esquema del flujo de trabajo realizado en el grupo de Virus Entèrics para la obtención de poblaciones del HAV adaptadas a diferentes niveles de silenciamiento celular. Imagen adaptada de [39].

De todas estas poblaciones, se utilizaron las siguientes en este estudio:

- *L0* o población parental: 5 pasajes en ausencia de AMD.
- *F0.05LA* o población largamente adaptada a 0.05 µg/ml de AMD: 127 pasajes en presencia de 0.05 µg/ml de AMD.

Materiales y métodos

- F0.2LA o población largamente adaptada a 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD: 65 pasajes en presencia de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD + 62 pasajes en presencia de 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD.

8.2 Líneas celulares

Las distintas poblaciones víricas utilizadas en este estudio fueron propagadas en la línea celular continua FRhK-4 (ATCC CRL 1688). Esta línea celular posee una morfología epitelial y deriva de células embrionarias de riñón de mono rhesus (*Macaca mulatta*). Estas células se cultivaban en un incubador de CO₂ a 37 °C en medio esencial mínimo (MEM) con sales de Earle suplementado con un 15% de suero fetal bovino inactivado (SFBi), aminoácidos, antibióticos y soluciones tamponadoras. Las células se subcultivaban cada 7-8 días según protocolos clásicos de cultivo celular y se sembraban con una relación de multiplicación 1:3, obteniendo una monocapa confluyente después de 2-3 días de incubación.

Para la transfección de transcritos del virus de la hepatitis A se utilizaron células FRhK-4 y AGMK GL37. El clon continuo GL37 [258] de las células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) AGMK (llamadas AGMK GL37 en este trabajo) fue gentilmente cedido por G. Kaplan, del Center for Biologics Evaluation and Research (Maryland, Estados Unidos). Se cultivó en un incubador de CO₂ a 37 °C en MEM con sales de Earle suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB), aminoácidos, antibióticos y soluciones tamponadoras. La frecuencia de subcultivo era la misma que con las células FRhK-4 (cada 7-8 días), pero se sembraban con una relación de multiplicación 1:5 o 1:6, obteniendo una monocapa confluyente después de 2-3 días de incubación.

- Soluciones necesarias:

MEM 15% SFBi:

MEM 1X con sales de Earle autoclavado 15 min suplementado en condiciones de esterilidad con:

NaHCO ₃	2% (v/v)
HEPES	15 mM
L-Glutamina	2 mM

NEAA	1X
SFBi	15% (v/v)
Penicilina – Estreptomicina ...	100 UI/ml – 100 µg/ml

MEM 10% SFB:

MEM 1X con sales de Earle autoclavado 15 min suplementado en condiciones de esterilidad con:

NaHCO ₃	2% (v/v)
HEPES	15 mM
L-Glutamina	2 mM
NEAA	1X
SFB	10% (v/v)
Penicilina – Estreptomicina ...	100 UI/ml – 100 µg/ml

Tampón PBS:

NaCl	8 g/l
KCl	0.2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1.15 g/l
KH ₂ PO ₄	0.2 g/l

Ajustar el pH a 7.1-7.2 si fuera necesario.
Esterilizar por autoclave 15 min.
Conservar a 4 °C.

Tripsina-EDTA:

Tripsina	2.5 g/l
EDTA	0.2 g/l
Penicilina – Estreptomicina ...	100 UI/ml – 100 µg/ml

En tampón PBS.
Esterilización por filtración.
Conservar a -20 °C.

8.3 Secuenciación masiva ultra-profunda de los fragmentos de 5’NCR y VP1

El RNA de las poblaciones estudiadas fue extraído utilizando el kit *NucleoSpin® RNA Virus* (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se llevó a cabo la transcripción reversa de los fragmentos de las regiones 5’NCR y VP1, mediante los cebadores 5ncr_masiva- y VP1_masiva-, respectivamente (**Tabla 13**). A partir del cDNA obtenido se realizó una ronda de PCR básica utilizando los cebadores 5ncr_masiva+ y 5ncr_masiva-

Materiales y métodos

(**Tabla 13**) para el fragmento de 5'NCR, (que incluyen las posiciones 332 a 762) y los cebadores VP1_masiva (+) y VP1_masiva (-) (**Tabla 13**) para el fragmento de VP1 (que abarca las posiciones 2394-2852 del genoma del HAV¹). Los cuatro cebadores contienen colas en sus extremos 5' (los cebadores universales M13: M13f y M13r) (**Tabla 13**). Estas colas se utilizan en una ronda posterior de PCR, en la que se añaden los identificadores de secuencias. Después de realizadas las PCR básicas se llevó a cabo la purificación de la banda de cada uno de los productos, utilizando el kit *High Pure PCR Product Purification* (Roche), conforme a las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó una precipitación con etanol con el fin de obtener una concentración final de al menos 20 ng/μl. Finalmente, los amplicones se enviaron al laboratorio del Dr. Josep Quer, en el Vall d'Hebron Research Institute (Barcelona), donde se llevó a cabo la adición de los identificadores y la secuenciación masiva de las muestras (**Figura 28**). En los siguientes subapartados se detallan estos pasos.

Tabla 13 Cebadores utilizados en la secuenciación masiva ultra—profunda de los fragmentos de 5'NCR y VP1. En las secuencias se han resaltado en negrita los cebadores universales M13.

Nombre	Secuencia	Posición
5ncr_masiva+	5' GTTGTAAAACGACGGCCAGT TTTGGAACGTCACCTTGCAGTG 3'	332-352
5ncr_masiva-	5' CACAGGAAACAGCTATGACCGAAAATACCTTGTCTAGAC 3'	762-743
VP1_masiva (+)	5' GTTGTAAAACGACGGCCAGT AAAGTRCCTGAGACATTTCTG 3'	2394-2415
VP1_masiva (-)	5' CACAGGAAACAGCTATGACCCAGTGCTCCAGACACAGC 3'	2852-2835

¹ En este trabajo, las posiciones nucleotídicas se nombran con respecto a la cepa de referencia HM-175 wt, cuyo código de acceso GenBank es el M14707.

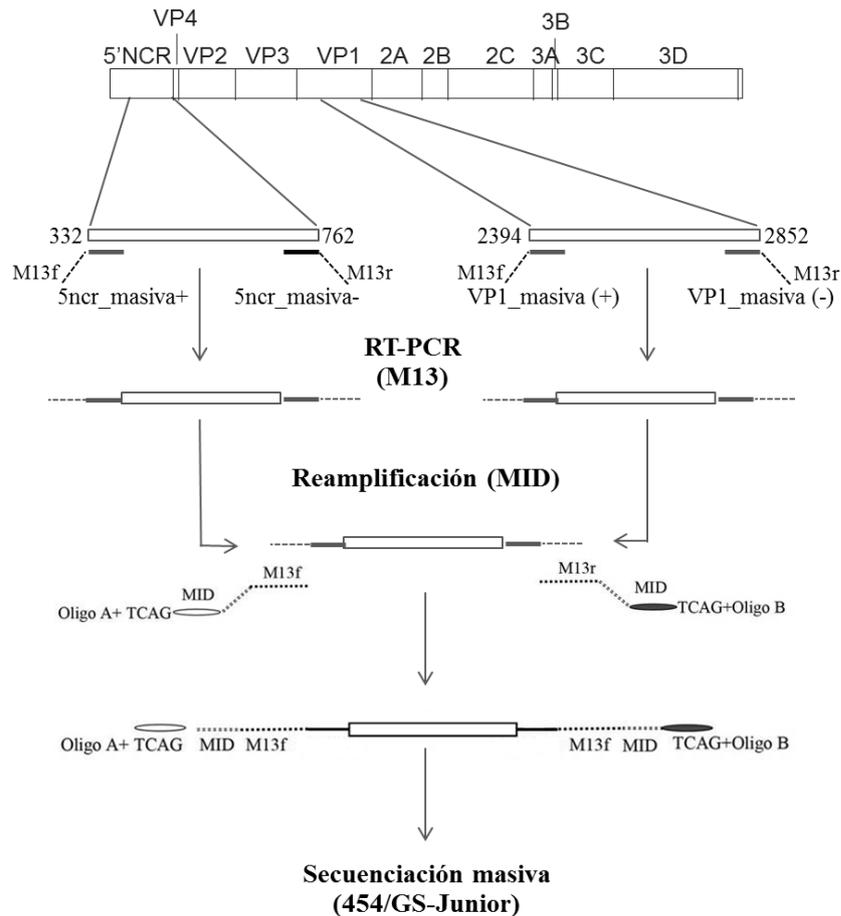


Figura 28 Esquema del protocolo de amplificación de los fragmentos de 5'NCR y VP1 que se siguió de forma previa a la realización de la secuenciación masiva. Adaptado de [288].

8.3.1 RT-PCR

El RNA vírico se retrotranscribía *in vitro* utilizando el enzima Expand Reverse Transcriptase (Roche), una versión genéticamente manipulada de la transcriptasa reversa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney (M-MuLV-RT). El cDNA se amplificaba utilizando la *Pwo* DNA polimerasa (Roche) que, debido a su actividad correctora de errores, tiene una tasa de error extremadamente baja [289].

1. Añadir a un tubo 10 µl de los ácidos nucleicos extraídos y 0.5 µl del cebador correspondiente (25 µM).
2. Desnaturalizar el RNA y el cebador durante 10 min a 65 °C. Colocar en hielo inmediatamente.
3. Añadir los siguientes reactivos al tubo procedente del paso anterior:

Materiales y métodos

Reactivo	Volumen	Concentración final
Tampón <i>Expand Reverse Transcriptase</i> 5x (Roche)	5 µl	1x
DTT (100 mM)	2.5 µl	10 mM
Desoxinucleótidos trifosfato (2 mM de cada uno)	2.5 µl	0.2 mM
Transcriptasa reversa <i>Expand</i> (Roche) (50 U/µl)	0.16 µl	8 U
Agua desionizada libre de DNasa y RNasa	4.34 µl	-

4. Incubar la reacción durante una hora a 45 °C. Parar la reacción colocando el tubo en hielo.
5. Preparar en un tubo la mezcla de reacción de PCR:

Reactivo	Volumen	Concentración final
Tampón de PCR (con MgSO ₄) 10x (Roche)	5 µl	1x
Desoxinucleótidos trifosfato (2 mM de cada uno)	5 µl	0.2 mM
MgSO ₄ (25 mM)	1 µl	mM
Cebador directo (0.1 mM)	0.5 µl	1 µM
Cebador reverso (0.1 mM)	0.5 µl	1 µM
DNA polimerasa Pwo (Roche) (5 U/µl)	0.1 µl	0.5 U
Agua desionizada libre de DNasa y RNasa	32.9 µl	-

6. Añadir 5 µl del producto de la retrotranscripción (RT) (procedente del paso 4).
7. Realizar el programa específico de PCR

Para el producto de RT obtenido a partir del cebador 5ncr_masiva-:

Paso	Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95 °C	10 min
2	41	95 °C	1 min 30 s
		53 °C	1 min
		72 °C	1 min
3	1	72 °C	10 min

Para el producto de RT obtenido a partir del cebador VP1_masiva-:

Paso	Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95 °C	5 min
2	41	95 °C	1 min
		54 °C	1 min
		72 °C	1 min
3	1	72 °C	10 min

Mantener los productos de PCR a 4 °C.

8. Analizar 10 µl del producto amplificado por electroforesis en un gel de agarosa al 2% en tampón TBE. Teñir el gel con bromuro de etidio y visualizar los amplímeros mediante un sistema de documentación de geles (GelDoc™ XR+, Bio-Rad).

- Solución necesaria:

Tampón TBE 10X:

Tris-HCl 108 g/l
 Ácido bórico 55 g/l
 EDTA 0.05M

En agua Milli-Q.

En pH 8.0.

Esterilizar por autoclave durante 15 minutos.

Conservar a temperatura ambiente.

8.3.2 Precipitación del DNA con etanol

1. Añadir 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5) a la suspensión de DNA.
2. Mezclar bien.
3. Añadir 2.5 volúmenes (calculados después de la adición de la sal) de etanol absoluto frío.
4. Mezclar bien y centrifugar brevemente.
5. Incubar a -20 °C toda la noche.
6. Centrifugar a 4 °C durante 15 min a velocidad máxima.

Materiales y métodos

7. Aspirar el sobrenadante cuidadosamente y descartarlo.
8. Lavar el pellet añadiendo 1 ml de etanol 70%.
9. Centrifugar durante 2 min a velocidad máxima.
10. Aspirar el sobrenadante cuidadosamente y descartarlo.
11. Dejar secar el pellet.
12. Resuspender el pellet en 20 μ l de agua libre de nucleasas.

8.3.3 Adición de los identificadores para la construcción de la librería

Los productos de PCR purificados fueron sometidos a 15 ciclos de reamplificación usando unos cebadores compuestos por una secuencia complementaria a los cebadores universales M13 seguidos de un identificador MID (*Multiplex Identifier*), distinto para cada muestra, y un oligonucleótido A o B en el extremo del cebador directo o reverso, respectivamente. Los productos de la reamplificación fueron purificados en gel de agarosa utilizando el kit *QIAquick® Gel Extraction* (Qiagen), cuantificados usando el ensayo PicoGreen (Invitrogen™) y analizados cualitativamente mediante el BioAnalyzer DNA 1000 LabChip (Agilent Technologies).

Una alícuota de cada uno de estos productos fue sometida a secuenciación masiva. La secuenciación masiva se llevó a cabo utilizando la plataforma 454/GS-Junior (Roche), que permite la secuenciación de fragmentos de un tamaño de entre 400 y 500 nucleótidos. El archivo fasta procedente del GS-Junior se demultiplexó para obtener un archivo fasta para cada muestra y cadena. Se descartaron las secuencias no identificadas por el MID y/o el cebador. Las secuencias que no cubrieron el amplicón completo, que mostraron más de dos Ns y/o 3 *gaps* o que no se observaron en la cadena directa y en la reversa, fueron descartadas. Se eliminaron los MID y los cebadores. Las secuencias de cadena negativa se transformaron en su reversa-complementaria y se unieron a las secuencias de cadena directa de la misma muestra. Se identificaron secuencias únicas (haplotipos) y se computaron sus frecuencias como el número de lecturas observadas. Finalmente, se eliminaron aquellos haplotipos que se encontraron en un nivel menor al 0.5 %, para limitar la presencia de haplotipos con errores procedentes de las PCR o la secuenciación [288][290].

8.4 Predicción de la estructura secundaria del RNA

Se utilizó el programa mfold, que se basa en un algoritmo de programación dinámica que aplica un modelo termodinámico basado en la existencia de apareamientos de bases Watson-Crick y GU, de varios tipos de bucle, de nucleótidos desapareados y de bases mal apareadas [234]. El servidor web mfold es libre, y se puede acceder a él a través del portal:

<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>

Para llegar a la aplicación que permite predecir la estructura secundaria de una secuencia de RNA hay que seguir el hipervínculo “RNA Folding Form” desde la página de entrada.

Como constricciones del plegamiento se utilizaron los datos de sustituciones nucleotídicas covariantes y análisis enzimáticos de clivaje de regiones de cadena doble o sencilla del IRES publicados en [199]. El resto de parámetros de plegamiento no se modificaron.

8.5 Estudio del grado de conservación de los nucleótidos implicados en la posible formación de estructuras secundarias en el IRES

Se recuperaron 81 secuencias de la base de datos Entrez Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), que incluían al menos desde la posición 324 a la 762 del HAV, región que contiene los dominios IV a VI del IRES. Los números de acceso de GenBank de estas secuencias son los siguientes: AB258387, M14707, AY644670, AJ299464, AB020564, AB020565, AB020566, AY644676, AF512536, AB020567, AB020568, AB020569, GU390553, GU390554, GU390555, GU390556, GU390557, GU390558, GU390559, GU390560, GU390561, GU390562, GU390563, GU390564, FJ829473, FJ829474, FJ829475, FJ829476, FJ829477, FJ829478, FJ829479, FJ829480, FJ829481, FJ829482, FJ829483, FJ829484, X75214, X75215, X75216, DQ991030, AB793725, AB793726, AB623053, AF268396, AB279735, AB279734, AB279733, AB279732, JQ425480, EU131373, EU526088, EU526089, HM769724, M59808, M59809, M59810, FJ360730, FJ360731, FJ360732, FJ360733, FJ360734, FJ360735, DQ646426, AB425339,

Materiales y métodos

AB300205, K02990, AF314208, EF207320, AF357222, AF485328, HQ437707, EU251188, M20273, KC182587, KC182589, DQ991029, X83302, AB618529, AB618531, M16632, AY644337.

Las secuencias se alinearon mediante el programa de alineamiento múltiple de secuencias Clustal Omega, utilizando los parámetros por defecto [291]. A partir del alineamiento, se inspeccionaron manualmente las posiciones 326-329, 629-632, 705-708 y 717-720. Estas posiciones participan en la formación de un *multiloop* de tres ramas en la estructura secundaria alternativa predicha en el primer capítulo del presente trabajo.

8.6 Análisis de la actividad del IRES mediante el uso de vectores bicistrónicos

Para comparar la capacidad para promover el inicio de la traducción dependiente de IRES que poseen distintos haplotipos de la región 5'NCR encontrados mediante secuenciación masiva, se hizo uso del vector bicistrónico G1RC (ver **Figura 29**), que fue amablemente cedido a nuestro laboratorio por la Dra. Anne Marie Roque-Afonso (Laboratoire de Virologie, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, Francia). Este vector bicistrónico posee un sistema dual de luciferasas: contiene un gen que codifica para la luciferasa de *Photinus pyralis* (FLuc, de *Firefly luciferase*), que actúa como gen reportero, y otro gen que codifica para la luciferasa de *Renilla reniformis* (RLuc, de *Renilla luciferase*), que sirve de control interno. El IRES del HAV de la cepa adaptada a cultivo HM-175/18f se encuentra entre ambos genes. Mientras que la transcripción es dirigida por el promotor de citomegalovirus, la traducción de FLuc depende del IRES del HAV y la de RLuc es dependiente de *cap* (ver **Figura 29**). El plásmido también contiene un gen de resistencia a ampicilina [292].

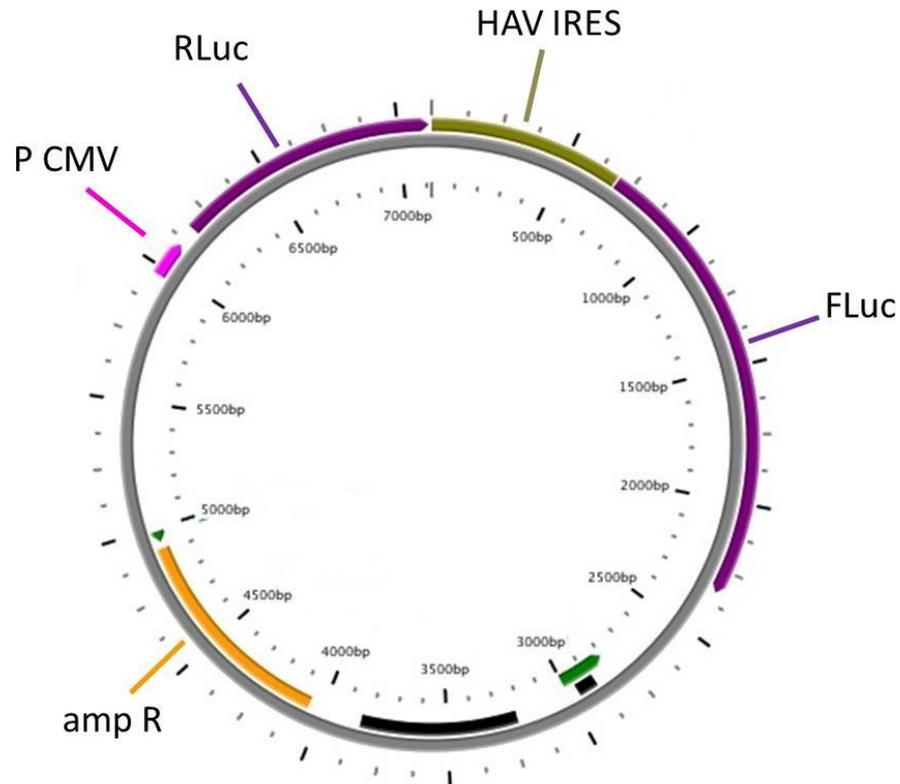


Figura 29 Esquema del vector bicistrónico G1RC. FLuc es el gen que codifica para la luciferasa de *Photinus pyralis*, y actúa como reportero; RLuc es el gen que codifica para la luciferasa de *Renilla reniformis*, y actúa como control de la eficiencia de la transfección; HAV IRES es el IRES del VHA de la cepa adaptada a cultivo HM-175/18f; promotor CMV es el promotor de citomegalovirus; ampR es un gen de resistencia a ampicilina.

La secuencia correspondiente al IRES del HAV en el plásmido G1RC se modificó mediante mutagénesis dirigida para crear una serie de plásmidos que contuvieran un IRES igual al de algunos de los haplotipos encontrados mediante secuenciación masiva. Las mutaciones se fueron introduciendo de forma secuencial. El plásmido G1RL0 (cuya secuencia corresponde al haplotipo más frecuentemente encontrado en la población L0, tal y como se describe en el capítulo 1 del presente trabajo) se obtuvo a partir de G1RC, introduciendo las mutaciones C140T, A149G (estas dos mutaciones se introdujeron a la vez), A394G, C473T y C647A. Añadiendo la mutación A513G a G1RL0 se creó G1R ϕ 4. Mutagenizando G1RL0 con unos cebadores que añadían las mutaciones T590C y T726C, se crearon los plásmidos G1R ϕ 5 y G1R ϕ 7 respectivamente. A partir de G1R ϕ 5 se obtuvo G1R ϕ 10 añadiendo la mutación T726C, mientras que G1R ϕ 16 fue generado tras mutagenizar G1R ϕ 10 con un cebador que añadía la mutación T359C.

Materiales y métodos

Una vez obtenidos los distintos plásmidos bicistrónicos, se transformó *E. coli* con ellos con el fin de almacenarlos y obtener grandes cantidades de los mismos a altas concentraciones. A partir de una solución concentrada de cada plásmido se transfectaron células FRhK-4 y a las 24 horas se midió la actividad bioluminiscente producida por cada una de las dos luciferasas mediante el kit *Dual-Glo® Luciferase Assay System* (Promega) y un luminómetro Lumat LB 9507 (Berthold Technologies). El cociente FLuc/RLuc permite normalizar la actividad del IRES con respecto a la eficiencia de transfección. Cada valor FLuc/RLuc se dividió por el promedio de los valores de FLuc/RLuc del plásmido G1RL0 y se expresó como unidades arbitrarias (UA) [292]. Este análisis se realizó para cada plásmido al menos 2 veces de forma independiente con 3 réplicas en cada caso. A continuación se describirán los protocolos de cada uno de los pasos que se han enumerado en este apartado.

8.6.1 Obtención de los plásmidos bicistrónicos mutagenizados

Las mutaciones para modificar el IRES en el plásmido G1RC y sus derivados fueron generadas, en los casos de las inserciones simples, siguiendo el protocolo recomendado en las instrucciones del kit de mutagénesis sitio-dirigida *QuikChange® Site-Directed mutagenesis* (Agilent Technologies) y, en el caso de la doble inserción C140T y A149G, siguiendo el protocolo publicado por Liu y Naismith [293].

El método que se usó siguiendo las instrucciones del kit *QuikChange® Site-Directed mutagenesis* se basa en el uso de dos cebadores complementarios que poseen la mutación deseada. Después de desnaturalizar el plásmido que se desea mutar, los cebadores mutagénicos hibridan en regiones complementarias de las cadenas opuestas del plásmido. La elongación mediante la polimerasa de DNA *PfuUltra II Fusion HS* (Agilent Technologies) resulta en un plásmido mutado con una mella en cada cadena. Después de varios ciclos de PCR, el producto resultante es tratado con la endonucleasa *DpnI*. Esta enzima es utilizada para digerir DNA parental metilado y hemimetilado, dejando intacto el nuevo DNA, que contendrá la mutación deseada. Después del tratamiento con *DpnI*, los plásmidos son transformados en *E. coli* DH5 α competentes. En el interior de dichas células la

maquinaria de reparación del DNA sella las mellas. Las colonias transformantes se seleccionaron haciéndolas crecer en un medio sólido que contiene ampicilina. La extracción plasmídica de estas colonias, después de cultivarlas en medio líquido, permitió obtener preparaciones del plásmido purificado. Mediante secuenciación de Sanger se comprobó que durante los procesos de mutagénesis se introdujo correctamente cada mutación y no se produjeron otras mutaciones espontáneas.

El método descrito por Liu y Naismith es una modificación del protocolo de *QuikChange*[®] *Site-Directed mutagenesis* que usa una estrategia diferente de diseño de cebadores, la cual promueve la hibridación entre el cebador y el molde frente a la formación de dímeros de cebador. Utilizamos este protocolo porque permite introducir mutaciones múltiples en un solo experimento, una opción incompatible con el método *QuikChange*[®] estándar. En el método de Liu y Naismith los cebadores contienen secuencias no solapantes en el extremo 3' y secuencias solapantes cebador-cebador en el extremo 5'. Los cebadores son diseñados de forma que la temperatura de fusión de las secuencias no solapantes ($T_{m\ no}$) es entre 5 y 10 °C mayor que la temperatura de fusión de la región complementaria cebador-cebador ($T_{m\ pp}$). Aparte del diseño de los cebadores y el programa de PCR, el resto de pasos es el mismo en ambos métodos (ver **Figura 30**).

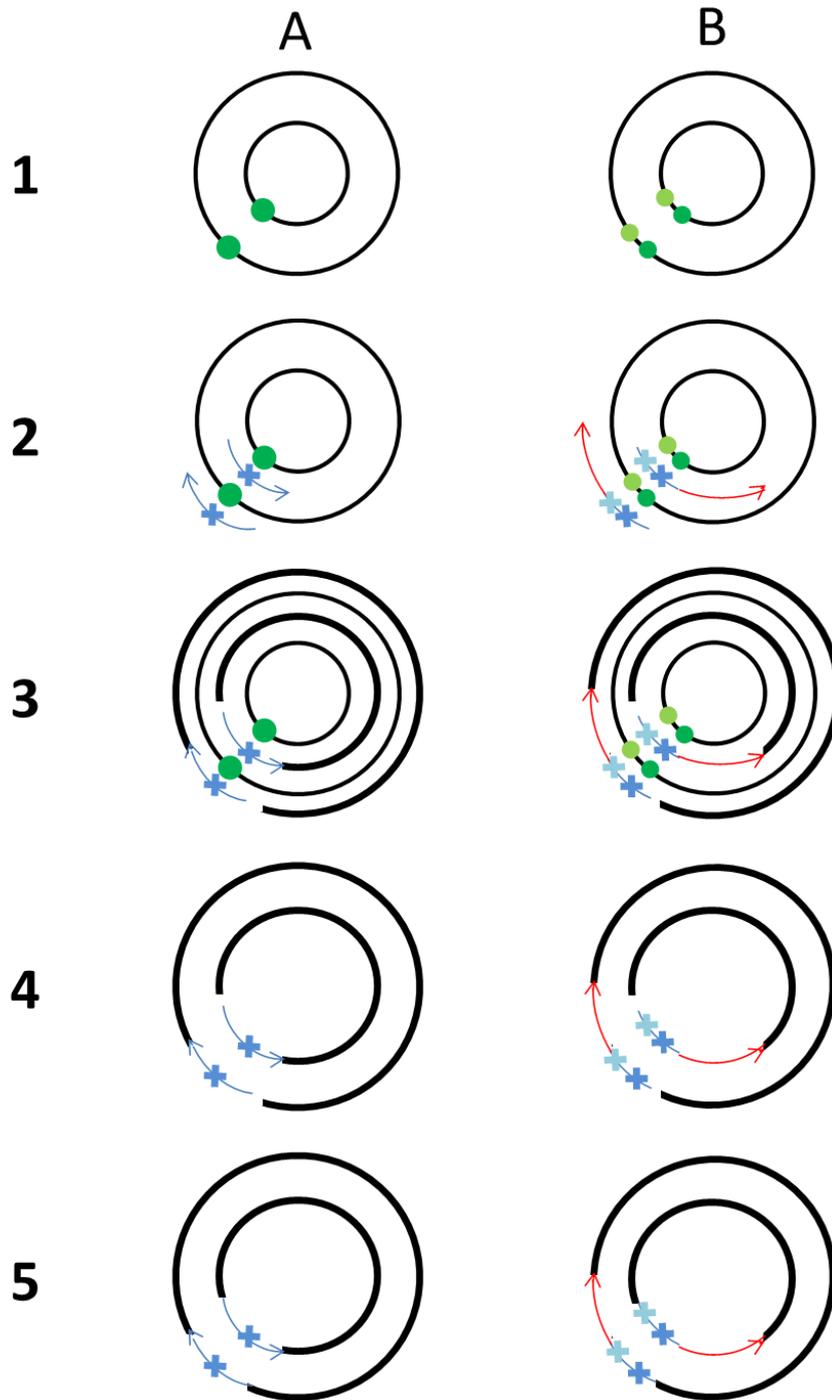


Figura 30 Esquema de las estrategias llevadas a cabo para introducir mutaciones en los plásmidos G1RC y pHAV/7. **A:** procedimiento recomendado en el kit *Quikchange® Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies). **B:** método publicado por Liu & Naismith [293]. **1:** Preparación del plásmido con la diana que se pretende mutar (●). **2:** Desnaturalización del plásmido e hibridación con los cebadores que contienen la mutación o mutaciones (+). **3:** Extensión e incorporación de los cebadores mutagénicos dando lugar a cadenas circulares discontinuas. **4:** Digestión con el enzima *DpnI* del DNA parental metilado no mutado. **5:** Transformación de células bacterianas. En su interior se sellan las discontinuidades en el plásmido mutado.

8.6.1.1 PCR para la mutagénesis de los plásmidos bicistrónicos

Los nombres y las secuencias de los cebadores mutagénicos utilizados se encuentran recogidos en la **Tabla 14**. Las condiciones de las reacciones de extensión de los cebadores mutagénicos fueron las siguientes:

Mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen	Concentración final
DNA molde (20-40 ng/ μ l)	1 μ l	0.4-0.8 ng/ μ l
Cebador directo (0.1 mM)	1 μ l	2 μ M
Cebador reverso (0.1 mM)	1 μ l	2 μ M
Tampón <i>PfuUltra</i> II Rxn 10x (Agilent Technologies)	5 μ l	1x
MgSO ₄ (25 mM)	2 μ l	3 mM ²
Desoxinucleótidos trifosfato (25 mM de cada uno)	1 μ l	0.5 mM de cada
DNA polimerasa <i>PfuUltra</i> II Fusion HS (Agilent Technologies)	1 μ l	-
Agua desionizada libre de DNAsa y RNAsa	38 μ l	-

Programa utilizado con los cebadores diseñados en base a las instrucciones del kit *QuikChange® Site-Directed mutagenesis*:

Paso	Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95 °C	2 min
2	35	95 °C	30 s
		57 °C	2 min
		72 °C	2 min
3	1	72 °C	7 min

² Teniendo en cuenta que el tampón 10x proporciona una concentración final de MgSO₄ de 2 mM.

Materiales y métodos

Programa utilizado con los cebadores que se diseñaron siguiendo las indicaciones de Liu y Naismith:

Paso	Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95 °C	5 min
2	12	95 °C	1 min
		T _{m no} - 5 °C	1 min
		72 °C	15 min
3	1	T _{m pp} - 5°C	1 min
		72 °C	30 min

T_{m no}: temperatura de fusión de las secuencias no solapantes. T_{m pp}: temperatura de fusión de la región complementaria cebador-cebador.

Tabla 14 Cebadores utilizados para la mutagénesis dirigida de G1RC y de los plásmidos derivados del mismo. En las secuencias se resaltan en negrita las mutaciones que se introdujeron. Los nombres de los cebadores indican su sentido (directo [+] o reverso [-]) y las mutaciones que contienen.

Nombre	Secuencia	Posición
C140T&A149G+	5' CCCTTTGTTTTGTTTGTAAATGTTGATTTGTAAATATTGATTCCTGCAGG TTC 3'	128-166
C140T&A149G-	5' ATCAACATTTACAAACAAAACAAAGGGAATAGGAAAGGGAAAAGGGAAA GG 3'	154-104
A394G+	5' CTTTGATCTTCCACAAGGGGTAGGCTACGGGTGAAAC3'	375-411
A394G-	5' GTTTCACCCGTAGCCTACCCCTGTGGAAGATCAAAG 3'	411-375
C473T+	5' GGGTAACAGCGCGGATATTGGTGAGTTGTTAAGACAAAAACC 3'	451-493
C473T-	5' GGTTTTTGTCTTAACAACACTACCAATATCCGCCGCTGTTACCC 3'	493-451
C647A+	5' GGGGATCCCTCCATTGACAGCTGGACTGTTC 3'	631-661
C647A-	5' GAACAGTCCAGCTGTCAATGGAGGGATCCCC 3'	661-631
A513G+	5' CGGAGGACTGGCTCTCATCCAGTGGATGCATTG 3'	503-535
A513G-	5' CAATGCATCCACTGGATGAGAGCCAGTCCCTCCG 3'	535-503
T590C_+	5' CCTCTCTGTGCTCGGGGCAAACATCATTG 3'	578-608
T590C_-	5' CCAAATGATGTTTGCCCCGAGCACAGAGAGG 3'	608-578
T726C_+	5' GGTTTTTCCTCATTCTCAAATAATAATGACCATGGCTGAAGACGC 3'	710-11*
T726C_-	5' GCGTCTTCAGCCATGGTCATTATTATTTGAGAATGAGGAAAAACC 3'	11*-710
T359C_+	5' CACCTTGCAGTGTAACTCGGCTTTCATGAATCTCTTTG 3'	341-379
T359C_-	5' CAAAGAGATTCATGAAAGCCGAGTTAACTGCAAGGTG 3'	379-341

8.6.1.2 Digestión con DpnI de los productos amplificados

1. Añadir 1 µl de la enzima de restricción *DpnI* (10 U/µl) (Thermo Scientific) directamente al DNA amplificado.
2. Mezclar suavemente y centrifugar durante unos segundos.
3. Incubar durante 1 hora a 37 °C para digerir el DNA parental (el no mutado).

8.6.1.3 Transformación de *E. coli* DH5α competentes

Realizar los siguientes pasos en condiciones de esterilidad:

1. Descongelar las células competentes en hielo (*Library Efficiency*[®] *DH5α*[™] *Competent Cells*, Invitrogen[™]). Colocar en hielo un tubo de polipropileno.
2. Mezclar suavemente las células y alicuotar 50 µl de las mismas en el tubo de polipropileno frío.
3. Añadir 1 µl de DNA procedente de la digestión con *DpnI* a las células, mezclando con movimientos suaves de la pipeta mientras se dispensa.
4. Incubar en hielo durante 30 minutos.
5. Introducir el tubo en un baño de agua a 42 °C durante 45 segundos.
6. Colocar el tubo en hielo durante 2 minutos.
7. Añadir 450 µl de medio S.O.C a temperatura ambiente.
8. Agitar durante 1 hora a 225 rpm y 37 °C.
9. Sembrar 100 µl de células transformadas en placas de Petri con medio LB agar y 100 µg/ml de Ampicilina.
10. Incubar las placas sembradas durante toda la noche a 37 °C

- Soluciones necesarias:

Medio LB-Agar con ampicilina:

Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l
Agar	15 g/l

En agua Milli-Q.

8.6.1.4 Preparación de plásmidos a pequeña escala

1. Poner a crecer colonias individuales obtenidas como resultado de la transformación en tubos de 10 ml, con 2 ml de medio LB líquido con 100 µg/ml de Ampicilina, a 37 °C *overnight*.
2. Realizar la extracción plasmídica (*miniprep*) utilizando el kit comercial *NucleoSpin® Plasmid* (Macherey-Nagel).
 - Soluciones necesarias:

Medio LB con ampicilina:

Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l

En agua Milli-Q.

Mezclar hasta que se disuelva completamente el contenido.

Esterilizar por autoclave durante 15 minutos.

Permitir que se enfríe hasta unos 55 °C .

Añadir ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml.

8.6.1.5 Secuenciación de Sanger

Se utilizó el kit *BigDye® Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). El protocolo se describe a continuación:

1. Preparar en un tubo la mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen
<i>BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix</i> (Applied Biosystems)	1 µl
Cebador específico (5 µM)	0.64 µl
Tampón de dilución 5x (Applied Biosystems)	2 µl
DNA molde	1-50 ng
Agua desionizada libre de DNasa y Rnasa	hasta 10 µl

2. Realizar el programa de secuenciación, que se inicia con un paso de desnaturalización durante 2 min a 96 °C y se continúa con 25 ciclos de

amplificación. Cada ciclo de amplificación consiste en 10 s a 96 °C, 5 s a 50 °C y 4 min a 60 °C. Guardar el producto a 4 °C

3. Añadir 10 µl de agua desionizada libre de DNasa y RNasa al producto resultante.

La purificación de los productos de extensión y la electroforesis en un secuenciador automático se realizaban en los Centros Científicos y Tecnológicos de la UB (CCiTUB). La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador automático de ADN, *ABI Prism 377*. Los cromatogramas generados por el secuenciador, contenidos en archivos "ab.1", se analizaron mediante el programa Chromas, disponible en: http://technelysium.com.au/?page_id=13

8.6.2 Preparación de plásmidos a altas concentraciones

Una vez comprobada la secuencia de los plásmidos producidos mediante mutagénesis, se procedió a obtener soluciones altamente concentradas de los mismos, para llevar a cabo las transfecciones a partir de ellas.

1. A partir del plásmido procedente de la miniprep, obtener colonias portadoras del plásmido de interés siguiendo el protocolo descrito en el apartado **8.6.1.3**.
2. Transferir una colonia procedente del paso anterior a 100 ml de medio LB con ampicilina contenidos en un matraz de 1000 ml. Mantener en agitación a 37 °C *overnight*.
3. Centrifugar el cultivo bacteriano a 4000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante.
4. Realizar la extracción plasmídica mediante el kit *PowerPrep™ HP Plasmid Midiprep System* (Origene), según las instrucciones del fabricante.
5. Guardar la *midiprep* a -20 °C.

8.6.3 Transfección transitoria de células FRhK-4 con plásmidos bicistrónicos

Las células FRhK-4 se transfectaron usando *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent* (Roche Applied Science) siguiendo el siguiente protocolo:

Materiales y métodos

1. 24 horas antes de la transfección, subcultivar células FRhK-4 y sembrarlas en placas de 96 pocillos con una relación de multiplicación 1:3.
2. Cuantificar el plásmido a transfectar mediante espectrofotometría.
3. Llevar a temperatura ambiente el vector a transfectar, el medio reducido en suero *Opti-MEM® I* (Thermo Fisher Scientific) y el reactivo de transfección *X-treme GENE™ HP DNA Transfection Reagent* (Roche).
4. Diluir el DNA plasmídico en medio *Opti-MEM® I* hasta una concentración final de DNA de 0.01 µg/µl.
5. Por cada pocillo que se quiera transfectar, añadir 1 µl de *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent* (Roche Applied Science) (reactivo de transfección) a 25 µl de la mezcla anterior. Mezclar suavemente e incubar durante 30 min a 25 °C.
6. Eliminar el medio de cultivo de la placa de 96 pocillos. Lavar 3 veces con PBS.
7. Añadir gota a gota el complejo DNA plasmídico - *Opti-MEM® I* - reactivo de transfección a cada pocillo de la placa que se quiera transfectar (26 µl/pocillo). Distribuir uniformemente el complejo por la superficie del pocillo.
8. Incubar durante 30 min a temperatura ambiente.
9. Añadir 60 µl de *Opti-MEM® I* a cada pocillo transfectado.
10. Colocar las placas con las células transfectadas en un incubador de CO₂ a 37 °C durante 24 horas.

Incluir controles negativos: células no transfectadas, células transfectadas sólomente con DNA (sin reactivo de transfección) y células transfectadas sólomente con reactivo de transfección (sin DNA).

8.6.4 Medición de la actividad bioluminiscente

La actividad bioluminiscente de las luciferasas Rluc y Fluc de los cultivos celulares transfectados con los plásmidos bicistrónicos se midió usando el kit *Dual-Glo® Luciferase Assay System* (Promega) y un luminómetro Lumat LB 9507 (Berthold Technologies), según el protocolo que se detalla a continuación:

1. Llevar los reactivos del kit a temperatura ambiente.

2. Añadir 85 µl del reactivo *Dual-Glo® Luciferase* (el sustrato específico de la luciferasa FLuc) a cada pocillo de la placa de 96 pocillos con células transfectadas, mezclar y transferir 160 µl a un tubo transparente que tenga las siguientes dimensiones: entre 11.5 y 12.1 mm de diámetro y de 75 a 76 mm de longitud.
3. Esperar 10 min y medir la emisión de luz en el luminómetro seleccionando un tiempo de medida de 10 s.
4. Preparar el reactivo *Dual-Glo® Stop & Glo* (que contiene el sustrato específico de la luciferasa RLuc y disminuye la luminiscencia de FLuc al menos 10000 veces), añadir 80 µl del mismo a cada pocillo y mezclar.
5. Esperar 10 min y medir la emisión de luz en el luminómetro seleccionando un tiempo de medida de 10 s.
6. Calcular la relación FLuc/RLuc para cada valor.

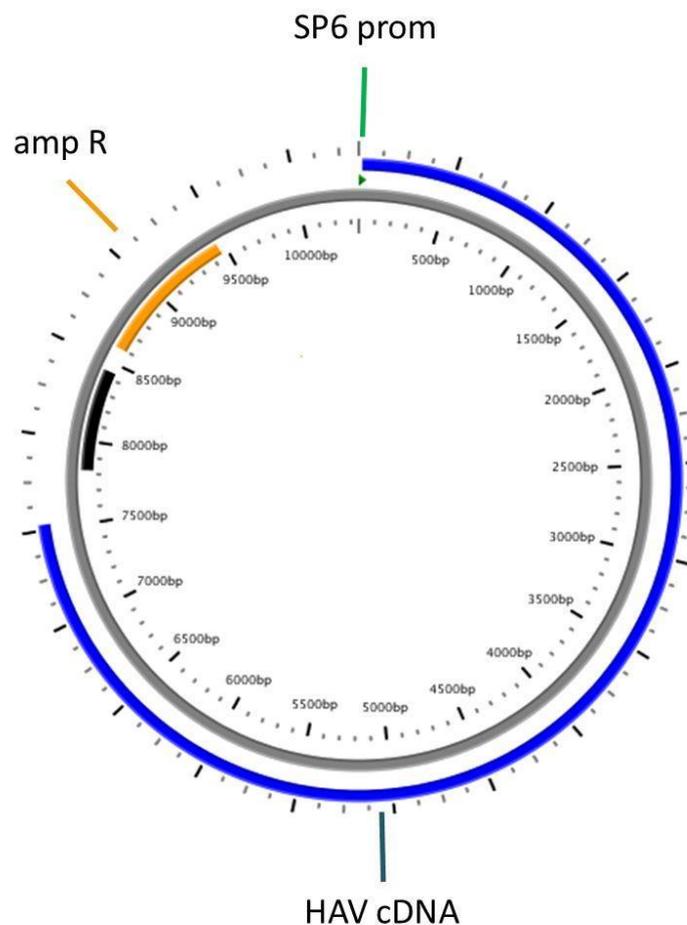


Figura 31 Esquema del vector pHAV/7. Este plásmido contiene una copia del genoma completo de la cepa del HAV atenuada y adaptada a cultivo celular (HAV/7), clonada en el plásmido pBR322 [166]; ampR es un gen de resistencia a ampicilina.

8.7 Análisis de la replicación de transcritos que contienen el genoma completo del HAV

El plásmido pHAV/7 es un vector de transcripción que contiene el cDNA infeccioso completo de la cepa HAV/7 bajo el control del promotor SP6 [166]. La cepa HAV/7 (también llamada HM-175/P35 y HM-175/7 MK-5) deriva del virus HM-175 wt y está adaptada a cultivo celular, pero no produce efecto citopático y replica muy lentamente [249]. El plásmido pHAV/7 contiene, además, un gen de resistencia a ampicilina (**Figura 31**).

La secuencia correspondiente a la región 5'NCR del HAV en el plásmido pHAV/7 se modificó mediante mutagénesis dirigida para crear dos plásmidos que contuvieran un IRES cuya secuencia coincidiera con la secuencia consenso de L0 (plásmido pL0) y el haplotipo ϕ 16 (plásmido p ϕ 16). El plásmido pL0 se obtuvo a partir de pHAV/7, introduciendo de forma secuencial las mutaciones A551G, A591G y T687G. A partir de pL0 se construyó el plásmido p ϕ 16, mediante la introducción secuencial de las siguientes mutaciones: T359C, T590C, T726C. Las mutaciones fueron generadas siguiendo el protocolo publicado por Liu y Naismith [293], que se ha explicado en el apartado **8.6.1**. Los cebadores mutagénicos empleados se describen en la **Tabla 15**.

Una vez obtenidos, los plásmidos pL0 y p ϕ 16 fueron purificados y escalados con una calidad suficientes para su posterior transcripción *in vitro*. El protocolo empleado en este caso fue el mismo que se describe en el apartado **8.6.2**. La transcripción *in vitro* se realizó a partir del promotor SP6, tras linealizar y purificar los plásmidos. La mezcla de reacción de la transcripción *in vitro* fue digerida con DNasa para eliminar el DNA molde plasmídico, y los transcritos fueron purificados. A partir de los transcritos purificados se transfectaron células FRhK-4 y GL37. Diez días después de la transfección se llevó a cabo un recuento de las células presentes en cada pocillo y se extrajo el RNA de las mismas. Este RNA fue retrotranscrito utilizando un cebador que hibrida exclusivamente con las cadenas negativas del HAV. El producto de la RT fue digerido con RNasa, con el fin de eliminar las cadenas positivas de RNA del HAV que hubiese presentes y se procedió a amplificar el cDNA mediante una PCR en tiempo real específica de la región 5'NCR

del HAV. Finalmente se estimó el número de moléculas de RNA del HAV de cadena negativa presentes en cada célula. Este análisis se realizó para cada plásmido al menos 2 veces de forma independiente con 2 réplicas en cada caso.

Tabla 15 Cebadores utilizados para la mutagénesis dirigida de pHAV/7 y de los plásmidos derivados del mismo. En las secuencias se resaltan en negrita las mutaciones que se introdujeron. Los nombres de los cebadores indican su sentido (directo [+] o reverso [-]) y las mutaciones que contienen.

Nombre	Secuencia	Posición
T687G+	5' GTTTGCCGCTGAGGTA CTCAGGGGCATTTAGGTTTTTCC 3'	680-718
T687G-	5' ACCTCAGCGGCAAACACCACATAAGGCCCAAAGAAC 3'	693-658
A591G+	5' TGTGCTTGGGGCAAACATCATT TGGCCTTAAATGGGATTC 3'	584-623
A591G-	5' TTTGCCCAAGCACAGAGAGGTCTGGAATTAAGCCTAAAGACAG 3'	598-555
A551G+	5' GGATTGACTGT CGGGGCTGTCTTTAGGCTTAATTCCAGACCTCTCTG 3'	539-585
A551G-	5' CCCC GACAGTCAATCCACTCAATGCATCCACTGGATGAGAG 3'	554-514
T359C+	5' CACCTGCAGTGTTAACT CGGCTTTCATGAATCTCTTTG 3'	341-379
T359C-	5' CAAAGAGATTCATGAAAGCC GAGTTAACTGCAAGGTG 3'	379-341
T726C+	5' CCTCATTCTCAAATAATAATGAACATGTCTAGACAAGGTATTTCCAGAC TGTTGG 3'	717-772
T726C-	5' CATGTTCA TATTATTTGAGAATGAGGAAAAACCTAAATGCCCTGAGTA CCTC 3'	743-690
T590C+	5' CCTCTCTGTGCTCGGGGCAAACATCATT TGGCCTTAAATGG 3'	578-618
T590C-	5' C CCGAGCACAGAGAGGTCTGGAATTAAGCCTAAAGACAGCCC 3'	593-552

8.7.1 Obtención de RNA infeccioso mediante transcripción *in vitro*

Los plásmidos pL0 y pφ16 se digirieron con *HaeII* (enzima de restricción que en el plásmido pHAV/7 corta inmediatamente después de la cola de poli(A)) del genoma vírico. Las mezclas de reacción de las digestiones fueron purificadas con el kit *High Pure PCR Product Purification* (Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el DNA linear resultante se precipitó con etanol. La transcripción del RNA se llevó a cabo con la polimerasa de SP6. Se trató luego con DNasa. A continuación se purificó el RNA extrayendo secuencialmente con fenol-cloroformo y cloroformo y precipitando con isopropanol. A continuación se detallan los protocolos mencionados en este párrafo.

8.7.1.1 Digestión con *HaeII*

1. Combinar los siguientes componentes de reacción a temperatura ambiente:

Reactivo	Volumen
Tampón 10X FastDigest (Thermo Scientific)	10 µl
DNA plasmídico molde	5 µg
Fosfatasa alcalina FastAP Thermosensitive (Thermo Scientific)	5 µl
FastDigest <i>HaeII</i> (Thermo Scientific)	5 µl
H ₂ O, libre de nucleasas	Hasta 100 µl

2. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente.
3. Incubar a 37 °C durante 1 hora.
4. Comprobar el resultado de la digestión mediante una electroforesis en gel de agarosa.

8.7.1.2 Precipitación con etanol

1. Combinar los siguientes componentes:

Reactivo	Volumen
Producto de la digestión con <i>HaeII</i>	100 µl
Acetato de sodio 3 M pH 5	1/10 volúmenes
EDTA 0.5 M pH 8	1/20 volúmenes

2. Añadir 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío.
3. Mezclar bien y centrifugar brevemente.
4. Incubar a -20 °C toda la noche.
5. Centrifugar a 4 °C durante 15 min a velocidad máxima.
6. Aspirar el sobrenadante cuidadosamente y descartarlo.
7. Lavar el pellet añadiendo 1 ml de etanol 70%.
8. Centrifugar durante 2 min a velocidad máxima.
9. Aspirar el sobrenadante cuidadosamente y descartarlo.
10. Dejar secar el pellet.
11. Resuspender el pellet en 20 µl de agua libre de nucleasas.

8.7.1.3 Transcripción in vitro

Se realizó con el kit de transcripción MEGAscript® SP6 (Ambion®, Life Technologies™), siguiendo los siguientes pasos:

1. Combinar los siguientes componentes a temperatura ambiente:

Reactivo	Volumen
Agua libre de nucleasas	Hasta 20 µl
Solución ATP	2 µl
Solución CTP	2 µl
Solución GTP	2 µl
Solución UTP	2 µl
Tampón de reacción 10X	2 µl
Mezcla enzimática SP6	2 µl
DNA molde lineal	1 µg

2. Mezclar completamente.
3. Incubar a 37 °C durante 3 horas.

8.7.1.4 Digestión con DNasa

1. Añadir 1 µl (2U) de DNasa TURBO (Ambion®, Life Technologies™).
2. Mezclar bien.
3. Incubar a 37 °C durante 30 min.

8.7.1.5 Purificación del RNA

1. Añadir 115 µl de agua libre de nucleasas y 15 µl de *Ammonium Acetate Stop Solution* (Ambion®, Life Technologies™) y agitar vigorosamente.
2. Añadir un volumen de fenol:cloroformo (1:1), mezclar bien y centrifugar a temperatura ambiente durante 5 min a 16000 g. Recuperar la fase acuosa y transferirla a un tubo nuevo.
3. Añadir un volumen de cloroformo, mezclar bien y centrifugar a temperatura ambiente durante 2 min a 16000 g. Recuperar la fase acuosa y transferirla a un tubo nuevo.

Materiales y métodos

4. Añadir un volumen de isopropanol, mezclar bien y guardar a -20 °C durante toda la noche.
5. Centrifugar a 4 °C durante 15 min en una centrífuga de sobremesa a velocidad máxima.
6. Eliminar el sobrenadante y resuspender en agua libre de nucleasas.
7. Guardar a -80 °C hasta el momento de su uso.

8.7.2 Transfección de células FRhK-4 y AGMK GL37 con transcritos de RNA

Tanto las células FRhK-4 como las GL37 se transfectaron usando *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent* (Roche Applied Science) siguiendo el siguiente protocolo:

1. Subcultivar las células 24 horas antes de la transfección y sembrarlas en placas de 24 pocillos con una relación de multiplicación 1:3 y 1:6 en el caso de FRhK-4 y GL37, respectivamente.
2. Cuantificar el RNA a transfectar mediante espectrofotometría.
3. Llevar a temperatura ambiente el RNA a transfectar, el medio reducido en suero *Opti-MEM® I* (Thermo Fisher Scientific) y el reactivo de transfección *X-treme GENE™ HP DNA Transfection Reagent* (Roche).
4. Diluir el RNA en medio *Opti-MEM® I* hasta una concentración final de RNA de 0.01 µg/µl.
5. Por cada pocillo que se quiera transfectar, añadir 3.25 µl de *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent* (Roche Applied Science) (reactivo de transfección) a 105 µl de la mezcla que contiene el RNA, preparada en el paso anterior. Mezclar suavemente e incubar durante 30 min a 25 °C.
6. Eliminar el medio de cultivo de la placa de 24 pocillos.
7. Añadir 59.7 µl de *Opti-MEM® I* a cada pocillo.
8. Añadir gota a gota el complejo RNA - *Opti-MEM® I* - reactivo de transfección a cada pocillo de la placa que se quiera transfectar (108.25 µl/pocillo). En el caso de GL37, añadir la mezcla con suavidad contra una esquina del pocillo, ya que estas células se desprenden de la multiplaca con facilidad. Distribuir uniformemente el complejo por la superficie del pocillo.
9. Incubar la placa transfectada durante 30 min a 37 °C con balanceo.

10. Añadir 238.15 µl de *Opti-MEM® I* a cada pocillo.
11. Incubar durante 90 min a 37 °C en un incubador de CO₂.
12. Eliminar el medio a los pocillos.
13. Añadir 500 µl de *Opti-MEM® I*.
14. Colocar las placas con las células transfectadas en un incubador de CO₂ a 37 °C durante 24 horas.
15. Eliminar el medio a los pocillos y añadir 500 µl de *Opti-MEM® I*.
16. Mantener las placas con las células transfectadas en un incubador de CO₂ a 37 °C durante 9 días más.

Incluir controles negativos: células no transfectadas, células transfectadas solamente con RNA (sin reactivo de transfección) y células transfectadas solamente con reactivo de transfección (sin RNA).

8.7.3 Cuantificación de la cadena negativa del genoma del HAV en células transfectadas

Diez días después de la transfección de las células FRhK-4 y GL37 se realizó una tripsinización de las mismas con 100 µl de tripsina/pocillo. Cuando las células se despegaron de la superficie de la placa, se inactivó la tripsina añadiendo 300 µl de medio MEM 2% SFBi. Tras mezclar bien, se pasó todo el contenido a un tubo. Se tomó una alícuota de 45 µl y se realizó un recuento celular. Las células que habían quedado en el tubo se centrifugaron durante 5 min a 1000 g y, tras eliminar el sobrenadante, se procedió a extraer el RNA usando el kit GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep (Sigma), observando las instrucciones del fabricante. A partir de este RNA se retrotranscribió la cadena negativa usando el cebador tagHAV68, que contenía una etiqueta en el extremo 5' (**Tabla 16**). La RT se llevó a cabo tal y como se describe en los cuatro primeros puntos del apartado **8.3.1**. El producto de la RT fue tratado con RNasa, con el fin de eliminar el RNA del HAV de cadena positiva presente en las muestras, y cuantificar únicamente el RNA negativo. A continuación se realizó una PCR en tiempo real para cuantificar el fragmento retrotranscrito. Para ello se utilizó el sistema RNA UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR (Invitrogen™, Life Technologies™), un cebador directo formado por la etiqueta que contenía el cebador utilizado en la RT, un cebador reverso específico del HAV (HAV240) y una sonda TaqMan® marcada con FAM™

Materiales y métodos

(HAV150). La **Figura 32** muestra una visión general del proceso de cuantificación de la cadena negativa, mientras que las secuencias de los cebadores y la sonda se encuentran en la **Tabla 16**. A partir de esta cuantificación y el recuento celular realizado anteriormente, se estimó la cantidad promedio de moléculas de cadena negativa del HAV presentes en cada célula transfectada.

Tabla 16 Cebadores y sonda utilizados en la cuantificación de la cadena negativa del HAV

Nombre	Secuencia	Posición
tagHAV68	5' CCAGATCGTTCGAGTCGTTACCGCCGTTTGCCTAG 3'	68-85
tag	5' CCAGATCGTTCGAGTCGT 3'	-
HAV240	5' GGAGAGCCCTGGAAGAAAG 3'	223-241
HAV150	5' TTAATTCCTGCAGGTCAGG 3'	150-169

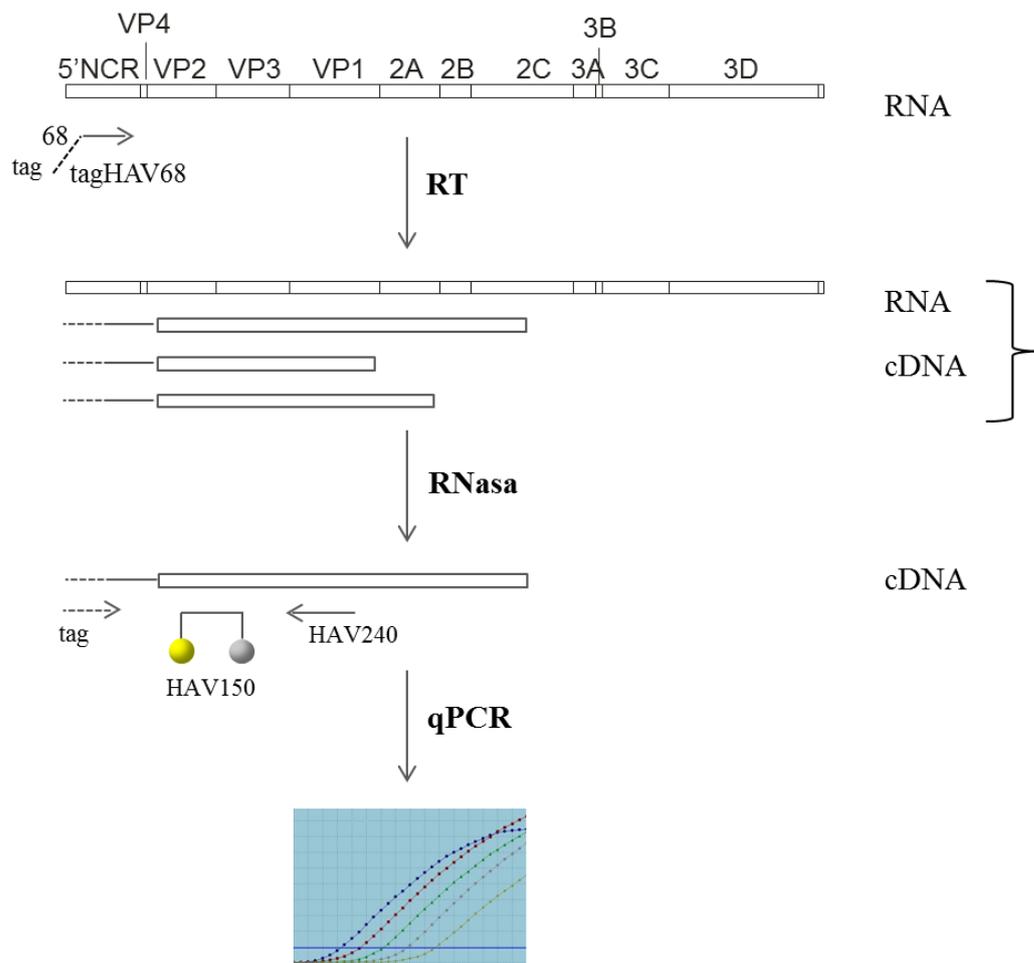


Figura 32 Esquema del proceso de cuantificación de la cadena negativa del HAV

8.7.3.1 Recuento celular

1. Mezclar la alícuota reservada para el recuento celular con 5 µl de azul tripán.
2. Contamos las células en una cámara de Neubauer.
3. Mediante la siguiente fórmula calculamos el número de células que permanecen en el tubo del cual sacamos la alícuota:

$$\frac{\text{Total células contada} \times 10\,000}{\text{Número de cuadrados contados}} \times 0.355$$

8.7.3.2 Digestión del RNA

1. Mezclar los siguientes componentes a temperatura ambiente:

Reactivo	Volumen
10X Reaction Buffer (Promega)	1.33 µl
Rnase ONE™ Ribonuclease (Promega)	2 µl
Producto de la RT	10 µl

2. Incubar durante 15 min a 37 °C.
3. Mantener a 4 °C.

8.7.3.3 Ensayo de PCR en tiempo real

1. Preparar la mezcla de reacción, según el siguiente esquema:

Reactivo	Volumen	Concentración final
Agua desionizada libre de DNasa y RNasa	13.375 µl	-
RNA UltraSense™ 5x Reaction Mix	5 µl	1X
RNA UltraSense™ Enzyme Mix	1.25 µl	-
tag 100 µM (cebador directo)	0.125 µl	0.5 µM
HAV240 100 µM (cebador reverso)	0.125 µl	0.5 µM
HAV FAM 50 µM (sonda TaqMan®)	0.125 µl	0.25 µM

Materiales y métodos

2. Dispensar 20 µl de la mezcla de reacción en cada pocillo de una placa para PCR en tiempo real.
3. Añadir 5 µl de las distintas muestras a los pocillos correspondientes.
4. Preparar el banco de diluciones para la curva de calibrado, a partir del estándar. La preparación del estándar se describe en el apartado **8.7.3.4**.
5. Añadir 5 µl de las distintas diluciones del estándar en los pocillos correspondientes.
6. Realizar la PCR en tiempo real en el termociclador Mx3000P Stratagene, según el siguiente programa:

Paso	Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95 °C	5 min
2	50	95 °C	15 s
		58 °C	1 min
		65 °C	1 min

8.7.3.4 Producción de un RNA estándar para la cuantificación de las moléculas del HAV de cadena negativa

El estándar de RNA para la cuantificación de la cadena negativa del HAV fue generado a partir de la transcripción *in vitro* del plásmido pGEM-HAV, el cual fue construido en el grupo de Virus Entéricos [124]. Este plásmido contiene la secuencia correspondiente a las bases 68 a 241 de la cepa HM-175/43c del HAV clonada en el vector pGEM-3Zf(+) [124]. El vector pGEM-HAV fue digerido con la enzima de restricción *Hind*III y purificado mediante el kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel), siguiendo el protocolo *Plasmid DNA clean-up*. A continuación, el vector linealizado se transcribió *in vitro* para dar lugar a la cadena negativa usando el kit de transcripción mMESSAGING mMACHINE T7 (Ambion®, Life Technologies™) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, que se basa en el uso de la polimerasa T7. La mezcla de reacción de la transcripción *in vitro* fue tratada con DNasa (ver apartado **8.7.1.4**) y purificada mediante extracción con fenol:cloroformo y fenol y precipitación con isopropanol (ver apartado **8.7.1.5**). El RNA purificado fue cuantificado espectrofotométricamente. En base a esta cuantificación, se calculó el

número de moléculas de RNA por unidad de volumen presentes en la preparación. Tras comprobar que no quedaron restos de DNA plasmídico en el estándar, se guardó a -80 °C hasta el momento de su uso.

8.8 Obtención de poblaciones del HAV a partir de distintas mezclas de las poblaciones F0.05LA y F0.2LA

Las poblaciones F0.05LA y F0.2LA se mezclaron en distintas proporciones (ver **Tabla 17**) y se hicieron multiplicar, en presencia de 0.05 µg/ml de AMD, en células FRhK-4 que formaban monocapas en frasco de cultivo T-25 cm². A partir de las suspensiones víricas obtenidas con estas infecciones, se llevaron a cabo pasajes seriados. Se realizaron 45 pasajes seriados de los experimentos en los que las proporciones iniciales de ambas poblaciones fueron 1:100, 1:1 y 100:1. Del resto de experimentos se llevaron a cabo 20 pasajes seriados.

En la primera infección el inóculo consistió en 1 ml de una dilución de la mezcla correspondiente en PBS, ajustando la concentración vírica a las multiplicidades de infección que figuran en la **Tabla 17**, y que variaron entre 1 y 2. En los posteriores pasajes (pasajes seriados) se utilizó como inóculo 1 ml de la suspensión vírica obtenida a partir del pasaje anterior.

Tabla 17 Diferentes mezclas de las poblaciones F0.05LA y F0.2LA (siguiendo la relación F0.05LA:F0.2LA) y multiplicidades de infección (MOI) utilizadas para iniciar las diferentes poblaciones mixtas ensayadas. A partir de las mezclas resaltadas en negrita se realizaron 45 pasajes; del resto, 20.

Mezcla	1:100	1:2	1:1	2:1	3:1	10:1	20:1	50:1	100:1
MOI inicial	1.00	1.50	2.00	1.5	1.35	1.10	1.05	1.02	1.00

La infección de las células y la obtención de suspensiones víricas se realizaron siguiendo el siguiente protocolo:

1. Decantar el medio de crecimiento de los frascos T-25 con monocapas confluentes de células FRhK-4.
2. Añadir el inóculo vírico a la monocapa e incubar durante 1 h a 37 °C para favorecer la adsorción del virus.
3. Añadir 9 ml de medio MEM 2% SFBi con 0.05 µg/ml de AMD.

Materiales y métodos

4. Incubar las células a 37 °C durante 7 días.
 5. Lisar las células mediante 3 ciclos de congelación (-80 °C) y descongelación.
 6. Eliminar los restos celulares por centrifugación durante 15 min a 3000 g.
 7. Conservar la suspensión vírica a -80 °C, excepto las alícuotas que se vayan a utilizar para infectar nuevas monocapas celulares, que se pueden mantener a 4 °C hasta su uso.
- Soluciones necesarias:

MEM 2% SFBi:

MEM 1x con sales de Earle autoclavado 15 min suplementado en condiciones de esterilidad con:

NaHCO ₃	2% (v/v)
HEPES	15 mM
L-Glutamina	2 mM
NEAA	1X
SFBi	2% (v/v)
Penicilina – Estreptomicina ...	100/ml – 100 µg/ml

8.9 Cuantificación del título infeccioso de las suspensiones del HAV: cálculo de la TCID₅₀/célula

La cuantificación del título vírico infeccioso de las suspensiones del HAV se realizó según el cálculo de la TCID₅₀, que se define como la dosis vírica que provoca efecto citopático (ECP) en el 50% de las monocapas celulares inoculadas. Para llevar a cabo esta titulación se infectan monocapas de células FRhK-4 en placas de 96 pocillos. Brevemente, el protocolo que se seguía era el siguiente:

1. Descartar el medio de crecimiento de las placas de 96 pocillos con monocapas confluentes de FRhK-4.
2. Inocular en la placa diluciones seriadas 1/10 de la suspensión vírica a titular en PBS (habitualmente de la dilución 10⁻³ hasta la 10⁻⁷). Concretamente, se inocula una columna (8 pocillos) por cada dilución, añadiendo 20 µl a cada pocillo. Como control negativo se añade el mismo volumen de PBS en los 8 pocillos de una columna de la placa.
3. Incubar la placa a 37 °C durante 1 h en una atmósfera enriquecida con un 5% de CO₂.

4. Añadir 160 µl de medio postinfección (MEM 2% SFBi) a cada pocillo.
5. Incubar a 37 °C durante 11 días.
6. Realizar una lectura de presencia/ausencia de ECP para cada pocillo inoculado en la placa a los 8-9 días de haber inoculado la placa y efectuar una lectura adicional y definitiva el día 11 postinoculación.
7. Calcular la TCID₅₀ según la fórmula descrita en el método de Behrens y Kärber [294] y que se detalla a continuación:

$$\text{Log TCID}_{50} = - \left(l_r + 1/2d - d \sum (p_i + 1) \right)$$

donde:

l_r es el logaritmo en base 10 de la dilución más alta que da el 100% de ECP, es decir, la destrucción de las 8 réplicas.

d es el logaritmo de la serie dilucional. En nuestro caso, al tratarse de diluciones decimales, d vale 1.

p_i es la proporción de respuesta positiva en las diluciones con ECP en menos de las 8 réplicas.

A partir del valor del log TCID₅₀, y teniendo en cuenta que el volumen de inóculo utilizado es de 20 µl, se obtiene la cuantificación del título vírico de las suspensiones expresado como la dosis infecciosa que provoca ECP en el 50% de las monocapas celulares por mililitro (TCID₅₀/ml). Para calcular la TCID₅₀/célula se multiplica el valor de TCID₅₀/ml por el número de mililitros totales de la suspensión vírica y se divide por el número de células estimado que contenía el frasco a partir del cual se produjo la suspensión.

8.10 Análisis del tamaño de las calvas

Con el objetivo de observar posibles cambios en la velocidad de replicación de distintas poblaciones, se realizó un ensayo de unidades formadoras de calvas o PFU (*plaque-forming units*), con la intención de analizar el tamaño de las calvas generadas por estas poblaciones ya que, en general, calvas más grandes indican una mayor velocidad de replicación y, por tanto, mayor habilidad para colonizar nuevas células. El protocolo utilizado, descrito por Cromeans y colaboradores [167], fue el siguiente:

Materiales y métodos

1. Sembrar células FRhK-4 en placas de 6 pocillos y esperar hasta que alcancen una confluencia del 90-100%.
2. Aspirar con pipeta el medio de crecimiento de los pocillos e infectar las monocapas con diluciones seriadas 1/10 (desde la dilución 10^{-3} hasta la 10^{-7}) de las diferentes poblaciones víricas en PBS, a razón de 200 μ l/pocillo.
3. Incubar las placas infectadas a 37°C durante 60 minutos para permitir la adsorción de los virus a las células.
4. Añadir 3 ml/pocillo de medio post-infección (overlay) con 0.05 μ g/ml de AMD.
5. Dejar las placas a temperatura ambiente hasta que el medio solidifique (10 minutos aproximadamente).
6. Incubar a 37°C durante 10 días en una atmósfera enriquecida con 5% de CO₂.
7. Fijar las células con 2 ml/pocillo de formaldehído 4% (Merck) durante 3 horas a temperatura ambiente.
8. Descartar el formaldehído con pipeta y retirar el *overlay* semisólido.
9. Teñir las calvas añadiendo una cantidad mínima de solución de cristal violeta. Balancear la placa en distintas direcciones hasta que el cristal violeta haya cubierto completa y uniformemente los pocillos. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Descartar el cristal violeta con pipeta y lavar con agua destilada el exceso de colorante.
11. Dejar secar las placas y medir el diámetro de las calvas.

- Soluciones necesarias:

Medio post-infección (overlay):

Se mezcla a partes iguales MEM 2% SFBi 2X y agarosa 1%, obteniendo una concentración final de agarosa de 0.5%, y se añade MgCl₂ a una concentración final de 26 mM y AMD a una concentración final de 0.05 μ g/ml.

MEM 2% SFBi 2X:

MEM 2X con sales de Earle autoclavado 15 min suplementado en condiciones de esterilidad con:

NaHCO₃ 4% (v/v)

HEPES	30 mM
L-Glutamina	4 mM
NEAA	2X
SFBi	4% (v/v)
Penicilina – Estreptomicina ...	200 UI/ml – 200 µg/ml

Agarosa 1%:

Se prepara una solución con un 1% de agarosa *SeaPlaque® GTG® Agarose* (Lonza) en PBS. La agarosa se funde al mismo tiempo que se esteriliza por autoclave durante 15 minutos.

MgCl₂:

Se prepara una solución de MgCl₂ 1.3 M en agua Milli-Q, y se esteriliza por autoclave durante 15 minutos.

Solución de cristal violeta:

Cristal violeta.....	1.3 g/l
Formaldehído.....	30% (v/v)
Alcohol isopropílico.....	5% (v/v)

En agua Milli-Q.

Usar una dilución 1:2 de esta solución.

8.11 Amplificación de VP0 y de la región 5’NCR para estudiar la proporción de F0.05LA y F0.2LA y de las mutaciones U359C, U590C y U726C en las poblaciones mixtas

Para estudiar la proporción de las poblaciones F0.05LA y F0.2LA en los distintos pasajes de las poblaciones mixtas 100:1, 1:1 y 1:100, se amplificó y secuenció un fragmento de VP0 que contenía dos marcadores que diferencian a ambas poblaciones. La población F0.05LA posee una citosina en las posiciones 1298 y 1409, mientras que F0.2LA presenta un uracilo. Se realizó una extracción de RNA de cada pasaje utilizando el kit *NucleoSpin® RNA Virus* (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este RNA fue retrotranscrito usando el cebador VP0C- (**Tabla 18**). El cDNA obtenido se amplificó mediante PCR utilizando la pareja de cebadores VP0C+/VP0C- (**Tabla 18**). Tanto la RT como la PCR se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado **8.3.1**, adaptando las temperaturas y los tiempos de los distintos pasos de la PCR al tamaño del amplicones y a la temperatura de fusión de los cebadores. Los productos de PCR

Materiales y métodos

fueron purificados utilizando el kit *High Pure PCR Product Purification* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante, y secuenciados tal y como se describe en el apartado **8.6.1.5**. La altura proporcional de cada pico en el cromatograma sirvió para determinar el porcentaje de citosina y uracilo presente en cada una de las dos posiciones nucleotídicas en la secuencia consenso de cada pasaje estudiado.

Para estudiar la proporción de individuos que contenían las mutaciones U359C, U590C y U726C en las poblaciones mixtas 100:1, 1:1 y 1:100, se empleó un protocolo similar al descrito en el párrafo anterior. En este caso se amplificaron y secuenciaron dos fragmentos de la región 5'NCR de varios pasajes de cada una de estas poblaciones. La retrotranscripción se llevó a cabo usando los cebadores 5NCR1- y 5NCR2- (**Tabla 18**). Para las PCR se utilizaron las parejas de cebadores 5NCR1+/5NCR1- y 5NCR2+/5NCR2- (**Tabla 18**).

8.12 Cálculo de la entropía normalizada de Shannon

Se calculó la entropía normalizada de Shannon (S_n) de las regiones VP1 y 5'NCR en base al valor de abundancia de los distintos haplotipos encontrados en los estudios de secuenciación masiva. El cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula [271]:

$$S_n = \frac{-\sum_{i=1}^s p_i \ln p_i}{\ln N}$$

En la que s es el número total de haplotipos presentes en una muestra y p_i es la proporción (n/N) de las secuencias del haplotipo i encontradas (n) en el total de secuencias en esa muestra (N). S_n varía desde 0 (nula diversidad) hasta 1 (diversidad máxima).

8.13 Obtención de la secuencia consenso del genoma completo de la población HP

La secuencia consenso de la población HP (el pasaje 30 de la población mixta 1:1 [F0.05LA:F0.2LA]) se obtuvo mediante secuenciación de tipo Sanger de un conjunto de fragmentos de PCR solapantes, procedentes de la amplificación de diversos cDNA, que habían sido retrotranscritos a partir de RNA vírico, aislado de la suspensión vírica. Para la extracción del RNA se utilizó el kit *NucleoSpin® RNA Virus* (Macherey-Nagel), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La RT-

PCR de los distintos fragmentos del genoma se realizó siguiendo el protocolo detallado en 8.3.1, aunque variando algunas temperaturas y tiempos de los distintos pasos de las PCR, en función de la temperatura de fusión de las parejas de cebadores y el tamaño de los amplicones.

Tabla 18 Cebadores utilizados para obtener la secuencia consenso.

Nombre	Secuencia	Posición
5NCR1+	5'-TGGTGAGGGGACTTGATCC-3'	48-66
5NCR1-	5'-GGCGTTGAATGGTTTTTGTGTC-3'	503-484
5NCR2+	5'-AGGCTACGGGTGAAACCTC-3'	396-414
5NCR2-	5'-TCTGCCAAAGACAGGATGTG-3'	805-786
VP0N+¹	5'-CAGCTGGACTGTTCTTTGGG-3'	648-667
VP0N-¹	5'-TCACCAGGAACCATAGCACAG-3'	1198-1178
VP0C+¹	5'-TACAATGAGCAGTTTGCTGT-3'	1065-1084
VP0C-¹	5'-GCTCTTGTCATCTTCATAATTTG-3'	1543-1522
VP3N+¹	5'-GGGACAGGAACCTCAGCTTATAC-3'	1380-1402
VP3N-	5'-AATCTACCTGAATGATATTTGG-3'	1861-1840
VP3i+¹	5'-GTTATTCCAGTTGACCCATATT-3'	1701-1722
VP3i-	5'-TGTATACCTGTTCACTCTGTA-3'	2030-2010
VP3C+¹	5'-TGTGCAGTAATGGATATTACAG-3'	1938-1959
VP3C-¹	5'-GTTGTTATACCAACTTGGGGA-3'	2287-2267
VP1N+¹	5'-AATGTTTATCTTTCAGCAAT-3'	2136-2155
VP1N-	5'-TCTGACAGCTCCAAGAGCAGTTTT-3'	2774-2751
VP1C+2	5'-TAGGTCTTGCCGTTGATACT-3'	2692-2711
VP1C-2	5'-CTTGTGAAAACAGTCCCTTC-3'	3243-3224
2A+	5'-ATCAGAGGAAGATAAAAAGATTT-3'	3083-3104
2A-	5'-TCTACACTCTGCTATTAATCCA-3'	3701-3680
2B+	5'-GTCTGAAACGGATTTGTGTT-3'	3569-3588
2B-	5'-AACCAGTTGGAAAACTCTG-3'	4012-3993
2CN+	5'-CCAGAATGATGGAGTTAAGG-3'	3970-3989
2CN-	5'-TCTGAAGCCACAGGTTTAGT-3'	4534-4515
2CC+	5'-GGCAACCAAAATTTGTA AAC-3'	4463-4482
2CC-	5'-GAGACCACAACCTCCATGAAT-3'	4998-4979
3AB+	5'-GTTTCATTGATGGATTTGCT-3'	4911-4930
3AB-	5'-CTTCCTAACCAGTCCTGCTA-3'	5324-5305
3CN+	5'-ATGGTGTAACCTAAGCCCAAG-3'	5233-5252
3CN-	5'-ATAGGGGTTCCATTTACA-3'	5674-5657
3CC+	5'-TGGCAACATTAGTGACAA-3'	5638-5655
3CC-	5'-TTTGGAGACCACATTCAT-3'	5999-5982
3CD²	5'-ATTGATAAGAAAATTGAAAGTCA-3'	5925-5947
3CD-	5'-AACATCCAAATCAGAACAAT-3'	6409-6428
3D+	5'-GAAGTTGACCAAAAGAGATT-3'	6302-6321
3D-²	5'-ATGATTCTACCTGCTTCTCT-3'	6739-6720
3Db+	5'-TTTGATGCTAGTCTTAGTCCATTTA-3'	6690-6714
3-	5'-AAGAAAGTTCATTTAAACAAATCA-3'	7439-7416

¹: secuencia publicada en [295]

²: secuencia publicada en [189]

Materiales y métodos

Los cebadores que se utilizaron figuran en la **Tabla 18**. El kit *High Pure PCR Product Purification* (Roche) se utilizó para purificar los productos de PCR, siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación se llevó a cabo de la manera descrita en el apartado **8.6.1.5**.

8.14 Análisis estadístico

Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas de los distintos parámetros evaluados entre las poblaciones, plásmidos y células, se utilizó los test ANOVA y t-Student. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar.

9 BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. M. Q. King, M. J. Adams, E. J. Lefkowitz, and E. B. Carstens, *Virus taxonomy: IXth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, vol. 9. Access Online via Elsevier, 2011.
- [2] Z. Feng, L. Hensley, K. L. McKnight, F. Hu, V. Madden, L. Ping, S.-H. Jeong, C. Walker, R. E. Lanford, and S. M. Lemon, "A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes," *Nature*, vol. 496, no. 7445, pp. 367–371, 2013.
- [3] F. X. Abad, R. M. Pinto, and A. Bosch, "Survival of enteric viruses on environmental fomites," *Appl Env. Microbiol*, vol. 60, no. 10, pp. 3704–3710, 1994.
- [4] C. M. Walker, Z. Feng, and S. M. Lemon, "Reassessing immune control of hepatitis A virus.," *Curr. Opin. Virol.*, vol. 11C, pp. 7–13, Jan. 2015.
- [5] P. J. Provost, B. S. Wolanski, W. J. Miller, O. L. Ittensohn, W. J. McAleer, and M. R. Hilleman, "Physical, Chemical and Morphologic Dimensions of Human Hepatitis A Virus Strain CR326," *Exp. Biol. Med.*, vol. 148, no. 2, pp. 532–539, Feb. 1975.
- [6] S. J. Anthony, J. A. St Leger, E. Liang, A. L. Hicks, M. D. Sanchez-Leon, K. Jain, J. H. Lefkowitz, I. Navarrete-Macias, N. Knowles, T. Goldstein, K. Pugliares, H. S. Ip, T. Rowles, and W. I. Lipkin, "Discovery of a Novel Hepatovirus (Phopivirus of Seals) Related to Human Hepatitis A Virus.," *MBio*, vol. 6, no. 4, Jan. 2015.
- [7] L. E. Whetter, S. P. Day, O. Elroy-Stein, E. A. Brown, and S. M. Lemon, "Low efficiency of the 5'nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells," *J. Virol.*, vol. 68, no. 8, pp. 5253–5263, 1994.
- [8] X. Y. Jia, G. Scheper, D. Brown, W. Updike, S. Harmon, O. Richards, D. Summers, and E. Ehrenfeld, "Translation of hepatitis A virus RNA in vitro: aberrant internal initiations influenced by 5' noncoding region.," *Virology*, vol. 182, no. 2, pp. 712–22, Jun. 1991.
- [9] R. M. Pinto, L. Aragonés, M. I. Costafreda, E. Ribes, and A. Bosch, "Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus," *Virus Res*, vol. 127, no. 2, pp. 158–163, 2007.
- [10] R. M. Pinto, L. D'Andrea, F. J. Perez-Rodriguez, M. I. Costafreda, E. Ribes, S. Guix, and A. Bosch, "Hepatitis A virus evolution and the potential emergence of new variants escaping the presently available vaccines," *Futur. Microbiol*, vol. 7, no. 3, pp. 331–346, 2012.

Bibliografia

- [11] N. E. Bishop and D. A. Anderson, "Uncoating kinetics of hepatitis A virus virions and provirions," *J. Virol.*, vol. 74, no. 7, pp. 3423–6, Apr. 2000.
- [12] C. Probst, M. Jecht, and V. Gauss-Müller, "Intrinsic signals for the assembly of hepatitis A virus particles. Role of structural proteins VP4 and 2A," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 8, pp. 4527–31, Feb. 1999.
- [13] X. Wang, J. Ren, Q. Gao, Z. Hu, Y. Sun, and X. Li, "Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses," *Nature*, vol. 517, no. 7532, pp. 85–8, 2015.
- [14] L. Zhu and X. Zhang, "Hepatitis A virus exhibits a structure unique among picornaviruses," *Protein Cell*, vol. 6, no. 2, pp. 79–80, 2015.
- [15] R. A. Grant, C. N. Hiremath, D. J. Filman, R. Syed, K. Andries, and J. M. Hogle, "Structures of poliovirus complexes with anti-viral drugs: implications for viral stability and drug design," *Curr. Biol.*, vol. 4, no. 9, pp. 784–97, Sep. 1994.
- [16] T. J. Smith, M. J. Kremer, M. Luo, G. Vriend, E. Arnold, G. Kamer, M. G. Rossmann, M. A. McKinlay, G. D. Diana, and M. J. Otto, "The site of attachment in human rhinovirus 14 for antiviral agents that inhibit uncoating," *Science*, vol. 233, no. 4770, pp. 1286–93, Sep. 1986.
- [17] M. I. Costafreda, E. Ribes, A. Franch, A. Bosch, and R. M. Pinto, "A single mutation in the glycoporphin A binding site of hepatitis A virus enhances virus clearance from the blood and results in a lower fitness variant," *J Virol*, vol. 86, no. 15, pp. 7887–7895, 2012.
- [18] E. Scholz, U. Heinricy, and B. Flehmig, "Acid stability of hepatitis A virus," *J. Gen. Virol.*, vol. 70 (Pt 9), pp. 2481–5, Sep. 1989.
- [19] G. Sanchez, A. Bosch, and R. M. Pinto, "Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis a virus," *J Virol*, vol. 77, no. 1, pp. 452–459, 2003.
- [20] G. Sanchez, L. Aragonés, M. I. Costafreda, E. Ribes, A. Bosch, and R. M. Pinto, "Capsid region involved in hepatitis A virus binding to glycoporphin A of the erythrocyte membrane," *J Virol*, vol. 78, no. 18, pp. 9807–9813, 2004.
- [21] O. V Nainan, M. A. Brinton, and H. S. Margolis, "Identification of amino acids located in the antibody binding sites of human hepatitis A virus," *Virology*, vol. 191, no. 2, pp. 984–7, Dec. 1992.
- [22] L. H. Ping and S. M. Lemon, "Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies," *J. Virol.*, vol. 66, no. 4, pp. 2208–16, Apr. 1992.

- [23] P. Gagneux and A. Varki, "Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function.," *Glycobiology*, vol. 9, no. 8, pp. 747–55, Aug. 1999.
- [24] A. Bosch, J. F. Gonzalez-Dankaart, I. Haro, R. Gajardo, J. A. Perez, and R. M. Pinto, "A new continuous epitope of hepatitis A virus," *J Med Virol*, vol. 54, no. 2, pp. 95–102, 1998.
- [25] T. Shibayama, H. Kojima, M. Ashida, S. Hirose, A. Sato, T. Kamimura, C. Hamada, Y. Shimizu, S. Suzuki, and F. Ichida, "Localization of hepatitis A virus in marmoset liver tissue during the acute phase of experimental infection.," *Gastroenterol. Jpn.*, vol. 20, no. 6, pp. 564–72, Dec. 1985.
- [26] L. V Asher, L. N. Binn, T. L. Mensing, R. H. Marchwicki, R. A. Vassell, and G. D. Young, "Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*).," *J. Med. Virol.*, vol. 47, no. 3, pp. 260–8, Nov. 1995.
- [27] G. Kaplan, A. Totsuka, P. Thompson, T. Akatsuka, Y. Moritsugu, and S. M. Feinstone, "Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus.," *EMBO J.*, vol. 15, no. 16, pp. 4282–96, Aug. 1996.
- [28] E. Silberstein, G. Dveksler, and G. G. Kaplan, "Neutralization of hepatitis A virus (HAV) by an immunoadhesin containing the cysteine-rich region of HAV cellular receptor-1.," *J. Virol.*, vol. 75, no. 2, pp. 717–25, Jan. 2001.
- [29] E. Silberstein, L. Xing, W. van de Beek, J. Lu, H. Cheng, and G. G. Kaplan, "Alteration of hepatitis A virus (HAV) particles by a soluble form of HAV cellular receptor 1 containing the immunoglobulin-and mucin-like regions.," *J. Virol.*, vol. 77, no. 16, pp. 8765–74, Aug. 2003.
- [30] S. Moller-Tank, A. S. Kondratowicz, R. A. Davey, P. D. Rennert, and W. Maury, "Role of the phosphatidylserine receptor TIM-1 in enveloped-virus entry.," *J. Virol.*, vol. 87, no. 15, pp. 8327–41, Aug. 2013.
- [31] D. Feigelstock, P. Thompson, P. Mattoo, Y. Zhang, and G. G. Kaplan, "The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor.," *J. Virol.*, vol. 72, no. 8, pp. 6621–8, Aug. 1998.
- [32] L. Sui, W. Zhang, Y. Chen, Y. Zheng, T. Wan, W. Zhang, Y. Yang, G. Fang, J. Mao, and X. Cao, "Human membrane protein Tim-3 facilitates hepatitis A virus entry into target cells.," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 17, no. 6, pp. 1093–9, Jun. 2006.
- [33] A. Dotzauer, U. Gebhardt, K. Bieback, U. Göttke, A. Kracke, J. Mages, S. M. Lemon, and A. Vallbracht, "Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor.," *J. Virol.*, vol. 74, no. 23, pp. 10950–7, Dec. 2000.

Bibliografia

- [34] A. Dotzauer, A. Heitmann, T. Laue, L. Kraemer, K. Schwabe, D. Paulmann, B. Flehmig, and A. Vallbracht, "The role of immunoglobulin A in prolonged and relapsing hepatitis A virus infections.," *J. Gen. Virol.*, vol. 93, no. Pt 4, pp. 754–60, Apr. 2012.
- [35] S. U. Emerson, M. Lewis, S. Govindarajan, M. Shapiro, T. Moskal, and R. H. Purcell, "cDNA clone of hepatitis A virus encoding a virulent virus: induction of viral hepatitis by direct nucleic acid transfection of marmosets.," *J. Virol.*, vol. 66, no. 11, pp. 6649–54, Nov. 1992.
- [36] N. E. Bishop, "Conformational changes in the hepatitis A virus capsid in response to acidic conditions," *J. Med. Microbiol.*, vol. 48, no. 5, pp. 443–450, May 1999.
- [37] N. E. Bishop, "Examination of potential inhibitors of hepatitis A virus uncoating.," *Intervirology*, vol. 41, no. 6, pp. 261–71, Jan. 1998.
- [38] F. Superti, L. Seganti, N. Orsi, M. Divizia, R. Gabrieli, and A. Pana, "The effect of lipophilic amines on the growth of hepatitis A virus in Frp/3 cells," *Arch. Virol.*, vol. 96, no. 3–4, pp. 289–296, Sep. 1987.
- [39] M. I. Costafreda, F. J. Pérez-Rodríguez, L. D'Andrea, S. Guix, E. Ribes, A. Bosch, and R. M. Pintó, "Hepatitis A virus adaptation to cellular shutoff is driven by dynamic adjustments of codon usage and results in the selection of populations with altered capsids.," *J. Virol.*, vol. 88, no. 9, pp. 5029–41, May 2014.
- [40] N. E. Bishop, "Effect of low pH on the hepatitis A virus maturation cleavage.," *Acta Virol.*, vol. 43, no. 5, pp. 291–6, Oct. 1999.
- [41] M. Tesar, X. Y. Jia, D. F. Summers, and E. Ehrenfeld, "Analysis of a potential myristoylation site in hepatitis A virus capsid protein VP4.," *Virology*, vol. 194, no. 2, pp. 616–26, Jun. 1993.
- [42] A. Shukla, A. K. Padhi, J. Gomes, and M. Banerjee, "The VP4 peptide of hepatitis A virus ruptures membranes through formation of discrete pores.," *J. Virol.*, vol. 88, no. 21, pp. 12409–21, Nov. 2014.
- [43] L. Cohen, D. Bénichou, and A. Martin, "Analysis of deletion mutants indicates that the 2A polypeptide of hepatitis A virus participates in virion morphogenesis.," *J. Virol.*, vol. 76, no. 15, pp. 7495–505, Aug. 2002.
- [44] R. Gosert, P. Cassinotti, G. Siegl, and M. Weitz, "Identification of hepatitis A virus non-structural protein 2B and its release by the major virus protease 3C.," *J. Gen. Virol.*, vol. 77 (Pt 2 , pp. 247–55, Feb. 1996.

- [45] A. Martin, N. Escriou, S. F. Chao, M. Girard, S. M. Lemon, and C. Wychowski, "Identification and site-directed mutagenesis of the primary (2A/2B) cleavage site of the hepatitis A virus polyprotein: functional impact on the infectivity of HAV RNA transcripts.," *Virology*, vol. 213, no. 1, pp. 213–22, Oct. 1995.
- [46] B. A. Malcolm, S. M. Chin, D. A. Jewell, J. R. Stratton-Thomas, K. B. Thudium, R. Ralston, and S. Rosenberg, "Expression and characterization of recombinant hepatitis A virus 3C proteinase.," *Biochemistry*, vol. 31, no. 13, pp. 3358–63, Apr. 1992.
- [47] D. A. Anderson and B. C. Ross, "Morphogenesis of hepatitis A virus: isolation and characterization of subviral particles.," *J. Virol.*, vol. 64, no. 11, pp. 5284–9, Nov. 1990.
- [48] G. Morace, Y. Kusov, G. Dzagurov, F. Beneduce, and V. Gauss-Muller, "The unique role of domain 2A of the hepatitis A virus precursor polypeptide P1-2A in viral morphogenesis.," *BMB Rep.*, vol. 41, no. 9, pp. 678–83, Sep. 2008.
- [49] N. E. Bishop and D. A. Anderson, "Hepatitis A virus subviral particles: purification, accumulation, and relative infectivity of virions, provirions and procapsids.," *Arch. Virol.*, vol. 142, no. 11, pp. 2147–60, Jan. 1997.
- [50] J. Graff, O. C. Richards, K. M. Swiderek, M. T. Davis, F. Rusnak, S. A. Harmon, X. Y. Jia, D. F. Summers, and E. Ehrenfeld, "Hepatitis A virus capsid protein VP1 has a heterogeneous C terminus.," *J. Virol.*, vol. 73, no. 7, pp. 6015–23, Jul. 1999.
- [51] N. E. Bishop and D. A. Anderson, "RNA-dependent cleavage of VP0 capsid protein in provirions of hepatitis A virus.," *Virology*, vol. 197, no. 2, pp. 616–23, Dec. 1993.
- [52] B. Zhang, G. Morace, V. Gauss-Müller, and Y. Kusov, "Poly(A) binding protein, C-terminally truncated by the hepatitis A virus proteinase 3C, inhibits viral translation.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 17, pp. 5975–84, Jan. 2007.
- [53] B. Zhang, S. Seitz, Y. Kusov, R. Zell, and V. Gauss-Müller, "RNA interaction and cleavage of poly(C)-binding protein 2 by hepatitis A virus protease.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 364, no. 4, pp. 725–30, Dec. 2007.
- [54] R. Gosert, D. Egger, and K. Bienz, "A cytopathic and a cell culture adapted hepatitis A virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements.," *Virology*, vol. 266, no. 1, pp. 157–69, Jan. 2000.
- [55] N. L. Teterina, K. Bienz, D. Egger, A. E. Gorbalenya, and E. Ehrenfeld, "Induction of intracellular membrane rearrangements by HAV proteins 2C and 2BC.," *Virology*, vol. 237, no. 1, pp. 66–77, Oct. 1997.

Bibliografia

- [56] Y. Yang, Y. Liang, L. Qu, Z. Chen, M. Yi, K. Li, and S. M. Lemon, "Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 17, pp. 7253–8, Apr. 2007.
- [57] Y. Yang, M. Yi, D. J. Evans, P. Simmonds, and S. M. Lemon, "Identification of a conserved RNA replication element (cre) within the 3Dpol-coding sequence of hepatoviruses.," *J. Virol.*, vol. 82, no. 20, pp. 10118–28, Oct. 2008.
- [58] A. Ciervo, F. Beneduce, and G. Morace, "Polypeptide 3AB of hepatitis A virus is a transmembrane protein.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 249, no. 1, pp. 266–74, Aug. 1998.
- [59] R. Banerjee and A. Dasgupta, "Interaction of picornavirus 2C polypeptide with the viral negative-strand RNA.," *J. Gen. Virol.*, vol. 82, no. Pt 11, pp. 2621–7, Nov. 2001.
- [60] D. Marc, G. Masson, M. Girard, and S. van der Werf, "Lack of myristoylation of poliovirus capsid polypeptide VP0 prevents the formation of virions or results in the assembly of noninfectious virus particles.," *J. Virol.*, vol. 64, no. 9, pp. 4099–107, Sep. 1990.
- [61] C. C. Abrams, A. M. King, and G. J. Belsham, "Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system.," *J. Gen. Virol.*, vol. 76 (Pt 12, pp. 3089–98, Dec. 1995.
- [62] C. I. Nugent and K. Kirkegaard, "RNA binding properties of poliovirus subviral particles.," *J. Virol.*, vol. 69, no. 1, pp. 13–22, Jan. 1995.
- [63] Y. Verlinden, A. Cuconati, E. Wimmer, and B. Rombaut, "Cell-free synthesis of poliovirus: 14S subunits are the key intermediates in the encapsidation of poliovirus RNA.," *J. Gen. Virol.*, vol. 81, no. Pt 11, pp. 2751–4, Nov. 2000.
- [64] P. Jiang, Y. Liu, H.-C. Ma, A. V Paul, and E. Wimmer, "Picornavirus morphogenesis.," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 78, no. 3, pp. 418–37, Sep. 2014.
- [65] I. J. Hidalgo, T. J. Raub, and R. T. Borchardt, "Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability.," *Gastroenterology*, vol. 96, no. 3, pp. 736–49, Mar. 1989.
- [66] C. A. Blank, D. A. Anderson, M. Beard, and S. M. Lemon, "Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cells with hepatitis A virus: vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes.," *J. Virol.*, vol. 74, no. 14, pp. 6476–84, Jul. 2000.

- [67] M. J. Snooks, P. Bhat, J. Mackenzie, N. A. Counihan, N. Vaughan, and D. A. Anderson, "Vectorial entry and release of hepatitis A virus in polarized human hepatocytes.," *J. Virol.*, vol. 82, no. 17, pp. 8733–42, Sep. 2008.
- [68] L. D'Andrea, "Efecto del uso de codones en la velocidad de traducción de la región codificante de la cápside en poblaciones del virus de la hepatitis A," Tesis doctoral, Universidad de Barcelona, Barcelona, 2015.
- [69] F. B. Hollinger and S. . Emerson, "Hepatitis A virus," in *D.M. Knipe, P.M. Howley (Eds.) Fields virology. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia*, 2007, pp. 911–47.
- [70] T. F. Clarke and P. L. Clark, "Increased incidence of rare codon clusters at 5' and 3' gene termini: implications for function.," *BMC Genomics*, vol. 11, p. 118, Jan. 2010.
- [71] F. Yamao, Y. Andachi, A. Muto, T. Ikemura, and S. Osawa, "Levels of tRNAs in bacterial cells as affected by amino acid usage in proteins.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 19, no. 22, pp. 6119–22, Nov. 1991.
- [72] S. Zhang, E. Goldman, and G. Zubay, "Clustering of low usage codons and ribosome movement.," *J. Theor. Biol.*, vol. 170, no. 4, pp. 339–54, Oct. 1994.
- [73] A. H. Rosenberg, E. Goldman, J. J. Dunn, F. W. Studier, and G. Zubay, "Effects of consecutive AGG codons on translation in Escherichia coli, demonstrated with a versatile codon test system.," *J. Bacteriol.*, vol. 175, no. 3, pp. 716–22, Feb. 1993.
- [74] T. A. Thanaraj and P. Argos, "Ribosome-mediated translational pause and protein domain organization.," *Protein Sci.*, vol. 5, no. 8, pp. 1594–612, Aug. 1996.
- [75] M. S. Evans, T. F. Clarke, and P. L. Clark, "Conformations of co-translational folding intermediates.," *Protein Pept. Lett.*, vol. 12, no. 2, pp. 189–95, Feb. 2005.
- [76] R. Andino and E. Domingo, "Viral quasispecies.," *Virology*, vol. 479–480, pp. 46–51, Mar. 2015.
- [77] J. W. Drake, "Rates of spontaneous mutation among RNA viruses.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 9, pp. 4171–5, May 1993.
- [78] J. Holland, K. Spindler, F. Horodyski, E. Grabau, S. Nichol, and S. VandePol, "Rapid evolution of RNA genomes.," *Science*, vol. 215, no. 4540, pp. 1577–85, Mar. 1982.
- [79] E. Domingo, E. Baranowski, J. I. Nuñez, C. M. Ruiz-Jarabo, S. Sierra, N. Molina,

Bibliografía

- and F. Sobrino, "Cuasiespecies y evolución molecular de virus," *Rev. Sci. Tech.*, vol. 19, no. 1, pp. 55–63, 2000.
- [80] M. Eigen, "Viral quasispecies.," *Sci. Am.*, vol. 269, no. 1, pp. 42–9, Jul. 1993.
- [81] A. S. Lauring and R. Andino, "Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses.," *PLoS Pathog.*, vol. 6, no. 7, p. e1001005, Jan. 2010.
- [82] T. Dobzhansky, "A review of some fundamental concepts and problems of population genetics.," *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, vol. 20, pp. 1–15, Jan. 1955.
- [83] I. S. Novella, E. A. Duarte, S. F. Elena, A. Moya, E. Domingo, and J. J. Holland, "Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 92, no. 13, pp. 5841–5844, 1995.
- [84] D. K. Clarke, E. A. Duarte, A. Moya, S. F. Elena, E. Domingo, and J. Holland, "Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses.," *J. Virol.*, vol. 67, no. 1, pp. 222–8, Jan. 1993.
- [85] I. S. Novella, J. Quer, E. Domingo, and J. J. Holland, "Exponential fitness gains of RNA virus populations are limited by bottleneck effects.," *J. Virol.*, vol. 73, no. 2, pp. 1668–71, Feb. 1999.
- [86] S. F. Elena, V. S. Cooper, and R. E. Lenski, "Punctuated evolution caused by selection of rare beneficial mutations.," *Science*, vol. 272, no. 5269, pp. 1802–4, Jun. 1996.
- [87] J. C. de la Torre and J. J. Holland, "RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny," *J. Virol.*, vol. 64, no. 12, pp. 6278–6281, 1990.
- [88] R. Miralles, P. J. Gerrish, A. Moya, and S. F. Elena, "Clonal interference and the evolution of RNA viruses.," *Science*, vol. 285, no. 5434, pp. 1745–7, Sep. 1999.
- [89] S. Ojosnegros, N. Beerenwinkel, T. Antal, M. A. Nowak, C. Escarmís, and E. Domingo, "Competition-colonization dynamics in an RNA virus.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 5, pp. 2108–12, Feb. 2010.
- [90] P. E. Turner and L. Chao, "Prisoner's dilemma in an RNA virus.," *Nature*, vol. 398, no. 6726, pp. 441–3, Apr. 1999.
- [91] E. A. Duarte, I. S. Novella, S. Ledesma, D. K. Clarke, A. Moya, S. F. Elena, E. Domingo, and J. J. Holland, "Subclonal components of consensus fitness in an RNA virus clone.," *J. Virol.*, vol. 68, no. 7, pp. 4295–301, Jul. 1994.
- [92] R. B. Hitchman, D. J. Hodgson, L. A. King, R. S. Hails, J. S. Cory, and R. D.

- Possee, "Host mediated selection of pathogen genotypes as a mechanism for the maintenance of baculovirus diversity in the field," *J. Invertebr. Pathol.*, vol. 94, no. 3, pp. 153–62, Mar. 2007.
- [93] M. López-Ferber, O. Simón, T. Williams, and P. Caballero, "Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes," *Proc. Biol. Sci.*, vol. 270, no. 1530, pp. 2249–55, Nov. 2003.
- [94] L. Cicin-Sain, J. Podlech, M. Messerle, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski, "Frequent coinfection of cells explains functional in vivo complementation between cytomegalovirus variants in the multiply infected host," *J. Virol.*, vol. 79, no. 15, pp. 9492–502, Aug. 2005.
- [95] M. Vignuzzi, J. K. Stone, J. J. Arnold, C. E. Cameron, and R. Andino, "Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population," *Nature*, vol. 439, no. 7074, pp. 344–8, Jan. 2006.
- [96] H. A. Orr, "Fitness and its role in evolutionary genetics," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 10, no. 8, pp. 531–9, Aug. 2009.
- [97] G. Sanchez, A. Bosch, G. Gomez-Mariano, E. Domingo, and R. M. Pinto, "Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome," *Virology*, vol. 315, no. 1, pp. 34–42, 2003.
- [98] L. Lu, K. Z. Ching, V. S. de Paula, T. Nakano, G. Siegl, M. Weitz, and B. H. Robertson, "Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate)," *J. Gen. Virol.*, vol. 85, no. Pt 10, pp. 2943–52, Oct. 2004.
- [99] M. Costa-Mattioli, J. Cristina, H. Romero, R. Perez-Bercof, D. Casane, R. Colina, L. Garcia, I. Vega, G. Glikman, V. Romanowsky, A. Castello, E. Nicand, M. Gassin, S. Billaudel, and V. Ferré, "Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein," *J. Virol.*, vol. 76, no. 18, pp. 9516–25, Sep. 2002.
- [100] U. Perez-Sautu, M. I. Costafreda, J. Lite, R. Sala, I. Barrabeig, A. Bosch, and R. M. Pinto, "Molecular epidemiology of hepatitis A virus infections in Catalonia, Spain, 2005-2009: circulation of newly emerging strains," *J Clin Virol*, vol. 52, no. 2, pp. 98–102, 2011.
- [101] J. Cristina and M. Costa-Mattioli, "Genetic variability and molecular evolution of hepatitis A virus," *Virus Res.*, vol. 127, no. 2, pp. 151–7, Aug. 2007.
- [102] A. E. Fiore, A. Wasley, and B. P. Bell, "Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)," *MMWR. Recomm. Rep.*, vol. 55, no. RR-7, pp.

Bibliografia

- 1–23, 2006.
- [103] M. S. Wolfe, “Hepatitis A and the American traveler.,” *J. Infect. Dis.*, vol. 171 Suppl, pp. S29–32, Mar. 1995.
- [104] L. R. Mathiesen, J. Drucker, D. Lorenz, J. A. Wagner, R. J. Gerety, and R. H. Purcell, “Localization of hepatitis A antigen in marmoset organs during acute infection with hepatitis A virus.,” *J. Infect. Dis.*, vol. 138, no. 3, pp. 369–77, Sep. 1978.
- [105] A. Dotzauer, M. Brenner, U. Gebhardt, and A. Vallbracht, “IgA-coated particles of Hepatitis A virus are translocated antivectorially from the apical to the basolateral site of polarized epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor.,” *J. Gen. Virol.*, vol. 86, no. Pt 10, pp. 2747–51, Oct. 2005.
- [106] L. Ouzilou, E. Caliot, I. Pelletier, M.-C. Prévost, E. Pringault, and F. Colbère-Garapin, “Poliovirus transcytosis through M-like cells.,” *J. Gen. Virol.*, vol. 83, no. Pt 9, pp. 2177–82, Sep. 2002.
- [107] S. A. Boone and C. P. Gerba, “Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 6, pp. 1687–96, Mar. 2007.
- [108] R. E. Lanford, Z. Feng, D. Chavez, B. Guerra, K. M. Brasky, Y. Zhou, D. Yamane, A. S. Perelson, C. M. Walker, and S. M. Lemon, “Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferon response and persistence of intrahepatic viral RNA.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 27, pp. 11223–8, Jul. 2011.
- [109] L. Qu, Z. Feng, D. Yamane, Y. Liang, R. E. Lanford, K. Li, and S. M. Lemon, “Disruption of TLR3 signaling due to cleavage of TRIF by the hepatitis A virus protease-polymerase processing intermediate, 3CD.,” *PLoS Pathog.*, vol. 7, no. 9, p. e1002169, Sep. 2011.
- [110] D. Wang, L. Fang, D. Wei, H. Zhang, R. Luo, H. Chen, K. Li, and S. Xiao, “Hepatitis A virus 3C protease cleaves NEMO to impair induction of beta interferon.,” *J. Virol.*, vol. 88, no. 17, pp. 10252–8, Sep. 2014.
- [111] Z. Feng, Y. Li, K. L. McKnight, L. Hensley, R. E. Lanford, C. M. Walker, and S. M. Lemon, “Human pDCs preferentially sense enveloped hepatitis A virions.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 125, no. 1, pp. 169–76, Jan. 2015.
- [112] S. M. Lemon and L. N. Binn, “Serum neutralizing antibody response to hepatitis A virus.,” *J. Infect. Dis.*, vol. 148, no. 6, pp. 1033–9, Dec. 1983.
- [113] S. Hong, H. W. Lee, D.-Y. Chang, S. You, J. Kim, J. Y. Park, S. H. Ahn, D. Yong, K.-

- H. Han, O. J. Yoo, and E.-C. Shin, "Antibody-secreting cells with a phenotype of Ki-67^{low}, CD138^{high}, CD31^{high}, and CD38^{high} secrete nonspecific IgM during primary hepatitis A virus infection," *J. Immunol.*, vol. 191, no. 1, pp. 127–34, Jul. 2013.
- [114] B. Flehmig, J. Zahn, and A. Vallbracht, "Levels of neutralizing and binding antibodies to hepatitis-A virus after onset of icterus: a comparison," *J. Infect. Dis.*, vol. 150, no. 3, p. 461, Sep. 1984.
- [115] J. T. Stapleton, D. K. Lange, J. W. LeDuc, L. N. Binn, R. W. Jansen, and S. M. Lemon, "The role of secretory immunity in hepatitis A virus infection," *J. Infect. Dis.*, vol. 163, no. 1, pp. 7–11, Jan. 1991.
- [116] J. T. Stapleton, "Host immune response to hepatitis A virus.," *J. Infect. Dis.*, vol. 171 Suppl , pp. S9–14, Mar. 1995.
- [117] Y. Zhou, B. Callendret, D. Xu, K. M. Brasky, Z. Feng, L. L. Hensley, J. Guedj, A. S. Perelson, S. M. Lemon, R. E. Lanford, and C. M. Walker, "Dominance of the CD4(+) T helper cell response during acute resolving hepatitis A virus infection," *J. Exp. Med.*, vol. 209, no. 8, pp. 1481–92, Jul. 2012.
- [118] Y. S. Choi, J. Lee, H. W. Lee, D.-Y. Chang, P. S. Sung, M. K. Jung, J. Y. Park, J. K. Kim, J. Il Lee, H. Park, J. Y. Cheong, K.-S. Suh, H. J. Kim, J. S. Lee, K.-A. Kim, and E.-C. Shin, "Liver injury in acute hepatitis A is associated with decreased frequency of regulatory T cells caused by Fas-mediated apoptosis.," *Gut*, vol. 64, no. 8, pp. 1303–13, Aug. 2015.
- [119] M. Manangeeswaran, J. Jacques, C. Tami, K. Konduru, N. Amharref, O. Perrella, J. M. Casasnovas, D. T. Umetsu, R. H. Dekruyff, G. J. Freeman, A. Perrella, and G. G. Kaplan, "Binding of hepatitis A virus to its cellular receptor 1 inhibits T-regulatory cell functions in humans.," *Gastroenterology*, vol. 142, no. 7, pp. 1516–25.e3, Jun. 2012.
- [120] J. J. Berge, D. P. Drennan, R. J. Jacobs, A. Jakins, A. S. Meyerhoff, W. Stubblefield, and M. Weinberg, "The cost of hepatitis A infections in American adolescents and adults in 1997.," *Hepatology*, vol. 31, no. 2, pp. 469–73, Feb. 2000.
- [121] "WHO position paper on hepatitis A vaccines – June 2012.," *Wkly. Epidemiol. Rec. / Heal. Sect. Secr. Leag. Nations*, vol. 87, no. 28/29, pp. 261–76, Jul. 2012.
- [122] L. D'Andrea, F. J. Pérez-Rodríguez, M. de Castellarnau, S. Manzanares, J. Lite, S. Guix, A. Bosch, and R. M. Pintó, "Hepatitis A virus genotype distribution during a decade of universal vaccination of preadolescents.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 4, pp. 6842–54, Jan. 2015.
- [123] R. S. Koff, "Hepatitis A.," *Lancet*, vol. 351, no. 9116, pp. 1643–9, May 1998.

Bibliografia

- [124] M. I. Costafreda, A. Bosch, and R. M. Pinto, "Development, Evaluation, and Standardization of a Real-Time TaqMan Reverse Transcription-PCR Assay for Quantification of Hepatitis A Virus in Clinical and Shellfish Samples," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 6, pp. 3846–3855, Jun. 2006.
- [125] W. A. Bower, O. V Nainan, X. Han, and H. S. Margolis, "Duration of viremia in hepatitis A virus infection.," *J. Infect. Dis.*, vol. 182, no. 1, pp. 12–7, Jul. 2000.
- [126] V. S. de Paula, "Laboratory diagnosis of hepatitis A," *Future Virol.*, vol. 7, no. 5, pp. 461–72, 2012.
- [127] E. A. Fagan and R. Williams, "Fulminant viral hepatitis.," *Br. Med. Bull.*, vol. 46, no. 2, pp. 462–80, Apr. 1990.
- [128] W. M. Lee, "Acute liver failure.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 329, no. 25, pp. 1862–72, Dec. 1993.
- [129] G. Rezende, A. M. Roque-Afonso, D. Samuel, M. Gigou, E. Nicand, V. Ferre, E. Dussaix, H. Bismuth, and C. Féray, "Viral and clinical factors associated with the fulminant course of hepatitis A infection.," *Hepatology*, vol. 38, no. 3, pp. 613–8, Sep. 2003.
- [130] H. Y. Kim, M. B. Eyheramonho, M. Pichavant, C. Gonzalez Cambaceres, P. Matangkasombut, G. Cervio, S. Kuperman, R. Moreiro, K. Konduru, M. Manangeeswaran, G. J. Freeman, G. G. Kaplan, R. H. DeKruyff, D. T. Umetsu, and S. D. Rosenzweig, "A polymorphism in TIM1 is associated with susceptibility to severe hepatitis A virus infection in humans.," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 3, pp. 1111–8, Mar. 2011.
- [131] K. Fujiwara, O. Yokosuka, T. Ehata, H. Saisho, N. Saotome, K. Suzuki, K. Okita, K. Kiyosawa, and M. Omata, "Association between severity of type A hepatitis and nucleotide variations in the 5' non-translated region of hepatitis A virus RNA: strains from fulminant hepatitis have fewer nucleotide substitutions.," *Gut*, vol. 51, no. 1, pp. 82–8, Jul. 2002.
- [132] S. Vento, "Fulminant hepatitis associated with hepatitis A virus superinfection in patients with chronic hepatitis C.," *J. Viral Hepat.*, vol. 7 Suppl 1, pp. 7–8, May 2000.
- [133] A. Mele, M. E. Tosti, and T. Stroffolini, "Hepatitis associated with hepatitis A superinfection in patients with chronic hepatitis C.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 338, no. 24, p. 1771; author reply 1772–3, Jun. 1998.
- [134] S. Hadler, "Global impact of hepatitis A virus infection: changing patterns," *Hollinger FB, Lemon SM, Margolis H, eds. Viral Hepat. liver Dis. Proc. 1990 Int. Symp. Viral Hepatitis. Balt. Williams Wilkins*, pp. 14–20, 1991.

- [135] D. Rein, "Modeling the global burden of hepatitis A virus infections in 1990 and 2005," *Poster Present. Liver Meet.* <http://liverlearning.aasld.org/aasld/2011/thelivermeeting/14085/doctor.david.rein.modeling.the.global.burden.of.hepatitis.a.virus.infecti>, 2011.
- [136] S. M. Lemon, "Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention.," *Clin. Chem.*, vol. 43, no. 8 Pt 2, pp. 1494–9, Aug. 1997.
- [137] T. Löscher, J. S. Keystone, and R. Steffen, "Vaccination of travelers against hepatitis A and B.," *J. Travel Med.*, vol. 6, no. 2, pp. 107–14, Jun. 1999.
- [138] J. C. Victor, A. S. Monto, T. Y. Surdina, S. Z. Suleimenova, G. Vaughan, O. V Nainan, M. O. Favorov, H. S. Margolis, and B. P. Bell, "Hepatitis A vaccine versus immune globulin for postexposure prophylaxis.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 357, no. 17, pp. 1685–94, Oct. 2007.
- [139] S. M. Lemon and C. N. Shapiro, "The value of immunization against hepatitis A.," *Infect. Agents Dis.*, vol. 3, no. 1, pp. 38–49, Feb. 1994.
- [140] B. P. Bell, C. N. Shapiro, M. J. Alter, L. A. Moyer, F. N. Judson, K. Mottram, M. Fleenor, P. L. Ryder, and H. S. Margolis, "The diverse patterns of hepatitis A epidemiology in the United States-implications for vaccination strategies.," *J. Infect. Dis.*, vol. 178, no. 6, pp. 1579–84, Dec. 1998.
- [141] A. Das, "An economic analysis of different strategies of immunization against hepatitis A virus in developed countries.," *Hepatology*, vol. 29, no. 2, pp. 548–52, Feb. 1999.
- [142] R. Steffen, M. A. Kane, C. N. Shapiro, N. Billo, K. J. Schoellhorn, and P. van Damme, "Epidemiology and prevention of hepatitis A in travelers.," *JAMA*, vol. 272, no. 11, pp. 885–9, Sep. 1994.
- [143] E. Franco, C. Giambi, R. Ialacci, R. C. Coppola, and A. R. Zanetti, "Risk groups for hepatitis A virus infection.," *Vaccine*, vol. 21, no. 19–20, pp. 2224–33, Jun. 2003.
- [144] P. L. Lopalco, L. Salleras, S. Barbuti, C. Germinario, M. Bruguera, M. Buti, and A. Domínguez, "Hepatitis A and B in children and adolescents--what can we learn from Puglia (Italy) and Catalonia (Spain)?," *Vaccine*, vol. 19, no. 4–5, pp. 470–4, Oct. 2000.
- [145] R. Dagan, A. Leventhal, E. Anis, P. Slater, Y. Ashur, and D. Shouval, "Incidence of hepatitis A in Israel following universal immunization of toddlers.," *JAMA*, vol. 294, no. 2, pp. 202–10, Jul. 2005.
- [146] A. Wasley, T. Samandari, and B. P. Bell, "Incidence of hepatitis A in the United

Bibliografia

- States in the era of vaccination.," *JAMA*, vol. 294, no. 2, pp. 194–201, Jul. 2005.
- [147] E. G. Fisenka, F. A. Germanovich, I. N. Glinskaya, O. I. Lyabis, and A. M. Rasuli, "Effectiveness of universal hepatitis A immunization of children in Minsk City, Belarus: four-year follow-up.," *J. Viral Hepat.*, vol. 15 Suppl 2, pp. 57–61, Oct. 2008.
- [148] P. Meyerhoff, AS Jacobs, RJ Margolis, HS Coleman, "Cost effectiveness of childhood hepatitis A vaccination in the USA," *Antivir Ther*, vol. 5, no. Suppl 1, 2000.
- [149] L. L. Hammitt, L. Bulkow, T. W. Hennessy, C. Zanis, M. Snowball, J. L. Williams, B. P. Bell, and B. J. McMahon, "Persistence of antibody to hepatitis A virus 10 years after vaccination among children and adults.," *J. Infect. Dis.*, vol. 198, no. 12, pp. 1776–82, Dec. 2008.
- [150] J. B. Cederna, D. Klinzman, and J. T. Stapleton, "Hepatitis A virus-specific humoral and cellular immune responses following immunization with a formalin-inactivated hepatitis A vaccine.," *Vaccine*, vol. 18, no. 9–10, pp. 892–8, Dec. 1999.
- [151] M. R. Hilleman, "Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries.," *Vaccine*, vol. 18, no. 15, pp. 1436–47, Feb. 2000.
- [152] S. Mueller, J. R. Coleman, and E. Wimmer, "Putting synthesis into biology: a viral view of genetic engineering through de novo gene and genome synthesis.," *Chem. Biol.*, vol. 16, no. 3, pp. 337–47, Mar. 2009.
- [153] R. J. Daemer, S. M. Feinstone, I. D. Gust, and R. H. Purcell, "Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage.," *Infect. Immun.*, vol. 32, no. 1, pp. 388–93, Apr. 1981.
- [154] B. Flehmig, "Hepatitis A-virus in cell culture: I. propagation of different hepatitis A-virus isolates in a fetal rhesus monkey kidney cell line (Frhk-4).," *Med. Microbiol. Immunol.*, vol. 168, no. 4, pp. 239–48, Jan. 1980.
- [155] L. N. Binn, S. M. Lemon, R. H. Marchwicki, R. R. Redfield, N. L. Gates, and W. H. Bancroft, "Primary isolation and serial passage of hepatitis A virus strains in primate cell cultures.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 20, no. 1, pp. 28–33, Jul. 1984.
- [156] P. J. Provost and M. R. Hilleman, "Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro.," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol. 160, no. 2, pp. 213–21, Feb. 1979.
- [157] A. Dotzauer, S. M. Feinstone, and G. Kaplan, "Susceptibility of nonprimate cell

- lines to hepatitis A virus infection.," *J. Virol.*, vol. 68, no. 9, pp. 6064–8, Sep. 1994.
- [158] L. Potash, R. M. Chanock, R. H. Purcell, and A. Z. Kapikian, "Method for producing a virus from an african green monkey kidney cell line," Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Patent No. 6,025,182, 2000.
- [159] F. D. LaBrecque, D. R. LaBrecque, D. Klinzman, S. Perlman, J. B. Cederna, P. L. Winokur, J. Q. Han, and J. T. Stapleton, "Recombinant hepatitis A virus antigen: improved production and utility in diagnostic immunoassays.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 36, no. 7, pp. 2014–8, Jul. 1998.
- [160] V. Gauss-Müller and Y. Y. Kusov, "Replication of a hepatitis A virus replicon detected by genetic recombination in vivo.," *J. Gen. Virol.*, vol. 83, no. Pt 9, pp. 2183–92, Sep. 2002.
- [161] S. U. Emerson, Y. K. Huang, C. McRill, M. Lewis, and R. H. Purcell, "Mutations in both the 2B and 2C genes of hepatitis A virus are involved in adaptation to growth in cell culture," *J. Virol.*, vol. 66, no. 2, pp. 650–654, 1992.
- [162] S. P. Day, P. Murphy, E. A. Brown, and S. M. Lemon, "Mutations within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA which enhance replication in BS-C-1 cells," *J. Virol.*, vol. 66, no. 11, pp. 6533–6540, 1992.
- [163] D. E. Schultz, M. Honda, L. E. Whetter, K. L. McKnight, and S. M. Lemon, "Mutations within the 5' nontranslated RNA of cell culture-adapted hepatitis A virus which enhance cap-independent translation in cultured African green monkey kidney cells.," *J. Virol.*, vol. 70, no. 2, pp. 1041–9, Feb. 1996.
- [164] S. U. Emerson, Y. K. Huang, and R. H. Purcell, "2B and 2C mutations are essential but mutations throughout the genome of HAV contribute to adaptation to cell culture.," *Virology*, vol. 194, no. 2, pp. 475–80, Jun. 1993.
- [165] J. I. Cohen, B. Rosenblum, S. M. Feinstone, J. Ticehurst, and R. H. Purcell, "Attenuation and cell culture adaptation of hepatitis A virus (HAV): a genetic analysis with HAV cDNA," *J. Virol.*, vol. 63, no. 12, pp. 5364–5370, 1989.
- [166] J. I. Cohen, J. R. Ticehurst, S. M. Feinstone, B. Rosenblum, and R. H. Purcell, "Hepatitis A virus cDNA and its RNA transcripts are infectious in cell culture.," *J. Virol.*, vol. 61, no. 10, pp. 3035–9, Oct. 1987.
- [167] T. Cromeans, M. D. Sobsey, and H. A. Fields, "Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus," *J. Med. Virol.*, vol. 22, no. 1, pp. 45–56, 1987.
- [168] S. M. Lemon, P. C. Murphy, P. A. Shields, L. H. Ping, S. M. Feinstone, T.

Bibliografia

- Cromeans, and R. W. Jansen, "Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination.," *J. Virol.*, vol. 65, no. 4, pp. 2056–65, Apr. 1991.
- [169] K. Brack, W. Frings, A. Dotzauer, and A. Vallbracht, "A cytopathogenic, apoptosis-inducing variant of hepatitis A virus.," *J. Virol.*, vol. 72, no. 4, pp. 3370–6, Apr. 1998.
- [170] M. Kulka, M. S. Calvo, D. T. Ngo, S. Q. Wales, and B. B. Goswami, "Activation of the 2-5OAS/RNase L pathway in CVB1 or HAV/18f infected FRhK-4 cells does not require induction of OAS1 or OAS2 expression.," *Virology*, vol. 388, no. 1, pp. 169–84, May 2009.
- [171] B. B. Goswami, M. Kulka, D. Ngo, and T. A. Cebula, "Apoptosis induced by a cytopathic hepatitis A virus is dependent on caspase activation following ribosomal RNA degradation but occurs in the absence of 2'-5' oligoadenylate synthetase.," *Antiviral Res.*, vol. 63, no. 3, pp. 153–66, Sep. 2004.
- [172] B. J. McMahon, J. Williams, L. Bulkow, M. Snowball, R. Wainwright, M. Kennedy, and D. Krause, "Immunogenicity of an inactivated hepatitis A vaccine in Alaska Native children and Native and non-Native adults," *J. Infect. Dis.*, vol. 171, no. 3, pp. 676–679, 1995.
- [173] S. Riedemann, G. Reinhardt, H. Ibarra, and G. G. Frösner, "Immunogenicity and safety of a virosomal hepatitis A vaccine (Epaxal®) in healthy toddlers and children in Chile," *Acta Paediatr.*, vol. 93, no. 3, pp. 412–414, 2004.
- [174] E. Vidor, R. Dumas, V. Porteret, F. Bailleux, and K. Veitch, "Aventis Pasteur vaccines containing inactivated hepatitis A virus: a compilation of immunogenicity data," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 23, no. 4, pp. 300–309, 2004.
- [175] A. Werzberger, B. Mensch, B. Kuter, L. Brown, J. Lewis, R. Sitrin, W. Miller, D. Shouval, B. Wiens, and G. Calandra, "A controlled trial of a formalin-inactivated hepatitis A vaccine in healthy children," *N. Engl. J. Med.*, vol. 327, no. 7, pp. 453–457, 1992.
- [176] M. Stoffel, M. Lievens, I. Dieussaert, I. Martin, and F. André, "Immunogenicity of Twinrix™ in older adults: a critical analysis," *Expert Rev. Vaccines*, vol. 2, no. 1, pp. 9–14, 2003.
- [177] J. Beran, R. Chlibek, and F. Weber, "A combined dual-chamber typhoid/hepatitis A vaccine as a booster dose in hepatitis A primed adults," *Vaccine*, vol. 21, no. 32, pp. 4650–4654, 2003.
- [178] X.-Y. Wang, Z.-Y. Xu, J.-C. Ma, L. von Seidlein, Y. Zhang, Z.-Y. Hao, O. P. Han, Y.-L. Zhang, M.-Y. Tian, P.-Y. Ouyang, Z.-Y. Zhang, C.-Q. Han, Z.-C. Xing, and J.-C.

- Chen, "Long-term immunogenicity after single and booster dose of a live attenuated hepatitis A vaccine: results from 8-year follow-up.," *Vaccine*, vol. 25, no. 3, pp. 446–9, Jan. 2007.
- [179] V. Demicheli and D. Tiberti, "The effectiveness and safety of hepatitis A vaccine: a systematic review.," *Vaccine*, vol. 21, no. 19–20, pp. 2242–5, Jun. 2003.
- [180] V. S. de Paula, L. M. Villar, L. M. Morais, L. L. Lewis-Ximenez, C. Niel, and A. M. C. Gaspar, "Detection of hepatitis A virus RNA in serum during the window period of infection.," *J. Clin. Virol.*, vol. 29, no. 4, pp. 254–9, Apr. 2004.
- [181] T. Kiyohara, Y. Ouchi, Y. Hasegawa, T. Sato, T. Yoneyama, K. Ishii, T. Ito, and T. Wakita, "An in-house-anti-hepatitis A virus (HAV)-specific immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay: evaluation and application to an HAV outbreak.," *J. Med. Virol.*, vol. 81, no. 9, pp. 1513–6, Sep. 2009.
- [182] A. W. Funkhouser, D. E. Schultz, S. M. Lemon, R. H. Purcell, and S. U. Emerson, "Hepatitis A virus translation is rate-limiting for virus replication in MRC-5 cells," *Virology*, vol. 254, no. 2, pp. 268–278, 1999.
- [183] S. M. Browne and M. Al-Rubeai, "Selection methods for high-producing mammalian cell lines.," *Trends Biotechnol.*, vol. 25, no. 9, pp. 425–32, Sep. 2007.
- [184] J. J. Holland and J. A. Peterson, "Nucleic acid and protein synthesis during poliovirus infection of human cells.," *J. Mol. Biol.*, vol. 8, pp. 556–75, Apr. 1964.
- [185] D. Etchison, S. C. Milburn, I. Edery, N. Sonenberg, and J. W. Hershey, "Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex.," *J. Biol. Chem.*, vol. 257, no. 24, pp. 14806–10, Dec. 1982.
- [186] A. M. Borman and K. M. Kean, "Intact eukaryotic initiation factor 4G is required for hepatitis A virus internal initiation of translation," *Virology*, vol. 237, no. 1, pp. 129–136, 1997.
- [187] A. Widell, B. G. Hansson, E. Nordenfelt, and B. Oberg, "Enhancement of hepatitis A propagation in tissue culture with 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole.," *J. Med. Virol.*, vol. 24, no. 4, pp. 369–76, Apr. 1988.
- [188] D. A. Anderson, B. C. Ross, and S. A. Locarnini, "Restricted replication of hepatitis A virus in cell culture: encapsidation of viral RNA depletes the pool

Bibliografia

- of RNA available for replication.," *J. Virol.*, vol. 62, no. 11, pp. 4201–6, Nov. 1988.
- [189] L. Aragonès, S. Guix, E. Ribes, A. Bosch, and R. M. Pintó, "Fine-tuning translation kinetics selection as the driving force of codon usage bias in the hepatitis A virus capsid.," *PLoS Pathog.*, vol. 6, no. 3, p. e1000797, Mar. 2010.
- [190] H. M. Sobell, "Actinomycin and DNA transcription.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 82, no. 16, pp. 5328–31, Aug. 1985.
- [191] B. C. Y. Collard and D. J. Mackill, "Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century.," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 363, no. 1491, pp. 557–72, Feb. 2008.
- [192] J. C. M. Dekkers and F. Hospital, "The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 3, no. 1, pp. 22–32, Jan. 2002.
- [193] B. J. Hayes, P. J. Bowman, A. J. Chamberlain, and M. E. Goddard, "Invited review: Genomic selection in dairy cattle: progress and challenges.," *J. Dairy Sci.*, vol. 92, no. 2, pp. 433–43, Feb. 2009.
- [194] T. H. Meuwissen, B. J. Hayes, and M. E. Goddard, "Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps.," *Genetics*, vol. 157, no. 4, pp. 1819–29, Apr. 2001.
- [195] P. S. Schnable, D. Ware, R. S. Fulton, J. C. Stein, F. Wei, S. Pasternak, C. Liang, J. Zhang, L. Fulton, T. A. Graves, P. Minx, A. D. Reily, L. Courtney, S. S. Kruchowski, C. Tomlinson, C. Strong, K. Delehaunty, C. Fronick, B. Courtney, S. M. Rock, E. Belter, F. Du, K. Kim, R. M. Abbott, M. Cotton, A. Levy, P. Marchetto, K. Ochoa, S. M. Jackson, B. Gillam, W. Chen, L. Yan, J. Higginbotham, M. Cardenas, J. Waligorski, E. Applebaum, L. Phelps, J. Falcone, K. Kanchi, T. Thane, A. Scimone, N. Thane, J. Henke, T. Wang, J. Ruppert, N. Shah, K. Rotter, J. Hodges, E. Ingenthron, M. Cordes, S. Kohlberg, J. Sgro, B. Delgado, K. Mead, A. Chinwalla, S. Leonard, K. Crouse, K. Collura, D. Kudrna, J. Currie, R. He, A. Angelova, S. Rajasekar, T. Mueller, R. Lomeli, G. Scara, A. Ko, K. Delaney, M. Wissotski, G. Lopez, D. Campos, M. Braidotti, E. Ashley, W. Golser, H. Kim, S. Lee, J. Lin, Z. Dujmic, W. Kim, J. Talag, A. Zuccolo, C. Fan, A. Sebastian, M. Kramer, L. Spiegel, L. Nascimento, T. Zutavern, B. Miller, C. Ambroise, S. Muller, W. Spooner, A. Narechania, L. Ren, S. Wei, S. Kumari, B. Faga, M. J. Levy, L. McMahan, P. Van Buren, M. W. Vaughn, K. Ying, C.-T. Yeh, S. J. Emrich, Y. Jia, A. Kalyanaraman, A.-P. Hsia, W. B. Barbazuk, R. S. Baucom, T. P. Brutnell, N. C. Carpita, C. Chaparro, J.-M. Chia, J.-M. Deragon, J. C. Estill, Y. Fu, J. A. Jeddelloh, Y. Han, H. Lee, P. Li, D. R. Lisch, S. Liu, Z. Liu, D. H. Nagel, M. C. McCann, P. SanMiguel, A. M. Myers, D. Nettleton, J. Nguyen, B. W. Penning, L. Ponnala, K. L. Schneider, D. C. Schwartz, A. Sharma, C. Soderlund, N. M. Springer, Q. Sun, H. Wang, M. Waterman, R. Westerman, T. K. Wolfgruber, L. Yang, Y. Yu, L. Zhang, S. Zhou, Q. Zhu, J. L. Bennetzen, R. K.

- Dawe, J. Jiang, N. Jiang, G. G. Presting, S. R. Wessler, S. Aluru, R. A. Martienssen, S. W. Clifton, W. R. McCombie, R. A. Wing, and R. K. Wilson, "The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics.," *Science*, vol. 326, no. 5956, pp. 1112–5, Nov. 2009.
- [196] A. V Zimin, A. L. Delcher, L. Florea, D. R. Kelley, M. C. Schatz, D. Puiu, F. Hanrahan, G. Pertea, C. P. Van Tassell, T. S. Sonstegard, G. Marçais, M. Roberts, P. Subramanian, J. A. Yorke, and S. L. Salzberg, "A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*," *Genome Biol.*, vol. 10, no. 4, p. R42, Jan. 2009.
- [197] E. Domingo and J. J. Holland, "RNA virus mutations and fitness for survival.," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 51, pp. 151–78, Jan. 1997.
- [198] D. E. Schultz, C. C. Hardin, and S. M. Lemon, "Specific interaction of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with the 5'-nontranslated RNA of hepatitis A virus," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 24, pp. 14134–14142, 1996.
- [199] E. A. Brown, S. P. Day, R. W. Jansen, and S. M. Lemon, "The 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: secondary structure and elements required for translation in vitro.," *J. Virol.*, vol. 65, no. 11, pp. 5828–38, Nov. 1991.
- [200] E. A. Brown, A. J. Zajac, and S. M. Lemon, "In vitro characterization of an internal ribosomal entry site (IRES) present within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus," *J. Virol.*, vol. 68, no. 2, pp. 1066–1074, 1994.
- [201] M. J. Glass, X.-Y. Jia, and D. F. Summers, "Identification of the Hepatitis A Virus Internal Ribosome Entry Site: *in Vivo* and *in Vitro* Analysis of Bicistronic RNAs Containing the HAV 5' Noncoding Region," *Virology*, vol. 193, no. 2, pp. 842–852, 1993.
- [202] J. S. Carneiro, M. Equestre, P. Pagnotti, A. Gradi, N. Sonenberg, and R. P. Bercoff, "5' UTR of hepatitis A virus RNA: mutations in the 5'-most pyrimidine-rich tract reduce its ability to direct internal initiation of translation," *J. Gen. Virol.*, vol. 76, no. 5, pp. 1189–1196, 1995.
- [203] N. Redondo, M. A. Sanz, J. Steinberger, T. Skern, Y. Kusov, and L. Carrasco, "Translation directed by hepatitis A virus IRES in the absence of active eIF4F complex and eIF2.," *PLoS One*, vol. 7, no. 12, p. e52065, Jan. 2012.
- [204] S. Y. Le, J. H. Chen, N. Sonenberg, and J. V Maizel, "Conserved tertiary structural elements in the 5' nontranslated region of cardiovirus, aphthovirus and hepatitis A virus RNAs.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 21, no. 10, pp. 2445–51, May 1993.
- [205] E. V Pilipenko, A. P. Gmyl, S. V Maslova, Y. V Svitkin, A. N. Sinyakov, and V. I.

Bibliografia

- Agol, "Prokaryotic-like cis elements in the cap-independent internal initiation of translation on picornavirus RNA.," *Cell*, vol. 68, no. 1, pp. 119–31, Jan. 1992.
- [206] E. Martínez-Salas, R. Francisco-Velilla, J. Fernandez-Chamorro, G. Lozano, and R. Diaz-Toledano, "Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions," *Virus Res.*, vol. 206, pp. 62–73, Jan. 2015.
- [207] J. Graff, J. Cha, L. B. Blyn, and E. Ehrenfeld, "Interaction of poly (rC) binding protein 2 with the 5' noncoding region of hepatitis A virus RNA and its effects on translation," *J. Virol.*, vol. 72, no. 12, pp. 9668–9675, 1998.
- [208] R. Gosert, K. H. Chang, R. Rijnbrand, M. Yi, D. V Sangar, and S. M. Lemon, "Transient expression of cellular polypyrimidine-tract binding protein stimulates cap-independent translation directed by both picornaviral and flaviviral internal ribosome entry sites in vivo," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 5, pp. 1583–1595, 2000.
- [209] M. Yi, D. E. Schultz, and S. M. Lemon, "Functional significance of the interaction of hepatitis A virus RNA with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): opposing effects of GAPDH and polypyrimidine tract binding protein on internal ribosome entry site function," *J. Virol.*, vol. 74, no. 14, pp. 6459–6468, 2000.
- [210] K. H. Chang, E. A. Brown, and S. M. Lemon, "Cell type-specific proteins which interact with the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA," *J. Virol.*, vol. 67, no. 11, pp. 6716–6725, 1993.
- [211] X. Jiang, T. Kanda, S. Wu, S. Nakamoto, K. Saito, H. Shirasawa, T. Kiyohara, K. Ishii, T. Wakita, H. Okamoto, and O. Yokosuka, "Suppression of La antigen exerts potential antiviral effects against hepatitis A virus.," *PLoS One*, vol. 9, no. 7, p. e101993, Jan. 2014.
- [212] S. Cordes, Y. Kusov, T. Heise, and V. Gauss-Müller, "La autoantigen suppresses IRES-dependent translation of the hepatitis A virus," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 368, no. 4, pp. 1014–1019, 2008.
- [213] S. U. Emerson, C. McRill, B. Rosenblum, S. Feinstone, and R. H. Purcell, "Mutations responsible for adaptation of hepatitis A virus to efficient growth in cell culture," *J. Virol.*, vol. 65, no. 9, pp. 4882–4886, 1991.
- [214] S. Y. Le and M. Zuker, "Common structures of the 5' non-coding RNA in enteroviruses and rhinoviruses. Thermodynamical stability and statistical significance.," *J. Mol. Biol.*, vol. 216, no. 3, pp. 729–41, Dec. 1990.
- [215] M. A. Skinner, V. R. Racaniello, G. Dunn, J. Cooper, P. D. Minor, and J. W. Almond, "New model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA

- of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence.," *J. Mol. Biol.*, vol. 207, no. 2, pp. 379–92, May 1989.
- [216] S. Y. Le, J. H. Chen, N. Sonenberg, and J. V Maizel, "Conserved tertiary structure elements in the 5' untranslated region of human enteroviruses and rhinoviruses.," *Virology*, vol. 191, no. 2, pp. 858–66, Dec. 1992.
- [217] C. Wang, P. Sarnow, and A. Siddiqui, "A conserved helical element is essential for internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA.," *J. Virol.*, vol. 68, no. 11, pp. 7301–7, Nov. 1994.
- [218] S. K. Jang and E. Wimmer, "Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein.," *Genes Dev.*, vol. 4, no. 9, pp. 1560–72, Sep. 1990.
- [219] R. Kühn, N. Luz, and E. Beck, "Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus.," *J. Virol.*, vol. 64, no. 10, pp. 4625–31, Oct. 1990.
- [220] Y. K. Kim, S. H. Lee, C. S. Kim, S. K. Seol, and S. K. Jang, "Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation.," *RNA*, vol. 9, no. 5, pp. 599–606, May 2003.
- [221] I. Ventoso, M. A. Sanz, S. Molina, J. J. Berlanga, L. Carrasco, and M. Esteban, "Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR.," *Genes Dev.*, vol. 20, no. 1, pp. 87–100, Jan. 2006.
- [222] M. Yi and S. M. Lemon, "Replication of subgenomic hepatitis A virus RNAs expressing firefly luciferase is enhanced by mutations associated with adaptation of virus to growth in cultured cells," *J. Virol.*, vol. 76, no. 3, pp. 1171–1180, 2002.
- [223] J. B. Plotkin and G. Kudla, "Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 12, no. 1, pp. 32–42, Jan. 2011.
- [224] T. Ikemura, "Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 2, no. 1, pp. 13–34, Jan. 1985.
- [225] P. M. Sharp and W. H. Li, "An evolutionary perspective on synonymous codon usage in unicellular organisms.," *J. Mol. Evol.*, vol. 24, no. 1–2, pp. 28–38, Jan. 1986.

Bibliografia

- [226] T. Tuller, M. Kupiec, and E. Ruppin, "Determinants of protein abundance and translation efficiency in *S. cerevisiae*," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 3, no. 12, p. e248, Dec. 2007.
- [227] C. G. Kurland, "Translational accuracy and the fitness of bacteria," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 26, pp. 29–50, Jan. 1992.
- [228] Z. Yang and R. Nielsen, "Mutation-selection models of codon substitution and their use to estimate selective strengths on codon usage," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 25, no. 3, pp. 568–79, Mar. 2008.
- [229] S. Vicario, E. N. Moriyama, and J. R. Powell, "Codon usage in twelve species of *Drosophila*," *BMC Evol. Biol.*, vol. 7, p. 226, Jan. 2007.
- [230] M. Oresic, M. Dehn, D. Korenblum, and D. Shalloway, "Tracing specific synonymous codon-secondary structure correlations through evolution," *J. Mol. Evol.*, vol. 56, no. 4, pp. 473–84, Apr. 2003.
- [231] G. Zhang, M. Hubalewska, and Z. Ignatova, "Transient ribosomal attenuation coordinates protein synthesis and co-translational folding," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 16, no. 3, pp. 274–80, Mar. 2009.
- [232] C. Kimchi-Sarfaty, J. M. Oh, I.-W. Kim, Z. E. Sauna, A. M. Calcagno, S. V. Ambudkar, and M. M. Gottesman, "A 'silent' polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity," *Science*, vol. 315, no. 5811, pp. 525–8, Jan. 2007.
- [233] M. Kertesz, Y. Wan, E. Mazor, J. L. Rinn, R. C. Nutter, H. Y. Chang, and E. Segal, "Genome-wide measurement of RNA secondary structure in yeast," *Nature*, vol. 467, no. 7311, pp. 103–7, Sep. 2010.
- [234] M. Zuker, "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction," *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 13, pp. 3406–15, Jul. 2003.
- [235] A. Wagner, "Neutralism and selectionism: a network-based reconciliation," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 9, no. 12, pp. 965–74, Dec. 2008.
- [236] E. Welnowska, M. A. Sanz, N. Redondo, and L. Carrasco, "Translation of viral mRNA without active eIF2: the case of picornaviruses," *PLoS One*, vol. 6, no. 7, p. e22230, Jan. 2011.
- [237] K. Suzuki, M. Yanagi, A. Mori-Aoki, E. Moriyama, K. J. Ishii, and L. D. Kohn, "Transfection of single-stranded hepatitis A virus RNA activates MHC class I pathway," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 127, no. 2, pp. 234–42, Feb. 2002.
- [238] J. E. Wilson, T. V. Pestova, C. U. Hellen, and P. Sarnow, "Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome," *Cell*, vol. 102, no. 4, pp. 511–20,

Aug. 2000.

- [239] T. E. Dever, "Gene-specific regulation by general translation factors.," *Cell*, vol. 108, no. 4, pp. 545–56, Feb. 2002.
- [240] E. Martínez-Salas, S. López de Quinto, R. Ramos, and O. Fernández-Miragall, "IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity.," *Biochimie*, vol. 84, no. 8, pp. 755–63, Aug. 2002.
- [241] T.-D. M. Plank and J. S. Kieft, "The structures of nonprotein-coding RNAs that drive internal ribosome entry site function.," *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, vol. 3, no. 2, pp. 195–212, Jan. .
- [242] V. P. Mauro and G. M. Edelman, "rRNA-like sequences occur in diverse primary transcripts: Implications for the control of gene expression," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 94, no. 2, pp. 422–427, Jan. 1997.
- [243] P. Tranque, M. C. Hu, G. M. Edelman, and V. P. Mauro, "rRNA complementarity within mRNAs: a possible basis for mRNA-ribosome interactions and translational control.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 21, pp. 12238–43, Oct. 1998.
- [244] J. Dresios, S. A. Chappell, W. Zhou, and V. P. Mauro, "An mRNA-rRNA base-pairing mechanism for translation initiation in eukaryotes.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 13, no. 1, pp. 30–4, Jan. 2006.
- [245] G. C. Scheper, H. O. Voorma, and A. A. Thomas, "Basepairing with 18S ribosomal RNA in internal initiation of translation.," *FEBS Lett.*, vol. 352, no. 3, pp. 271–5, Oct. 1994.
- [246] M. C. Hu, P. Tranque, G. M. Edelman, and V. P. Mauro, "rRNA-complementarity in the 5' untranslated region of mRNA specifying the Gtx homeodomain protein: evidence that base-pairing to 18S rRNA affects translational efficiency.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 4, pp. 1339–44, Feb. 1999.
- [247] V. P. Mauro and G. M. Edelman, "The ribosome filter hypothesis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 19, pp. 12031–6, Sep. 2002.
- [248] S. U. Emerson, Y. K. Huang, C. McRill, M. Lewis, M. Shapiro, W. T. London, and R. H. Purcell, "Molecular basis of virulence and growth of hepatitis A virus in cell culture.," *Vaccine*, vol. 10 Suppl 1, pp. S36–9, Jan. 1992.
- [249] H. Zhang, S.-P. Chao, L.-H. Ping, K. Grace, B. Clarke, and S. M. Lemon, "An infectious cDNA clone of a cytopathic hepatitis A virus: genomic regions associated with rapid replication and cytopathic effect," *Virology*, vol. 212, no. 2, pp. 686–697, 1995.

Bibliografia

- [250] E. Martínez-Salas, J. C. Sáiz, M. Dávila, G. J. Belsham, and E. Domingo, "A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus leads to enhanced cap-independent translation in vivo.," *J. Virol.*, vol. 67, no. 7, pp. 3748–55, Jul. 1993.
- [251] B. Roizman, Capítulo 42: Multiplication. En: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX). University of Texas Medical Branch at Galveston. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8181/>. 1996.
- [252] G. Schmitz and A. Dotzauer, "Proof of hepatitis A virus negative-sense RNA by RNA/DNA-hybrid detection: a method for specific detection of both viral negative- and positive-strand RNA species.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 26, no. 22, pp. 5230–2, Nov. 1998.
- [253] F. Komurian-Pradel, M. Perret, B. Deiman, M. Sodoyer, V. Lotteau, G. Paranhos-Baccalà, and P. André, "Strand specific quantitative real-time PCR to study replication of hepatitis C virus genome.," *J. Virol. Methods*, vol. 116, no. 1, pp. 103–6, Mar. 2004.
- [254] R. E. Lanford, C. Sureau, J. R. Jacob, R. White, and T. R. Fuerst, "Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR.," *Virology*, vol. 202, no. 2, pp. 606–14, Aug. 1994.
- [255] R. L. Chaves, J. Graff, A. Normann, and B. Flehmig, "Specific detection of minus strand hepatitis A virus RNA by Tail-PCR following reverse transcription.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 22, no. 10, pp. 1919–20, May 1994.
- [256] V. S. de Paula, A. S. Perse, L. A. Amado, L. M. de Moraes, S. M. B. de Lima, R. S. Tourinho, A. M. C. Gaspar, and M. A. Pinto, "Kinetics of hepatitis A virus replication in vivo and in vitro using negative-strand quantitative PCR.," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 28, no. 10, pp. 1167–76, Oct. 2009.
- [257] A. W. Funkhouser, R. H. Purcell, E. D'Hondt, and S. U. Emerson, "Attenuated hepatitis A virus: genetic determinants of adaptation to growth in MRC-5 cells," *J. Virol.*, vol. 68, no. 1, pp. 148–157, 1994.
- [258] A. Totsuka and Y. Moritsugu, "Hepatitis A Vaccine Development in Japan," in *Nishioka, K.; Suzuki, H.; Mishiro, S. and Oda.T. (eds), Viral Hepatitis and Liver Disease. Springer-Verlag, Tokyo, Japan.*, 1994, pp. 509–13.
- [259] S. Mueller, D. Papamichail, J. R. Coleman, S. Skiena, and E. Wimmer, "Reduction of the rate of poliovirus protein synthesis through large-scale codon deoptimization causes attenuation of viral virulence by lowering specific infectivity.," *J. Virol.*, vol. 80, no. 19, pp. 9687–96, Oct. 2006.

- [260] W. Kabsch and C. Sander, "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features.," *Biopolymers*, vol. 22, no. 12, pp. 2577–637, Dec. 1983.
- [261] G. Cannarozzi, G. Cannarozzi, N. N. Schraudolph, M. Faty, P. von Rohr, M. T. Friberg, A. C. Roth, P. Gonnet, G. Gonnet, and Y. Barral, "A role for codon order in translation dynamics.," *Cell*, vol. 141, no. 2, pp. 355–67, Apr. 2010.
- [262] M. A. Sørensen, C. G. Kurland, and S. Pedersen, "Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*.," *J. Mol. Biol.*, vol. 207, no. 2, pp. 365–77, May 1989.
- [263] C. Tu, T. H. Tzeng, and J. A. Bruenn, "Ribosomal movement impeded at a pseudoknot required for frameshifting.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, no. 18, pp. 8636–40, Sep. 1992.
- [264] S. Ojosnegros Martos, "Dinamica evolutiva de virus RNA," Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, 2009.
- [265] M. López-Villavicencio, F. Courjol, A. K. Gibson, M. E. Hood, O. Jonot, J. A. Shykoff, and T. Giraud, "Competition, cooperation among kin, and virulence in multiple infections.," *Evolution (N. Y.)*, vol. 65, no. 5, pp. 1357–1366, May 2011.
- [266] N. Sevilla, C. M. Ruiz-Jarabo, G. Gómez-Mariano, E. Baranowski, and E. Domingo, "An RNA virus can adapt to the multiplicity of infection.," *J. Gen. Virol.*, vol. 79 [Pt 12, pp. 2971–80, Dec. 1998.
- [267] I. S. Novella, D. D. Reissig, and C. O. Wilke, "Density-dependent selection in vesicular stomatitis virus.," *J. Virol.*, vol. 78, no. 11, pp. 5799–804, Jun. 2004.
- [268] P. E. Turner and L. Chao, "Sex and the evolution of intrahost competition in RNA virus phi6.," *Genetics*, vol. 150, no. 2, pp. 523–32, Oct. 1998.
- [269] C. Condit, "Principles of virology," in *Knipe DM, Howley PM (eds) Fields virology. Lippincot Williams and Wilkins, Philadelphia*, 2001, pp. 811–5.
- [270] S. Sierra, M. Dávila, P. R. Lowenstein, and E. Domingo, "Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis: influence of viral load and fitness in loss of infectivity.," *J. Virol.*, vol. 74, no. 18, pp. 8316–23, Sep. 2000.
- [271] M. Volkenstein, "Physical approaches to biological evolution. Berlin, Germany: Springer-Verlag KG," 1994.
- [272] R. Kassen and G. Bell, "The ecology and genetics of fitness in *Chlamydomonas*. X. The relationship between genetic correlation and genetic distance.," *Evolution*, vol. 54, no. 2, pp. 425–32, Apr. 2000.

Bibliografia

- [273] S. D. Smith-Tsurkan, R. A. Herr, S. Khuder, C. O. Wilke, and I. S. Novella, "The role of environmental factors on the evolution of phenotypic diversity in vesicular stomatitis virus populations," *J. Gen. Virol.*, vol. 94, no. Pt 4, pp. 860–8, Apr. 2013.
- [274] C. M. Ruiz-Jarabo, N. Pariente, E. Baranowski, M. Dávila, G. Gómez-Mariano, and E. Domingo, "Expansion of host-cell tropism of foot-and-mouth disease virus despite replication in a constant environment," *J. Gen. Virol.*, vol. 85, no. Pt 8, pp. 2289–97, Aug. 2004.
- [275] E. Domingo, "Quasispecies Theory in Virology," *J. Virol.*, vol. 76, no. 1, pp. 463–465, Jan. 2002.
- [276] B. T. Grenfell, O. G. Pybus, J. R. Gog, J. L. N. Wood, J. M. Daly, J. A. Mumford, and E. C. Holmes, "Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens," *Science*, vol. 303, no. 5656, pp. 327–32, Jan. 2004.
- [277] M. R. Beard, L. Cohen, S. M. Lemon, and A. Martin, "Characterization of recombinant hepatitis A virus genomes containing exogenous sequences at the 2A/2B junction," *J. Virol.*, vol. 75, no. 3, pp. 1414–26, Feb. 2001.
- [278] D. Posada and K. A. Crandall, "Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 24, pp. 13757–13762, Nov. 2001.
- [279] J. Maynard Smith and N. H. Smith, "Detecting recombination from gene trees," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 15, no. 5, pp. 590–9, May 1998.
- [280] M. W. Cho, N. Teterina, D. Egger, K. Bienz, and E. Ehrenfeld, "Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells," *Virology*, vol. 202, no. 1, pp. 129–45, Jul. 1994.
- [281] Y. Y. Kusov, C. Probst, M. Jecht, P. D. Jost, and V. Gauss-Müller, "Membrane association and RNA binding of recombinant hepatitis A virus protein 2C," *Arch. Virol.*, vol. 143, no. 5, pp. 931–44, Jan. 1998.
- [282] T. Pfister and E. Wimmer, "Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 11, pp. 6992–7001, Mar. 1999.
- [283] K. Konduru and G. G. Kaplan, "Determinants in 3Dpol modulate the rate of growth of hepatitis A virus," *J. Virol.*, vol. 84, no. 16, pp. 8342–7, Aug. 2010.
- [284] I. K. Ali, L. McKendrick, S. J. Morley, and R. J. Jackson, "Activity of the hepatitis A virus IRES requires association between the cap-binding translation

- initiation factor (eIF4E) and eIF4G," *J. Virol.*, vol. 75, no. 17, pp. 7854–7863, 2001.
- [285] S. Mueller, J. R. Coleman, D. Papamichail, C. B. Ward, A. Nimnual, B. Futcher, S. Skiena, and E. Wimmer, "Live attenuated influenza virus vaccines by computer-aided rational design," *Nat. Biotechnol.*, vol. 28, no. 7, pp. 723–6, Jul. 2010.
- [286] B. Wang, C. Yang, G. Tekes, S. Mueller, A. Paul, S. P. J. Whelan, and E. Wimmer, "Recoding of the vesicular stomatitis virus L gene by computer-aided design provides a live, attenuated vaccine candidate," *MBio*, vol. 6, no. 2, Jan. 2015.
- [287] J. C. M. Dekkers, "Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons," *J. Anim. Sci.*, vol. 82 E-Suppl, pp. E313–328, Jan. 2004.
- [288] J. Quer, J. Gregori, F. Rodríguez-Frias, M. Buti, A. Madejon, S. Perez-del-Pulgar, D. Garcia-Cehic, R. Casillas, M. Blasi, M. Homs, D. Tabernero, M. Alvarez-Tejado, J. M. Muñoz, M. Cubero, A. Caballero, J. A. del Campo, E. Domingo, I. Belmonte, L. Nieto, S. Lens, P. Muñoz-de-Rueda, P. Sanz-Cameno, S. Sauleda, M. Bes, J. Gomez, C. Briones, C. Perales, J. Sheldon, L. Castells, L. Viladomiu, J. Salmeron, A. Ruiz-Extremuera, R. Quiles-Pérez, R. Moreno-Otero, R. López-Rodríguez, H. Allende, M. Romero-Gómez, J. Guardia, R. Esteban, J. Garcia-Samaniego, X. Forns, and J. I. Esteban, "High-resolution hepatitis C virus subtyping using NS5B deep sequencing and phylogeny, an alternative to current methods," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 53, no. 1, pp. 219–26, Jan. 2015.
- [289] B. Mullan, E. Kenny-Walsh, J. K. Collins, F. Shanahan, and L. J. Fanning, "Inferred hepatitis C virus quasispecies diversity is influenced by choice of DNA polymerase in reverse transcriptase-polymerase chain reactions," *Anal. Biochem.*, vol. 289, no. 2, pp. 137–46, Feb. 2001.
- [290] J. Gregori, J. I. Esteban, M. Cubero, D. Garcia-Cehic, C. Perales, R. Casillas, M. Alvarez-Tejado, F. Rodríguez-Frías, J. Guardia, E. Domingo, and J. Quer, "Ultra-deep pyrosequencing (UDPS) data treatment to study amplicon HCV minor variants," *PLoS One*, vol. 8, no. 12, p. e83361, Jan. 2013.
- [291] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J. D. Thompson, and D. G. Higgins, "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 7, p. 539, Jan. 2011.
- [292] V. Mackiewicz, A. Cammas, D. Desbois, E. Marchadier, S. Pierredon, F. Beaulieux, E. Dussaix, S. Vagner, and A.-M. Roque-Afonso, "Nucleotide variability and translation efficiency of the 5' untranslated region of hepatitis A virus: Update from clinical isolates associated with mild and severe hepatitis," *J. Virol.*, vol. 84, no. 19, pp. 10139–10147, 2010.

Bibliografia

- [293] H. Liu and J. H. Naismith, "An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol," *BMC Biotechnol.*, vol. 8, no. 1, p. 91, 2008.
- [294] G. Kärber, "Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche," *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, vol. 162, no. 4, pp. 480–483, 1931.
- [295] G. Sanchez, R. M. Pinto, H. Vanaclocha, and A. Bosch, "Molecular characterization of hepatitis a virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak," *J Clin Microbiol*, vol. 40, no. 11, pp. 4148–4155, 2002.