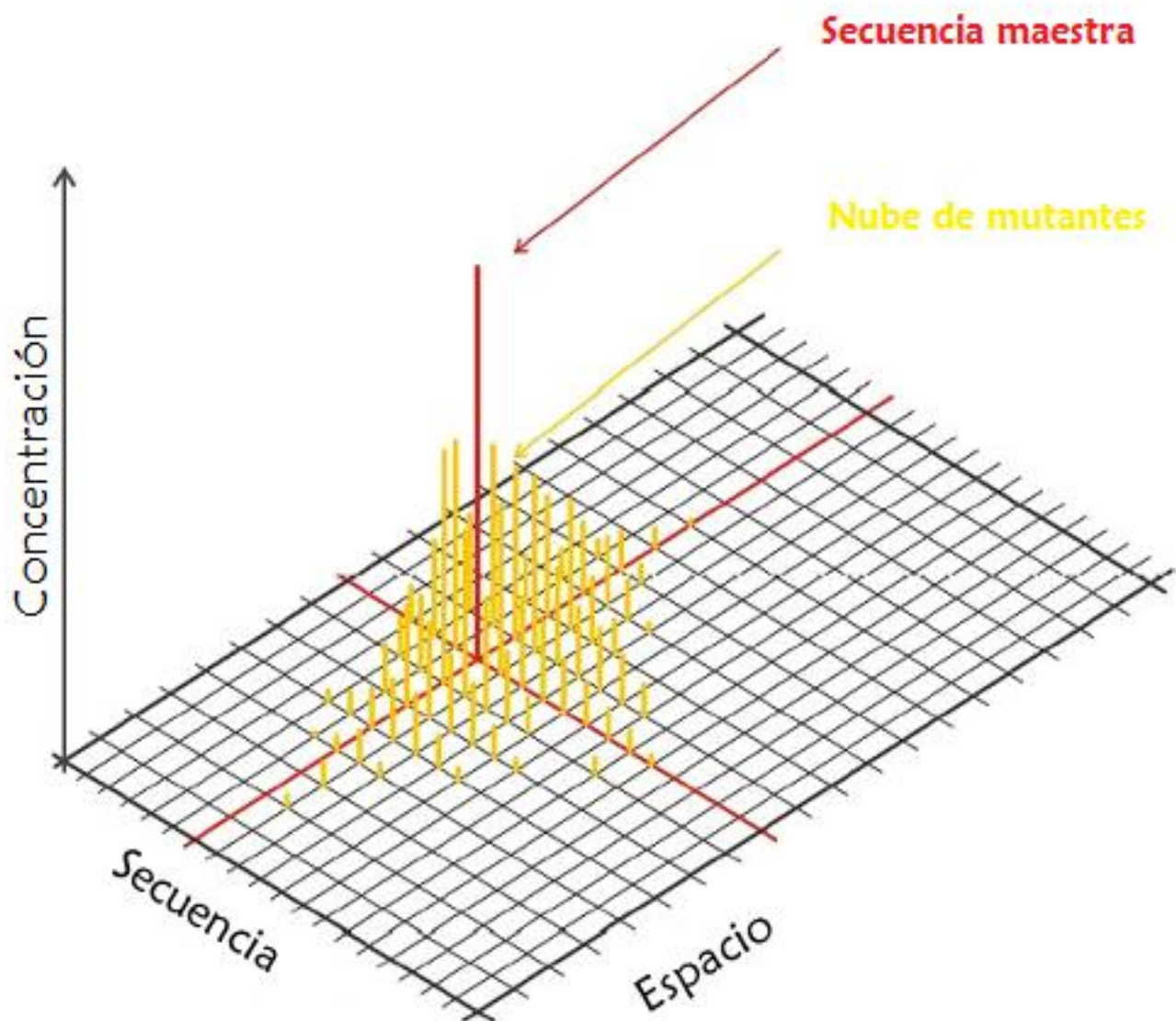


ANÁLISIS DE CUASIESPECIES EN CEPAS URUGUAYAS DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD INFECCIOSA DE LA BURSA



Bach. María José Benítez Galeano

Pasantía de Grado, Profundización Genética y Evolución

Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Orientador: Dr. Ruben Pérez Crossa

Co-Orientador: Lic. Martín Hernández

ÍNDICE

Resumen	3
1. Introducción	4
1.1. La avicultura actual y los problemas sanitarios	4
1.2. La enfermedad de Gumboro	4
1.2.1. Etiología	4
1.2.2. Características de la enfermedad	5
1.2.3. Variantes actuales de IBDV	6
1.2.4. Estructura del genoma de IBDV	8
1.2.5. Proteínas Virales	9
1.3. Evolución de virus RNA	12
1.3.1 Factores que generan variabilidad y modulan la evolución en virus RNA	12
1.3.2 Dinámica de cuasiespecies	14
2. Hipótesis y Objetivos	17
2.1. Hipótesis	17
2.2.1. Objetivo general	17
2.2.2. Estrategia de Investigación	17
3. Materiales y Métodos	18
3.1. Muestras	18
3.2. Extracción del genoma viral	18
3.3. Retrotranscripción (RT)	18
3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	19
3.5. Clonación de los productos de PCR	21
3.5.1. Extracción de DNA plasmídico	22
3.5.2. Verificación de clones por PCR	22
3.6. Secuenciación de insertos	23
3.7. Análisis informático	23
4. Resultados	24
4.1. Resultados experimentales	24
4.2. Resultados analíticos	26
4.2.1. Frecuencia de mutación y distribución de las sustituciones	26
4.2.2. Características de las mutaciones	27
4.2.3. Análisis comparativo con cepas de IBDV de diferente procedencia geográfica	29

5. Discusión	31
6. Avances logrados y perspectivas	35
7. Bibliografía	36
Anexo I: Protocolos	45

RESUMEN

La enfermedad infecciosa de la bursa (IBD) es una afección severa y altamente contagiosa que produce inmunodepresión en pollos de corta edad. Es causada por el virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV) (*Birnaviridae*; *Avibirnavirus*), cuyo genoma está compuesto por dos segmentos de RNA doble cadena. En el mundo circulan tres tipos de cepas de IBDV: clásicas, variantes e hipervirulentas, siendo estas últimas las que presentan mayor patogenicidad. Debido a tiempos cortos de replicación y a altas tasas de mutación, los virus RNA se organizan típicamente en cuasiespecies. Este tipo de organización, consiste en poblaciones replicantes altamente diversas, dinámicas y complejas, confiriéndole una importante capacidad adaptativa a los virus que la integran.

Hasta el momento no se han realizado estudios para determinar la existencia de cuasiespecies en brotes de campo de IBDV, de manera que su investigación puede proporcionar información relevante acerca de los mecanismos y tendencias evolutivas de este virus. En el presente trabajo se describe la investigación desarrollada para determinar la presencia de cuasiespecies en un brote de campo uruguayo de IBDV hipervirulento. Para realizar esta investigación se analizaron las secuencias de amplicones clonados de una muestra de IBDV previamente caracterizada como hipervirulenta. Los amplicones correspondieron a fragmentos genómicos que codifican para las proteínas VP5 (no estructural) y VP2 (estructural). Se secuenciaron automáticamente un total de 20 clones de cada fragmento y posteriormente se analizaron mediante programas bioinformáticos. El análisis de las secuencias obtenidas revela la presencia de cambios nucleotídicos reiterativos en las dos regiones que fueron estudiadas. Nuestros resultados revelan que IBDV podría encontrarse organizado en un sistema de cuasiespecies, sustentando la realización de estudios más profundos para confirmar y analizar esta organización.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La Avicultura Actual y los Problemas Sanitarios

En los últimos años, la producción avícola industrial ha experimentado un explosivo crecimiento a nivel mundial, principalmente en los países sudamericanos, debido al aumento en la eficiencia productiva y al incremento generalizado en el consumo de carne de ave. Sin embargo, esta intensificación productiva de la industria condujo a un notorio incremento en los problemas sanitarios debido a los sistemas de manejo extremadamente intensivos a los que son sometidas las aves para cumplir con los requerimientos productivos. Como resultado de la cría intensiva se observa un marcado incremento de enfermedades de alto impacto socioeconómico como la enfermedad de Newcastle, Influenza aviar y la enfermedad infecciosa de la bursa, también llamada Enfermedad de Gumboro, entre otras (El Zowalaty, M. *et al.*, 2011). El alto impacto de los brotes de Influenza y Newcastle en la avicultura industrial, especialmente de las formas de alta patogenicidad, ha motivado a que se consideren enfermedades de denuncia obligatoria. No es el caso de Gumboro ya que su incidencia se reduce mayormente a la disminución de los rendimientos productivos, aunque es una enfermedad de dispersión mundial. Durante la 63^{ra} Sesión General de la Organización Mundial de Sanidad Animal, en el año 1995, la enfermedad de Gumboro fue clasificada como una de las enfermedades aviares de mayor impacto socioeconómico a nivel internacional, siendo una dolencia presente en más del 95% de los Países Miembros, encontrándose Uruguay entre ellos. En dicha sesión, 80% de los países presentes notificaron la ocurrencia de casos clínicos agudos de la enfermedad (Eterradossi, 1995).

1.2. La Enfermedad de Gumboro

1.2.1. Etiología

También conocida como Enfermedad Infecciosa de la Bursa (IBD de su nombre en inglés, *Infectious Bursal Disease*), fue descrita por primera vez en 1962 por Albert Cosgrove en la ciudad de Gumboro, cerca de Delaware, EE.UU. (Cosgrove, 1962). Es una afección viral severa, altamente contagiosa, que afecta pollos jóvenes de 3 a 6 semanas de edad. Su agente etiológico, aislado por

primera vez por Winterfield el mismo año de su descripción (Winterfield & Hitchner, 1962), es el Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (IBDV), el cual pertenece a la familia *Birnaviridae*. Esta familia consta de tres géneros: *Aquabirnavirus* cuya especie típica es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV, del inglés *Infectious Pancreatic Necrosis Virus*) que infecta peces, moluscos y crustáceos; *Avibirnavirus* que incluye como especie tipo al virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV, del inglés *Infectious Bursal Disease Virus*); y *Entomobirnavirus* conteniendo como especie tipo al virus *Drosophila X* que afecta insectos (Leong *et al.*, 2000).

IBDV presenta como blanco primario los tejidos linfoides, con especial predilección por la bursa de Fabricius, siendo en este órgano donde maduran los linfocitos B durante las primeras semanas de vida del ave. La infección por IBDV destruye los linfocitos B inmaduros, provocando inmunodepresión, y en algunos casos, llegando a producir estados de inmunosupresión generalizados e incluso la muerte del animal (Allan *et al.*, 1972; Hirai *et al.*, 1981; Banda *et al.*, 2003; 2004; Lukert & Saif, 2003).

1.2.2. Características de la Enfermedad

La transmisión de la enfermedad ocurre vía oral, por ingestión del virus a partir de heces, fómites, alimento, o agua contaminada. Una vez que las aves son infectadas, el virus se replica en macrófagos y células linfoides de los órganos gastrointestinales (Müller *et al.*, 1979). Luego de que ocurre la viremia primaria, el virus es diseminado hacia otros tejidos, incluyendo la bursa de Fabricius. La infección de este órgano provoca una segunda viremia masiva, por la replicación del virus en los linfocitos B, distribuyéndolo de esta manera a otros órganos como riñón, timo y bazo (Pascucci, 1998).

El período de incubación de la enfermedad es muy corto y la sintomatología clínica aparece luego de 2-3 días post-infección. Las aves afectadas presentan deshidratación y, en etapas avanzadas de la enfermedad, su temperatura se encuentra por debajo de lo normal (Lukert & Saif, 2003). En parvadas altamente susceptibles, la enfermedad aparece espontáneamente provocando elevada morbilidad, llegando en la mayoría de los casos al 100%. En cambio, la

mortalidad varía de acuerdo a la cepa que infecte el ave (Lukert & Saif, 2003) (ver más adelante). La intensidad de los síntomas clínicos varía según diversos factores como la patogenicidad de la cepa, edad y tipo de ave infectada y si presentan o no anticuerpos (Ac) maternos.

1.2.3. Variantes actuales de IBDV

Por medio de la prueba de seroneutralización se demostró la existencia de dos serotipos de IBDV (McFerran *et al.*, 1980). Ambos serotipos son capaces de replicarse en pollos al igual que en otras especies de aves, como patos y pavos. Aunque el serotipo II presenta infectividad en aves, éste no tiene tropismo selectivo por los linfocitos B de la bursa de Fabricius y es asintomático. Por otro lado, el serotipo I se replica preferentemente en los linfocitos B de la bursa produciendo diferentes tipos de manifestación clínica dependiendo de la cepa involucrada (Otaki, 2005).

Existen distintos tipos de cepas dentro del serotipo I que han ido emergiendo a lo largo del tiempo. Estas presentan diferencias antigénicas y patogénicas que permiten su clasificación en cepas clásicas (cIBDV), variantes (vaIBDV) e hipervirulentas (vvIBDV) (Jackwood & Saif, 1987). A su vez, se ha hecho la distinción entre cepas de baja patogenicia, que incluye a las cIBDV y las vaIBDV, y alta patogenicia, que refiere a la vvIBDV.

Las cepas de cIBDV, como fue comentado anteriormente, fueron aisladas en los EE.UU. a principios de los ´60 e inducen lesiones hemorrágicas acompañadas de depleción de los folículos de células B, causando entre un 1 y 2% de mortalidad en polluelos (Hudson *et al.*, 1986; Kibenge *et al.*, 1996; Brandt *et al.*, 2001). En un principio, estas eran controladas efectivamente mediante vacunación de parvadas con vacunas a virus vivo e inactivado. De esta manera, la progenie de estas parvadas presentaba un nivel de anticuerpos maternos que de forma general los protegía de las cepas de campo circulantes en ese momento. Sin embargo, con el transcurso del tiempo, la eficiencia de los planes de vacunación comenzó a verse alterada, revelandose posteriormente que se debía a nuevas cepas de IBDV que estaban emergiendo.

En 1985, se aislaron en la península Delmarva las cepas variantes (Rosenberg & Cloud, 1986), que causan una rápida atrofia de la bursa de Fabricius pero sin la

presencia de inflamación, hemorragia o mortalidad, como las anteriores cepas clásicas (Hudson *et al.*, 1986, Kibenge *et al.*, 1996, Brandt *et al.*, 2001). Las nuevas cepas presentaban un cambio antigénico respecto a los cIBDV, y además un leve aumento en la virulencia (Dobos *et al.*, 1979, Kibenge *et al.*, 1996, Lim *et al.*, 1999). Las vacunas utilizadas hasta ese momento para el control de las cepas clásicas no eran efectivas para estas variantes antigénicas, por lo que fue necesario introducir vacunas específicas para su control (Snyder *et al.*, 1992).

Por otro lado, en 1987, se aislaron brotes severos de IBD con alta mortalidad en Holanda, Bélgica y Reino Unido (30 a 60%) (van den Berg, 1991). Debido al característico aumento de virulencia de este nuevo linaje de IBDV, estas cepas fueron denominadas hipervirulentas. No obstante, y a pesar de su marcado aumento en la virulencia, estas nuevas formas virales eran antigénicamente similares a las cepas clásicas originales, por lo que se las consideró desde ese momento variantes patogénicas de las cepas clásicas. Desde su aparición, han ocurrido brotes de vvIBDV en Europa (Van Den Berg *et al.*, 1991; Eterradosi *et al.*, 1999; Domanska *et al.*, 2003), Asia (Nunoya *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1993; Cao *et al.*, 1998; Hoque *et al.*, 2001; Phong *et al.*, 2003), África (Zierenberg *et al.*, 2000; Hassan *et al.*, 2002), y América Latina (DiFabio *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2006). Los síntomas clínicos que producen los vvIBDV en polluelos infectados son depresión, plumas erizadas, diarrea, deshidratación severa, decoloración de cresta y barbillas y posteriormente mortalidad (Otaki, 2005). Una característica de las cepas hipervirulentas es que son capaces de infectar al huésped aún estando protegido por vía pasiva o inmunoestimulado por vacunas atenuadas. Esto se debe a que los títulos virales que logran los vvIBDV superan generalmente los inducidos por planes de vacunación contra cepas estándar. Por esta razón, se han introducido vacunas vivas de virulencia intermedia, así como planes de vacunación con vacunas a virus vivo o inactivado (Goddard *et al.*, 1994).

1.2.4. Estructura de la cápside y del genoma de IBDV

Los Birnavirus presentan una cápside con simetría icosaédrica (T=13), cuyo diámetro varía entre 55-60 nm (Dobos *et al.*, 1979; Böttcher *et al.*, 1997). Según datos de microscopía crioelectrónica, la cápside presenta una única capa formada

en su parte externa por subunidades triméricas de la proteína viral 2 (VP2). La cara interna de la misma está formada por la proteína viral 3 (VP3) que se encuentra asociada a la proteína viral 1 (VP1) (Böttcher *et al.*, 1997; Lombardo *et al.*, 1999). De acuerdo a su mecanismo de liberación celular, las partículas virales no presentan envoltura derivada de la célula huésped (Müller *et al.*, 1979).

Como todos los miembros de esta familia, IBDV presenta un genoma de RNA doble hebra (dsRNA) bisegmentado (Leong *et al.*, 2000), conteniendo cada partícula viral cantidades equimolares de ambos segmentos (A y B) (Müller & Nitschke, 1987). El segmento más grande, segmento A, tiene una longitud de 3261 pares de bases (pb) (Azad *et al.*, 1985; Hudson *et al.*, 1986) y presenta dos marcos abiertos de lectura (ORFs), ORF A-1 y ORF A-2, parcialmente solapados (Lombardo *et al.*, 2000) (Fig. 1).

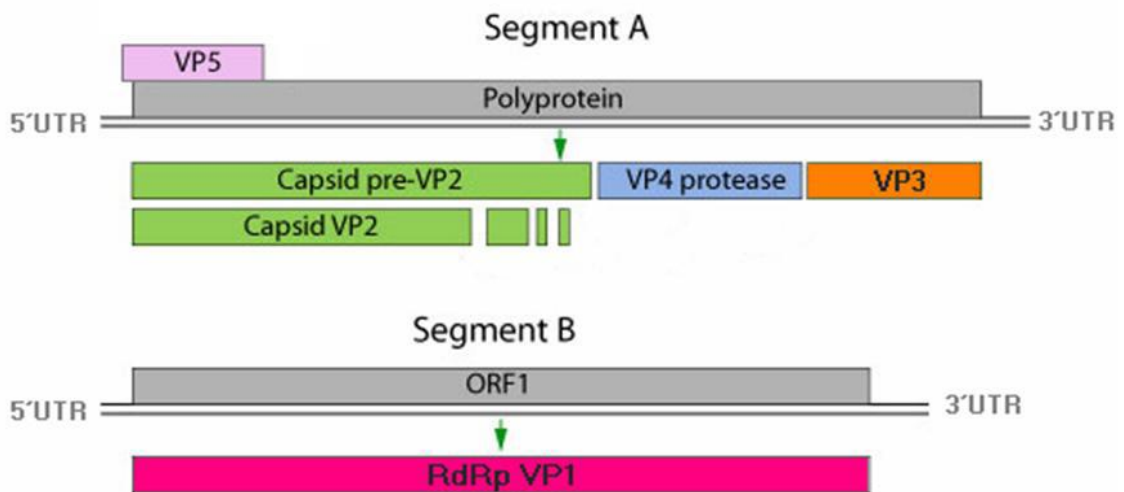


Figura 1. Esquema representativo del genoma de IBDV donde se muestran los dos segmentos genómicos, A y B, y sus productos proteicos correspondientes.

El ORF A-1 codifica para un precursor proteico de 110 kDa y 1.012 aminoácidos (aa), que es procesado cotraduccionalmente por autoproteólisis para dar las proteínas virales maduras 2, 4 y 3 (VP2, VP4 y VP3, respectivamente) (Duncan *et al.*, 1987). El ORF más pequeño, ORF A-2, se solapa con el extremo 5' del ORF A-1 y codifica para la proteína viral 5 (VP5) de 17 kDa. Ambos ORFs se traducen en la misma dirección pero presentan un desfase de tipo +1. De esta

manera, la primera base del codón del gen vp5 se corresponde con la tercera base del codón del gen vp2 del ORF A-1.

El segmento B tiene una longitud de 2827 nucleótidos y codifica para la proteína viral 1 (VP1) de 97 kDa en un único marco abierto de lectura (Spies *et al.*, 1987).

En ambos extremos de los segmentos genómicos se encuentran las regiones no traducidas 5´ y 3´ (5´UTR y 3´UTR respectivamente). Estas regiones presentan en sus extremos repetidos directos e invertidos, que tienen importantes funciones en la regulación de la expresión génica (Boot & Pritz-Verschuren, 2004).

1.2.5. Proteínas Virales

Las proteínas virales se encuentran representadas en distintas proporciones en el virión. Cada una de ellas posee al menos una función, pudiendo ser estructural, de replicación, e incluso de regulación de la expresión del sistema de defensa del huésped. A continuación se realizará una breve descripción de las cinco proteínas virales.

- **VP1**

Es la única proteína codificada por el segmento genómico B y corresponde a una RNA polimerasa RNA dependiente (Morgan *et al.*, 1988). Presenta un tamaño de 878 aa y está presente en el virión de dos formas diferentes: como polipéptido libre y como proteína de unión al genoma (*Vpg* por su nombre en inglés) unida covalentemente al extremo 5´ de ambos segmentos genómicos (Duncan *et al.*, 1991). Es bajo esta forma que VP1 participa en la encapsidación del RNA genómico durante el ensamblaje de las partículas virales mediante la interacción con VP3 (Lombardo *et al.*, 1999; Tacken *et al.*, 2000).

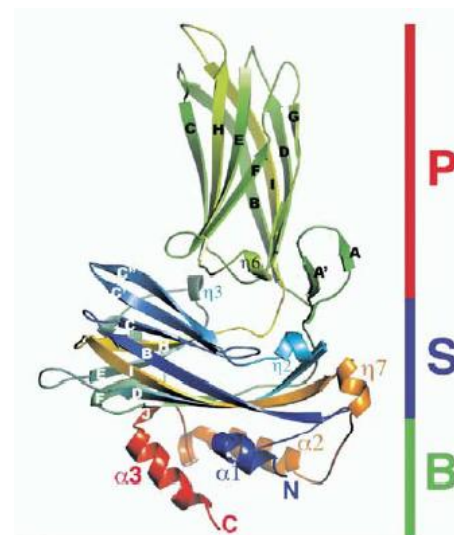
La proteína VP1 presenta, además, actividad guanilil transferasa, mediante la cual se autoguanila formando un intermediario que participa tanto en la replicación, como en la transcripción y traducción del genoma viral (Spies & Muller, 1990). Por lo tanto, podemos considerar a VP1 como una proteína multifuncional del virus ya que presenta actividad RNA polimerasa-RNA dependiente, siendo responsable de la replicación del genoma viral e interviene en la síntesis de los RNA mensajeros y en su traducción.

- VP2

La proteína VP2 surge del procesamiento de pVP2, de 512 aa, luego de sucesivos cortes en el extremo carboxilo terminal del mismo por la proteasa viral (VP4). Se obtienen cuatro péptidos de 46, 7 y 11 aa (pep46, pep7a, pep7b y pep11), que se mantienen asociados al virión, y la proteína VP2 madura de 442 aa (Da Costa *et al.*, 2002). Estas modificaciones post traduccionales ocurren luego de la formación de la cápside viral (Muller & Becht, 1982), la cual se encuentra formada en su cara externa por VP2 (Bottcher *et al.*, 1997).

Para formar la cápside viral, la VP2 adquiere una estructura terciaria, en la cual se pliega en tres dominios denominados base (B), capa (S de *Shell*) y proyección (P) (Figura 2). Los dominios B y S están formados por las extensiones N- y C-terminales conservadas de VP2, mientras que el dominio P corresponde a la región hipervariable de VP2 (aminoácidos del 206 al 350) identificada previamente por Azad (Azad *et al.*, 1987). Las regiones antigénicas, también llamadas espículas, A (aminoácidos del 212 a 224) y B (aminoácidos del 314 a 325) definidas por Bayliss y colaboradores (Bayliss *et al.*, 1990) constituyen loops en la parte más exterior del dominio P. Estudios por delección demostraron que estas regiones forman parte de epítopes conformacionales definidos por anticuerpos monoclonales neutralizantes, por lo que VP2 es la responsable de la producción de anticuerpos neutralizantes en el huésped (Azad *et al.*, 1987). Cambios en los picos A y B son las bases moleculares para la variación antigénica en IBDV (Vakharia *et al.*, 1994; van den Berg *et al.*, 1994).

Figura 2: Diagrama de cintas de la subunidad de VP2. Se destacan sus tres dominios base (B), capa (S de *Shell*) y proyección (P) (Extraído de Coulibaly *et al.*, 2005).



- VP4

La proteína viral 4 tiene una longitud de 243 aa y un peso molecular aproximado de 28 kDa. Es una serina-lisina proteasa, que se encarga del clivaje de la poliproteína codificada por el ORF A-1 del segmento A, para dar lugar a las proteínas pVP2, VP4 y VP3 (Brown & Skinner, 1996; Petit *et al.*, 2000). Esta actividad catalítica se encuentra localizada en los aminoácidos Ser-652 y Lis-692, los cuales forman la díada catalítica y se encuentran altamente conservados entre los distintos birnavirus (Lejal *et al.*, 2000). Además de catalizar los cortes pVP2-VP4 y VP4-VP3, esta proteasa también podría ser la encargada de procesar el extremo carboxilo terminal de pVP2 para obtener los cuatro péptidos y la VP2 madura (Da Costa *et al.*, 2002).

- VP3

Esta proteína, de 257 aa de longitud y un peso molecular de 32 kDa, se ubica en la cara interna de la cápside viral. Su extremo carboxilo terminal es rico en aminoácidos cargados positivamente (altamente hidrofílico), el cual puede actuar como un dominio de unión a otras proteínas (Maraver *et al.*, 2003). VP3 juega un rol fundamental en la morfogénesis de las partículas virales al interactuar con otras VP3 (Maraver *et al.*, 2003) y con pVP2 mediante sus últimos cinco residuos aminoacídicos (Chevalier *et al.*, 2004; Saugar *et al.*, 2005). A su vez, es capaz de estabilizar ambos segmentos genómicos dentro de la partícula viral (Tacken *et al.*, 2002), formando parte de un complejo ribonucleoproteico (RNP) junto con los segmentos genómicos de dsRNA y la RNA polimerasa VP1. Es así que actúa como andamio para el genoma y la polimerasa (Hjalmarsson *et al.*, 1999).

- VP5

Codificada por el ORF A-2 del segmento A, es una proteína no estructural con un peso molecular de 17 kDa, altamente básica y rica en cisteínas (Lombardo *et al.*, 2000). vp5 es un gen terminal que se encuentra solapado con el extremo 5' del gen de la poliproteína y más de un 90% de su secuencia está incluida en la región codificante de vp2. Esta condición de región superpuesta, le otorga a VP5 una capacidad limitada de variar desde el punto de vista aminoacídico, encontrándose restringida por vp2 (Hernandez *et al.*, 2010).

Para conocer la función de VP5 se han realizado diversos estudios. Algunos de ellos han demostrado que esta proteína está relacionada con la lisis celular por acumulación dentro de la membrana de la célula huésped (Lombardo *et al.*, 2000). Otros estudios indican que la apoptosis inducida por IBDV es caspasa dependiente y que VP5 tiene funciones antiapoptóticas en las primeras fases de la infección viral. En una infección por IBDV, las caspasas 3 y 9 son activadas en el último estadio de la replicación viral, provocando que ocurra la apoptosis cuando se completa la síntesis de IBDV y la progenie viral necesita ser liberada de la célula huésped. Estos autores proponen que VP5 podría ser una proteína reguladora, con funciones antiapoptóticas en las fases tempranas de la infección y que alcanzaría la membrana plasmática de la célula al final del ciclo viral (Liu & Vakharia, 2006).

1.3. Evolución de Virus RNA

1.3.1. Factores que generan variabilidad y modulan la evolución en virus RNA

La historia del virus de Gumboro, en la que se parte de un tipo viral (cIBDV) que por modificación de sus características antigénicas y patogénicas dio lugar a la emergencia de nuevas formas (vaIBDV y vvIBDV), estimula a explorar temas relacionados a mecanismos evolutivos que explican la ocurrencia de este tipo de variaciones. Es sabido que los mecanismos de patogénesis viral se encuentran íntimamente relacionados con la variación genética y fenotípica de los virus (Domingo & Gomez, 2007). Los virus utilizan los mismos mecanismos moleculares de variación genética que otras formas biológicas: mutación, recombinación y reordenamiento de segmentos genómicos.

Los virus que presentan RNA, ya sea como material genético o como intermediario replicativo, comparten altas tasas de mutación. Esto se debe principalmente a que la mayoría de las RNA polimerasas RNA dependientes (RdRp) y las DNA polimerasas RNA dependientes o retrotranscriptasas (RT) carecen de un dominio con actividad exonucleasa 3'-- 5'. Esta actividad conocida como correctora de pruebas (proofreading-repair) permite escindir los nucleótidos incorporados incorrectamente y cambiarlos por los nucleótidos correctos. Esta falta de mecanismos correctores conlleva a la hipermutabilidad de los virus con

genomas RNA; provocando una mayor variabilidad genética y mayores tasas de evolución en comparación con virus DNA. Mediante métodos genéticos y bioquímicos, se ha estimado que las tasas de mutación promedio para virus RNA se encuentran dentro del rango de 10^{-3} – 10^{-5} sustituciones por nucleótido copiado, mientras que para los virus DNA varían entre 10^{-7} - 10^{-9} sustituciones por nucleótido copiado (Batschelet *et al.*, 1976; Domingo *et al.*, 1978, 2001; Drake, & Holland, 1999).

La recombinación genética es un mecanismo de variación genómica en virus ampliamente distribuido, asociado a tasas de cambio evolutivo rápido. Este fenómeno consiste en la formación de nuevas combinaciones de material genético covalentemente ligado, a partir de dos genomas parentales diferentes o entre distintos sitios del mismo genoma. Se han reconocido varias formas de recombinación que se diferencian en la necesidad o no de homología de secuencia alrededor del sitio de recombinación (homóloga vs. no homóloga), o si se requiere la replicación del genoma viral para que ocurra (replicativa vs. no replicativa) (Nagy & Simon, 1997; Gmyl *et al.*, 2003; Domingo, 2006). El mecanismo más común de recombinación que se observa en virus RNA es el llamado copy-choice o intercambio de molde. Este requiere una cierta homología entre las secuencias a recombinar y a su vez, sucede mientras el virus se encuentra en etapa de replicación. El mecanismo involucra el desprendimiento del complejo polimerasa del molde, junto con un producto naciente, y la continuación del proceso de copiado en la misma posición pero en otra molécula molde (Domingo & Gómez, 2007).

Por último, en virus con genomas segmentados, el reordenamiento de segmentos les provee un mecanismo adicional de variación genética y fenotípica. Este fenómeno ocurre por la co-infección de una célula huésped por dos o más virus, donde ocurre el intercambio de segmentos. Este proceso aumenta la variabilidad genética llevando a una rápida divergencia por las combinaciones novedosas de segmentos genómicos.

En el caso del virus de Gumboro hasta el momento se ha calculado la frecuencia de mutación correspondiente a la región hipervariable de vp2, la cual corresponde a 1.86×10^{-3} (Jenkins *et al.*, 2002). En el virus de Gumboro se ha

constatado que tanto las mutaciones, como los reordenamientos genómicos (Le Noüen *et al.*, 2006), e incluso la recombinación genética (Hon *et al.*, 2008; He *et al.*, 2009), son utilizados como mecanismos de variación. No obstante, las mutaciones parecen ser la fuente principal de cambio en este modelo viral (van den Berg, 2000).

1.3.2. Dinámica de Cuasiespecies

Además de las altas tasas de mutación, los virus RNA presentan tiempos de replicación cortos. Estas características pueden llevar a la producción de grandes poblaciones replicantes altamente diversas. A este conjunto de variantes virales capaces de infectar diversos tipos de tejidos dentro de un mismo huésped, de ampliar su rango de huésped e incluso de generar infecciones persistentes, se las llamó cuasiespecies virales (Dockter *et al.*, 1996; Schneider & Roossinck, 2001). Estas representan genomas mutantes y recombinantes, cercanamente relacionados pero no idénticos, sujetos a continua variación genética, competencia y selección (Domingo *et al.*, 1998). Estas poblaciones de virus RNA se caracterizan por una secuencia maestra y un espectro de mutantes (ver figura 3).

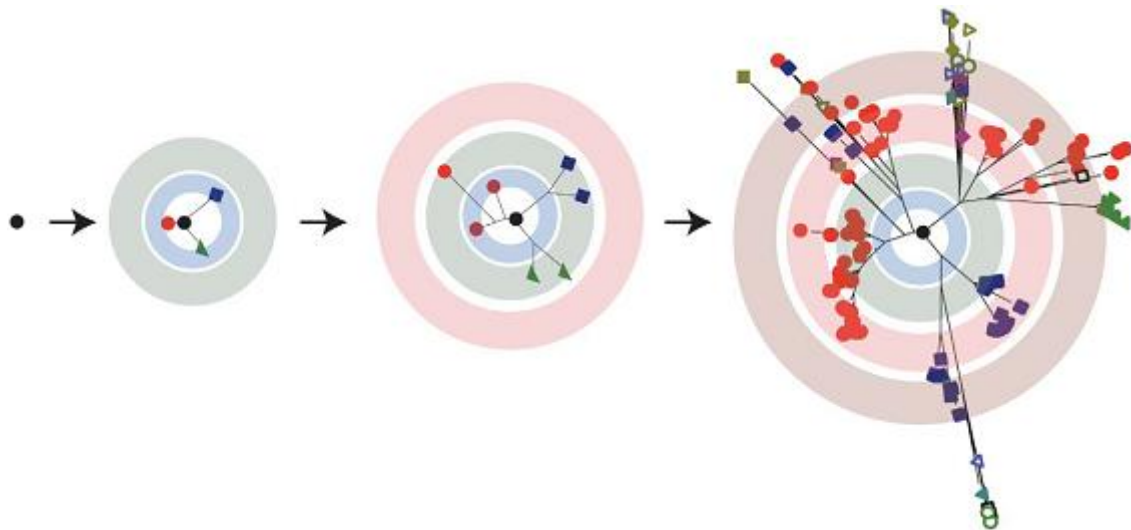


Figura 3. Los virus RNA existen como una cuasiespecie. Un virus replicante con una alta tasa de mutación puede generar un repertorio diverso de mutantes durante el curso de unas pocas generaciones. En estos árboles, cada rama indica dos variantes ligadas por una mutación puntual y los círculos concéntricos representan ciclos de replicación seriados. La distribución resultante es representada, por lo general, como una nube rodeando una secuencia maestra. Este esquema bidimensional es una gran simplificación de la conectividad intracuasiespecies. En las formulaciones matemáticas de la teoría de cuasiespecies, el espacio de secuencias es multidimensional, con numerosas ramas entre variantes (Extraído de Luring & Andino, 2010).

La secuencia maestra es la secuencia nucleotídica dominante en la distribución genómica, mientras que el espectro de mutantes es el conjunto de copias con error ordenados de acuerdo a sus habilidades replicativas en el contexto del total de mutantes (Ruiz-Jarabo *et al.*, 2000). Estudios evolutivos han mostrado que las altas tasas de mutación de los virus RNA, no son una simple consecuencia de la rápida replicación de sus genomas sino que tienen un valor adaptativo y son el origen de la dinámica de cuasiespecies (Domingo & Gómez, 2007).

Las cuasiespecies se distinguen por una rápida evolución genómica y se comportan como una unidad de selección. Existe un equilibrio dentro de la población que debe ser mantenido, es decir, las tasas de mutación no deben superar determinado umbral crítico de error porque se generan pérdidas de infectividad debido a la pérdida de información en el conjunto de secuencias (Domingo & Gomez, 2007). A su vez, el espectro de mutantes modula su comportamiento a través de interacciones positivas (complementación) y negativas (interferencia); si existe dominancia de estas últimas puede conducir a la extinción viral (Domingo & Gomez, 2007). Otra característica de las cuasiespecies es que presentan la capacidad de generar memoria molecular, la cual queda registrada en el espectro de mutantes (Ruiz-Jarabo *et al.*, 2000). Esto permite una adaptación más rápida y eficaz de la población en el transcurso de una infección similar a una ocurrida anteriormente. Por otro lado, la diversidad del espectro de mutantes es fundamental para la determinación de la patogénesis. Estas variantes virales son capaces de interactuar entre sí variando de esta manera las características de la población en general (Vignuzzi *et al.*, 2006). En la dinámica de cuasiespecies pueden ocurrir mutaciones deletéreas, neutrales o ventajosas en componentes del espectro de mutantes. La naturaleza ventajosa o perjudicial de las mismas depende del ambiente donde se encuentre el virus al momento que ocurren y del contexto de la secuencia (sitio donde ocurre la mutación), afectando ya sea a nivel de un genoma individual o a nivel del espectro de mutantes circundante (Domingo & Gomez, 2007).

Hasta el momento no se han realizado estudios específicos de cuasiespecies en brotes de campo de IBDV. Su investigación puede proporcionar información relevante acerca de los mecanismos y tendencias evolutivas de este virus. En el

presente trabajo se describe la investigación desarrollada para determinar la presencia de cuasiespecies en un brote de campo uruguayo de IBDV hipervirulento. Así mismo se presenta información que puede ser de utilidad para entender la epidemiología de IBDV a nivel local y regional.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

- IBDV se encuentra organizado en un sistema de cuasiespecies.

2.2.1. OBJETIVO GENERAL

- Investigar la existencia de un sistema de cuasiespecies en una cepa hipervirulenta del virus de la enfermedad infecciosa de la Bursa.

2.2.2. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Para cumplir con el objetivo planteado el estudiante se familiarizará con las siguientes metodologías:

- Amplificar dos fragmentos de los genes vp2 y vp5 de una muestra de campo de Uruguay.
- Clonar los amplicones obtenidos en un vector plasmídico.
- Analizar las secuencias de varios clones.
- Realizar una búsqueda exhaustiva de secuencias de IBDV en el GenBank y compararlas con las secuencias obtenidas en el presente trabajo

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras

Las muestras fueron obtenidas de un brote de IBDV ocurrido en el año 2004 en una granja de aves de engorde al suroeste del departamento de Canelones, Uruguay. Las aves presentaban signos clínicos y patológicos característicos de IBD, por lo que, las bolsas de Fabricius de dichos animales fueron remitidas a la Facultad de Ciencias, Sección Genética Evolutiva, para su análisis. Estas muestras fueron conservadas a -80°C hasta el momento de su utilización. La caracterización del brote fue realizada mediante secuenciación parcial de los genes de las proteínas VP1 y VP2 (Hernández *et al*, 2006).

En la presente tesina se utilizó una bursa del brote descrito anteriormente, la cual fue ingresada al laboratorio como Muestra 8 (M8).

3.2. Extracción del genoma viral

La extracción del RNA total se realizó mediante el método TRIzol Reagent™ (Invitrogen, Carlsbad, California) según protocolo recomendado por el fabricante (ver protocolo en anexo I). La muestra correspondiente fue tomada del tejido linfóide de los pliegues internos de la bursa de Fabricius.

3.3. Retrotranscripción (RT)

Para la obtención del DNA complementario (cDNA) del fragmento del gen vp5 se realizó una retrotranscripción con random primers (RP), mientras que para el fragmento del gen vp2 la RT fue realizada con primers específicos (P1 y P2) (Tabla 1). Ambas reacciones se llevaron a cabo mediante el RevertAid™ Minus First Strand cDNA Síntesis Kit (Fermentas Life Sciences Inc., Hanover, MD) según las indicaciones del fabricante (anexo I) partiendo de $10\ \mu\text{l}$ del RNA extraído.

Tabla 1: Cebadores utilizados para la retrotranscripción del fragmento del gen VP2, detallando sus secuencias y sitios de hibridación en el genoma.

Nombre del cebador	Secuencia	Posición
Directo VP2 (P1)	5'-TCACCGTCCTCAGCTTAC-3'	621 a 638
Reverso VP2 (P2)	5'-TCAGGATTTGGGATCAGC-3'	1246 a 1263

3.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó la amplificación del gen vp5 y la región hipervariable de vp2 de la muestra de campo M8 a partir del cDNA obtenido en la RT descrita en el punto 3.3 mediante PCR en un termociclador Corbett Palm Cyclor™. La reacción fue catalizada por la DNA polimerasa *Pfu* con actividad de corrección de pruebas (DNA Polymerase, Sbs Genetech Co., Ltd.) para disminuir la variabilidad generada durante la polimerización. En la Tabla 2 se detallan las secuencias de los primers usados para cada región genómica.

Tabla 2: Secuencias de los primers utilizados para generar los amplicones y posición donde hibridan los mismos.

Nombre del cebador	Secuencia	Posición
Directo VP5 (MuF)	5'-GGATACGATCGGTCTGAC-3'	1 a 18
Reverso VP5 (MuR)	5'-TGGGCCTGTCACTGCTGCACATGT-3'	716 a 740
Directo VP2 (P3)	5'-GCCCAGAGTCTACACCATAACTGC-3'	736 a 759
Reverso VP2 (P4)	5'-GCGACCGTAACGACAGATCC-3'	1208 a 1227

Los primers correspondientes al gen vp5 fueron descritos previamente por Mundt (Mundt *et al.*, 1997) y la amplificación de dicho gen correspondió desde la posición 1 a la 740 abarcando un fragmento de 740 pb (Fig. 4). Los primers que amplifican parte de la región hipervariable de vp2 fueron diseñados por Liu y colaboradores (Liu *et al.*, 1998) y se obtiene un fragmento de 492 pb desde la posición 736 a la 1227 (Fig. 4).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 15 μ l utilizando los reactivos en las siguientes concentraciones finales:

Reactivo	[] stock	[] final	Volumen (μ l)
Buffer S-Pfu DNA Polymerase	10x	1x	1.5
Mezcla de dNTP's	10 mM	0.3 mM	0.4
Cebador Directo (MuF o P3)	10 μ M	0.5 μ M	0.75
Cebador Reverso (MuR o P4)	10 μ M	0.5 μ M	0.75
S-Pfu DNA Polymerase	5 U/ μ l	0.05 U/ μ l	0.15
cDNA			0.5
Agua			c.s.p 15

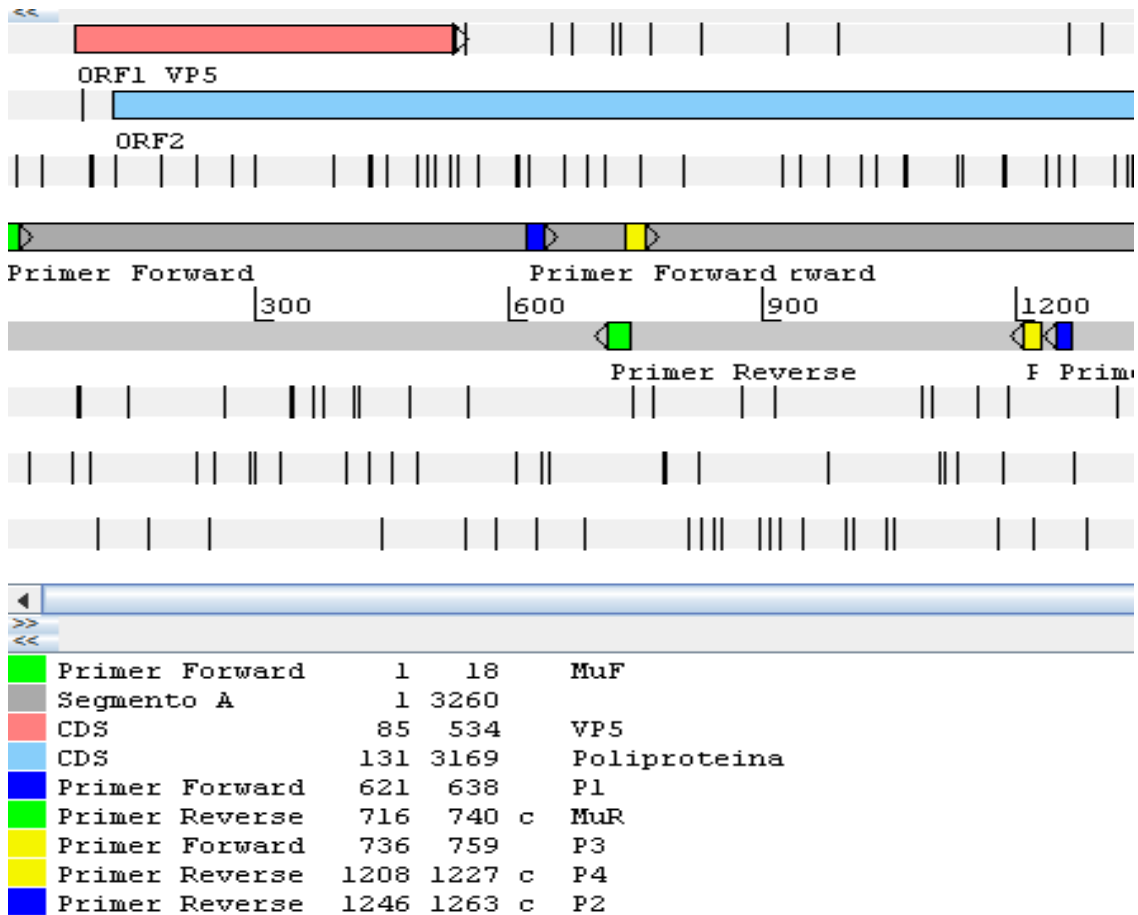


Figura 4. Esquema realizado con el programa Artemis donde se muestra la longitud del gen vp5 y de la poliproteína y las posiciones donde hibridan los cebadores usados en la PCR. Los cebadores que amplifican el fragmento de vp5 se muestran en verde y los correspondientes a vp2 en amarillo. En la parte superior de la figura se observa en rojo el ORF-A2 y en celeste parte del ORF-A1. En azul se muestran los cebadores usados en la RT.

Las condiciones del ciclado fueron como se detallan a continuación:

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	05:00
Desnaturalización	95	00:30
Hibridación	55	01:00
Extensión	72	01:00
Extensión final	72	15:00

Los amplicones obtenidos fueron visualizados mediante luz UV, en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio (anexo I). Como control positivo se utilizó RNA de una muestra previamente caracterizada en el laboratorio.

El registro de los resultados se realizó mediante fotografías digitales. Las muestras fueron preparadas en el buffer de carga “Orange Loading Dye 6X” (Fermentas™), el cual consta de dos marcadores, el orange G y el xylene cyanol FF, que co-migran con fragmentos de DNA de aproximadamente 50 pb y 4000 pb respectivamente (anexo I).

3.5. Clonación de los productos de PCR

Para alcanzar la cantidad de inserto recomendada para la clonación, fue necesario purificar y concentrar los amplicones. Para esto se repitieron los ensayos de PCR a partir del cDNA de M8 para ambos fragmentos. Luego se purificaron los productos de PCR y seguidamente fueron concentrados por centrifugación en vacío, hasta un volumen final de 10 µl. Una vez obtenida la cantidad de producto deseado se procedió a la clonación de los amplicones.

Se clonaron los amplicones obtenidos de vp5 y vp2 utilizando el kit CloneJET™ PCR Cloning de Fermentas (Fermentas Life Sciences Inc., Hanover, MD) y bacterias *E. coli XL-1 Blue* competentes (anexo I).

De acuerdo a las propiedades del vector de clonación presente en este kit (Figura 5), los productos de PCR amplificados con la enzima *Pfu DNA Polymerase* pueden ser ligados directamente. Esta enzima genera extremos romos en los productos que polimeriza y este vector posee un sitio de inserción para productos de PCR con extremos romos en el sitio de policlonado.

Para la selección de las bacterias transformantes, se utilizaron las siguientes características del vector. Este presenta el gen *bla* codificante de la β-lactamasa, el cual le confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Por otro lado, presenta el gen modificado *Eco47IR*, que codifica para la enzima de restricción *Eco47I*, producto letal para la bacteria en la cual se expresa (Figura 5). Dentro de este gen se encuentra el sitio de policlonado, característica utilizada para la selección positiva ya que al albergar un inserto, *Eco47IR* es interrumpido y su producto no es funcional. De esta manera, las bacterias que no adquirieron el vector no pudieron crecer en un medio con ampicilina, y las que si fueron transformadas con el vector

sin inserto, tampoco pudieron desarrollarse debido a la expresión de *Eco47IR*. Por lo tanto, solamente las bacterias con un plásmido recombinante crecieron en un medio con ampicilina.

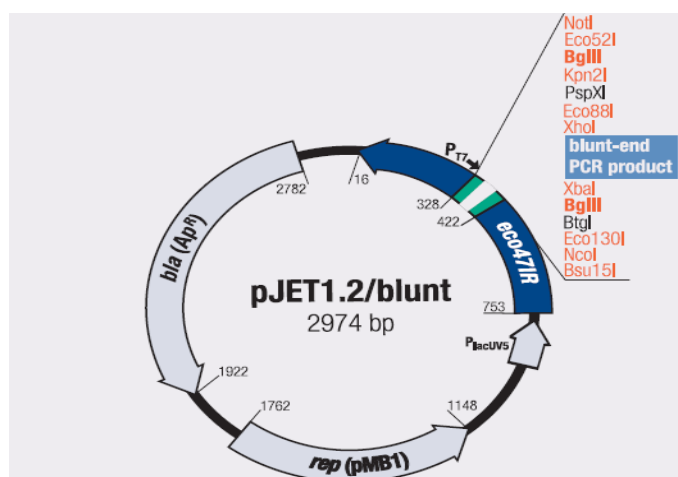


Figura 5. Mapa del vector de clonación pJET1.2/blunt utilizado en el presente trabajo.

El análisis de las colonias obtenidas fue realizado mediante rastreo por PCR utilizando los primers específicos para cada amplicón según fuera el caso. Las condiciones utilizadas para la preparación de la mezcla de reacción fueron las mismas que para la obtención de los fragmentos que fueron clonados, con la salvedad de que la enzima utilizada fue la *Taq DNA Polymerase* (5U/ μ l) (SBS Genetech Co., Ltd.) con su respectivo buffer (10X Taq Buffer). Las condiciones del termociclador utilizadas también fueron las detalladas anteriormente.

Los clones positivos fueron crecidos en medio LB con ampicilina durante toda la noche en agitador a 37°C para la extracción del DNA plasmídico.

3.5.1 Extracción del DNA plasmídico

La extracción del DNA plasmídico se realizó por el método de fenol - cloroformo según protocolo modificado de Sambrook (1989) (anexo I).

3.5.2 Verificación de clones por PCR

Para poder estimar la cantidad de DNA plasmídico obtenida se realizó la cuantificación de las colonias por dos métodos diferentes. Uno fue utilizando geles de agarosa y comparando la intensidad de los amplicones con otros de concentración conocida. El segundo fue mediante el uso de un espectrofotómetro (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific Inc.).

La correcta extracción del DNA plasmídico se confirmó por PCR y los resultados fueron visualizados en gel de agarosa 0,8%.

3.6. Secuenciación de insertos

Los vectores que incorporaron el inserto deseado fueron secuenciados de forma automática utilizando el primer forward del vector (pJETF). Para esto se utilizó el servicio de secuenciación automática del Instituto Pasteur de Montevideo.

3.7. Análisis informático

Para el análisis informático de las secuencias nucleotídicas se utilizó el programa SeqMan del paquete Lasergene DNASTAR (www.dnastar.com). Se analizaron los cromatogramas de las 20 secuencias correspondientes a cada fragmento y se ensamblaron sobre las secuencias de vp5 y vp2 de la cepa hipervirulenta de referencia D6948 obtenida del GenBank.

En este análisis se buscaron cambios a nivel nucleotídico, teniendo en cuenta si se encontraban repetidos en más de una secuencia. Se tuvo en cuenta si los cambios producían sustituciones sinónimas o no sinónimas a nivel aminoacídico, tanto para las regiones no solapadas de vp5 y vp2, como para la región solapada conformada por ambos genes.

También se procedió a comparar las secuencias del espectro de mutantes pertenecientes a la cepa hipervirulenta de IBDV de nuestro estudio (M_8) con secuencias de distintas cepas de vvIBDV. Para el análisis se utilizaron 26 secuencias obtenidas del GenBank más los 40 clones obtenidos en el laboratorio.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados experimentales

Los productos obtenidos de ambos fragmentos confirmaron la efectividad de las extracciones con TRizol y el diseño de las reacciones de RT-PCR. En ambos casos se observaron los amplicones correspondientes al gen vp5 y a la región parcial del fragmento codificante de vp2 en sus tamaños esperados: 740 y 491 pb respectivamente (Figs. 6 y 7).

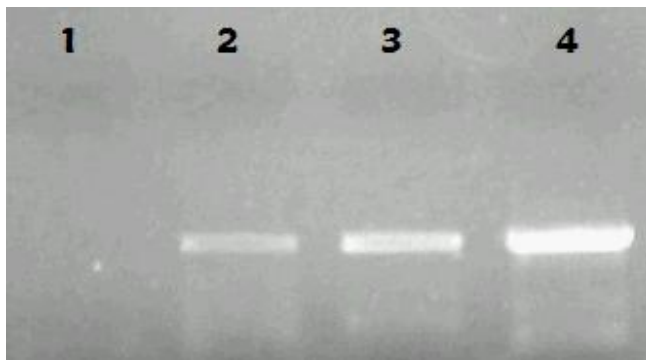


Fig. 6- Gel de agarosa donde se muestran los amplicones del gen vp5 obtenidos con los primers Mu y el uso de la polimerasa Pfu. Carril 1: Blanco; Carril 2: 0.5 μ l M6; Carril 3: 0.5 μ l M8; Carril 4: Control positivo.

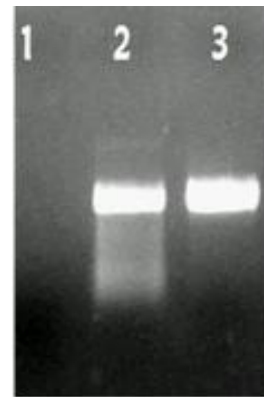


Fig. 7- Gel de agarosa donde se observan las amplificaciones de VP2 con los primers P3P4 y la polimerasa Pfu. Carril 1: Blanco; Carril 2: 0.5 μ l M8; Carril 3: control positivo.

Para el caso de vp5 se probó la amplificación en dos muestras diferentes: M6 y M8. Debido a que consecutivamente se lograron mejores rendimientos con M8 (Fig.6) fue seleccionada esta muestra para los ensayos subsiguientes. Los análisis de vp2 también incluyeron M8, ya que para determinar la presencia de cuasiespecies se debía trabajar sobre la misma población viral.

El análisis de los productos obtenidos de la clonación se realizó mediante rastreo por PCR utilizando los primers específicos para cada fragmento. En los casos en que se obtuvieron fragmentos del tamaño esperado (Fig. 8), se realizaron minipreparaciones para la extracción del DNA plasmídico. La verificación de este procedimiento se llevo a cabo mediante PCR y en todos los casos se observaron resultados de acuerdo a lo esperado. Como se observa en la figura 8, existió un buen rendimiento en las extracciones de DNA plasmídico.

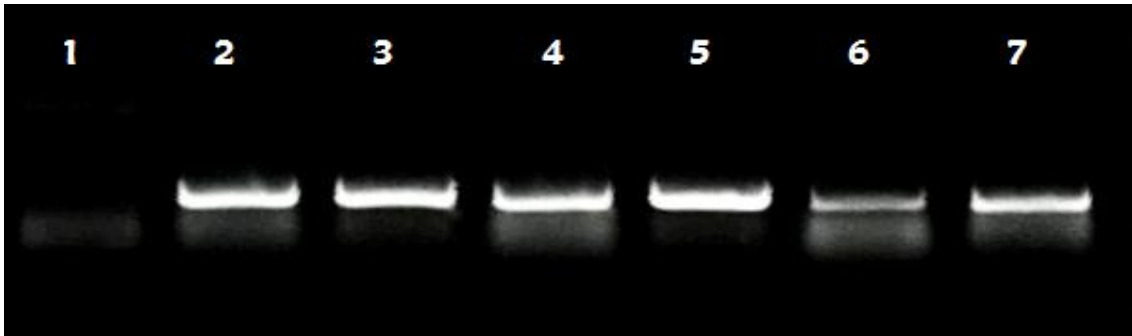


Fig. 8- Gel de agarosa donde se muestra el análisis de los productos obtenidos mediante clonación del fragmento P3P4 de VP2. Carril 1: blanco; Carriles 2-6: colonias; Carril 7: control positivo (500 pb).

Para observar la concentración de DNA previo a la secuenciación se cuantificó mediante geles de agarosa al 0.8% o eventualmente utilizando un espectrofotómetro (Fig. 9). En todos los casos la concentración del DNA se mantuvo dentro de un rango de 3000 a 4000 ng/μl, indicando un alto rendimiento en los procesos de clonación.

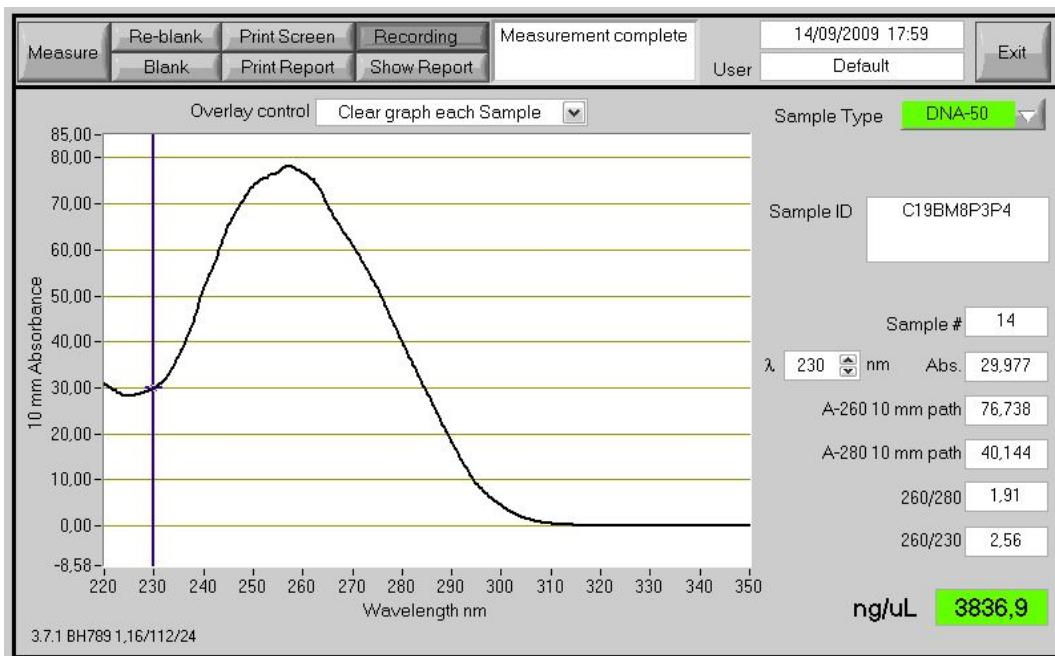


Fig. 9- Resultado de cuantificación de una colonia utilizando un espectrofotómetro. Se observa la concentración en ng/μl (recuadro verde inferior).

Una vez obtenidas las secuencias de ambos fragmentos fueron procesadas con el programa SeqMan (Lasergene DNASTAR, Inc.). Luego de editadas se seleccionó un fragmento de 586 pb (posición 85 a 670 del segmento genómico A) que

incluye la totalidad del gen vp5 (85 – 534) y un fragmento de 450 pb (posición 756 a 1205) que incluye la región hipervariable de vp2.

4.2 Resultados analíticos

4.2.1 Frecuencia de mutación y distribución de las sustituciones.

Una vez seleccionadas las secuencias de vp5 y vp2 se realizaron los análisis comparativos correspondientes. Se realizó el cálculo de la frecuencia de mutación para cada amplicon, como el número total de mutaciones observadas en todos los clones obtenidos dividido el total de bases secuenciadas para la población de clones del amplicón referido (Kim et al., 2005) (Tabla 3). En nuestro trabajo se secuenciaron un total de aprox. 11,1kb para vp5, y 9,5kb para vp2.

Tabla 3: Variación encontrada en las distintas regiones analizadas

Región	Porcentaje de clones mutados	Mutaciones totales/bases secuenciadas	Frecuencia de mutación ($\times 10^{-3}$)
VP5	26 (5/19)	7/11115	0,63
VP2	67 (14/21)	20/9450	2,1

Para los amplicones correspondientes a la región hipervariable de vp2 se observó una frecuencia de mutación de $2,1 \times 10^{-3}$ sustituciones por nucleótido.

Para el gen vp5 se observó una frecuencia de mutación de $0,63 \times 10^{-3}$ sustituciones por nucleótido.

4.2.2 Características de las mutaciones

La tabla 4 resume los cambios encontrados en las diferentes secuencias con respecto a la secuencia mayoritaria. Se detallan la cantidad de clones que presentan un determinado cambio, su posición en el genoma, tipo de cambio a nivel nucleotídico y aminoacídico, y posición en el codón respecto al marco de lectura de vp5 y vp2. Todos los cambios analizados corresponden a sustituciones de una única base.

Para describir los cambios nucleotídicos dividimos el análisis en la región no superpuesta de vp5 y vp2, y la región superpuesta vp5/vp2 (Tabla 4).

Tabla 4- Cambios encontrados en las diferentes secuencias analizadas.

	Cant de secs	Posición	VP5		VP2		Tipo de Cambio Nucleotídico	Tipo de Cambio Aminoacídico	
			Codón	AA	Codón	AA		VP5	VP2
VP5	1	128	AGC---GGC	Ser---Gly			Transición	No Sinónimo	
VP5/VP2	1	165	TGT---TAT	Cys---Tyr	GTT---ATT	Val---Ile	Transición	No Sinónimo	No sinónimo
	1	200	CGG---TGG	Arg---Trp	ACC---ACT	Thr---Thr	Transición	No Sinónimo	Sinónimo
	1	280	GGG---GGC	Gly---Gly	GGG---GCG	Gly---Ala	Transversión	Sinónimo	No sinónimo
	1	333	TGT---TTT	Cys---Phe	GTG---TTG	Val---Leu	Transversión	No Sinónimo	No sinónimo
	1	373	CAA---CAT	Gln---His	AAG---ATG	Lys---Met	Transversión	No Sinónimo	No sinónimo
	1	404	CCT---TCT	Pro---Ser	AAC---AAT	Asn---Asn	Transición	No Sinónimo	Sinónimo
VP2	1	550			AGC---AAC	Ser---Asn	Transición		No sinónimo
	1	577			GCC---GTC	Ala---Val	Transición		No sinónimo
	1	604			GTC---GCC	Val---Ala	Transición		No sinónimo
	1	623			GTA---GTT	Val---Val	Transversión		Sinónimo
	1	787			CAG---CTG	Gln---Leu	Transversión		No sinónimo
	1	800			GGT---GGC	Gly---Gly	Transición		Sinónimo
	2	901			CTG---CCG	Leu---Pro	Transición		No sinónimo
	1	941			GCG---GCA	Ala---Ala	Transición		Sinónimo
	1	954			GCT---ACT	Ala---Tre	Transición		No sinónimo
	2	966			GAC---AAC	Asp---Asn	Transición		No sinónimo
1	1100			GAT---GAC	Asp---Asp	Transición		Sinónimo	
1	1117			GCA---GTA	Ala---Val	Transición		No sinónimo	

Región Hipervariable

Región vp5 no superpuesta.- En la región no solapada del gen vp5 se observa una sustitución en la posición 128 del genoma. Dicha sustitución se ubica en la primera posición del codón y genera un cambio no sinónimo, sustituyendo el aminoácido (aa) serina por glicina. Desde el punto de vista bioquímico, ambos aminoácidos son hidrofílicos y neutros.

La sustitución nucleotídica encontrada en esta región corresponde a una transición.

Región vp2 no superpuesta.- En el caso de la región no solapada de vp2 observamos catorce sustituciones, doce de las cuales correspondieron a transiciones (Tabla 4). Del total de las sustituciones, el 71% (10 de 14) corresponde a cambios de tipo no sinónimo (Tabla 4). En su mayoría estuvieron ubicadas dentro de la región hipervariable. Dos de ellas fueron compartidas por dos clones cada una. Ambos cambios repetidos no sinónimos se ubicaron entre las

proyecciones hidrofóbicas A y B (Azad *et al.*, 1987) en las posiciones 901 y 966 del genoma. Para la posición 901, ubicada en la espícula A, los aminoácidos involucrados en el cambio son de tipo hidrofóbico polar (leucina-prolina). Sin embargo, el cambio en la espícula B involucró dos aminoácidos bioquímicamente diferentes, ácido aspártico y asparagina, que a pesar que ambos son hidrofílicos, el primero es ácido mientras que el segundo es de polaridad neutra.

El resto de las sustituciones no sinónimas observadas produjeron cambios más o menos drásticos en relación a las propiedades bioquímicas de los aminoácidos involucrados. Por ejemplo, en la posición 954 del genoma, la alanina, que es aminoácido hidrofóbico no polar, cambia por treonina, el cual es hidrofílico y neutro; y en la posición 787 el cambio que ocurrió fue glutamina, hidrofílico de polaridad neutra, por leucina que es hidrófobo sin polaridad.

Región superpuesta vp5/vp2.- Para realizar un correcto análisis de las sustituciones nucleotídicas en esta región, y poder determinar su efecto en cada proteína debimos tener en cuenta el marco de lectura de vp5 y vp2. Ambos marcos presentan un desfase del tipo +1, siendo la 2^a posición del codón de vp5 la primera en vp2.

En esta región se encontraron seis sustituciones nucleotídicas (Tabla 4). Para el marco de vp5, cinco de ellas fueron no sinónimas, mientras que para el marco de vp2, cuatro fueron de este mismo tipo. No parece haber habido correlación ni direccionalidad en el tipo de cambio de acuerdo al marco de lectura. Esto significa que hubo cambios no sinónimos para ambos marcos de lectura en la misma posición, así como cambios que fueron sinónimos para vp5 resultaron no sinónimos para vp2, y viceversa. En ningún caso se presentó un cambio sinónimo simultáneo para ambos marcos.

En relación a las características bioquímicas de los cambios aminoacídicos, estos mantuvieron sus propiedades en la mayoría de los casos en ambas proteínas.

Al igual que en el resto de las regiones analizadas, en la región superpuesta, la mayoría de los cambios nucleotídicos correspondieron a transiciones (4 de 6).

4.2.3 Análisis comparativo con cepas de IBDV de diferente procedencia geográfica

Una vez descritas las mutaciones detectadas en los clones de la muestra hipervirulenta M8, se realizó un análisis comparativo de sus secuencias con diferentes secuencias maestras de vvIBDVs reportadas en el GenBank, con el fin de identificar que mutaciones nucleotídicas y aminoacídicas son toleradas por IBDV.

Los resultados obtenidos revelaron que ninguna de las mutaciones de los clones de M8 correspondiente a la región de vp5 fue encontrada en las secuencias de los aislamientos obtenidos del GenBank. Sin embargo cuatro de los sitios cambiados en los clones de vp2 también variaron en cepas de otros sitios del mundo. Solamente uno de ellos (posición 623) se ubicó por fuera de la región hipervariable, mientras que los tres restantes (941, 966, y 1100) se ubicaron dentro de ella.

La **posición 623**, ubicada fuera de la región hipervariable, presentó diferencias en cinco secuencias distintas, pudiendo estar presente la base A, T, G, o C en dicho lugar. No obstante todos los cambios nucleotídicos en dicha posición mantuvieron el mismo aminoácido.

La **posición 941**, incluida en la región hipervariable, presentaba una G en la mayoría de las secuencias comparadas con excepción de un aislamiento hipervirulento y uno de los clones que presentaban una T y una A respectivamente. De todos modos el aminoácido alanina permaneció incambiado.

El cambio en la **posición 966** fue compartido por dos clones de M8 y se encontró también en tres cepas de vvIBDV. Todos ellos presentaron una A en la primera posición del codón, mientras que el resto de las secuencias comparadas tuvieron G en su lugar. Los mencionados cambios de nucleótidos generaron una variación hacia el aminoácido asparagina en los primeros, mientras que el resto de los aislamientos mantuvo ácido aspártico. Desde el punto de vista bioquímico, ambos aminoácidos son hidrofílicos pero presentan diferente polaridad, siendo neutro el primero y ácido el segundo.

Dos secuencias presentaron C en lugar de T en la **posición 1100** del genoma. Dicha sustitución se ubicó en la tercera posición del codón de acuerdo al marco de

lectura de vp2 de manera que se mantuvo el mismo aminoácido en las 47 secuencias analizadas.

5. DISCUSIÓN

Desde fines de los 70s, cuando Eigen y Schuster proponen su existencia (Eigen & Schuster, 1979), el estudio de las cuasiespecies ha despertado el interés de un gran número de investigadores vinculados a la dinámica de poblaciones virales. Su importancia se refuerza con la constante incorporación de especies virales que siguen un patrón representativo de cuasiespecies. Modelos virales esencialmente de RNA, pertenecientes a diversas familias como *Retroviridae*, *Picornaviridae*, *Coronaviridae*, son ejemplos en los que se aplica este concepto. Sin embargo aún quedan muchas especies de virus en las que aun se desconoce si se organizan de esta manera.

Si bien se ha sugerido la existencia de cuasiespecies en la familia *Birnaviridae* (Hsu *et al.*, 1995; Jackwood & Sommer, 2002), las evidencias experimentales son indirectas y obtenidas mediante metodologías poco adecuadas para el análisis de las cuasiespecies.

Existen dos abordajes posibles para la obtención de secuencias nucleotídicas de los componentes individuales del espectro de mutantes de una cuasiespecie (Fields, 2007). Una se basa en la obtención de clones biológicos a partir de cultivos celulares con la subsiguiente amplificación del genoma viral por PCR o RT-PCR y posterior secuenciación. Este mecanismo, no es afectado por errores introducidos por las enzimas utilizadas en el proceso, pero sí puede sesgar la información de secuencias hacia los clones más infectivos para las células utilizadas en el cultivo. El procedimiento alternativo consiste en la secuenciación de clones moleculares obtenidos a partir del genoma total del virus, seguido de una amplificación y una posterior clonación de copias individuales en un vector. Este método no depende de la infectividad de los genomas virales y además permite el análisis de genomas defectivos. Sin embargo, se puede producir un sesgo por la fidelidad de las enzimas utilizadas durante la amplificación *in vitro*, el cual se puede corregir utilizando polimerasas de alta fidelidad.

El procedimiento utilizado en el presente trabajo corresponde al segundo abordaje, utilizando la polimerasa *Pfu* de alta fidelidad. Durante las distintas etapas del proceso se obtuvieron resultados que sugieren una organización en

cuasiespecies en IBDV, determinándose la presencia de variaciones genéticas que conformarían la nube de mutantes de la población estudiada.

Nuestro diseño experimental consistió en el estudio de dos regiones del genoma de IBDV en las que, *a priori*, se había establecido la acción diferencial de presiones selectivas (van den Berg, 1991; Vakharia *et al.*, 1994; Hernández *et al.*, 2010). En este sentido, la región hipervariable de la proteína VP2, relacionada a la reactividad antigénica del virus, presenta un nivel de variabilidad mayor que el resto del genoma de IBDV. Por otra parte, el 90% del gen vp5 se encuentra solapado de forma terminal con la región que codifica el anclaje de la proteína VP2, representando una zona muy conservada del genoma de IBDV. Este análisis se realizó con el objetivo de establecer si las variaciones nucleotídicas encontradas en nuestros clones siguen un patrón al azar o responden a la acción del modelo de selección determinado para este virus.

Como resultado, observamos que la frecuencia de mutación de los clones para la región hipervariable de vp2 fue de $2,1 \times 10^{-3}$ sustituciones por nucleótido. Esta frecuencia de mutación parecería ser coherente con la publicada para esta región del genoma, que oscila entre 1.86 a 2.09×10^{-3} sustituciones por nucleótido (Jenkins *et al.*, 2002). No obstante, debemos ser cautelosos en la interpretación de este resultado en la medida en que no serían datos estrictamente comparables. La frecuencia obtenida por el comparativo de nuestros clones estaría reflejando la variación intrínseca de una población viral particular; esto es, la variación existente en la posible nube de mutantes obtenida del aislamiento que utilizamos en el presente estudio (M8). Puede no tener relación con la frecuencia de mutación determinada por Jenkins *et al.* (2002) obtenida a partir del análisis comparativo de secuencias de distintos aislamientos reportados en diversas partes del mundo y en diferentes momentos. Concretamente, de existir cuasiespecies en IBDV, dichos aislamientos representarían la secuencia maestra de la nube de mutantes de cada reporte.

Por otro lado, para el gen vp5 la frecuencia de mutación observada entre los clones obtenidos de la muestra M8 fue de $0,63 \times 10^{-3}$ sustituciones por nucleótido. Se constata una notable diferencia en la frecuencia de mutación entre los clones de vp5 en relación a los observados para la región hipervariable de vp2. Una

reducción de 70% en la frecuencia de mutación de vp5 estaría reflejando algo más que la incorporación de cambios por fallas en la técnica aplicada, más aun considerando que la incorporación de error de la *Pfu* utilizada es del orden de 1000 veces menor ($1,3 \times 10^{-6}$ sustituciones por nucleótido por ciclo) que la observada para cualquiera de los dos grupos de clones. Tampoco se puede desestimar que el fragmento de los clones de vp5 es más de 1/3 mayor que el utilizado para el estudio de vp2. Si las variaciones nucleotídicas se debieran a errores introducidos en la manipulación, estos serían al azar. Como consecuencia esperaríamos ver mayor cantidad de variaciones en los clones con el fragmento más largo. Los resultados dieron lo contrario, lo que sería otro indicativo que el cambio de frecuencias se debería a algo no relacionado al proceso experimental.

Recordemos que naturalmente la región del genoma que codifica al gen vp5 está sometida a presiones selectivas que reducen su capacidad de variación nucleotídica en relación a la región genómica que codifica la región antigénica de vp2; se considera que esta última zona del genoma es donde las presiones selectivas permiten mayores cambios. Siguiendo esta línea de razonamiento, la marcada diferencia de frecuencias de mutación observada en los clones representativos de ambas regiones genómicas (vp5 y vp2) estaría reflejando claramente la acción de presiones selectivas según se ha determinado para IBDV.

Si lo que observamos es el producto de las presiones selectivas, podemos asumir por lo tanto que en la muestra analizada existe una población de virus sobre la que las presiones están actuando. Por lo tanto con este estudio estaríamos poniendo en evidencia una organización poblacional de virus extraídos de una muestra que reflejan una estructura de cuasiespecies.

A esta evidencia debemos sumar la detección en nuestros clones de cambios nucleotídicos que se repiten en aislamientos reportados en otros lugares del mundo. Que dicho cambio se encuentre en aislamientos ya reportados disminuye la probabilidad de que se trate de un error introducido al azar por manipulación. Por el contrario refuerza la posibilidad que se trate de un cambio permitido por la selección, y que por lo tanto su presencia en los clones se debe a la presencia en la muestra de mutantes que lo presentan.

Además, existieron cambios repetidos en más de un clon analizado, sustentando que se trataría de variaciones de alta frecuencia en el espectro de mutantes. Notoriamente, hubieron cambios repetidos entre los clones que también fueron encontrados en aislamientos previamente reportados, sugiriendo que serían variaciones relativamente permitidas dentro de las cuasiespecies de IBDV.

En cuanto a los cambios observados en la estructura de la proteína correspondiente, no tenemos condiciones de afirmar el impacto que puedan tener en la evolución de la nube de mutantes. No obstante, si efectivamente IBDV se organiza en cuasiespecies como lo indican las evidencias obtenidas del presente trabajo, estudiar el grado de impacto que provocan los cambios más frecuentes de la nube de mutantes, podría proporcionar información evolutiva de gran utilidad para entender la epidemiología de este virus.

6. AVANCES LOGRADOS Y PERSPECTIVAS

El presente trabajo constituye un precedente en el estudio de la dinámica poblacional del virus de Gumboro, y también de los *Birnaviridae*, como primer trabajo específicamente dirigido a detectar cuasiespecies en un miembro de esta familia.

Es destacable dentro de la estrategia utilizada haber analizado dos regiones genómicas en las que previamente se hayan constatado diferencias en sus frecuencias de mutación. El hecho de que éstas diferencias se mantengan en los clones analizados sustenta que éstos provienen de una población subyacente sometida a presiones selectivas.

Que los resultados hayan dado variaciones nucleotídicas repetidas en los clones analizados, y que éstas a su vez estén presentes en aislamientos reportados en el banco de datos, sugiere que no se trata de una ocurrencia azarosa inducida por errores de la técnica empleada.

De acuerdo al objetivo general propuesto de “*Investigar la existencia de un sistema de cuasiespecies...*” creemos que hemos realizado una investigación cuyo diseño experimental generó resultados que sugieren sólidamente la existencia de cuasiespecies en el virus de Gumboro.

Como perspectiva vemos necesario diseñar en un próximo trabajo, un modelo experimental en el que se aplique la estrategia alternativa de estudio de cuasiespecies para la obtención de clones biológicos a partir de cultivos celulares. De esta manera corroboraríamos que IBDV presenta este tipo de organización poblacional. Considerar que el virus de Gumboro tiene una dinámica de cuasiespecies significaría un gran avance para entender su epidemiología, y para generar nuevas estrategias de control y desarrollo de vacunas.

7. BIBLIOGRAFIA

- Allan, W.**, Faragher, J. & Cullen, G. Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease. *Vet Rec.* 90(18):511-2. **1972.**
- Azad, A.**, Barrett, S. & Fahey, K. The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of Infectious Bursal Disease Virus. *Virology* 143(1):35-44. **1985.**
- Azad, A.**, Jagadish, M., Brown, M. and Hudson, P. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology* 161:145–152. **1987**
- Banda, A.**, Villegas, P. and El-Attrache, J. Molecular characterization of infectious bursal disease virus from commercial poultry in the United States and Latin America. *Avian Dis.* 47:87–95. **2003.**
- Banda, A.** and Villegas, P. Genetic characterization of very virulent infectious bursal disease viruses from America Latina. *Avian Dis.* 48(3): 540-549. **2004.**
- Batschelet, E.**, Domingo, E. & Weissmann, C. The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. *Gene* 1:27-32. **1976.**
- Bayliss, C.**, Spies, U., Shaw, K., Peters, R., Papageorgiou, A., Müller, H. & Bournnell. A comparison of the sequences of segment A of four Infectious Bursal Disease Virus strains and identification of a variable region in VP2. *J. Gen. Virol* 71:1303-1312. **1990.**
- Boot, H. & Pritz-Verschuren, S.** Modifications of the 3'-UTR stem-loop of Infectious Bursal Disease Virus are allowed without influencing replication or virulence. *Nucleic Acid Res* 32(1):211-222. **2004.**
- Bottcher, B.**, Kiselev, N. A., Stel'Mashchuk, V. Y., Perevozchikova, N. A., Borisov, A. V., Crowther, R. A. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J. Virol.* 71(1): 325-30. **1997.**

- Brandt, M.**, Yao, K., Liu, M., Heckert, R. and Vakharia, V. Molecular determinants of virulence, cell tropism and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 75(24): 11974- 11982. **2001.**
- Brown, M. & Skinner, M.** Coding sequences of both genome segments of a European “very virulent” infectious bursal disease virus. *Virus Res.* 40(1):1-15. **1996.**
- Cao, Y.**, Yeung, W., Law, M., Bi, Y. Leung, F. and Lim, B. Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent and variant strains. *Avian Dis.* 42:340–351. **1998.**
- Chevalier, C.**, Lepault, J., Da Costa, B. and Delmas, B. The last C-terminal residue of VP3, glutamic acid 257, controls capsid assembly of Infectious Bursal Disease Virus. *J. Virol.* 78(7):3296-3303. **2004.**
- Cosgrove, A.** An apparently new disease of chickens-avian nephrosis. *Avian Dis.* 6: 385-389. **1962.**
- Da Costa, B.**, Chevalier, C., Henry, C., Huet, J-C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H. & Delmas, B. The capsid of Infectious Bursal Disease Virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J. Virol.* 76:2393-2402. **2002.**
- Di Fabio, J.**, Rossini, L., Eterradossi, N., Toquin, M. and Gardin, Y. European-like pathogenic infectious bursal disease viruses in Brazil. *Vet. Rec.* 145: 203–204. **1999.**
- Dobos, P.**, Hill, B., Hallett, R., Kells, D., Becht, H. and Teninges, D. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol.* 32(2): 593-605. **1979.**
- Dockter, J.**, Evans, C., Tishon, A., Oldstone, M. Competitive Selection In Vivo by a Cell for One Variant over Another: Implications for RNA Virus Quasispecies In Vivo. *J. Virol.* 70:1799-1803. **1996.**
- Domanska, K.**, Rivallan, G., Smietanka, K., Toquin, D., De Boisseson, C., Minta, Z. and Eterradossi, N. Genetic characterization of Polish infectious bursal disease virus strains. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 47:61–69. **2003.**
- Domingo, E.**, Sabo, D., Taniguchi, T. & Weissman, C. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* 13:735-744. **1978.**

- Domingo, E.**, Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C., Martín-Hernández, A., Sáiz, J. & Escarmís, C. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerging Infectious Diseases*. 4(4):521-527. **1998**.
- Domingo, E.**, Biebricher, C. & Eigen, M. Quasispecies and RNA Virus Evolution: Principles and Consequences. Austin: Landes Bioscience. **2001**.
- Domingo, E.** ed. Quasispecies: concepts and implications for virology. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **2006**.
- Domingo, E. & Gomez, J.** Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Research*. 127: 131-150. **2007**.
- Duncan, R.**, Mason, C., Nagy, E., Leong, J. & Dobos, P. Sequence analysis of Infectious Pancreatic Necrosis Virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology* 181(2):541-552. **1991**.
- Drake, J. & Holland, J.** Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13910-13913. **1999**.
- Eigen, M. & Schuster, P.** The hypercycle. A principle of natural self-organization. Berlin: Springer. **1979**.
- El Zowalaty, M.**, Chander, Y., Redig, P., Abd El Latif, H., El Sayed, M. & Goyal, S. Selective isolation of Avian influenza virus (AIV) from cloacal samples containing AIV and Newcastle disease virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23(2):330-2. **2011**.
- Eterradossi, N.** Progress in the diagnosis and prophylaxis of Infectious Bursal Disease in poultry, comprehensive reports on technical items presented to the International Committee or to regional commissions. *OIE* 75-82. **1995**.
- Eterradossi, N.**, Arnauld, C., Tekaia, F., Toquin, D., Coq, H., Rivallan, G., Guittet, M., Domenech, J., Van Den Berg, T. and Skinner, M. Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate. *Avian Pathol.* 28:36-46. **1999**.
- Fields.** Virology. Knipe, D. & Howley, P. (Editors). Lippincott Williams & Wilkins. 5th edition. 3177 p. ISBN: 0781760607. **2007**.

- Goddard, R.**, Wyeth, P. & Varney, W. Vaccination of commercial layer chicks against infectious bursal disease with maternally derived antibodies. *Vet. Rec.* 135(2):273-4. **1994.**
- Gmyl, A.**, Korshenko, S. & Belousov, E. Nonreplicative homologous RNA recombination: promiscuous joining of RNA pieces? *RNA* 9:1221-1231. **2003.**
- Hassan, M.**, Afify, M. and Aly, M. Susceptibility of vaccinated and unvaccinated Egyptian chickens to very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.* 31:149–156. **2002.**
- He, X.**, Wei, P., Guan, D., Yang, X. & Qin, A. Molecular epidemiology of infectious bursal disease virus in Guangxi during the period of 2000 to 2007. *Bing Du Xue Bao.* 25(6):437-44. **2009.**
- Hernández, M.**, Banda, A., Hernández, D., Panzera, F. and Pérez, R. Detection of very virulent strains of infectious bursal disease virus (vvIBDV) in commercial broilers from Uruguay. *Avian Dis.* 50:624-631. **2006.**
- Hernández, M.**, Villegas, P., Hernández, D., Banda, A., Maya, L., Romero, V., Tomás, G. & Pérez, R. Sequence variability and evolutionary trends of the VP5 gene in very virulent strains of Infectious Bursal Disease Virus. *Virus Genes.* 41:59-66. **2010.**
- Hirai, M.**, Funakoshi, T., Nakai, T. and Shimakura, S. Sequential changes in the number of surface immunoglobulin-bearing B lymphocytes in infectious bursal disease virus-infected chickens. *Avian Dis.* 25:484-496. **1981.**
- Hjalmarsson, A.**, Carlemalm, E. and Everitt, E. Evidence for O-linked glycosylation of the capsid protein VP2. *J. Virol.* 73(4):3484-3490. **1999.**
- Hon, C.**, Lam, T., Yip, C., Wong, R., Shi, M., Jiang, J., Zeng, F. & Leung, F. Phylogenetic evidence for homologous recombination within the family *Birnaviridae*. *J. Gen. Virol.* 89(Pt 12): 3156-64. **2008.**
- Hoque, M.**, Omar, A., Chong, L., Hair-Bejo, M. and Aini, I. Pathogenicity of Ssp I-positive infectious bursal disease virus and molecular characterization of the hypervariable region. *Avian Dis.* 30:369–380. **2001.**
- Hsu, Y.**, Chen, C. & Wu, J. Molecular relationships in Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Virus Res.* 37:239-252. **1995.**

- Hudson, P.**, McKern N., Power, B. and Azad, A. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res.* 14(12): 5001-5012. **1986.**
- Jackwood, D. & Saif, Y.** Antigenic diversity of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 31(4):766-70. **1987.**
- Jackwood, D. & Sommer, S.** Identification of Infectious Bursal Disease Virus quasispecies in commercial vaccines and field isolates of this double-stranded RNA virus. *Virology.* 304:105-113. **2002.**
- Jenkins, G.**, Rambaut, A., Pybus, O. & Holmes, E. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J. Mol. Evol.* 54(2):156-65. **2002.**
- Kibenge, F.**, Nagarajan, M. and Qian, B. Determination of the 5´ and 3´ terminal noncoding sequences of the bi-segmented genome of the avibirnavirus infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 141(6): 1133-1141. **1996.**
- Lauring, A. S. & Andino, R.** Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog* 6(7): e1001005. doi:10.1371/journal.ppat.1001005. **2010.**
- Le Nouën, C.**, Rivallan, G., Toquin, D., Darlu, P., Morin, Y., Beven, V., de Boisseson, C., Cazaban, C., Comte, S., Gardin, Y. & Etteradossi, N. Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare segment-B-reassorted isolate. *J. Gen. Virol.* 87(Pt 1):209-16. **2006.**
- Lejal, N.**, Da Costa, B., Huet, J. and Delmas, B. Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of Infectious Bursal Disease Virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *J. Gen. Virol.* 81:983-992. **2000.**
- Leong, J.C.**, Brown, D., Dobos, P., Kibenge, F.S.B., Ludert, J.E., Muller, H., Mundt, E., Nicholson, B. Family Birnaviridae, in: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.L., Cartens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B. (Eds.), *Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, Academic Press, San Diego, pp. 481–1490. **2000.**

- Lim, B.**, Cao, Y., Yu, T. and Mo, C. Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblast by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2. *J. Virol.* 73(4): 2854-2862. **1999.**
- Lin, Z.**, Kato, A., Otaki, Y., Nakamura, T., Sasmaz, E. and Ueda, S. Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis.* 37:315–323. **1993.**
- Liu, X.**, Giambrone, J. & Dormitorio, T. Simplified sample processing combined with a sensitive nested polymerase chain reaction assay for detection of infectious bursal disease virus in the bursa of Fabricius. *Avian Dis.* 42:480–485. **1998.**
- Liu, M. & Vakharia, V.** Nonstructural Protein of Infectious Bursal Disease Virus Inhibits Apoptosis at the Early Stage of Virus Infection. *J. Virol.* 80:3369-3377. **2006.**
- Lombardo, E.**, Maraver, A., Caston, J., Rivera, J., Fernandez-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. and Rodriguez, J. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J. Virol.* 73, 6973–6983. **1999.**
- Lombardo, E.**, Maraver, A., Espinosa, I., Fernández-Arias, A., & Rodríguez, F. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology* 277:345–57. **2000.**
- Lukert, P. & Saif, Y.** Infectious Bursal Disease. En: Diseases of poultry/edited by Y. M. Saif- 11th ed. Poultry-Diseases. I. Saif, Y. M. SF995. D69 2003 636.5`0896-dc21. Chapter 6. **2003.**
- Maraver, A.**, Clemente, R. Rodríguez, J. and Lombardo, E. Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of Infectious Bursal Disease Virus inner capsid protein VP3. *J. Virol.* 77(4):2459-2468. **2003.**
- McFerran, J.**, McNulty, M., McKillop, E., Connor, T., McCracken, R., Collins, D. & Allan, G. Isolation and serological studies with Infectious Bursal Disease

- viruses from fowls, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. *Avian Pathol.* 9(3):395-404. **1980.**
- Morgan, M.,** Macreadie, I., Harley, V., Hudson, P. & Azad, A. Sequence of the small double-stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90-kDa product. *Virology.* 163(1):240-242. **1988.**
- Müller, H.,** Kaufer, I., Reinacher, M., and Wiess, E. Immunofluorescent studies of early virus propagation after oral infection with infectious bursal disease virus (IBDV). *Zentralbl Veterinarmed. B* 26(5): 345-352. **1979.**
- Müller, H. & Becht, H.** Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. *J. Virol.* 44(1):384-92. **1982.**
- Müller, H. & Nitschke, R.** The two segments of Infectious Bursal Disease Virus genome are circularized by a 90.000-Da protein. *Virology* 159:174-177. **1987.**
- Mundt, E.,** Köllner, B. and Kretzschmar, D. VP5 of Infectious Bursal Disease Virus is not essential for viral replication in cell culture. *J. Virol.* 71(7): 5647-5651. **1997.**
- Nagy, P & Simon, A.** New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* 235:1-9. **1997.**
- Nunoya, T.,** Otaki, Y., Tajima, M., Hiraga, M. and Saito, T. Occurrence of acute infectious bursal disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field isolates in SPF chickens. *Avian Dis.* 36:596–609. **1992.**
- Otaki, Y.** Enfermedad de la Bolsa de Fabricio. En: Boletín Técnico N°9 PRODIVET. Pag. 1-6. <http://project.jica.go.jp/mexico/2451085E0/>. **2005.**
- Pascucci, S.** La malattia di Gumboro. In 7^o Corso di formazione specialistica per veterinari in tecnica dell'allevamento avicolo e patologia aviare. *Vol Brescia.* **1998.**
- Petit, S.,** Lejal, N. Huet, J and Delmas, B. Active residues and viral substrate cleavage sites of the protease of the Birnavirus Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *J. Virol.* 74(5): 2057-2066. **2000.**

- Phong, S.**, Hair-Bejo, M., Omar, A. and Aini, I. Sequence analysis of Malaysian infectious bursal disease virus isolate and the use of reverse transcriptase nested polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of VP2 hypervariable region. *Avian Dis.* 47:154–162. **2003.**
- Ruíz-Jarabo, C. M.**, Arias, A., Baranowski, E., Escarmís, C. & Domingo, E. Memory in viral quasispecies. *J. Virol.* 74, 3543–3547. **2000.**
- Rosemberg, J. & Cloud, S.** Isolation and characterization of variant Infectious Bursal Disease viruses. *J Am Vet Med Assoc.* 189-357. **1986.**
- Sambrook, J.**, Fritsch, E. & Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2^a Edición. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.* **1989.**
- Saugar, I.**, Luque, D., Oña, A., Rodriguez, J., Carrascosa, J., Trus, B. & Castón, J. Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic α helix as a molecular switch. *Structure* 13:1007-1017. **2005.**
- Schneider, W. & Roossinck, M.** Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *J. Virol.* 75, 6566–6571. **2001.**
- Snyder, D.**, Vakharia, V. and Savage, P. Naturally occurring neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease virus in the United States. *Arch. Virol.* 127:89–102. **1992.**
- Spies, U.**, Müller, H. and Becht, H. Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res.* 8:127-140. **1987.**
- Spies, U. & Müller, H.** Demonstration of enzyme activities required for capsid structure formation in Infectious Bursal Disease Virus, a member of the Birnavirus group. *J. Gen. Virol.* 71:977-981. **1990.**
- Tacken, M.**, Rottier, P., Gielkens, A. and Peeters, B. Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. *J Gen Virol* 81, 209–218. **2000.**
- Tacken, M.**, Peeters, B., Thomas, A., Rottier, P. & Boot, H. Infectious Bursal Disease Virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-

- dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J. Virol.* 76(22):11301-11311. **2002.**
- Vakharia, V.,** He, J., Ahamed, B. & Snyder, D.B. Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Research.* 31, 265±273. **1994.**
- van den Berg, T.,** Gonze, M. and Meulemans, G.. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian Pathol.* 20:133–143. **1991.**
- van den Berg, T.,** Morales, D., Gonze, M. & Meulemans, G. Relevance of antigenic variation for protection in infectious bursal disease. In *Proceedings of the 1st International Symposium on Infectious Bursal Disease and Infectious Anaemia*, Rauschholzhausen, Germany, 21±24 June 1994, pp. 22±36. **1994.**
- Van den Berg, T.,** Etteradossi, N., Toquin, D. & Meulemans, G. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev. Sci. Tech.* 19(2):509-43. **2000.**
- Vignuzzi, M.,** Stone, J.K., Arnold, J.J., Cameron, C.E. & Andino, R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439, 344–348. **2006.**
- Winterfield, R. & Hitchner, S.** Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am J Vet Res* 23:1273-9. **1962.**
- Zierenberg, K.,** Nieper, H., Van Den Berg, T., Ezeokoli, C., Voss, M. and Muller, H. The VP2 variable region of African and German isolates of infectious bursal disease virus: comparison with very virulent, “classical” virulent, and attenuated tissue culture-adapted strains. *Arch. Virol.* 145:113–125. **2000.**

Anexo I: Protocolos

Extracción del RNA viral

Todo el procedimiento se realizó con material libre de RNasas.

Pretratamiento con SDS 5% y proteinasa K

1. Tomar 50 mg de tejido de los pliegues internos de la bursa, macerar bien con tijera y colocar en un tubo (uno por cada muestra).
2. Agregar 100 μ l de SDS 5% y continuar la maceración con tijera.
3. Agregar 4 μ l de proteinasa K (Fermentas, 18 mg/ml)
4. Incubar 1-2 horas a 60°C
5. Centrifugar 2 minutos a 10.000g

Homogeneización

6. Añadir 1 ml de TRIzol® Reagent (Invitrogen) a cada tubo
7. Mezclar con agitador

Separación de fases

8. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos
9. Agregar 200 μ l de cloroformo por ml de TRIzol
10. Mezclar con agitador durante 15 segundos
11. Incubar 3 minutos a temperatura ambiente
12. Centrifugar 115 minutos a 12.000g

Precipitación del RNA

13. Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo
14. Añadir 500 μ l de isopropanol (a 4°C) por cada ml de TRIzol
15. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente
16. Centrifugar 10 minutos a 12.000g

Lavado del RNA

17. Descartar el sobrenadante

18. Resuspender el RNA suavemente con 1 ml de etanol 75% por cada ml de TRIzol

19. Mezclar con agitador

20. Centrifugar 5 minutos a 7.500g

21. Secar el RNA en estufa a 55°C

22. Disolver el RNA en 30 μ l de agua libre de RNasas

Retrotranscripción con primers al azar

Para la obtención del cDNA se utilizó el RevertAid™ Minus First Strand cDNA Síntesis Kit (Fermentas Life Sciences Inc., Hanover, MD).

Durante todo el proceso se tuvo la precaución de trabajar siempre en hielo.

1. Homogeneizar 10 μ l de la muestra (RNA total extraído) y 1 μ l de Random Primers

Desnaturalización

2. Incubar 5 minutos a 98°C y pasar inmediatamente a hielo para impedir la rehibridación de las cadenas.

3. Con el tubo en hielo agregar en el siguiente orden:

Reactivo (Concentración)	Volumen
Buffer de Reacción (5X)	4 μ l
Ribolock (20 U/ μ l)	1 μ l
Mezcla de dNTPs (10 mM)	2 μ l

4. Incubar 5 minutos a 25°C

Retrotranscripción

5. Agregar 1 μ l de RevertAid™ Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200U/ μ l).

6. Incubar 10 minutos a 25°C

7. En el termociclador incubar 1 hora a 42°C y luego a 70°C durante 10 minutos.

Retrotranscripción con primers específicos

Para la obtención del cDNA se utilizó el RevertAid™ Minus First Strand cDNA Síntesis Kit (Fermentas Life Sciences Inc., Hanover, MD).

Durante todo el proceso se tuvo la precaución de trabajar siempre en hielo.

El protocolo con Primers Específicos se diferencia del anterior en tres pasos que se detallan a continuación:

- En el paso 1 se agrega a los 10 μl de la muestra 1 μl de cada uno de los primers específicos.
- La incubación del paso 4 se realiza a 37°C durante 5 minutos.
- Por último, no se realiza la incubación descrita en el paso 6.

Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%

Preparación del gel

1. 0,2 g de agarosa en 25 ml de buffer TAE 1X
2. Calentar hasta su disolución
3. Dejar enfriar y agregar bromuro de etidio a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Preparación del buffer TAE 50X

- 24,2 g de Tris base
- 5,71 ml de ácido acético glacial puro
- 20 ml de EDTA 0,25 M, pH 8
- Disolver y llevar hasta 100 ml con agua destilada miliRO.

Preparación de las muestras

Se prepararon con el buffer de carga “Orange Loading Dye 6X” (Fermentas™).

Buffer de carga

- Tris-HCl 10 mM, pH 7,6
- Orange G 0,15%
- Xylene cyanol FF 0.03%
- Glicerol 60%
- EDTA 60 mM

Clonación en células competentes *E. coli XL-1 Blue*

Para las reacciones de ligación y transformación se siguieron las instrucciones del fabricante del CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas Life Sciences Inc., Hanover, MD) según se detalla a continuación.

Reacción de ligación

1. Colocar en un tubo eppendorf de 1,5 ml los siguientes reactivos:
 - 10 µl de buffer de reacción 2X
 - 1-2 µl de producto de PCR (no exceder este volumen para evitar la inhibición de la T4 DNA ligasa por sales presentes en el buffer de PCR)
 - 1 µl del vector pJET1.2/blunt (50 ng/µl)
 - Agua libre de nucleasas c.s.p 19 µl
 - 1 µl de T4 DNA ligasa (5 U/µl)
2. Incubar la mezcla de ligación a temperatura ambiente (22°C) durante 5 minutos.

Reacción de transformación

Durante todo el proceso se tuvo la precaución de trabajar en condiciones de esterilidad.

1. Transferir 5 µl de la mezcla de ligación a un tubo eppendorf de 1,5 ml

2. Agregar 50 µl de células *E. coli XL-1 Blue* competentes
 3. Incubar en hielo durante 15 minutos
 4. Realizar un choque térmico por incubación a 42°C por 45 segundos y rápida transferencia a hielo por 2 minutos
 5. En un tubo “falcon” agregar 300 µl de medio SOC más 3 µl de glucosa 2M y 1,5 µl de magnesio 2M por cada ligación
 6. Incubar en shaker a 37°C durante 60-90 minutos
- Plaquear el cultivo en placas de petri con medio LB-agar pH7, precalentadas previamente en estufa a 37°C.
 - Incubar las placas toda la noche a 37°C
- Preparación de medio SOC (20 ml)
 - Pesar 0,4 g de triptona
 - Agregar 0,1 g de extracto de levadura
 - Adicionar 40 µl de NaCl 5M y 20 µl de KCl 2,5 M
 - Disolver en 10 ml de agua destilada miliRO
 - Llevar a 20 ml con agua destilada miliRO
 - Esterilizar por autoclave durante 20 minutos

Extracción del DNA plasmídico

Se realizó mediante el método de fenol-cloroformo según protocolo modificado de Sambrook (1989) como se detalla a continuación.

1. Transferir 1,5 ml del cultivo a un eppendorf de 1,5 ml
2. Centrifugar a 12.000 rpm durante 1 minuto
3. Descartar el sobrenadante y dejar bastante seco el pellet. Repetir pasos 1-3 en el mismo eppendorf hasta terminar el cultivo
4. Resuspender el pellet en 100 µl de solución I y mezclar bien con agitador
5. Agregar 200 µl de solución II recién preparada en cada eppendorf, agitar por inversión cinco veces y transferir a hielo rápidamente

6. Agregar 150 µl de solución III fría, invertir durante 10 segundos y mantener en hielo durante 3-5 minutos
7. Centrifugar durante 5 minutos a 12.000 rpm y transferir el sobrenadante a un nuevo eppendorf
8. Incubar con RNasa (2mg/ml) durante 30 minutos a 55°C, utilizando 2 µl cada 50 µl de volumen total
9. Realizar dos extracciones con 400 µl de fenol:cloroformo:isoamil (25:24:1) y centrifugar 5 minutos. Recuperar la fase superior y transferirla a un nuevo eppendorf
10. Realizar una extracción con 400 µl de cloroformo y centrifugar 5 minutos. Recuperar la fase superior y transferirla a un nuevo eppendorf
11. Precipitar el DNA agregando dos volúmenes de etanol absoluto frío y 0,1 volumen de acetato de sodio, agitar vigorosamente y guardar a -20°C durante toda la noche
12. Centrifugar durante 30 minutos a 12.000 rpm y descartar el sobrenadante
13. Lavar las sales del pellet agregando 500 µl de etanol 70% frío y centrifugar por 10 minutos
14. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet hasta evaporar las trazas de etanol (puede secarse en estufa a 55°C durante 5 minutos)
15. Resuspender el DNA en 30 µl de agua libre de nucleasas y guardar a -20°C