



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA



Facultad de Ciencias
Universidad de la República

“Variabilidad Genética de *Enterovirus* asociados a Encefalitis Pediátricas”

Ricardo Recarey Rizzo

**Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
Opción Biología Celular y Molecular, PEDECIBA**

Laboratorio de Virología Molecular

Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Orientador: Dr. Rodney Colina

Co-Orientador: Dr. Juan Cristina

JULIO 2011

INDICE

ABREVIATURAS	Pág 4
RESUMEN	Pág 6
1.-INTRODUCCION	Pág 7
1.1.- El virus	Pág 7
1.1.1.- Clasificación	Pág 7
1.1.2.-Tipificación	Pág 9
1.1.3.- El virión	Pág 10
1.1.4.- El genoma	Pág 17
1.2.- Ciclo replicativo	Pág 17
1.2.1.- Unión al receptor celular	Pág 17
1.2.2.- Entrada a la célula	Pág 18
1.2.3.- Traducción	Pág 19
1.2.4.- Replicación	Pág 20
1.2.5.- Ensamblaje	Pág 20
1.2.6.- Encapsidación	Pág 21
1.3.- Variabilidad génica	Pág 22
1.3.1.- Procesos evolutivos	Pág 22
1.4.- La enfermedad	Pág 24
1.4.1.- Meningitis viral	Pág 25
1.4.2.- Encefalitis viral	Pág 26
2.- OBJETIVOS	Pág 28
2.1.- Objetivo General	Pág 28
2.2.- Objetivos Específicos	Pág 28
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	Pág 29
3.1.- Obtención de muestras clínicas	Pág 29
3.2.- Obtención del control positivo	Pág 29
3.2.1.- Mantenimiento de la línea celular	Pág 29
3.2.2.- Aislamiento viral	Pág 31
3.3.- Extracción de ARN	Pág 31
3.4.- Transcripción reversa	Pág 31
3.5.- Determinación de los genotipos	Pág 32

3.5.1.- Amplificación de la región VP1	Pág 32
3.5.2.- Amplificación de la región 3CD	Pág 32
3.6.- Electroforesis en gel de agarosa	Pág 33
3.7.- Purificación de productos de PCR	Pág 33
3.8.- Secuenciación	Pág 33
3.9.- Estudios Bioinformáticos	Pág 35
4.- RESULTADOS	Pág 40
4.1.- Desarrollo de metodologías moleculares para la detección de HEV-B en LCR.	Pág 40
4.2.- Determinación de los genotipos	Pág 40
4.3.- Variabilidad en la región	Pág 42
4.4.- Evolución de los <i>Coxsackievirus B</i>	Pág 42
5.- DISCUSIÓN	Pág 57
6.- PERSPECTIVAS	Pág 61
7.- AGRADECIMIENTOS	Pág 62
8.- BIBLIOGRAFÍA	Pág 63

ABREVIATURAS

μ l	microlitros
3CD ^{pro}	Proteasa viral 3CD
ADNc	ácido nucleico copia
aLRT	test de relación de verosimilitud aproximada
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNt	Ácido Ribonucleico de Transferencia
CAP	capuchón
CAR	Receptor Coxsackie-Adeno
CD55	Factores de aceleración del decaimiento
COA	Análisis de Correspondencia
CRE	elemento replicativo en cis.
CVA	<i>Coxsackievirus A</i>
CVB	<i>Coxsackievirus B</i>
DNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
ENC	Número efectivo de codones
GARD	Algoritmo Genético para la Detección de Recombinantes
GC3s	Contenido en G y C en tercera posición sinónima
HEV-B	<i>Enterovirus Humanos B</i>
ICAM	molécula de adhesión intracelular 1.
IRES	sitio interno de entrada del ribosoma
kD	kiloDalton
LCR	líquido cefalorraquídeo
M	Molar
min	minutos
ml	mililitros
nm	nanómetros
nt	nucleótidos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PVR	Receptor de Poliovirus
RDA	Rhabdomiosarcoma Humano
rpm	revoluciones por minuto

RSCU	Uso relativo de codones sinónimos
RT-PCR	Retrotranscripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa
SCN	Sistema Nervioso Central
seg	segundos
TLR	receptores similares a toll
UTR	Región no codificante
VPg	Proteína unida al genoma

RESUMEN

Las encefalitis y meningitis representan la infección del sistema nervioso central (SNC) más comúnmente reportada y su presentación clínica varía con la edad del paciente. Los niños son la población más vulnerable, en los que se alcanzan las tasas más elevadas de infección durante los primeros meses de vida. Un segundo pico de incidencia suele acontecer durante la edad escolar. A pesar que desde el año 2004 se establece la obligatoriedad de notificar todo caso sospechoso de meningitis o meningoencefalitis, poco es lo que sabemos acerca de los agentes virales involucrados.

En el presente trabajo se pone a punto dos técnicas moleculares rápidas a partir directamente de líquido cefalorraquídeo (LCR) para la determinación de los *Enterovirus Humanos* correspondientes al grupo B (HEV-B). Éstos han sido reportados como los agentes etiológicos virales que se detectan con mayor frecuencia asociados a encefalitis pediátricas.

Directamente de LCR sin pasaje de cultivo, se logró la amplificación parcial por RT-PCR de los genes que codifican para VP1 y para la 3Dpolimerasa, en base a muestras de pacientes pediátricos uruguayos con diagnóstico de encefalitis, colectadas durante los últimos 5 años.

Se identifica por primera vez para nuestro país los genotipos de HEV-B causantes de encefalitis pediátricas que circularon en los últimos 5 años, siendo ellos CVA9, CVB2, CVB4, E4, E11 y E14. Determinándose un patrón claramente estacionario en los meses cálidos (noviembre a marzo).

Para comprender los procesos evolutivos que gobiernan la evolución de los *Coxsackievirus B* (CVB) así como su adaptación a los diferentes tipos celulares, analizamos el uso de codones de los distintos genotipos de CVB. La sub-utilización de los dinucleótidos CpG detectada en los CVB podría explicarse como un posible mecanismo de evasión de los receptores Tolls endógenos, los que se hallan implicados en la síntesis de interferón y desencadenan la respuesta inmune innata antiviral.

Los resultados sugieren que el uso de codones de los CVB está experimentando un proceso evolutivo, lo que probablemente refleja un proceso dinámico de selección para adaptar su uso de codones a distintos entornos.

1.- INTRODUCCION

1.1.- El virus

1.1.1.- Clasificación

El género *Enterovirus* es uno de los 9 géneros que integran la familia *Picornaviridae*.

Los *Enterovirus humanos* (HEV) fueron originalmente clasificados en 4 grupos en base a las enfermedades que producían en humanos, y a la virulencia producidas al ser inoculados intracranalmente en crías de ratones, estos grupos son: i) *Poliovirus* (PV) agentes causantes de poliomielitis en humanos, generalmente no patógenos en ratones; ii) *Coxsackievirus A* (CVA) asociados a enfermedades del sistema nervioso central, exantemas en humanos, y causantes de parálisis flácida en ratones; iii) *Coxsackievirus B* (CVB) asociados a enfermedades del sistema nervioso central y enfermedades cardíacas en humanos, y causantes de parálisis aséptica en ratones; y iv) *Echovirus* (E) de los cuales no se conocía enfermedades provocadas en humanos y no eran patogénicos al ser inoculados intracranalmente en ratones. Sin embargo esta clasificación resulta insuficiente para describir la totalidad de los HEV, es por lo que los nuevos serotipos fueron simplemente denominados *Enterovirus* (EV) y numerados secuencialmente a partir del EV68 (Wildy, 1971).

Actualmente se conocen más de 90 serotipos de HEV clasificados en 4 grupos (A-D), HEV-A (17 serotipos), HEV-B (56 serotipos), HEV-C (16 serotipos incluyendo los 3 serotipos de *Poliovirus*), y HEV-D (3 serotipos) (Oberste *et al.*, 2000) (Figura 1). Éstos son clasificados dentro del mismo serotipo si presentan una similitud nucleotídica mayor al 75% en el gen de la VP1 (85% de similitud aminoacídica) (Oberste *et al.*, 2004a).

El grupo de los HEV-B es el grupo mayoritario dentro de los Enterovirus y comprende a todos los 6 genotipos de CVB (1-6), CVA9, los E 1-7; 9; 11-21; 24-27; 29-33 y los EV 69; 73-75; 77-88; 97 y 100-101. Este grupo se halla asociado a enfermedades severas tales como meningitis, encefalitis, diabetes mellitus entre otras.

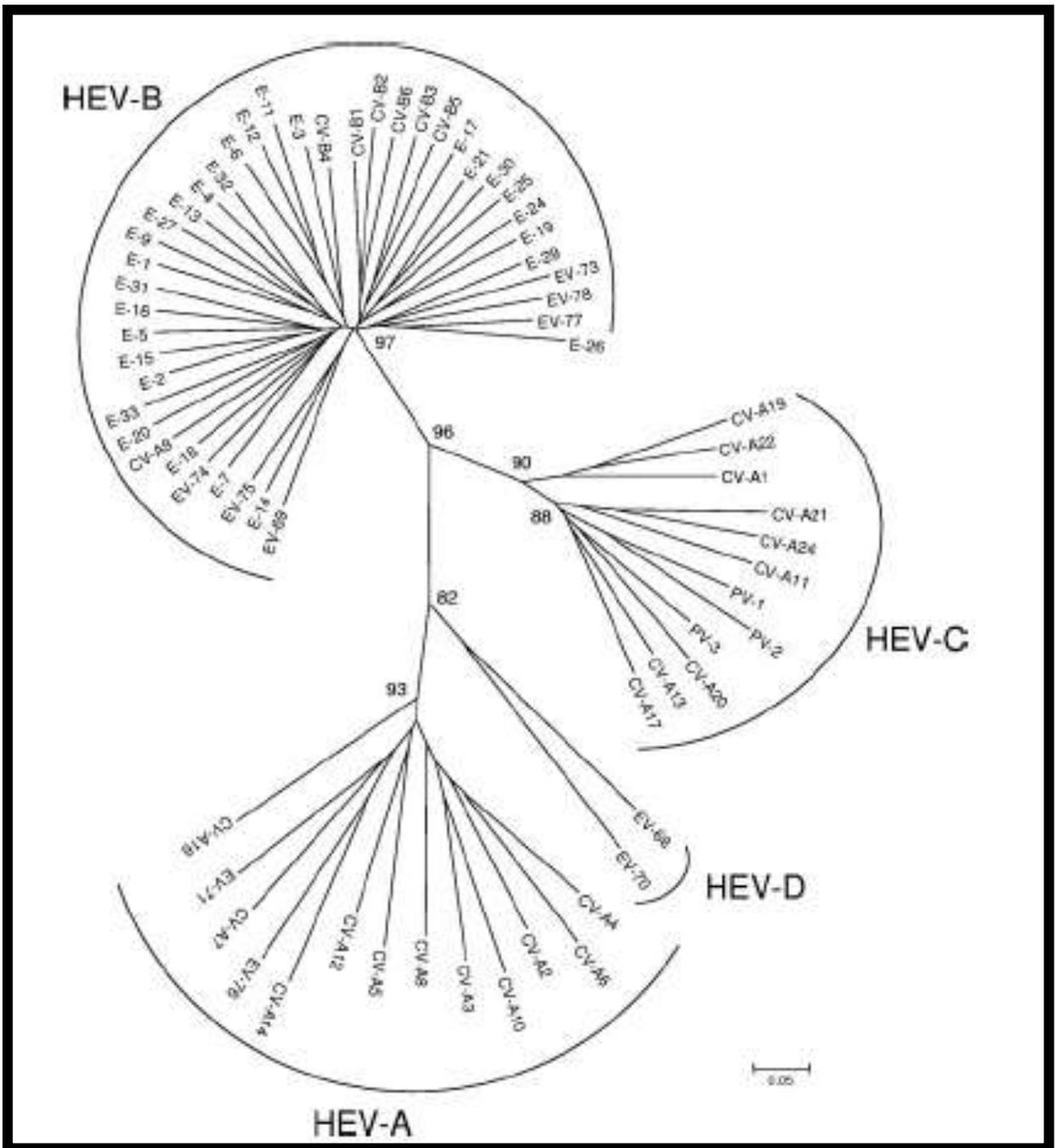


Figura 1. Árbol mostrando las relaciones filogenéticas entre las cepas prototipos de los principales HEV basadas en el alineamiento del gen que codifica a la proteína estructural VP2 (Tomado de Dorsaf *et al.*, 2007).

1.1.2.- Tipificación

En la década de los 80, la tipificación de las cepas de HEV consistió en el aislamiento del virus a partir de cultivos celulares donde se observa el efecto citopático, la identificación de los serotipos se realiza basándose en la neutralización con un pool de sueros equinos hiperinmunes y antisueros monovalentes policlonales para su confirmación. El test de diagnóstico más ampliamente utilizado es el de Lim, Benyesh-Melnick (LBM) (Melnick *et al.*, 1973), en el que anticuerpos de 42 enterovirus diferentes son mezclados en 8 grupos (A-H), el sobrenadante viral desconocido es incubado separadamente a 37°C durante 2 horas con cada pool de antisueros disponibles, luego la mezcla virus-antisuero se inyecta en otro sistema de cultivo celular susceptible durante varios días. El conjunto de grupos de antisueros que neutralizan al aislado desconocido es el que identifica al virus. Por ejemplo, si únicamente los grupos E y F neutralizan al virus, se puede afirmar que el aislado desconocido es E18 pues únicamente antisueros de ese virus se hallan en ambos grupos. Ésta técnica fue durante mucho tiempo el “Gold Standard”, pero es muy laboriosa, consume mucho tiempo y muchas cepas permanecen no tipificables (Muir *et al.*, 1998).

En las últimas décadas se han desarrollado test de ELISA para IgM específica para HEV, pero la existencia de reactividad cruzada entre algunos serotipos hace que el test no sea serotipo-específico (Boman *et al.*, 1992).

Se desarrollaron métodos moleculares basados en RT-PCR y secuenciación utilizando como blanco la región 5'UTR altamente conservada cuya secuencia, no posee información para la genotipificación de todas las variantes existentes de HEV. Por otra parte se ha demostrado que las secuencias de genes de la región estructural, tales como VP1, si permiten la identificación genotípica (Caro *et al.*, 2001; Palacios *et al.*, 2002); pero dichos ensayos requieren una considerable optimización y el uso de cebadores degenerados para lograr la sensibilidad requerida para su uso directo en muestras clínicas, particularmente cuando se trata de LCR donde la carga viral es particularmente baja (Iturriza-Gomara *et al.*, 2006; Mirand *et al.*, 2008; McWilliam Leitch *et al.*, 2009).

Los estudios que se han realizado en este trabajo han permitido la optimización de métodos moleculares para la identificación y establecimiento de los distintos genotipos circulantes de HEV a partir de LCR en el Uruguay. La gran variabilidad genética de los HEV hace que la amplificación de la región que codifica para la VP1 sea poco eficiente, por ello hemos realizado la amplificación de la región codificante para 3CD (Lindberg *et al.*, 2003).

1.1.3.- El virión

La partícula viral es esférica, de unos 30nm de diámetro y sin envoltura lipídica. Como casi todos los miembros de la familia *Picornaviridae* la cápside de los HEV está compuesta por 60 copias de cada una de las 4 proteínas estructurales (VP1-VP4).

Éstas se hallan organizadas en una estructura icosaédrica que presenta simetría rotacional 5:3:2.

Cada una de estas 4 proteínas se asocian para formar una subunidad denominada protómero, en el que las 3 proteínas mayores (VP1-VP3) se disponen en la superficie del virión y el pequeño péptido VP4 lo hace en la cara interna; la asociación de 5 protómeros constituye un pentámero y la asociación de 12 pentámeros constituyen el icosaedro con un pseudo número de triangulación (T) igual a 3 (Figura 2).

Las proteínas de la cápside cumplen varias funciones: i) Proteger al ARN genómico de las endonucleasas ambientales; ii) Reconocer los receptores celulares específicos proceso fundamental en la determinación del rango de huésped y del tropismo celular; iii) Determinar la antigenicidad; iv) Portar las señales de desensamblaje para la liberación del ARN genómico y de empaquetamiento durante la maduración del virión (Racaniello, 2007).

La característica más importante es la presencia de una meseta en forma de estrella bordeando una depresión o cañón en el eje de simetría 5, cuya función es reconocer a los receptores celulares, una saliente en forma de propela o hélice triple en el eje de simetría 3, y una depresión alrededor del eje de simetría 2 (Flore *et al.*, 1990).

La región N-terminal de VP1 a pesar de ser poco conservada, presenta una periodicidad en la distribución de residuos polares y no polares, lo que es característico de una hélice antipática, que incrementan la afinidad del virión por la membrana celular o endosómica (Tosteson *et al.* 2004).

Las proteínas VP1-VP3, pese a su poca similaridad de secuencias, poseen un patrón de plegado común, adoptando una forma prismática constituida por 8 láminas antiparalelas marcadas en dirección amino-carboxil. Adoptando forma de barril β unidas por loops variables, distribuidas en 2 hojas de 4 láminas β , donde una hoja forma una pared (C,H,E y F); y la otra, que se curva forma el piso y la otra pared del prisma (G,D,I,y B).

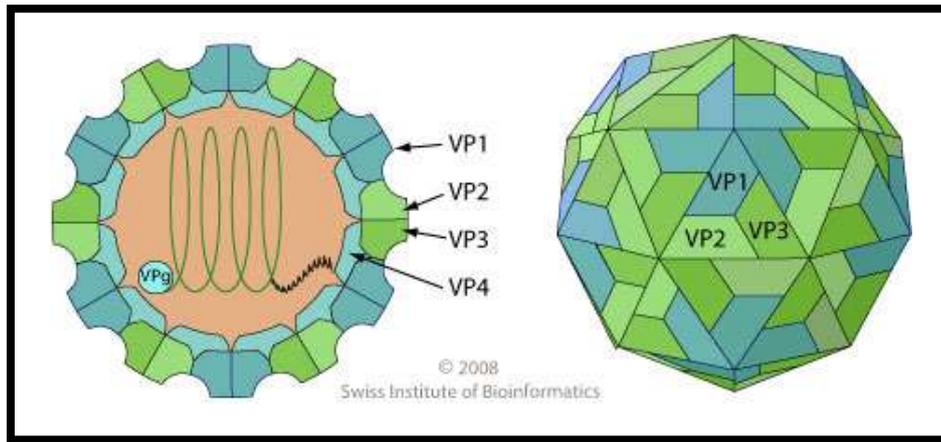


Figura 2. Esquema de la estructura de la cápside de un *Enterovirus*, las proteínas estructurales VP1-3 constituyen la cara externa de la cápside, mientras que VP4 se halla en el interior, encerrando a un genoma ARN que lleva en su extremo 5' la proteína VPg (tomado de Swiss Institute of Bioinformatics, 2008).

Las extensiones en los extremos N terminales se dirigen hacia el interior de la cápside y las C terminales lo hacen hacia el exterior. Los grupos de barriles β de VP1, VP2 y VP3, se hallan empaquetados juntos en un T=1 (pseudo T=3), los loops cortos que unen las hojas β de VP1 se asocian en torno al eje de simetría 5, mientras que los de VP2 y VP3 alternan alrededor del eje de simetría 3 (Hewat *et al.*, 2002).

La superficie externa del virión queda de esa manera tapizada por los extremos C-terminales de VP1, VP2 y VP3, y por los loops que conectan las hojas β , constituyendo la meseta en forma de estrella alrededor del eje de simetría 5. Los cortos loops terminales de VP2 y VP3 forman el eje de una propela, mientras que los loops EF de las VP2 y los loops GH de las VP1 forman las paletas de las propelas (Hazel *et al.*, 2010) (Figura 3).

En el interior del virión, debajo del eje de simetría 5, existe una red formada por las regiones N-terminales de las VP1-VP3 que interaccionan con la VP4-miristilada (myrVP4) para estabilizar el virión. Esta estructura es rodeada por 3 láminas β pertenecientes a la región N-terminal de VP4 y VP1, el grupo miristilo unido a la región N terminal de VP4 media la interacción de estas 2 estructuras (Chow *et al.*, 1987).

La asociación entre pentámeros vecinos es estabilizada por interacciones electrostáticas en una estructura de 7 láminas β que se forman al clivarse VP0.

Los residuos Y41 y W38 que flanquean los loops de VP2 parecen interactuar con el ARN encapsidado (Muckelbauer *et al.*, 1995) y los residuos S10 y D11 de VP2 interactúan con los residuos N69 y M67 del extremo C-terminal de myrVP4 (Filman *et al.*, 1989). Esta estructura contribuye a la estabilidad del virión y correlaciona el clivaje de VP0 con la encapsidación del ARN genómico.

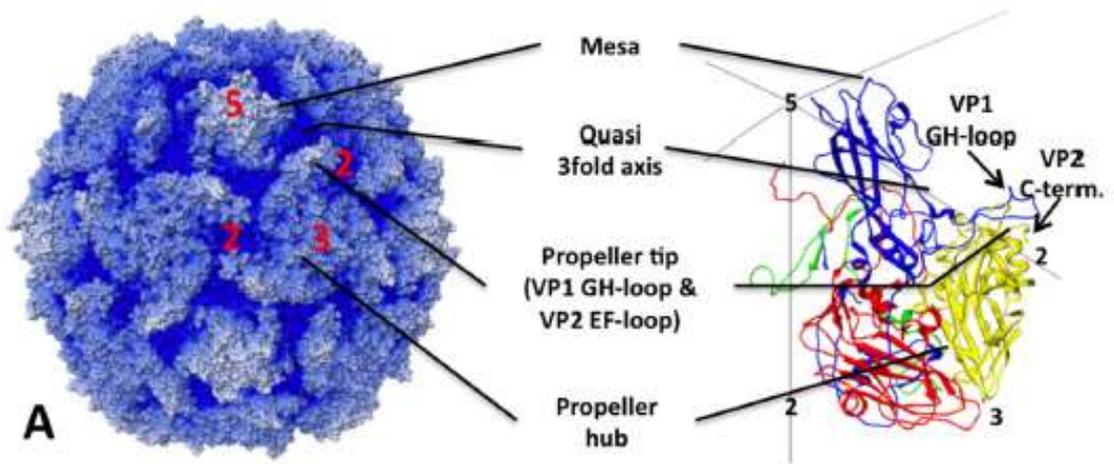


Figura 3. Estructura 3D mostrando las características más importantes de las relaciones entre las proteínas estructurales y los ejes de la cápside (Tomado de Hazel *et al.*, 2010).

1.1.4.- El genoma

El genoma de los HEV está constituido por una molécula de ARN simple hebra de polaridad positiva (+) de 7500 nt, con un único marco abierto de lectura flanqueado por 2 regiones no codificantes (UTR). El extremo 5' se halla altamente estructurado. Posee 7 dominios (I-VII) definidos por apareamientos de bases, unidos por secuencias conectoras de 2 a 25 nt, y comprende una estructura en “hoja de trébol” necesaria para la replicación viral, consistente en 4 Stem-Loops (A-D), y el sitio interno de entrada del ribosoma (Internal Ribosome Entry Site o IRES). Unida covalentemente al extremo 5' mediante un enlace O4-(5'-uridylyl)-tirosina se encuentra la proteína VPg (22-24 aminoácidos), siendo la tirosina el tercer aminoácido de la región N-terminal de la VPg. Unido al extremo 3' del genoma se encuentra una cola poliA.

La región codificante produce una poliproteína de unos 2200 aminoácidos que es clivada en 4 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales, así como proteínas intermediarias funcionales. Su procesamiento se realiza en 3 etapas; un clivaje primario realizado por 2A^{pro} que produce 3 proteínas (P1-P3) (Figura 4).

La proteína P1 posteriormente es clivada por 3C^{pro} y su precursor 3CD^{pro} para formar las proteínas estructurales VP0, VP3 y VP1, finalmente VP0 es clivada para producir VP4 y VP2. Dicho clivaje, que también es realizado por 3C^{pro}, ocurre tardíamente durante el ensamblaje (clivaje de maduración) (Thoelen *et al.*, 2004).

La proteína P2 es clivada por 3C^{pro}, produciendo la proteína 2A (proteasa), y el precursor 2BC, que posteriormente es clivado dando lugar a las proteínas 2B, la cual es hidrofóbica y está asociada a la membrana e involucrada en la síntesis de ARN viral, y a la proteína 2C, que pertenece a la superfamilia de las helicasas III. En esta región existe una estructura secundaria en forma de horquilla “CRE” elemento replicativo en *cis*, que sirve como molde para la uridilación de la VPg.

La proteína P3 es clivada por 3C^{pro}, produciendo 2 péptidos precursores, 3AB y 3CD, los que posteriormente son clivados. El péptido 3AB es una proteína de unión a membrana de unos 109 aminoácidos (12kD) que se fija a la membrana a través de una región hidrofóbica, dejando sus extremos N y C terminales del lado citoplasmático (Choe, 2004). Siendo 3AB la responsable de la localización de la ARNpolimerasa-ARNdependiente en las membranas de las vesículas donde va a ocurrir la replicación (Rodríguez-Wells, 2001). A su vez, el péptido 3CD es posteriormente clivado produciendo la proteinasa 3C y la ARNpolimerasa-ARNdependiente 3D.

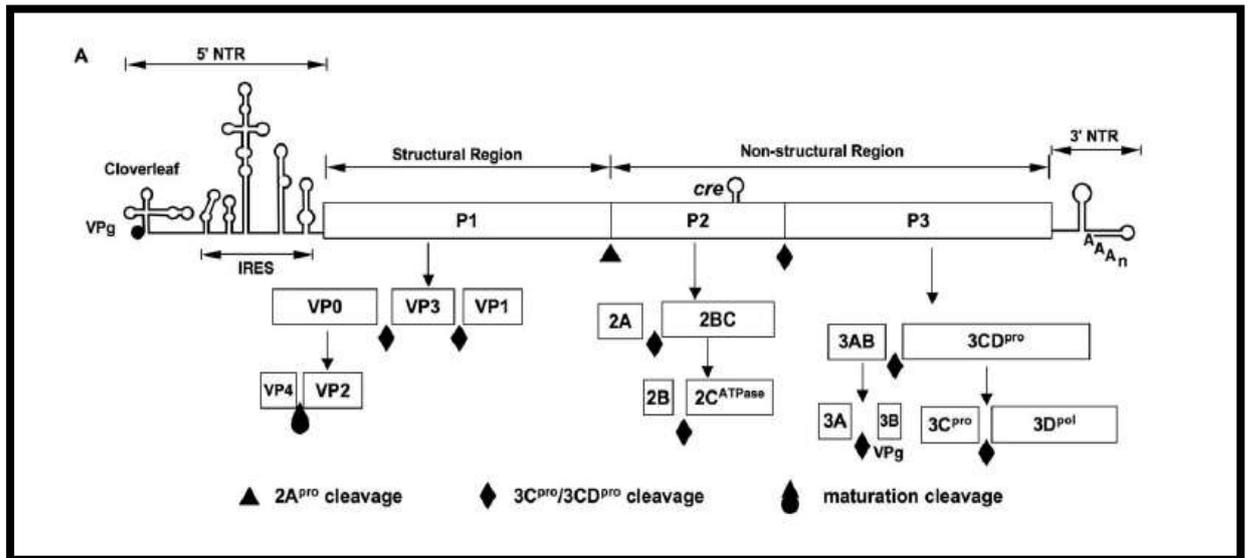


Figura 4: Esquema del genoma de los *Enterovirus* mostrando los sucesivos clivajes que dan lugar a las proteínas virales. Se puede apreciar la fuertemente estructurada 5' UTR. La proteína VPg esta representada por un círculo negro (Tomada de Thoelen *et al.*, 2004).

La polimerasa viral presenta la clásica estructura en forma de mano derecha, aunque parte de la estructura de los dedos esta desordenada debido a impedimentos estéricos ocasionados entre los dedos de 2 polimerasas vecinas, una fuerte interacción molecular debida a puentes salinos que involucran la L446 la estabilizan (Thompson and Peersen, 2004).

La Interfaz I de la polimerasa es extensa e incluye más de 23 cadenas laterales de aminoácidos entre el pulgar de una polimerasa y la parte posterior de la palma de la otra. La repetición de esta interacción cabeza-cola produce largas fibras de moléculas de polimerasa de 50 ángströms de diámetro (Marcotte *et al.*, 2007).

La interfaz II está formada por la interacción de los dominios N-terminales (residuos 12 a 37 con 67 a 97) de 2 polimerasas de fibras vecinas. Las regiones N-terminales participan en una red de puentes de hidrógeno que posicionan a la D238 cerca del sitio activo (GDD) de la polimerasa, D238 reconoce los grupos OH⁻ de los rNTPs, permitiendo la entrada de los mismos al sitio activo.

La mutación G64S en la región de los dedos le confiere a la polimerasa un aumento en la fidelidad de copia, dado que se produce una menor tasa de mutaciones espontáneas, a costa de una disminución en la eficiencia en la incorporación de nucleótidos (Arnold *et al.*, 2005).

1.2.- Ciclo replicativo

1.2.1.- Unión al receptor celular

El ciclo infeccioso se inicia cuando el virus se une a su receptor celular. Diferentes tipos de moléculas en la superficie celular sirven como receptores para que los *Enterovirus* se unan a la célula huésped: CD155 o PVR (Poliovirus Receptor), CD55 y CAR (Coxsackie-Adeno Receptor). Una vez que el virus se halla unido a su receptor se desencadenan cambios conformacionales en la partícula de 160S, transformándola en la partícula A de 134S, que permite la liberación del ARN genómico. El ARN(+) viral una vez dentro del citoplasma del hospedero, debe de ser traducido para producir las proteínas necesarias para la replicación viral y la formación de nuevas partículas virales.

Para muchos *Picornavirus* (*Poliovirus* y *Rhinovirus*), un único receptor es suficiente para la entrada del virus a la célula, otros como CAV21 utiliza a CD55 como receptor pero requiere de ICAM 1 (una molécula de adhesión entre los leucocitos y las células endoteliales) como co-receptor para la entrada a la célula (Shafren *et al.*, 2000). Los receptores utilizados se caracterizan por ser moléculas largas, delgadas, y por presentar articulaciones en forma de bisagra entre sus dominios. Esto es consistente con la idea de que el receptor debe de ser lo suficientemente flexible para permitir que otras moléculas (co-receptores) reconozcan sitios adicionales sobre la superficie viral, luego del reconocimiento inicial (Xiao *et al.*, 2001).

CAR es una glicoproteína de membrana (46kD) perteneciente a la familia de las moléculas de adhesión, que se expresa en varios órganos, fundamentalmente el corazón y es esencial para el normal desarrollo embriológico, en el corazón adulto es requerido para el normal funcionamiento del nodo Atrio-Ventricular. Posee dos dominios extracelulares de tipo Inmunoglobulina (D1-D2), un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático de 107 aminoácidos. La interacción con el virión se da fundamentalmente a través de VP1.

CD155 o PVR es una proteína transmembrana de tipo I, perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y en el humano esta codificada por el gen PVR. Se expresa en 4 variantes de splicing alternativos α , β , γ y δ , las variantes β y γ (de 44kD) carecen de dominio transmembrana y son secretadas, solo las variantes α y δ (de 43 y 45kD respectivamente) lo presentan y son de adhesión a la superficie celular.

El receptor PVR consta de un ectodominio formado por 3 dominios similares a Ig (D1-D3), estabilizados por puentes disulfuro, seguido por un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático en el extremo C-terminal (Bernhardt *et al.* 1994). Se halla altamente glicosilada, presentando 6 sitios de glicosilación. El dominio I (D1) es el responsable del reconocimiento viral y entre D1 y D2 se forma un ángulo de 160°. Su función celular normal es establecer uniones adherentes intercelulares entre células epiteliales, e interviene en la respuesta inmune humoral.

La unión del virus al receptor celular se da en una depresión alrededor del eje de simetría 5, en forma de bolsillo hidrofóbico, denominada cañón. El que se halla ocupado por una molécula de carácter lipídico conocida como factor de bolsillo. Dicha molécula contribuye a la estabilidad de la partícula nativa impidiendo cambios conformacionales. El receptor celular induce la liberación del factor de bolsillo, cuya eliminación es necesaria para la desestabilización de la cápside, dándole la flexibilidad necesaria para permitir la salida del ARN genómico, iniciándose la descapsidación.

Durante la fase inicial, el receptor ejerce una fuerza sobre VP1 en el techo del bolsillo, resultando en la expulsión del factor de bolsillo, lo que genera inestabilidad, causando la separación de las subunidades virales y disparando la liberación del ARN genómico (Zhanga *et al.*, 2008). Estudios de Microscopia-Crioeléctronica del complejo Polio-PVR revelan que es el dominio 1 similar a Ig, es el que se asocia al virión de Polio (Xiao *et al.*, 2005 PDB 1Z7S).

Para muchos *Enterovirus*, su unión al receptor sirve únicamente para concentrar partículas virales en la superficie celular, y la liberación del RNA es una consecuencia de una baja del pH. Para otros, es el propio receptor celular el que desencadena los cambios que conllevan a la liberación del RNA genómico.

1.2.2.- Entrada a la célula

La unión al receptor produce cambios estructurales en la partícula de 160S, originando una partícula intermediaria (partícula A) de 135S (Bubeck *et al.*, 2005; Tuthill *et al.*, 2006), en la que se externaliza la proteína myrVP4 y la región hidrofóbica N-terminal de VP1, que se hallaban en la cara interna del virión (Fricks and Hogle 1990). Estos cambios incrementan la afinidad del virión por la membrana celular o endosómica, permitiendo que la región N-terminal de VP1 penetre la membrana formando un poro (Tosteson *et al.*, 2004). Estudios mutacionales han demostrado la importancia de la treonina T28 de VP4, pues la mutación T28G impide la formación de

los canales, mientras las mutaciones T28V y T28S alteran la formación de los mismos. Estas mutaciones impiden o disminuyen la velocidad de liberación del RNA viral (Danthi *et al.*, 2003).

El sitio de externalización de ambos polipéptidos es a través del poro ubicado en el fondo del canal en el eje de simetría 5; dicho canal se halla cerrado en la superficie externa de la cápside por los loops correspondientes a VP1, y en la superficie interna por la región N-terminal de VP3 (Filman *et al.*, 1989). La VP3 que se hallaba bloqueando el poro del eje de simetría 5 se mueve permitiendo la salida del ARN genómico (Bubeck *et al.*, 2005), dejando tras de sí una partícula vacía de 80S.

Estudios de microscopia crioelectrónica permitieron la observación de 3 tipos de estados conformacionales de las partículas de 80S (Hazel *et al.*, 2010), dos de los cuales se observaron también en *Rhinovirus 2* y 14 (Rossmann *et al.*, 1985). El tercer estado conformacional, en el que las partículas se han visto atrapadas en el acto del lanzamiento de su ARN viral sugiere que éste sale a través de poros en la base del cañón, no muy lejos del sitio en el que el extremo amino terminal de VP1 hace protrusión en la partícula de 135S (Bostina *et al.*, 2010).

1.2.3.- Traducción

Dado que el ARN genómico de los HEV es de polaridad positiva, puede actuar como mensajero, pero carece de CAP en su extremo 5' (lo que no le permite ser traducido de forma canónica). Al ser removida la proteína VPg, por las enzimas celulares al ingresar al citoplasma del hospedero deja un extremo 5' uridilado seguido de una estructura en hoja de trébol y el IRES. El IRES posee alta afinidad por los ribosomas, por lo que se une a la subunidad 40S ribosomal. Existen 5 tipos de IRES según su estructura y la ubicación del codón de inicio, siendo los IRES de *Enterovirus* y *Rhinovirus* del tipo I.

La traducción se inicia con la unión de la subunidad 40S al IRES, seguido de un escaneo hasta el codón de inicio (AUG). Brevemente, la traducción de los ARNm celulares requiere que eIF4G forme el complejo proteico eIF4F, con la proteína de unión a cap llamada eIF4E y la ARN helicasa eIF4A, que luego se asocia al CAP y a eIF3 para reclutar a la subunidad 40S y comenzar el escaneo, ensamblar la subunidad 60S y llevar a cabo el proceso de traducción. Sin embargo los *Enterovirus* son capaces de clivar a eIF4G mediante la acción de la proteasa 2A^{pro}, deteniendo así la traducción de ARNm celulares, produciendo el apagado o shutoff celular, no obstante los ARN virales

continúan traduciéndose dado que la traducción dependiente de IRES I es independiente de CAP, pero depende de la porción C terminal de eIF4G, la cual se une directamente al IRES I y a la subunidad 40S del ribosoma a través de eIF3, comenzando el escaneo (Ohlmann *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2003).

1.2.4.- Replicación

El ARN viral lleva unido en su extremo 5' la proteína VPg mediante un enlace O4-(5'-uridylyl)-tyrosina, este enlace fosfodiéster es clivado por proteasas celulares, dejando un extremo 5' uridilado y con una estructura de 108 nt en forma de hoja de trébol. Al loop D de esta estructura se une la proteasa viral 3CD y al loop B lo hace la proteína celular Poli-C-binding-protein (PCBP). Este complejo interactúa con la proteína Poli-A-binding-protein (PABP1) que se halla asociada a la cola poliA del extremo 3' del RNA viral, permitiendo el acercamiento de los extremos 5' y 3'.

La proteína viral 3AB (precursora de VPg), se halla anclada en la membrana del retículo endoplasmático mediante su dominio hidrofóbico. La proteasa 3CD^{pro} cliva a 3AB formando VPg, la que es uridilada (agrega una cola poli U) por la 3D^{pol} utilizando como molde la secuencia CRE que es una proteína de 67kD con actividad transferasa UMP (Rieder *et al.*, 2000). La VPg uridilada es transferida al extremo 3' donde va a actuar como primer para la síntesis de la cadena ARN(-).

Una vez sintetizada la cadena de ARN(-), la que va a tener su extremo 3' poliadenilado, ésta se halla separada del ARN genómico por la proteína 2C que está unida a la estructura de hoja de trébol de la cadena (-).

Otra proteína 3AB unida a la membrana es nuevamente clivada por 3CD^{pro} y uridilada y se une al extremo poli A de la cadena (-), donde actúa como primer para que la ARNpolimerasa-ARNdependiente inicie la síntesis de una nueva cadena de ARN(+) la que queda unida a VPg en su extremo 5' y una cola poli A en el extremo 3'.

1.2.5.- Ensamblaje

Las 4 proteínas estructurales son codificadas por un único polipéptido P1 que es clivado de la poliproteína original por 2A^{pro}, el que es co-traduccionalmente miristilado. El miristilo se une a una glicina, que queda expuesta luego de ser removida la metionina de inicio en el extremo amino-terminal de la futura VP4, este precursor forma la proteína myrVP1, la que posteriormente es clivada por 3CD^{pro} para producir el

protómero (myrVP0-VP1- VP3), que es la unidad estructural de la cápside (formada por una copia de cada una de las proteínas myrVP0, VP1, y VP3).

Rearreglos posteriores de los extremos C y N-terminales permiten que 5 protómeros se ensamblen formando un pentámero, los que pueden ensamblarse constituyendo una cápside intermediaria vacía de 73S, constituida por 60 copias de myrVP0-VP1- VP3.

1.2.6.- Encapsidación

La encapsidación del genoma viral está asociada a una interacción proteína-proteína, que se establece entre la proteína 2C y la proteína de la cápside VP3, que se produce en el sitio de formación del complejo de replicación.

El clivaje autocatalítico de myrVP0 para producir myrVP4 y VP2, aumenta la estabilidad del virión, formando la partícula viral madura de 160S, haciendo que el ensamblaje sea irreversible. La naturaleza autocatalítica de este clivaje está dada porque el sitio de clivaje de VP0 se halla en el interior de la cápside vacía, inaccesible a las proteinasas virales y celulares. La presencia de una serina conservada en VP2 es la que apoya este modelo autocatalítico de serin-proteasa.

1.3.- Variabilidad génica.

1.3.1.- Procesos evolutivos

Entre los procesos evolutivos que emplean los *Enterovirus* para generar variabilidad a fin de lograr una mejor adaptabilidad tenemos:

i) Tasa mutacional. Los virus ARN debido a la falta de capacidad correctora de la ARN polimerasa viral, presentan una elevada tasa de mutaciones del orden de 10^{-4} sustituciones por sitio por año (s/s/a), lo que les permite organizarse en poblaciones de muy alta diversidad genética denominadas cuasiespecies, es decir como una nube de mutantes fuertemente relacionadas genéticamente (Domingo, 2002). Esta característica les confiere a los virus de ARN una gran capacidad de adaptación a los cambios.

ii) Recombinación. Debido a la circulación simultánea de diferentes estirpes (pertenecientes o no a distintos genotipos) en un mismo hospedero, la recombinación es un importante mecanismo para la generación de diversidad genética, pudiendo ocasionar la aparición de cepas con mayor capacidad de replicación, mayor capacidad de transmisión o más virulentas. Entre los *Enterovirus* los procesos de recombinación tanto intra como intergenotípica, son muy comunes. Los puntos de recombinación se han encontrado principalmente dentro de la VP4 (intergenotípica) y dentro de 2BC (intra genotípica) (Lukashev *et al.*, 2003).

Oberste analizó el genoma completo de las cepas de referencia de los HEV-B demostrando que han existido múltiples eventos de recombinación entre ellos en la región no estructural, resultando un complejo mosaico de secuencias. Encuentra que la diferencia aminoacídica entre los HEV-B con los restantes grupos de HEV (A,C y D) oscila entre 42-53% para P1; entre 33-42% para P2 y entre 27-38% para P3. Dentro de los HEV-B la similaridad aminoacídica es del 68-87% para P1, de 93-99% para P2 y de 94-99% para P3. Esto demuestra claramente que las proteínas no estructurales son muy conservadas entre los HEV-B, siendo la 2C y la 3D las mas conservadas mientras que la mas variable resulto ser la 2A. La mayor variabilidad se da dentro de las proteínas de la cápside, siendo la VP1 la mas variable con una identidad de 56-83% (Oberste *et al.*, 2004b).

iii) Uso de codones. Aunque menos estudiado, las variaciones en el uso de los codones sinónimos constituyen un importante mecanismo utilizado por los virus a fin de generar variabilidad y adaptabilidad a sus hospederos.

Debido a que el código genético es degenerado la mayoría de los aminoácidos son codificados por más de un codon (codones sinónimos). Esos codones codificantes de un mismo aminoácido no son utilizados equitativamente por muchos organismos, lo que origina la presencia de un sesgo en el uso de los codones sinónimos.

Para explicar la presencia de dicho sesgo se han desarrollado 2 modelos:

i) El modelo traduccional o seleccionista según el cual existe una co-adaptación entre el uso de codones sinónimos y la abundancia relativa de los ARN de transferencia (ARNt) a fin de optimizar la eficiencia traduccional, dándose una correlación entre el uso de codones y la expresión de los genes (Duret, 2002).

ii) El modelo mutacional o neutral establece que la composición genética está influenciada por la probabilidad de que una mutación se fije por deriva génica o por proceso fundacional. Ambos modelos no son mutuamente excluyentes.

Comprender el alcance y las causas del sesgo en el uso de codones es esencial para comprender la evolución viral y en particular la interacción virus-célula hospedera, así como la interacción del virus con la respuesta inmune (Jenkins and Holmes, 2003).

1.4.- La enfermedad

Los *Enterovirus Humanos* (HEV) pueden causar un amplio espectro de enfermedades en humanos. Además de producir infecciones gastrointestinales pueden afectar otros órganos: *Poliovirus* afecta el sistema nervioso central (SNC) produciendo parálisis flácida, el grupo de los *Coxsackievirus* está asociado a pancreatitis, miocarditis encefalitis y a diabetes mellitus (D1T), *Enterovirus 70* produce conjuntivitis hemorrágica aguda, mientras que *Echovirus* y otros *Enterovirus* se asocian a meningitis y encefalitis, fundamentalmente en niños (Pallansch *et al.*, 2003).

Si bien la mayoría de las infecciones enterovirales suelen ser asintomáticas, las meningitis representan la infección del SNC más comúnmente reportada y su presentación clínica varía con la edad del paciente y con la capacidad de producir una respuesta inmune eficiente (Modlin *et al.*, 2000). Éstas pueden tener como origen diversas causas que involucran a distintos agentes infecciosos, siendo los HEV-B los agentes etiológicos que se detectan con mayor frecuencia. En este tipo de afección, los HEV-B se presentan con distintos patrones epidemiológicos según el tiempo y el lugar, acentuándose su circulación en los meses cálidos (Modlin *et al.*, 2000).

Habitualmente las personas afectadas presentan una evolución que lleva a la eliminación del virus con pronóstico favorable. Ante la imposibilidad de descartar con certeza una meningitis bacteriana, en muchos casos los pacientes son internados y se les trata con antibióticos intravenosos, hasta lograr determinar la negatividad en los respectivos cultivos bacterianos.

El mecanismo de transmisión más frecuente es por ruta fecal-oral, aunque algunos serotipos causantes de enfermedades respiratorias o conjuntivas se transmiten a través de secreciones de esas zonas. Los niños son la población más vulnerable, en los que se alcanzan las tasas más elevadas de infección durante los primeros meses de vida. Un segundo pico de incidencia suele ocurrir durante la edad escolar. Los niños constituyen pues los principales transmisores de la infección, especialmente en el ámbito familiar y escolar. El reservorio de los HEV es exclusivamente humano, y dado que los virus se hallan presentes en el tracto intestinal es frecuente detectarlos en aguas residuales y terrenos húmedos.

En nuestro país el Código Nacional de Enfermedades y Eventos de Notificación Obligatoria Decreto Ley N° 64/004 del año 2004, establece la obligatoriedad de notificar todo caso sospechoso de meningitis y meningoencefalitis ocurrido en territorio

nacional dentro de las primeras 24 horas. Este código está siendo actualizado, incorporándose como eventos de notificación obligatoria independientes a: meningitis, encefalitis y meningoencefalitis. Tanto en nuestro país como en la región existen pocos estudios, lo que no permite conocer con exactitud la magnitud y comportamiento de los agentes implicados y en consecuencia, impidiendo una caracterización epidemiológica adecuada de los mismos.

En nuestro país el Ministerio de Salud Pública define como caso sospechoso de encefalitis, meningitis y meningoencefalitis a aquellos que presenten la siguiente sintomatología (Ministerio de Salud Pública, 2010):

Encefalitis

Temperatura mayor o igual a 37,5°C y alteración del estado mental (depresión de conciencia, letargo, excitación) y/u otro/s elemento/s de afectación cortical (ej. síndrome focal neurológico, convulsiones, etc.)

Meningitis (niños mayores de 1 año)

Temperatura mayor o igual a 37,5°C y (al menos uno de los siguientes):

- Rigidez de nuca
- Alteración de conciencia

Meningitis (niños menores de 1 año)

Temperatura mayor o igual a 37,5°C y fontanela bombé, vómitos, letargia, irritabilidad o convulsiones con o sin erupción petequiral.

Meningoencefalitis

Cumple ambas definiciones de caso.

1.4.1.- Meningitis viral

Las meningitis virales o asépticas se caracterizan por la inflamación de las leptomeninges. Con ausencia de compromiso de parénquima cerebral o médula espinal. Actualmente en Uruguay se considera que aproximadamente el 85% de las meningitis virales son causadas por *Enterovirus* no polio (principalmente *Echovirus* y *Coxsackievirus*) pertenecientes a los HEV-B (Salamano *et al.*, 2009).

Habitualmente, los pacientes presentan fiebre, cefalea, irritabilidad, náuseas, vómitos, rigidez de nuca, rash o astenia de 18 a 36 horas de evolución.

En niños, el cuadro clínico es variable, pudiendo presentarse simplemente con irritabilidad, letargo o dificultad y rechazo del alimento.

La presentación clínica puede diferir de acuerdo al agente responsable. En muchos casos se presenta con un patrón bifásico con una primera fase constituida por un cuadro de enfermedad tipo influenza, que en un plazo de aproximadamente 48 horas instala signos y síntomas neurológicos. La instalación de rigidez de nuca y cefalea suele preceder la desaparición de la fiebre.

La tasa de mortalidad asociada a meningitis viral es menor a un 1%, a excepción de los casos ocurridos durante el período neonatal (Chang *et al.*, 2007).

El pronóstico de las meningitis virales es habitualmente muy bueno, resolviéndose el cuadro en un plazo de 7 a 10 días. El diagnóstico de meningitis viral trae implícita la naturaleza auto-limitada del cuadro. Sin embargo, los recién nacidos no siempre presentan este comportamiento, siendo en muchos casos fatal o causa de importante morbilidad. La presencia concomitante de encefalitis incrementa la probabilidad de una mala evolución. Otros factores indicadores de mal pronóstico son la presencia de pericarditis y hepatitis (Mong-Cheng *et al.*, 2008).

Existe controversia en referencia a las secuelas a largo plazo, las posibles secuelas son: convulsiones, hidrocefalia, pérdida de audición, paresia, parálisis facial, trastornos del aprendizaje, ceguera, trastornos de conducta y del lenguaje, especialmente en niños y lactantes (Mong-Cheng *et al.*, 2008).

1.4.2.- Encefalitis viral

Las encefalitis agudas virales no son tan comunes, afectando predominantemente a niños y adultos jóvenes.

Estudios epidemiológicos estiman una incidencia de 3,5 a 7,4 encefalitis virales cada 100.000 habitantes por año en los Estados Unidos, sin embargo, se cree que en los países subdesarrollados o en vías de desarrollo su incidencia anual está ampliamente subestimada.

Los estudios realizados previamente en nuestro país indican que los agentes responsables más frecuentemente encontrados en casos de encefalitis, tanto en niños como en adultos, son los *Herpesvirus*, otros agentes implicados son: virus *Urleano*, virus causantes de fiebres hemorrágicas (*Flavivirus*, *Alfavirus*), virus *Varicela Zoster* (VVZ), *Influenza* (Salamano *et al.*, 2009).

Las encefalitis virales usualmente se presentan como cuadros febriles de inicio agudo. A diferencia de las meningitis, éstas son enfermedades agudas más severas y dejan secuelas por un término más prolongado (Chang *et al.*, 2007). Habitualmente se

presentan con signos focales neurológicos, convulsiones, y alteración de conciencia (letargo que habitualmente progresa a confusión, estupor y finalmente coma) y es posible encontrar alteraciones del lenguaje o de conducta.

Las complicaciones y mortalidad están relacionadas con el agente causal; las encefalitis causadas por *Enterovirus* suelen asociarse a un buen pronóstico, sin embargo, el *Enterovirus 71* posee una tasa de mortalidad elevada, y las encefalitis producidas por *Herpesvirus* pueden determinar una letalidad de hasta el 70% en los casos no tratados, y determina secuelas severas, entre las que se encuentra miocarditis y parálisis flácida aguda.

2.- OBJETIVOS

2.1.- Objetivo General

Estudiar el grado de variabilidad genética y el modo de evolución molecular en estirpes de HEV-B causantes de encefalitis; y determinar la epidemiología molecular en nuestro país a partir de muestras de LCR en niños hospitalizados.

2.2.- Objetivos Específicos

2.2.1.- Implementar métodos moleculares a fin de detectar y genotipificar estirpes de HEV-B en muestras de LCR. Optimización de técnicas de RT-PCR para la amplificación de 2 regiones del genoma que codifican para las proteínas VP1 y 3Dpol (polimerasa viral).

2.2.2.- Amplificar, secuenciar y analizar el genoma de estirpes de HEV-B en muestras de LCR provenientes de niños internados con diagnóstico clínico de encefalitis.

2.2.3.- Determinación de los genotipos circulantes, mediante estudios filogenéticos, comparando nuestras muestras con las cepas referencias de los HEV-B reportadas en la database.

2.2.4.- Determinar y documentar emergencia de nuevos genotipos y la posible dispersión de nuevas formas recombinantes en la población.

2.2.5.- Analizar el grado de variabilidad genética y modo de evolución de los HEV-B causantes de encefalitis en nuestro país, con los que circulan en la región.

2.2.6.- A fin de establecer cuáles son los principales mecanismos que gobiernan la evolución de los CVB, estudiaremos el uso de codones que emplean como posible forma de adaptación a los diferentes tipos celulares que infectan.

3.- Materiales y métodos

3.1.- Obtención de muestras clínicas

Para realizar estos estudios se han obtenido 18 muestras de LCR provenientes de niños hospitalizados, las cuales fueron cedidas por el Laboratorio de Biología Molecular de la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos con diagnóstico clínico presuntivo de encefalitis viral. Las muestras fueron colectadas durante los últimos 5 años y luego fueron conservadas en freezer a -80°C (Tabla 1).

Todos los procedimientos fueron realizados y aprobados en virtud de los protocolos de ética y los estándares requeridos y aprobados por las autoridades de la referida institución.

3.2.- Obtención del control positivo.

Se utilizó como control positivo la cepa CVB4 ("J.V.B. Benschoten"), obtenida del CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Esta cepa fue cultivada en la línea celular RDA (Rhabdomiosarcoma Humano), y la infección de la misma fue realizada en área del Laboratorio con Nivel de Bio-Seguridad 2.

3.2.1.- Mantenimiento de la línea celular

La línea celular RDA fue descongelada rápidamente en baño a 37°C durante 1 min. y transferidas a una botella de cultivo de 25cm² de superficie.

El cultivo se realizó en Medio Esencial Mínimo (MEM), suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino. Los cultivos se mantuvieron en estufa a 37°C.

Una vez que las células crecieron al 90 o 100 % de confluencia, procedimos a la tripsinización de las mismas y su posterior transferencia a nuevas botellas de cultivos para ampliar la línea. La monocapa de células fue desprendida mediante el agregado de una solución de tripsina. Las células fueron colectadas en tubo Falcon y centrifugadas a 700 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se transfirieron a una o más botellas de cultivo con el mencionado medio.

Luego de al menos 3 pasajes desde su descongelamiento, la línea celular RDA fue crecida en nuevas botellas de cultivo para luego colectarlas, congelarlas y mantener el respaldo del laboratorio. Para ello el pellet obtenido luego de la tripsinización y centrifugación, fue resuspendido mediante el agregado de DMSO 10% en suero fetal.

Tabla 1. Fecha de obtención de las muestras de LCR que fueron amplificadas y secuenciadas en el presente estudio, provenientes de niños internados en la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos, Montevideo, Uruguay, con diagnóstico clínico de encefalitis.

MUESTRA	FECHA AISLACION
Uru 37	04/01/2005
Uru 38	03/02/2005
Uru 39	03/02/2005
Uru 40	04/02/2005
Uru 85	04/11/2005
Uru 140	28/11/2006
Uru 161	21/12/2006
Uru 200	17/12/2007
Uru 384	02/03/2010
Uru 390	08/03/2010
Uru 397	18/03/2010
Uru 421	01/06/2010

bovino. La solución obtenida se colocó en un tubo de criopreservación y conservadas a -70°C .

3.2.2. Aislamiento viral

Uno de los frascos de cultivo conteniendo la monocapa de células RDA fue infectado con la cepa de referencia de CVB4, e incubado durante 7 días a 37°C en estufa, observado el efecto citopático. Se colectó el sobrenadante, se centrifugó a 300rpm durante 5 min para separar el medio de cultivo conteniendo las partículas virales de las células y/o restos celulares. El sobrenadante obtenido se guardó a -70°C para ser utilizado para la puesta a punto de las técnicas y como control positivo.

3.3.- Extracción del ARN

La extracción del ARN de las muestras de LCR fue realizado utilizando el sistema de extracción “Viral RNA Extraction kit” (Qiagen), de acuerdo a las instrucciones brindadas por el fabricante, obteniendo ARN total de las muestras recibidas.

3.4.- Transcripción reversa

Realizamos una Transcripción Reversa (RT) para obtener ADN copia (ADNc) a partir de los ARN aislados de dichas muestras. Para ello realizamos una mezcla de reacción utilizando los siguientes reactivos por cada muestra: $3\mu\text{l}$ de agua Milli-Q, $1\mu\text{l}$ de desoxinucleótidos tri-fosfato (dNTP's) a una concentración de 10mM, $3\mu\text{l}$ de hexámeros randómicos (SBS Genetech Co., Ltd.) y $5\mu\text{l}$ de cada muestra de ARN. Esta mezcla se incubó a 65°C por 5min y posteriormente fue colocada en hielo 1min. A continuación se adicionaron a la mezcla $4\mu\text{l}$ de buffer 5X, $2\mu\text{l}$ de DTT 100mM, $1\mu\text{l}$ de ARNase out (Invitrogen) y $1\mu\text{l}$ de la enzima ADN polimerasa ARN dependiente superscript II (Invitrogen) en una concentración de 200 unidades de enzima (U)/ μl , obteniendo un volumen final de $20\mu\text{l}$. Esta mezcla de reacción fue incubada 10min a 25°C , 50min a 42°C y 15min a 70°C en el termociclador Corbett PalmCycler CG-196.

3.5.- Determinación de los genotipos

3.5.1- Amplificación de la región codificante de VP1

Para determinar los genotipos de HEV-B presentes en cada una de las muestras de LCR, sometimos los ADNc obtenidos a una reacción en cadena de la polimerasa anidada (Nested PCR), para la amplificación de la región que codifica VP1, siguiendo el protocolo de McWilliam Leitch *et al.*, 2009, con modificaciones a fin de optimizarlo para nuestras muestras.

Se amplificó la región codificante de VP1 utilizando cebadores degenerados genéricos a fin de poder amplificar todos los serotipos del grupo de los HEV-B.

Para la primera ronda de amplificación preparamos la siguiente mezcla de reacción por muestra: 16,6µl de agua Milli-Q; 3µl de Buffer 10X (Invitrogen); 2µl de MgCl₂ a una concentración de 25mM; 1µl de dNTP's 10mM; 1µl de cada uno de los cebadores R132 y 2328S (Tabla 2) a una concentración 15µM; y 0,4µl de la ADN polimerasa Taq Platinum (Invitrogen), en una concentración de 5 U/µL. A esta mezcla se le agregaron 5µl de ADNc y se incubaron los 30µl resultantes a 94°C por 5min, 35 ciclos de 94°C por 45seg, 55°C por 45seg y 72°C por 2min; culminando con 5min a 72°C. El producto obtenido fue sometido a una nueva reamplificación con la finalidad de ganar en sensibilidad y especificidad, con cebadores internos S1695 y 3481A cuyas secuencias se muestran en la Tabla 2.

Se utilizó el mismo protocolo que para la primera ronda de amplificación, excepto que la temperatura de hibridación en esta etapa fue de 60°C.

3.5.2- Amplificación de la región codificante de 3CD

Para la amplificación de la región que codifica a 3CD se siguió el protocolo de Lindberg *et al.*, 2003 y se procedió de manera similar que para la región VP1 utilizando para el primer ciclo de amplificación los cebadores P3E- y P3E+ y para el segundo ciclo los cebadores P3I- y P3I+, cuyas correspondientes secuencias se muestran en la Tabla 2.

La mezcla de reacción por muestra para ambas rondas de amplificación fue de 16,6µl de agua Milli-Q; 3µl de Buffer 10X (Invitrogen); 2µl de MgCl₂ a una concentración de 25mM; 1µl de dNTP's 10mM; 1µl de cada uno de los cebadores a una concentración 15µM; y 0,4µl de la ADN polimerasa Taq Platinum (Invitrogen), en una concentración de 5 U/µL. A esta mezcla se le agregaron 5µl de ADNc en la primera ronda y de 5µl del

producto anteriormente amplificado para la segunda ronda. Se incubaron los 30 μ l resultantes a 94°C por 5min con 30 ciclos de 94°C por 45seg / 50°C por 45seg / 72°C por 1 min con una extensión final de 72°C por 10min para ambas rondas de la PCR anidada.

3.6.- Electroforesis en gel de agarosa

Con el fin de observar los productos obtenidos por PCR, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X. Se sembraron en cada pocillo 5 μ L de los productos de PCR con 2 μ L de buffer de carga 12X (Promega). Además, en un pocillo se sembró como referente de corrida un marcador de peso molecular de 100nt (Fementas). La corrida fue realizada por 50min a 90 voltios (V) para que el frente de corrida alcance las 3/4 partes del gel. Por último el gel se tiñó durante 10 a 15min a temperatura ambiente en una solución de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) y se visualizó en un documentador de geles con luz ultravioleta (Gel Doc X5 170-8170, Biorad).

3.7.- Purificación de los productos de PCR

Los amplicones fueron purificados utilizando el sistema de purificación “QIAquick PCR Purification Kit” de Qiagen, de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante.

3.8.- Secuenciación

La secuenciación de los amplicones generados a partir de las muestras fue realizada por la Unidad de Biología Molecular (UBM) del Instituto Pasteur de Montevideo, en un secuenciador automático de cuatro capilares ABI3130 de Applied Biosystems. Para ello se utilizaron los mismos oligonucleótidos con los cuales se llevó a cabo la segunda ronda de amplificación de ambas regiones. Todos los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones a los efectos de evitar cualquier posible discrepancia.

Tabla 2. Secuencia de cebadores utilizados para las dos rondas de amplificación de las regiones correspondientes a VP1 y 3CD, según los protocolos de McWilliam Leitch y de Lindberg respectivamente (McWilliam Leitch *et al.*, 2009; Lindberg *et al.*, 2003).

Nombre	SECUENCIA	Región
R132	5'-GGTGCTCACTAGGAGGTCYCTRTRTRTARTCYTCCCA-3'	VP1
2328S	5'-GGYTAYATNACNTGYTGGTAYCARAC-3'	VP1
S1695	5'-CTTGTGCTTTGTGTCGGCRTGYAAYGAYTTYTCWG-3'	VP1
3481A	5'-TCYTCCCACACRCAVTTYTGCCARTC -3'	VP1
P3E-	5'-TCRTCYTTBACRTADGTYACCATTGG-3'	3CD
P3E+	5'-GGYGGYACHCCCCANAARAGAATGCT-3'	3CD
P3I+	5'-AARAGAATGCTYATGTAYAAYTTYCC-3'	3CD
P3I-	5'-ARDCCRTAYTTRTCCATRCAYTCYTT-3'	3CD

3.9.- Estudios bioinformáticos

Las secuencias nucleotídicas obtenidas, mediante la edición con el programa Chromas Lite 2.01 de los cromatogramas correspondientes a la región del genoma del gen que codifica para VP1, se alinearon utilizando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) y MUSCLE (Edgar, 2004), con las secuencias correspondientes a las 55 cepas patrones de los HEV-B obtenidas de la database del Gen Bank.

Con el fin poder genotipificar nuestras muestras problemas se construyeron árboles filogenéticos utilizando el programa MEGA 3 (Kumar *et al.*, 2004). Se crearon matrices de distancia por el modelo de Kimura-dos parámetros (Felsenstein, 1993). Finalmente utilizando el método de Neighbour-joining, se generaron árboles filogenéticos, cuyo apoyo estadístico se calculó realizando 1000 pseudo-replicas por medio del método de bootstraps.

Otro abordaje filogenético también se llevó a cabo mediante la construcción de árboles de Máxima Verosimilitud. Se emplearon los programas Modelgenerator (Keane *et al.*, 2006), con el que se determinó el modelo evolutivo que mejor se adapte a nuestros datos (Akaike Information Criteria and Hierarchical Likelihood Ratio Test). Siendo dicho modelo el GTR+ γ , se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud, como medida de la robustez de cada rama de los mismos se utilizó nuevamente el método de bootstrap, esta vez de 100 réplicas.

Para el estudio de variabilidad de los HEV-B que circulan en la región sudamericana se alinearon las secuencias obtenidas correspondientes a la amplificación de VP1, utilizando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) y MUSCLE (Edgar 2004), con las secuencias correspondientes a la región y a secuencias amplificadas directamente de LCR de otras regiones del mundo, obtenidas de la Database del Gen Bank, se construyeron árboles filogenéticos utilizando los abordajes anteriormente descritos.

Para comprender los procesos evolutivos que gobiernan la evolución de los CVB así como su adaptación a los diferentes tipos celulares, con las secuencias obtenidas que amplifican el gen que codifica la polimerasa viral 3Dpol se construyeron dos juegos de datos (Tabla 3).

Uno con la región codificante de la 3Dpol secuenciada de nuestras muestras (380nt pertenecientes a la posición 5907 a 6287 de acuerdo a la cepa referencia X05690) y las

Tabla 3. Identificación de las cepas en base a las que se construyeron ambos juegos de datos.

CEPA	A. C.	Localizacion	Genotipo
pCV1	M16560	Japan	B1
CVB1Nm	EU147493	Argentina	B1
Ohio	AF081485	Germany	B2
Ohio-1	AF085363	Sweden	B2
GA	AY673831	USA	B3
B3	U57056	USA	B3
Nancy	M16572	Sweden	B3
20	AY752946	USA	B3
28	AY752944	USA	B3
Coxsackievirus B3	M33854	USA	B3
CVB3	M88483	USA	B3
O	AY752945	USA	B3
P	AF231764	Germany	B3
31/01/1993	AF231763	Germany	B3
PD	AF231765	Germany	B3
Beijing0811	GQ141875	China	B3
GZ803	FJ357838	China	B3
SSM-CVB3	GU109481	China	B3
J.V.B. Benschoten	X05690	USA	B4
Tuscany	DQ480420	Italy	B4
E2	AF311939	Sweden	B4
Uru421	FR865909	Uruguay	B4
Uru384	FR865902	Uruguay	B4
Uru10	FR865903	Uruguay	B4
Uru39	FR865908	Uruguay	B4
Uru37	FR865907	Uruguay	B4
Uru140	FR865906	Uruguay	B4
Uru200	FR865910	Uruguay	B4
Uru85	FR865904	Uruguay	B4
Uru390	FR865905	Uruguay	B4
Faulkner	AF114383	Sweden	B5
1954/85/UK	X67706	United Kingdom	B5
Schmitt	AF114384	Sweden	B6
CVB6	AF105342	Sweden	B6
Schmitt 1-15-21	AF039205	Sweden	B6

secuencias correspondientes de los 6 tipos de CVB cuyos genomas completos se hallan en la database.

ii) Otro con la región codificante de los 26 genomas completos de las cepas pertenecientes a las distintas estirpes de los CVB.

Con dichas secuencias se realizó el análisis filogenético de ambos juegos de datos, utilizando como grupo externo una cepa perteneciente a CVA9.

Si bien los eventos de recombinación son muy frecuentes entre los CVB (Simmonds, 2006; Domingo *et al.*, 2008); existe una muy alta homología entre las diferentes cepas en la región 3D, donde se observan muy pocos cambios no sinónimos.

Se analizó también la existencia de posibles eventos de recombinación en dicha región, así como la tasa de sustitución a lo largo del genoma de los 6 tipos de CVB entre sí, utilizando el modelo de ventanas deslizantes establecido por Alvarez-Valin *et al.*, 2000. Las distancias entre pares de nucleótidos (sinónimos y no sinónimas) dentro de cada ventana se calculó por el método de Comeron (1995), tal como se aplica en el programa Kestimator, versión 6.1, donde k es el número de sustituciones de nucleótidos entre secuencias. Para aquellas ventanas donde este método no pudo ser aplicado se empleó el método de Jukes-Cantor (Jukes and Kantor, 1969). El tamaño de la ventana utilizado fue de 150 codones y el corrimiento fue de 50 codones.

Para estudiar el uso de codones, se determinó el Número Efectivo de Codones (ENC) (Wright, 1990) y el contenido en G+C en la 3 posición sinónima (CG3s) para ambos juegos de datos, mediante el Programa CODON W, y la frecuencia de dinucleótidos mediante <http://mobylye.pasteur.fr>. A continuación se determinó el Uso Relativo de Codones Sinónimos (RSCU) y se realizó un análisis multivariado de correspondencia COA con la finalidad de detectar variaciones en el uso de codones entre los 6 serotipos de los CVB.

El ENC es un estimador útil para cuantificar el sesgo en el uso de codones de la secuencia codificante de una proteína, su rango de valores va de 20, cuando sólo uno de los codones sinónimos es el utilizado para codificar a cada aminoácido, hasta 61 cuando todos los codones sinónimos son utilizados de forma similar para codificar a los aminoácidos (Wright, 1990; Comeron, 1998), por lo que, cuanto menor sea el ENC más sesgo habrá en el uso de codones. Valores de $ENC < 40$ indican un importante sesgo en el uso de codones sinónimos.

Para su cálculo se emplea:

$$ENC = 2 + \frac{9}{F_2} + \frac{1}{F_3} + \frac{5}{F_4} + \frac{3}{F_6}$$

$$F = \frac{n \sum_{i=1}^k P_i^2 - 1}{n - 1} \quad n > 1 \quad P_i = \frac{n_i}{n}$$

Donde n es el número observado de los codones que se utilizan, k es el número de codones sinónimos que posee y P_i es la frecuencia de uso de cada codon i (n_i/n). ENC está influenciado por el contenido aminoacídico y por el largo del gen que se está analizando

El “Número Efectivo de Codones” (ENC) y la frecuencia en el uso de G+C en la tercera posición del codon (GC_3S) (excluyendo Metionina (AUG), Triptofano (UGC), y los codones de terminación) fueron calculados mediante CODON W.

El cálculo del “Uso Relativo de Codones Sinónimos” (RSCU), que es la frecuencia observada de codones dividida la frecuencia esperada, se realizó empleando:

$$RSCU = \frac{g_{ij}}{\sum_j g_{ij}} \cdot n_i$$

Donde g_{ij} es el número observado de los j^{th} codones para los i^{th} aminoácidos (los que tienen n_i codones sinónimos). Si todos los codones que codifican un determinado aminoácido fueran utilizados en la misma frecuencia el $RSCU=1$ (Tsai *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2010) por lo que valores cercanos a 1 indican que no existe sesgo en el uso de los diferentes codones. Los valores del RSCU son independientes de la composición aminoacídica, por lo que es útil para ser utilizado para genes que codifican proteínas con diferente número de aminoácidos.

Dado que el uso de codones es un evento de naturaleza multivariada se requiere que los datos sean analizados mediante técnicas de estadísticas multivariadas, tal como un análisis de correspondencia (COA). La ventaja de este análisis es que no asume que los datos caen en grupos discretos, por lo cual se pueden representar como una variación continua.

El análisis de correspondencia COA es una técnica que identifica y ordena las principales tendencias en la variación en los datos, permitiendo la distribución continua de los datos a lo largo de los ejes. De acuerdo con esas tendencias COA crea una serie

de ejes ortogonales que permiten identificar las tendencias que explican la variación de los datos. Cada nuevo eje aporta una menor explicación a esa variación. Cada ORF se representa en cada una de las 59 dimensiones del análisis, donde cada dimensión esta relacionada con el RSCU (Greenacre, 1984).

Existen reportes de que el sesgo en la frecuencia en el uso de dinucleótidos afecta el uso de codones (Tao *et al.*, 2009). Para analizar el alcance de este efecto, se determinó la abundancia relativa de los 16 dinucleótidos para los juegos de datos de la 3Dpol y de la región codificante del genoma completo.

Para la evaluación de los resultados se realizó un análisis estadístico utilizando el método de análisis de correlación de Spearman disponible en <http://www.wessa.net>, (Wessa, 2010).

4.- RESULTADOS

4.1.- Desarrollo de metodologías moleculares para detección de HEV-B de LCR.

Se implementaron exitosamente las metodologías moleculares basada en RT-PCR para la amplificación de las dos regiones del genoma (VP1 y 3Dpol), a partir de muestras de LCR de pacientes pediátricos con diagnóstico presuntivo de encefalitis viral. Basándose en el protocolo de McWilliam Leitch *et al.*, 2009), se realizaron modificaciones a fin de optimizarlo para nuestras muestras.

Los productos obtenidos se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio, observándose una banda a la altura de los 1100nt en el caso de la amplificación de VP1 y de 450nt para la 3Dpol.

Fueron purificados y secuenciados por la Unidad de Biología Molecular (UBM) del Instituto Pasteur de Montevideo.

4.2.- Determinación de Genotipos.

Del total de muestras de LCR analizadas se logró amplificar y secuenciar 7 de ellas para la VP1. La región amplificada corresponde al extremo N-terminal del gen que codifica para VP1 (1100nt). Estos estudios fueron realizados mediante la construcción de árboles filogenéticos de Máxima Verosimilitud, bajo el modelo GTR+ γ de las muestras de los LCR con las correspondientes secuencias de las cepas patrones de los HEV-B (Figura 5).

Las secuencias de las 7 muestras amplificadas directamente de los LCR de los pacientes pediátricos uruguayos se agrupan junto a algunas de las diferentes cepas patrones de los HEV-B con fuerte soporte estadístico. Agrupándose junto a las cepas patrones de *Echovirus 4* (E4), *Echovirus 11* (E11), *Echovirus 14* (E14), *Coxsackievirus B2* (CVB2), *Coxsackievirus B4* (CVB4) y *Coxsackievirus A9* (CVA9).

Correspondiendo las muestras Uru38 de febrero de 2005 a E4, Uru40 de noviembre 2005 a CVB2, Uru140 de noviembre 2006 a CVB4, Uru161 de diciembre de 2006 a CVB4, Uru200 de diciembre de 2007 a CVA9, Uru390 de marzo de 2010 a E11 y Uru397 de marzo de 2010 a E14 (Tabla1).

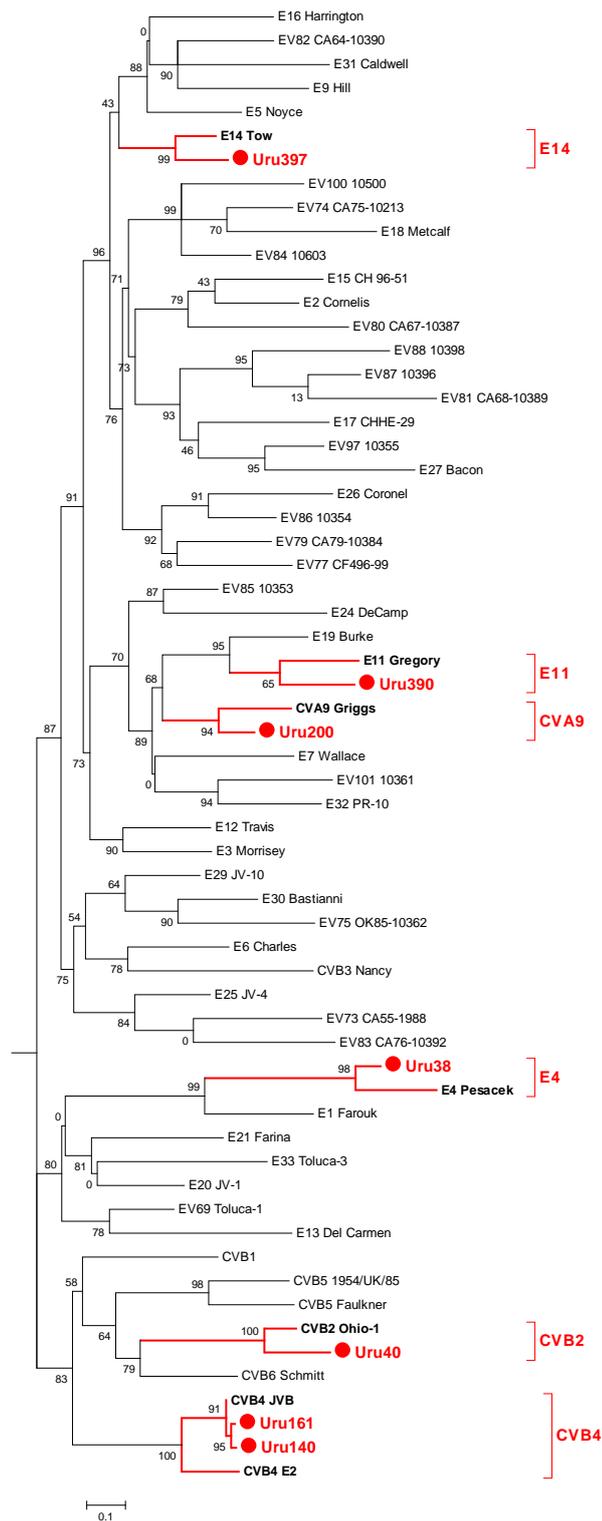


Figura 5. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de las cepas referencias de los HEV-B correspondiente a la región N-terminal del gen VP1 con los aislados obtenidos a partir de LCR de pacientes pediátricos uruguayos. Lo que nos permite la genotipificación de los mismos, dado que cada uno pertenece a un determinado clado con fuertes valores de aLRT. Los valores de los nodos corresponden a valores de aLRT y la barra en la parte inferior del gráfico representa la distancia filogenética.

4.3.- Variabilidad en la región

Se analizó el grado de variabilidad genética y modo de evolución de los HEV-B que circulan en nuestro país y en la región por medio de la construcción de árboles filogenéticos de máxima verosimilitud, bajo el modelo GTR+ γ con secuencias de cepas de la región (Argentina y Brasil) y con secuencias de cepas aisladas directamente de LCR tomadas de la base de datos (Figura 6).

Las 7 secuencias amplificadas directamente de los LCR de la región N-terminal del gen VP1 de los pacientes pediátricos uruguayos se agrupan en sus correspondientes clados junto a cepas Argentinas, cuando las hay, o junto a cepas tomadas directamente de LCR de diferentes regiones del mundo.

4.4.- Evolución de los CVB

Del total de muestras de LCR analizadas se logró amplificar y secuenciar 9 muestras.

Con la región correspondientes al gen que codifica para 3Dpol (380nt pertenecientes a la posición 5907 a 6287 de acuerdo a la cepa referencia X05690), y con la región codificante de los 26 genomas completos, se realizó el análisis filogenético. Utilizando el modelo GTR+ γ , determinado por el programa Modelgenerator, se construyeron los árboles filogenéticos por Máxima Verosimilitud utilizando como grupo externo una cepa perteneciente a CVA9.

Para el juego de datos correspondiente a la 3Dpol se observa que todas las cepas aisladas de los pacientes uruguayos se agruparon juntas y asociadas a CVB4 con altos valores de aLTR, conformando un único y bien definido grupo, mientras que para los CVB3 se pueden observar diferentes linajes genéticos (Figura 7).

Resultados similares se obtuvieron al realizar el estudio tomando la región codificante del genoma completo (Figura 8).

Mediante el análisis con el programa Simplot empleando el método de ventanas deslizantes y el proceso de “*bootscanning*”, no encontrándose cepas recombinantes en la región de 3Dpol en el set de datos de las secuencias uruguayas. No obstant, utilizando la región codificante completa si se detectaron posibles puntos de recombinación mediante el programa GARD (Algoritmo Genético para la Detección de Recombinantes). La mayor posibilidad de que se produzcan eventos de recombinación se da en la región de la P2 y en P3B (Figura 9).

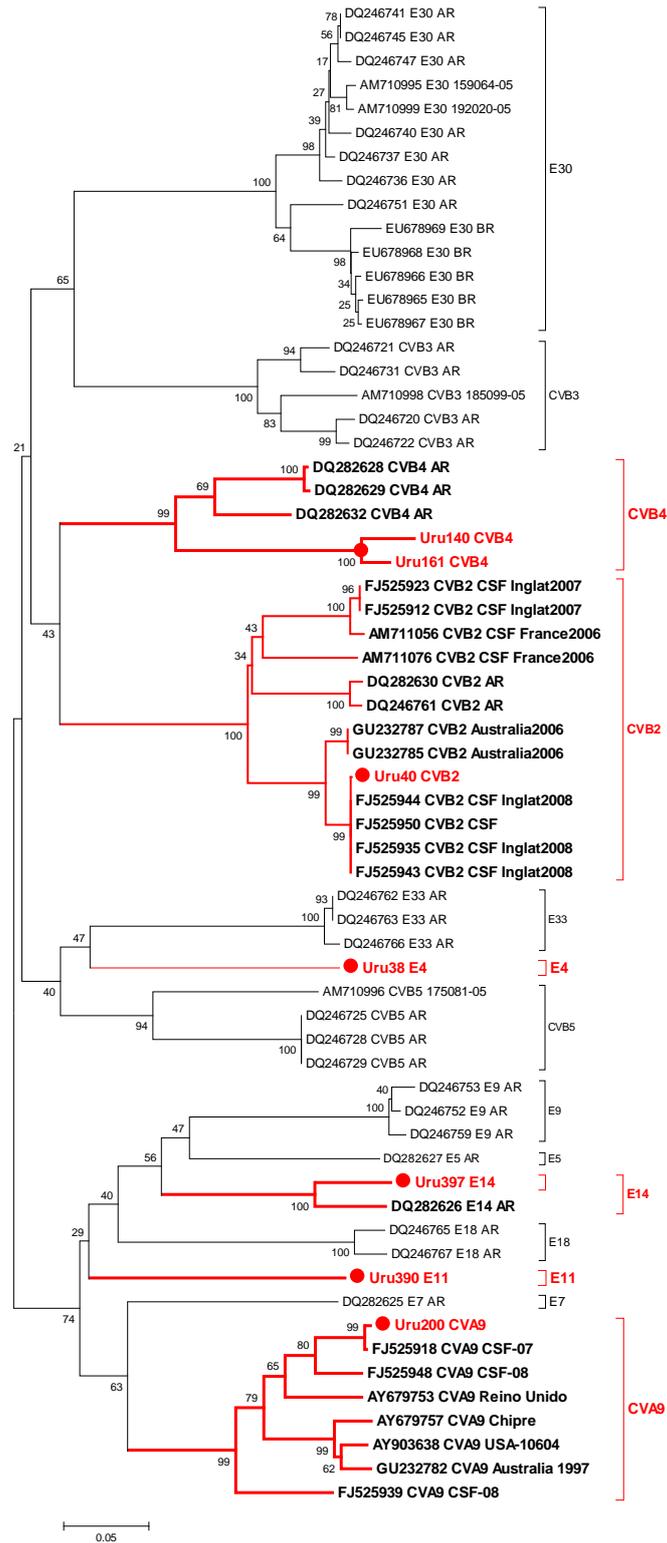


Figura 6: Árbol filogenético correspondiente a la región VP1 N terminal construido por Máxima Verosimilitud de los aislados obtenidos a partir de LCR de pacientes pediátricos uruguayos con cepas reportadas circulantes en Argentina (AR) y Brasil (BR) así como aislados directos de LCR (CSF).

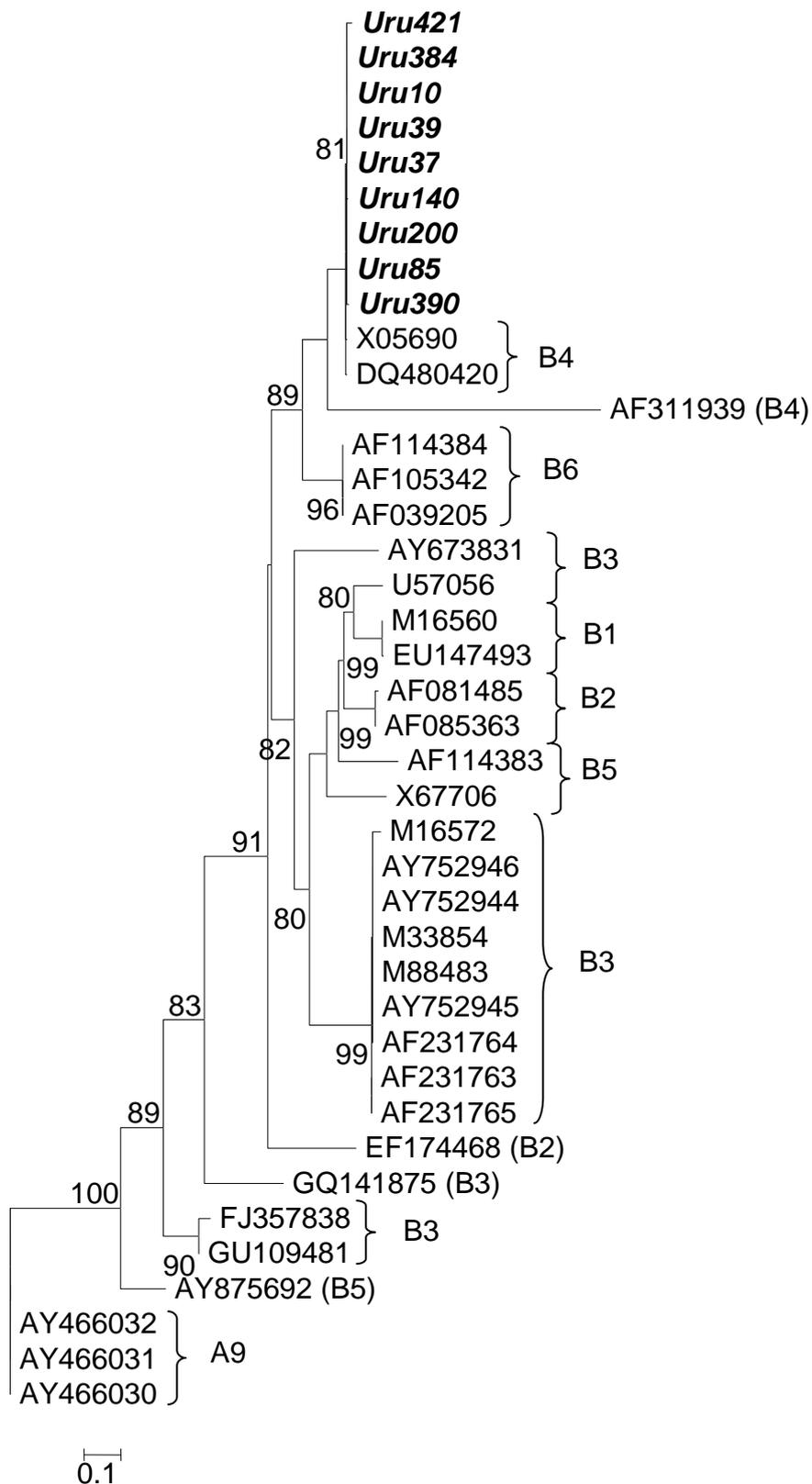


Figura 7. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud utilizando la 3Dpol de las 26 cepas de CVB cuyo genoma completo se conoce (identificadas por su Accesoión Number) y de las cepas aisladas en Uruguay con su nombre en negrita.

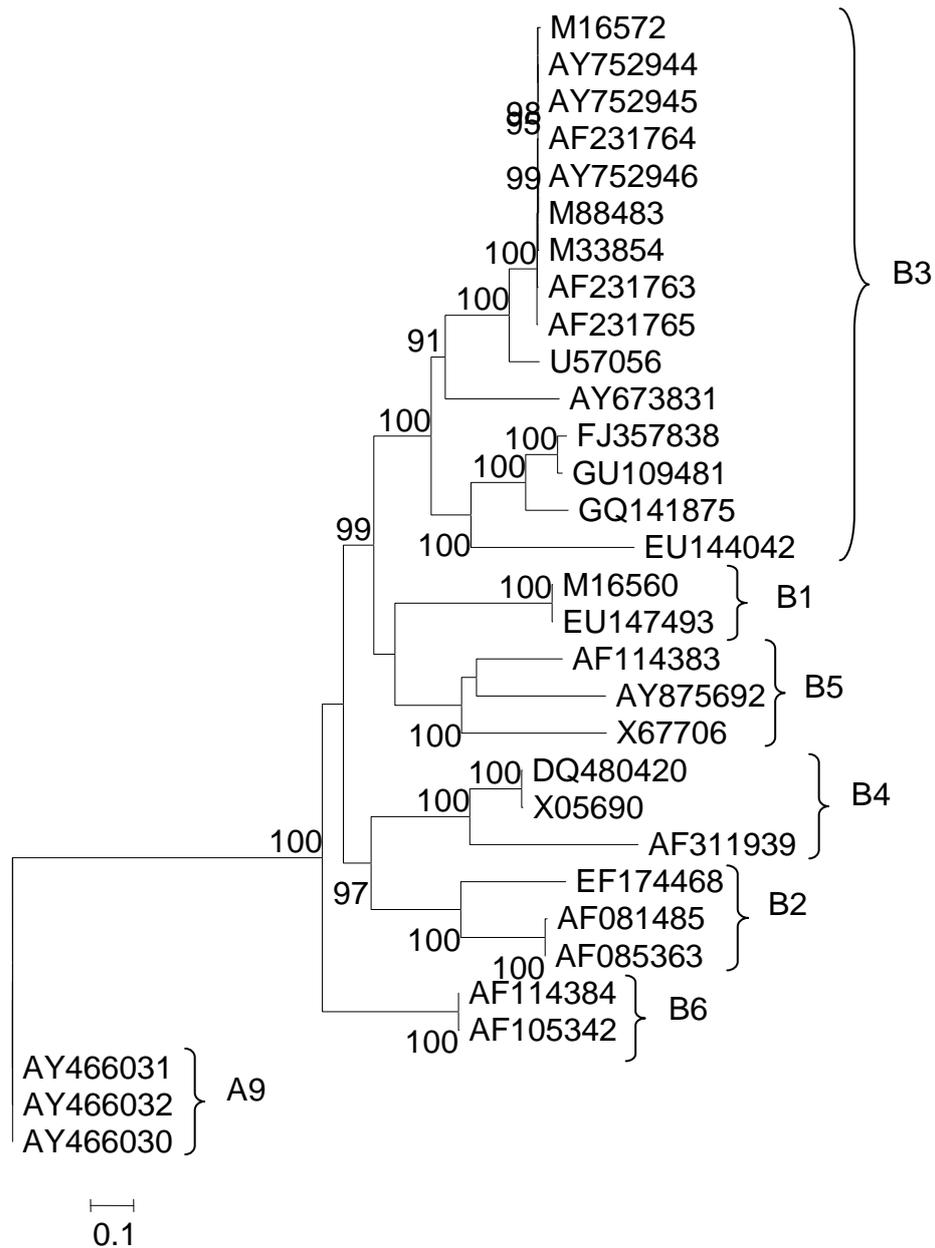


Figura 8. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud utilizando la región codificante del genoma completo de las 26 cepas de CVB (identificadas por su Acceso Number). Los números en los nodos de los árboles muestran los valores de aLTR, y la barra en la parte inferior del árbol muestra la distancia filogenética.

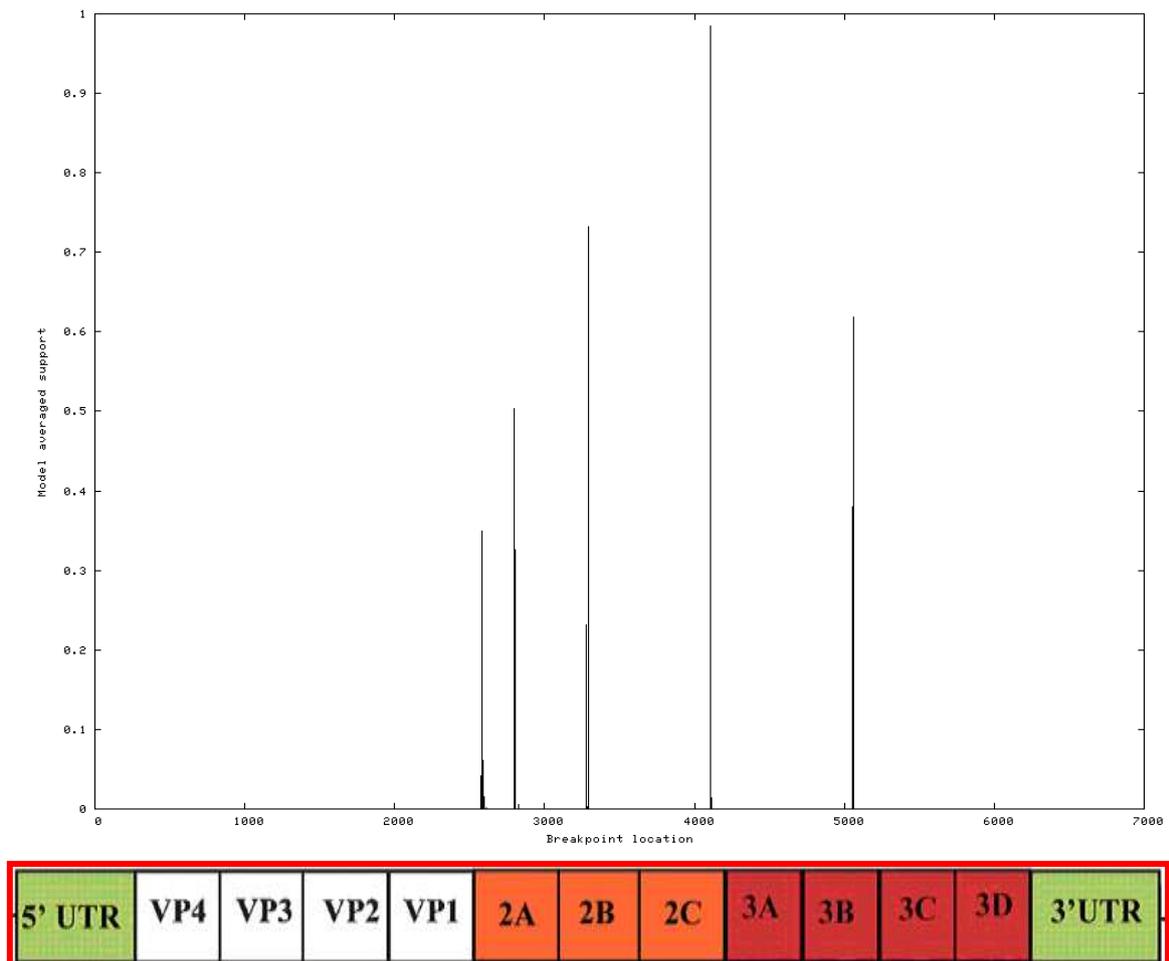


Figura 9. Análisis de detección de posibles puntos de recombinación utilizando GARD (Algoritmo Genético para la Detección de Recombinantes) de las 26 cepas cuyos genomas completos se disponen. Se observa que los posibles eventos de recombinación se darían principalmente en la región estructural principalmente en P2 y P3B.

La comparación de los perfiles de sustituciones sinónimas y no sinónimas entre los diferentes pares de cepas pertenecientes a los CVB (que se realizó con la finalidad de evaluar la importancia de los eventos de recombinación en la evolución) muestra muy bajas tasas de sustituciones no sinónimas, sobretodo en la región no estructural (Figura 10 a-f).

Para ambos juegos de datos se analizó el Numero Efectivo de Codones (ENC); siendo el ENC medio obtenido para el gen de la 3Dpol de 56.36 ± 4.63 analizando 5.080 codones. Cuando el mismo análisis se realizó para toda la región codificante del genoma sobre un total de 61.171 codones se obtuvo un ENC medio de 54.54 ± 0.55 .

La gráfica ENC vs GC3s nos permite investigar si el sesgo en el uso de codones sinónimos esta asociado al contenido en G+C en la tercera posición, los puntos que la constituyen, tanto los pertenecientes a la 3Dpol como los correspondientes a la región codificante completa, se hallan justo por debajo de la curva esperada, lo que nos indica que el uso de codones es debido a un sesgo mutacional (Figura 11).

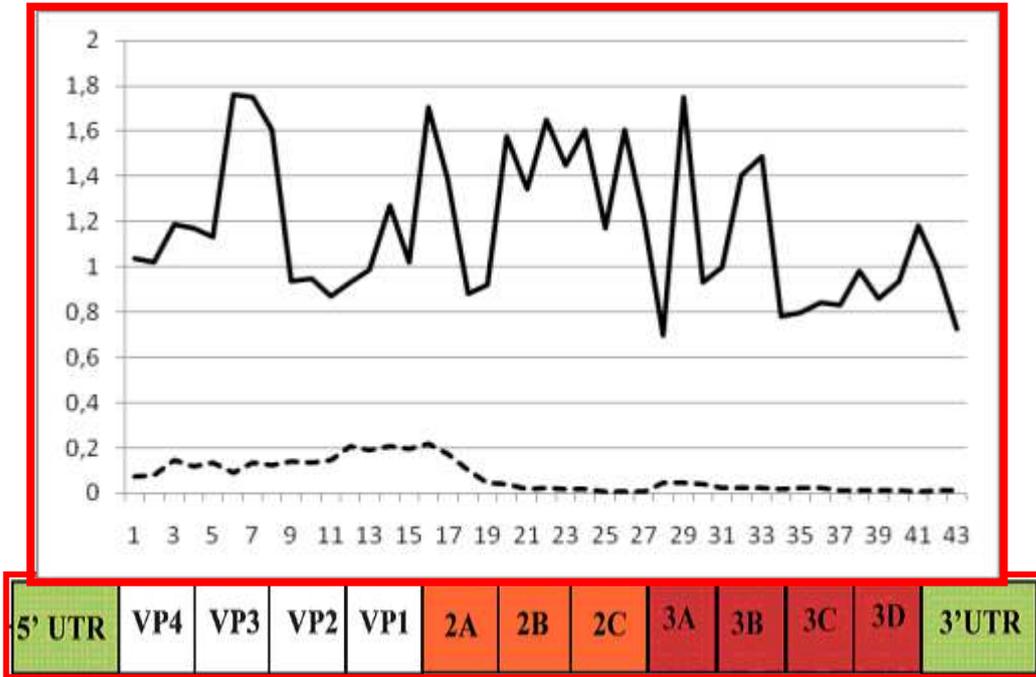
Dado que el uso de codones es un evento de naturaleza multivariada se requiere que los datos sean analizados mediante técnicas estadísticas multivariadas, tal como un análisis de correspondencia COA.

El análisis de la correlación entre la posición en el primer eje generado por el COA para cada gen y el contenido GC3s para cada cepa fue analizada para los datos de la 3Dpol y para la región codificante del genoma completo dando valores de ($r = -0.383$, $P = 0.020$ y $r = -0.030$, $P = 0.865$) para ambos juegos de datos respectivamente. No encontrándose correlación mediante COA entre el eje 1 y el contenido GC3s entre las diferentes cepas de CVB.

Para analizar la variación entre los diferentes genotipos de los CVB se hizo un COA para el RSCU, observándose que la distribución de los 6 genotipos de los CVB a lo largo de los 2 ejes principales del COA se ubican en distintas posiciones del plano (Figura 12). Diferentes cepas aisladas de diferentes tejidos celulares y por ende asociadas a diferentes enfermedades, se observan en zonas diferentes del plano. La cepa diabetogénica de CVB4, la cepa asociada a miocarditis de CVB3 y las cepas halladas en LCR asociadas a encefalitis se hallan claramente en regiones diferentes del plano, sugiriendo un uso diferencial de codones.

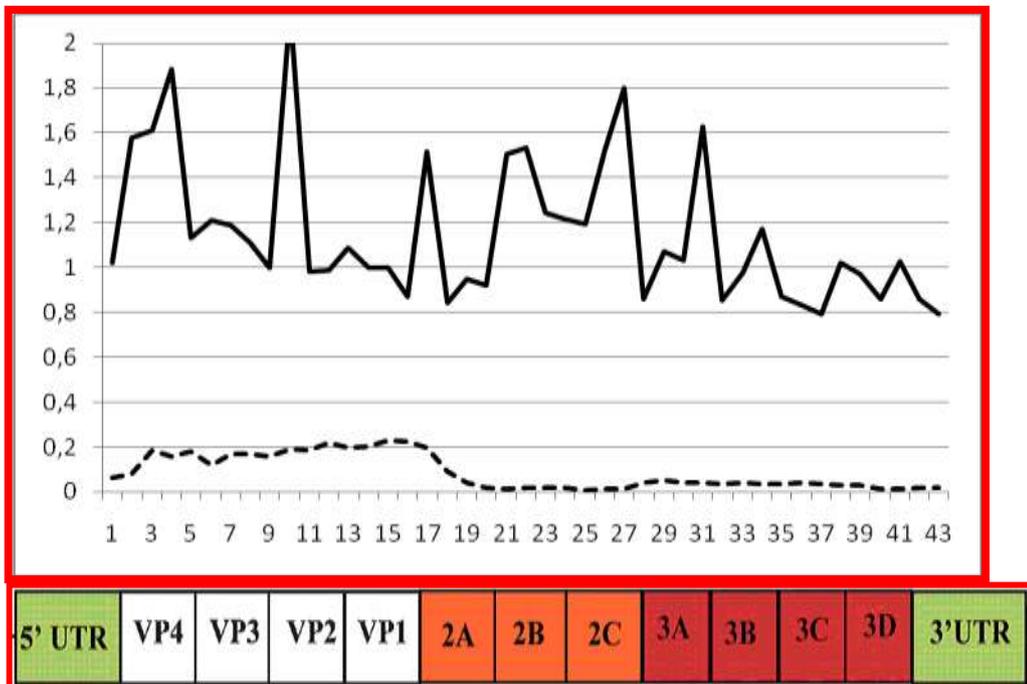
La frecuencia en el uso de los dinucleótidos observada fue similar, tanto cuando se analizó la 3Dpol como cuando se analizó el genoma completo de las diferentes cepas de CVB. El dinucleótido cuya abundancia se aparto más del rango normal fue CpG

CVB4 vs CVB2



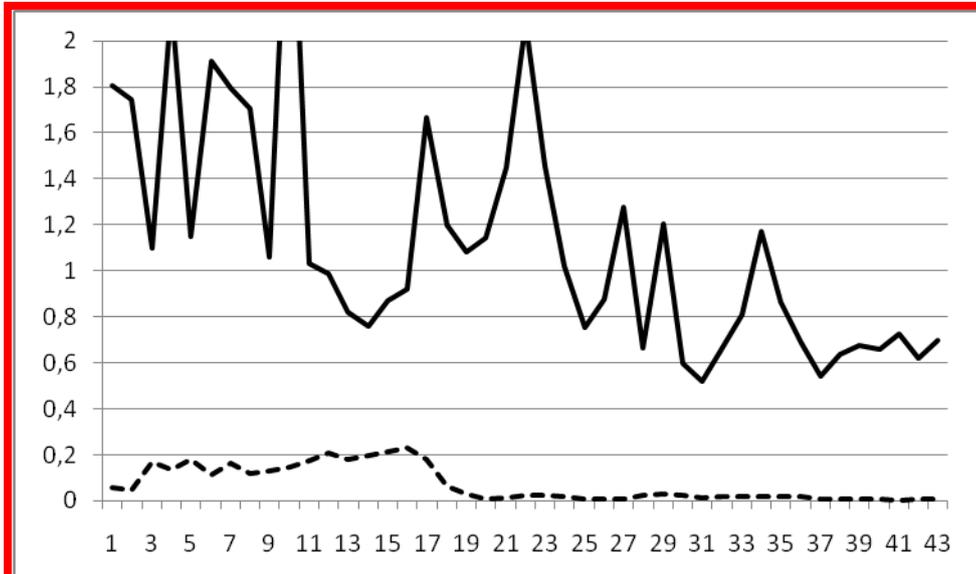
A

CVB4 vs CVB3



B

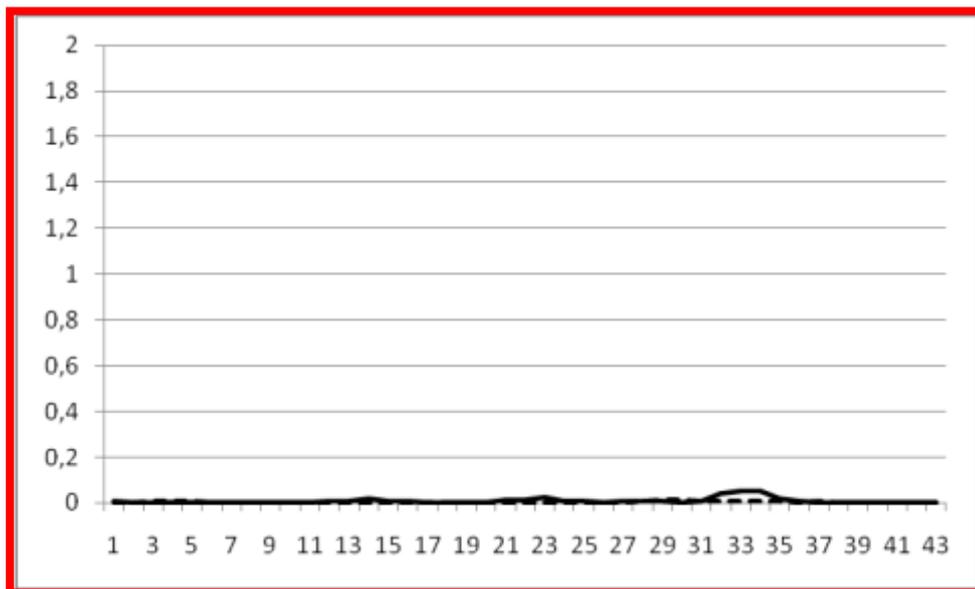
CVB4 vs CVB6



C

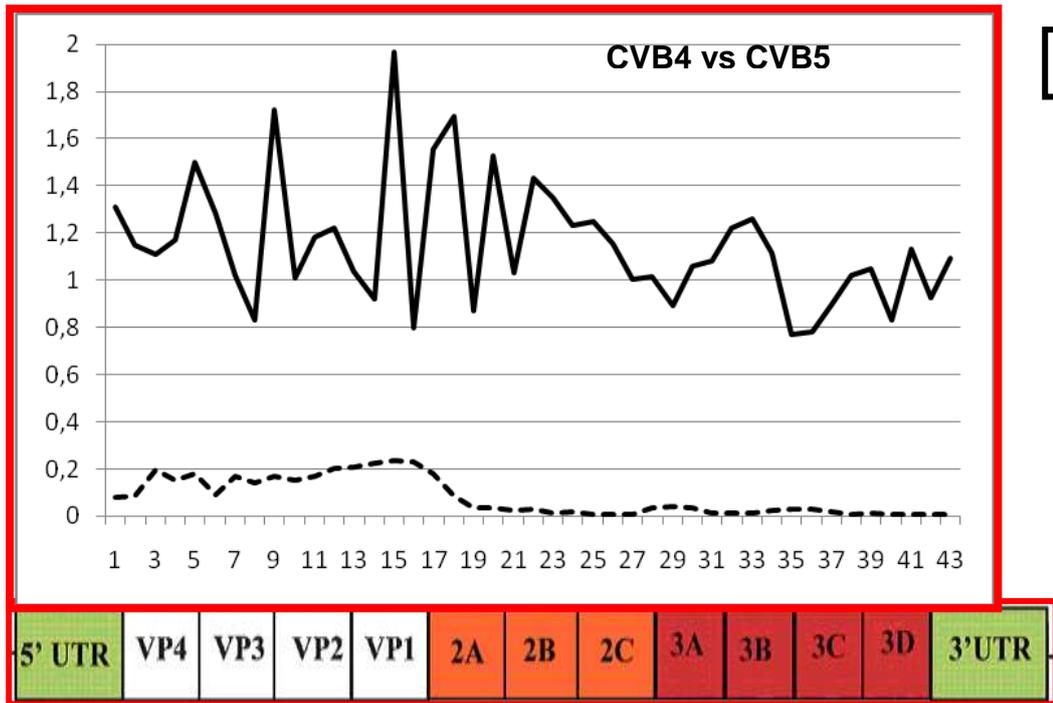


CVB4 vs CVB4

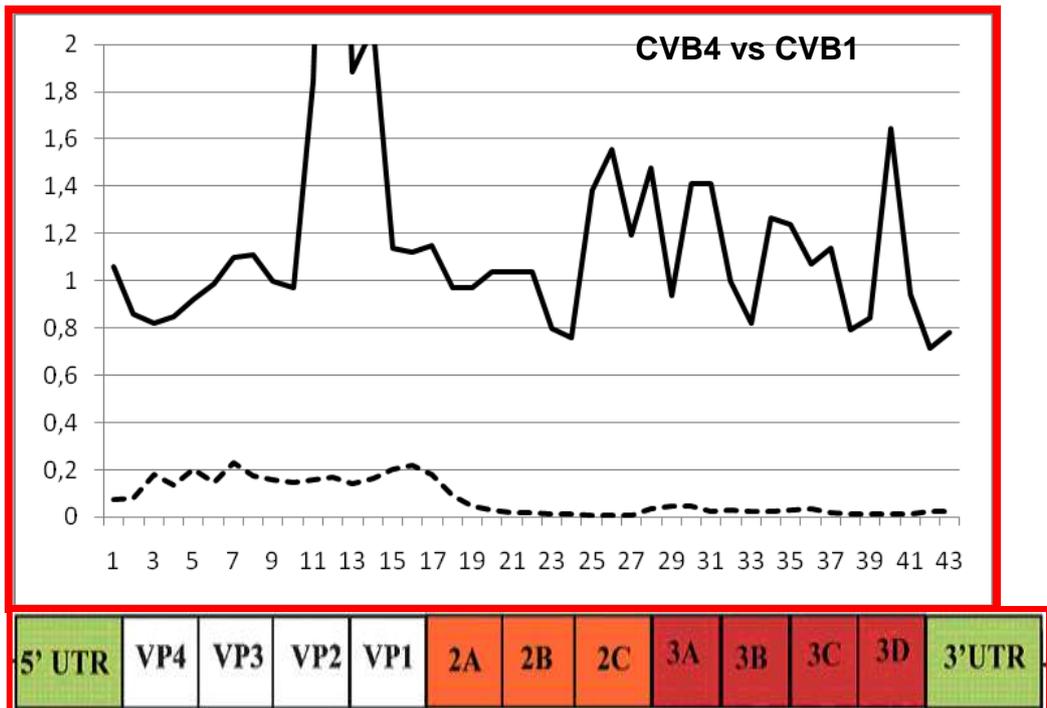


D





E



F

Figura 10. Perfiles de las distancias sinónimas y no sinónimas entre los diferentes linajes de los CVB. Las distancias sinónimas están representadas por una línea continua mientras que las distancias no sinónimas lo están por una línea punteada. En el eje “x” se indica la posición en el genoma mientras que el eje ”y” representa la distancia. Las cepas comparadas son A) X05690 (B4)-AF081485 (B2); B) X05690 (B4) - M16572 (B3); C) X05690 (B4) - AF114384 (B6); D) X05690 (B4) -DQ480420 (B4); E) X05690 (B4) - AF114383 (B5) y F) X05690 (B4) - M16560 (B1).

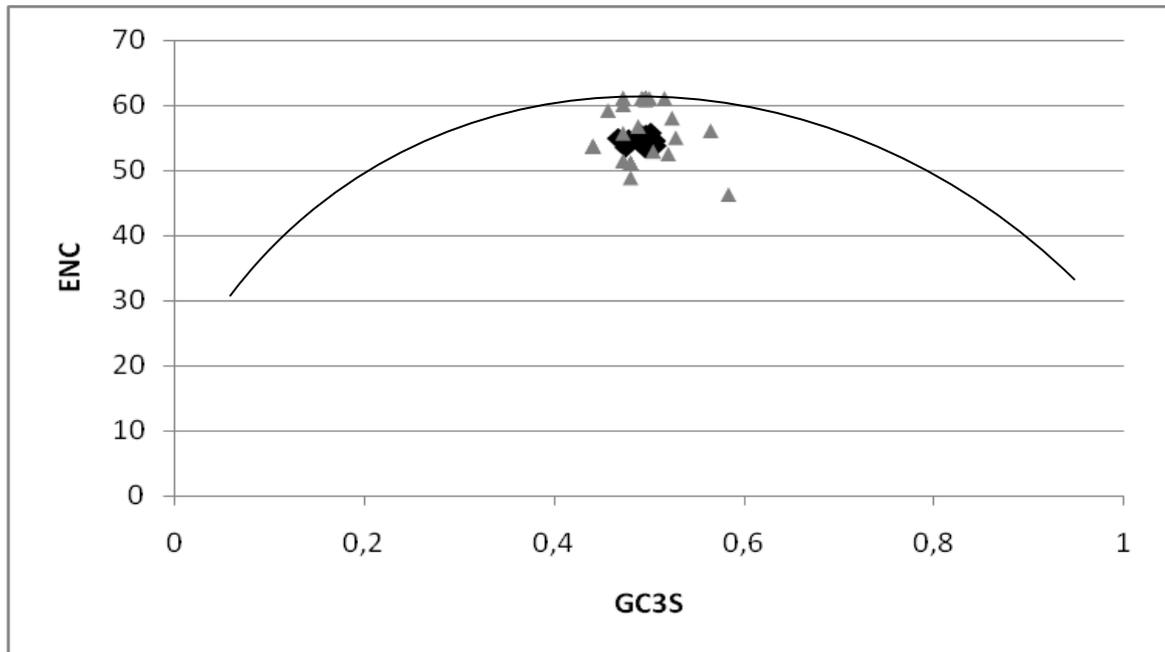


Figura 11. Gráfica del ENC vs GC3s para ambos juegos de datos. La curva representada en el gráfico indica la relación entre ENC y GC3s en ausencia de selección. Los triángulos grises corresponden a las secuencias de la 3Dpol y los cuadrados negros indican los resultados obtenidos al utilizar la región codificante del genoma completo de los diferentes genotipos de CVB.

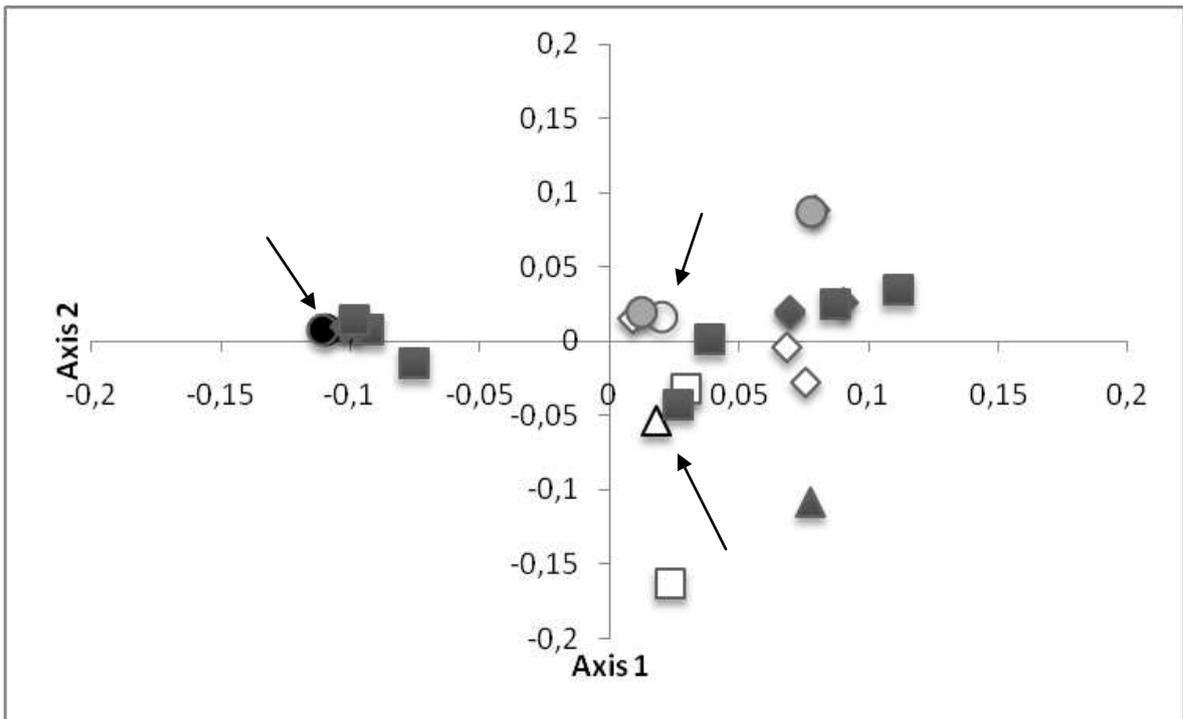


Figura 12. Posición de las 26 secuencias codificantes del genoma completo de los diferentes genotipos de los CVB ubicados en el gráfico correspondiente a los 2 ejes principales del COA de los RSCU. El 1° y 2° eje contribuyen con el 32.31 % y 12.52 % de la variación total respectivamente. Los CVB se hallan representados en función de sus genotipos, las cepas pertenecientes a los CVB1 por diamantes obscuro (◆); los CVB2 por un cuadrado blanco (□); los CVB3 por un cuadrado obscuro (■); los CVB4 por un diamante blanco (◇); los CVB5 por un triángulo obscuro (▲); y los CVB6 por un círculo gris. La cepa de CVB que se conoce asociada a diabetes mellitus (DQ480420, genotipo B4) se halla identificada por un círculo negro (●); el genotipo asociado a miocarditis (M16572, genotipo B3) por un círculo blanco (○); y las cepas aisladas a partir de LCR (AY875692 genotipo B5) se hallan representadas por un triángulo blanco (△).

estando subrepresentado con una $\text{media} \pm \text{S.D.} = 0.484 \pm 0.020$ para la región codificante completa y de 0.526 ± 0.121 para la 3Dpol. Por otra parte, el dinucleótido que aparece sobre-representado fue CpA con una $\text{media} \pm \text{S.D.}$ de 1.429 ± 0.031 para la región codificante completa y para la 3Dpol el dinucleótido más sobre-representado fue ApA con 1.482 ± 0.128 (Tabla 4).

El análisis de la frecuencia relativa del uso de dinucleótidos nos muestra que de los 16, dinucleótidos 10 de ellos se correlacionan fuertemente con el primer eje del COA (Tabla 5).

Se analizaron los codones para los cuales se obtuvieron los valores máximos y mínimos para cada uno de los ejes de estudio (es decir, los valores de los codones más divergentes), Como se puede observar la mayoría de los codones divergentes fueron los tripletes que codifican para Arginina y Leucina (Tabla 6).

Tabla 4. Frecuencia Relativa de dinucleótidos para los diferentes genotipos de los CBV. En ambos juegos de datos el dinucleótido GpC es el que aparece menos representado (en rojo), mientras que el dinucleótido ApA en el gen parcial de la 3Dpol y CpA en la región codificante completa son los dinucleótidos que aparecen más representados (en azul).

Gen parcial de la 3D pol								
	UU	UC	UA	UG	CU	CC	CA	CG
Mean ± SD ^a	0.899±0.092	0.746±0.089	0.798±0.096	0.986±0.116	0.757±0.083	0.770±0.110	1.472±0.092	0.526±0.121
	AU	AC	AA	AG	GU	GC	GA	GG
Mean ± SD	0.980±0.108	1.147±0.110	1.482±0.128	1.339±0.095	0.794±0.139	0.865±0.118	1.258±0.092	1.116±0.095
Región codificante completa								
	UU	UC	UA	UG	CU	CC	CA	CG
Mean ± SD	0.900±0.042	0.758±0.024	0.844±0.049	1.238±0.047	0.850±0.023	0.909±0.030	1.429±0.031	0.484±0.020
	AU	AC	AA	AG	GU	GC	GA	GG
Mean ± SD	1.038±0.031	1.144±0.044	1.283±0.028	1.169±0.029	0.954±0.019	0.857±0.028	1.078±0.018	1.057±0.028

Tabla 5. Resumen del análisis de correlación entre los ejes del COA y la frecuencia de los 16 dinucleóticos para la región codificante completa del juego de datos de los CVB. Se observa que la frecuencia de utilización de 10 de los 16 dinucleótidos se correlaciona con el primer eje del COA (en negrita).

		UU	UC	UA	UG	CU	CC	CA	CG
Axis 1	<i>r</i>	0.660	0.680	-0.779	0.774	0.311	-0.711	-0.035	-0.370
	<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.105	<0.001	0.849	0.053
		AU	AC	AA	AG	GU	GC	GA	GG
Axis 1	<i>r</i>	0.579	-0.621	0.683	-0.715	-0.396	0.730	-0.157	-0.260
	<i>P</i>	<0.01	0.001	<0.001	<0.001	0.038	<0.001	0.406	0.173

Tabla 6. Análisis de la posición que ocupan los codones en cada uno de los cuatro principales ejes del COA.

Los codones más divergentes fueron aquellos que codifican para la Arginina y Leucina.

Axis 1			Axis 2		
Codon	Valor	Aminoácido	Codon	Valor	Aminoácido
CGG	-0.334	Arg	UCG	-0.143	Ser
CGA	0.289	Arg	GUU	0.082	Val

Axis 3			Axis 4		
Codon	Valor	Aminoácido	Codon	Valor	Aminoácido
CUU	0.065	Leu	UUA	-0.142	Leu
CUC	0.096	Leu	CUU	0.097	Leu

5.- DISCUSIÓN

Se puso a punto una técnica basada en biología molecular mediante la amplificación por RT-PCR de 2 regiones del genoma (VP1 y 3Dpol) que nos permite en sólo unas horas, determinar y genotipificar los HEV-B causante de la infección, a partir directamente de LCR.

Los estudios que hemos realizados nos han permitido por amplificación del gen que codifica para VP1 directamente de LCR, establecer los genotipos circulantes de HEV-B en nuestro país.

Debido a baja carga viral de los HEV-B presentes en los LCR, así como las posibles condiciones de preservación de las muestras de LCR por un largo período de tiempo (de hasta 5 años) se nos ha imposibilitado amplificar un mayor número de muestras. Cabe destacar que para lograr nuestros objetivos, determinar los genotipos que se hallaban directamente implicados en la infección del SNC, era de suma importancia realizar los estudios directamente del LCR, evitando su crecimiento y aislamiento en cultivos celulares. Pudiendo de esta manera afirmar con absoluta certeza que las secuencias analizadas provienen de la estirpe original causante de la enfermedad.

El estudio de las secuencias obtenidas del gen VP1 nos han permitido establecer por primera vez para nuestro país, que al menos 6 genotipos de los HEV-B están circulando en nuestro país asociados a encefalitis pediátricas, siendo ellos CVA9, CVB2, CVB4, E4, E11 y E14 (Figura 5).

Teniendo en cuenta las fechas de obtención de la muestra [Uru38 (E4) de febrero de 2005; Uru40 (CVB2) de noviembre 2005, Uru140 (CVB4) de noviembre 2006; Uru161 (CVB4) de diciembre de 2006; Uru200 (CVA9) de diciembre de 2007; Uru390 (E11) de marzo de 2010 y Uru397 (E14) de marzo de 2010], se observa que diferentes cepas circularon en diferentes años, a excepción del 2010 donde hemos hallado E11 y E14 co-circulando. Además de observarse un claro patrón estacionario que comprende el período cálido de noviembre a marzo (Tabla 1). Dichos patrones de circulación están de acuerdo a los reportados para los HEV-B (Modlin *et al.*, 2000).

Las cepas que se hallaron circulando en nuestro país se hallan relacionadas filogenéticamente con cepas que han sido reportadas circulando en Argentina (Figura 7).

A pesar de que en Argentina el reporte de meningitis es obligatorio desde 1960 (ley 15.465) sólo existen 5 reportes de brotes asociados a HEV.

El genotipo E4 ha sido reportado como el causante de un brote en la Provincia de Tucumán en 1996 entre el 18/2 y el 18/5 de 1996, siendo identificado en un 68% de los casos (Freire *et al.*, 2003). En el 2008 Grenón *et al.*, presentaron un estudio retrospectivo al año 2005 de un brote de meningitis en la Provincia de Misiones donde se volvió a identificar a E4 como el agente más representativo. La cepa Uru38 genotificada como E4 aislada en nuestro país del 3/2/2005 podría estar relacionada con estos casos reportados.

En Brasil se reportó que en el período 2002-2003, en la ciudad de Belén a HEV como causantes de meningitis aséptica, siendo E30 el aislado mas frecuente seguido de CVB5 y E4 (Gomes *et al.*, 2007).

El análisis filogenético de los datos correspondiente a la 3Dpol de las cepas de CVB y para la región codificante del genoma completo, utilizando el modelo GTR+ γ , y como grupo externo una cepa perteneciente a CVA9, mostraron resultados similares (Figuras 7 y 8). Lo que nos permiten sugerir que la secuencia de la 3Dpol contiene información suficiente para la genotipificación de las diferentes estirpes de CVB, tal como se había demostrado en estudios previos (Simmonds *et al.*, 2006).

La incongruencia en la genotipificación observada en las cepas Uru200 y Uru390, podría ser debida a posibles eventos de recombinación, pero los estudios correspondientes no pudieron realizarse por la falta de muestra.

Con el fin de evaluar cuanto aporta la recombinación a la evolución de los CVB, determinamos con el programa GARD (Algoritmo Genético para la Detección de Recombinantes), donde es mayor la probabilidad de recombinación a lo largo del genoma. Dándose la mayor posibilidad de recombinación en P2 antes de la región de la polimerasa.

Nuestro análisis de los patrones de sustituciones sinónimas y no sinónimas nos sugiere, que si bien los eventos de recombinación son frecuentes dentro de los diferentes genotipos de CVB estos no parecerían jugar un rol significativo en la evolución de los mismos, dado que casi no alteran la constitución de las proteínas, sobretodo en la región no estructural.

Al igual que lo que se ha reportado para otros virus tales como *Influenza H5N1*, (media de ENC = 50.91) (Ahn *et al.*, 2006) (Zhou *et al.*, 2005); *SARS* (media de ENC = 48.99); *foot-and-mouth disease virus* (media de ENC = 51.42) (Zhong *et al.*, 2007); *classical swine fever virus* (media de ENC = 51.7) (Tao, P., *et al.*, 2009) y *Duck Enteritis virus* (media de ENC = 52.17) (Jia *et al.*, 2009). Los valores de ENC hallados para CVB (media de ENC = 56.36), son similares a los reportados para estos virus, indicando que el

sesgo en el uso de codones no es significativo para ellos. Teniendo en cuenta que los valores medios de ENC para los genes de los CVB son >50 , se estaría indicando la existencia de un muy bajo sesgo en el uso de codones por parte de los CVB, lo cuál estaría acorde con el hecho de que los HEV-B presentan una primera viremia en el tracto gastrointestinal y luego replican en diferentes tejidos.

La no significativa correlación entre el primer eje del COA y los valores del contenido en GC3s obtenido para todos los CVB de este estudio sugiere que aunque la presión mutacional esta presente, ésta no contribuye significativamente en el sesgo en el uso de codones en los CVB, sugiriendo que otros factores podrían contribuir en el sesgo observado (Figura 11).

El análisis de correspondencia de la frecuencia relativa en el uso de dinucleótidos, nos hace suponer que la frecuencia en la utilización de los mismos por parte de los CVB podría influir en la evolución y la adaptación de las diferentes estirpes a diferentes tejidos celulares con su consiguiente epidemiología.

Detectándose una sub-utilización de los dinucleótidos CpG por parte de los CVB (Tabla 4) esté resultado indicaría que se estaría evitando que los receptores Tolls endógenos (TLR 3, 7, 8 y 9) que actúan como sensores de ARNs y de CpG no metiladas, desencadenen la respuesta inmune innata antiviral, evitando de esa forma la formación de interferón endógeno.

La distribución de los 6 diferentes genotipos de los CVB a lo largo de los 2 ejes principales del COA, muestra que diferentes genotipos asociados a diferentes enfermedades se hallan localizados en diferentes regiones del plano (Figura 12).

Lo que es particularmente interesante, dado que los 6 genotipos de CVB entran a la célula a través de un mismo receptor celular, el coxsackie-adeno receptor (CAR), el que se halla presente en diferentes tipos de tejidos celulares susceptibles de ser infectados por los CVB. Luego diferentes CVB infectan a diferentes tejidos, produciendo enfermedades diferentes.

Estos resultados sugieren que el uso de codones de los CVB está experimentando un proceso evolutivo. Lo que probablemente refleja un proceso dinámico de selección para adaptar su uso de codones a los distintos entornos.

Se analizaron los codones para los cuales se obtuvieron los valores máximos y mínimos para cada uno de los ejes del COA del estudio. El hecho de que los codones más divergentes sean los relacionados con los tripletes de Arginina y Leucina revela que el uso de estos codones juega un rol importante en la evolución y la variabilidad observada entre

los CVB. Por lo que ambos aminoácidos podrían jugar un importante rol en la evolución y la variabilidad de los CVB (Tabla 6).

Los virus en general evaden la respuesta inmune innata celular, pero los CVB van mas allá, induciéndola activamente y luego explotando algunas de las características de la respuesta celular. Mientras que la mayoría de los virus codifican proteínas que impiden la función efectora de la inmunidad adaptativa, los CVB eluden la atención de las células TCD8+ nativas.

Todos estos resultados sugieren que el sesgo genómico en los CVB es el resultado de una co-evolución a la adaptación traduccional, y probablemente la necesidad de escapar a las defensas anti-virales celulares, lo que esta de acuerdo con la teoría retórica de la evolución propuesta por Vetsigian & Goldenfeld, 2009 en la cual el sesgo genómico surge de la necesidad de aumentar la comunicación con el entorno siempre cambiante de las células sin la necesidad de cambiar el mensaje.

6.- PERSPECTIVAS

Los HEV al igual que la mayoría de los virus de ARN debido a la falta de actividad correctora de las polimerasas virales y las altas tasas de replicación viral, están presentes en paciente infectados como un enjambre de variantes genéticamente muy relacionados, denominadas cuasiespecies. Esta variabilidad intra-hospedera representa un sustrato para la presión selectiva ejercida por el sistema inmune del hospedero o por la exposición a un fármaco, lo que conduce a la continua evolución del virus.

El análisis de la cuasiespecie circulante permitirá un mejor entendimiento de la composición de los distintos genomas virales, variabilidad genética e historia evolutiva del virus. La interacción entre diferentes variantes dentro de la cuasiespecie podría estar asociada a facilitar la entrada y la reproducción de la población viral en nuevos tipos celulares como el SNC.

Es también importante mencionar que el estudio de las poblaciones de cuasiespecies que circulan en pacientes con distintas manifestaciones de enfermedad causadas por HEV-B, permitirán contribuir a una mejor comprensión de la relación entre la variabilidad genética de cuasiespecies y la enfermedad, comprender estos mecanismos es de fundamental importancia para el diseño de nuevas y efectivas estrategias antivirales contra estos agentes.

El análisis de las cuasiespecies circulantes en los LCR nos permitan contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Cuáles son las estirpes virales que están asociadas a las encefalitis?
2. ¿Qué grado de variabilidad genética tienen entre sí las estirpes que circulan en el SNC de nuestros pacientes?
3. ¿Existe una relación entre el grado de variabilidad genética de poblaciones de cuasiespecies de HEV-B que circulan en el paciente y una manifestación específica de la enfermedad?
4. ¿Existen estirpes de HEV-B recombinantes circulando actualmente en nuestros pacientes?
5. ¿Los eventos de recombinación han generado estirpes con una particular virulencia de la enfermedad?

7.- AGRADECIMIENTOS

A la ANII por la financiación que permitió la realización de esta Tesis.

A mis compañeros de ayer, con los que me inicié dentro del campo de la Biología que hicieron realidad su anhelo, y que me han permanentemente impulsado a que siguiera adelante, para que yo también pudiera concretar la meta que nos fijamos hace ya más de tres décadas, Juan, Toti, Gabriel, Melita, Richard, Estrellita, Gabriela, Graciela, Silvia, Lilian, Mariela y Oscar entre otros.

A mis compañeros de hoy Katia, Naty, Leandro, Carolina, Jorge, Elisa, Victoria y muchos otros que me transmitieron su fuerza joven y me dieron una transfusión de vida para transitar estos últimos pasos.

A mis compañeros de laboratorio Gonzalo, Alvaro, Matias, Victoria, Laura, Natalia y Lilia, por su apoyo y paciencia a lo largo de la pasantía, por lo que compartimos, por lo que aprendimos, por lo que vivimos juntos.

A Rodney que además de tutor fue un amigo.

A los miembros del tribunal que accedieron a revisarme este manuscrito Héctor Musto, Mabel Berois y Rúben Pérez.

A mi madre y hermana por darme siempre para adelante verdaderas artífices del volver a encarar el estudio, así como a mi mujer Carmen y mis hijos Fernando, Nicolás y Matias por el tiempo que les robe.

AA mis hermanos.

Y especialmente a Juan Cristina el compañero de las primeras épocas, el amigo con el que compartí momentos inolvidables a mediados de los 70, al docente y tutor de esta nueva etapa. Gracias por darme la oportunidad de poder culminar esta etapa a tu lado junto al maravilloso equipo que has sabido componer.

8.- BIBLIOGRAFÍA

- **Ahn I., Jeong B.J., Bae S.E., Jung J., Son H.S. (2006).** Genomic analysis of Influenza A viruses, including Avian Flu (H5N1) strains. *Eur J Epidemiol* **21**:511-519.
- **Alvarez-Valin F., Tort F., Bernardi G. (2000).** Nonrandom spatial distribution of synonymous substitutions in the GP63 gene from Leishmania. *Genetics* **155**: 1683-1692.
- **Arnold J.J., Vignuzzi M., Stone J.K., Andino R., Cameron C.E. (2005).** Remote site control of an active site fidelity checkpoint in a viral RNAdependent-RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **280**:25706–25716.
- **Boman J., Nilsson B., Juto P. (1992).** Serum IgA, IgG, and IgM responses to different enteroviruses as measured by a coxsackie B5-based indirect ELISA. *J. Med. Virol.*; **38**:32–35.
- **Bostina M., Levy H., Filman D.J., Hogle J.M. (2011).** Poliovirus RNA is released from the capsid near a twofold symmetry axis. *J Virol.* **85**(2):776-83.
- **Bubeck D., Filman D.J., Cheng N., Steven A.C., Hogle J.M., Belnap D.M. (2005).** The structure of the poliovirus 135S cell entry intermediate at 10-angstrom resolution reveals the location of an externalized polypeptide that binds to membranes. *J. Virol.* **79**:7745–7755.
- **Caro V., Guillot S., Delpeyroux F., Crainic R. (2001).** Molecular strategy for ‘serotyping’ of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.* **82**:79–91.
- **Chang L.Y., Huang L. M.; Gau S.F.; Wu Y.Y.; Hsia S.H.; Fan T.Y.; Lin K.L.; Huang Y.C.; Lu C.Y.; Lin. T.Y. (2007).** Neurodevelopment and cognition in children after enterovirus 71 infection. *N. Engl. J. Med.* **356**:1226–1234.
- **Choe, S.S., and Kirkegaard K. (2004).** Intracellular topology and epitope shielding of poliovirus 3A protein. *J. Virol.* **78**:5973–5982.
- **Chow M., Newman J.F., Filman D., et al. (1987).** Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* **327**:482-486.
- **Comeron J.M. (1995).** A method for estimating the number of synonymous and nonsynonymous substitutions per site. *J Mol Evol* **41**:1152-1159.
- **Comeron J.M., Aguade M. (1998).** An evaluation of measures of synonymous codon usage bias. *J. Mol. Evol.* **47**:268-274.

- **Costa-Mattioli M., Cristina J., Romero H., et al. (2002).** Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J. Virol.* **76**:9516-9525.
- **Danthi P., Tosteson M., Li Q.H, Chow M. (2003).** Genome delivery and ion channel properties are altered in VP4 mutants of poliovirus. *J. Virol.* **77**:5266–5274.
- **Delpont W., Poon A.F., Frost S.D., Kosakovsky S.L. (2010).** Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics* **26**:2455-2457.
- **Domingo E., Martin V, Perales C., Escarmis C. (2008).** Coxsackieviruses and quasispecies theory: evolution of enteroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **323**: 3-32.
- **Domingo, E., (2002).** Quasispecies theory in virology. *J Virol*, **76**(1): 463-465.
- **Dorsaf N., Lamjed B., Shabir O., Saoudin H., Bourlet T., Aouni M., Pozzetto B., Pillet S. (2007).** Typing of Human Enterovirus by Partial Sequencing of VP2. *J Clinic Microbio.*, **Aug. 2007**, 2370–2379.
- **Duret L (2002).** Evolution of synonymous codon usage in metazoans. *Curr Opin Genetics & Develop* **12**: 640-649.
- **Edgar R.C. (2004).** MUSCLE : multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, **32**: 1792-1797.
- **Felsenstein J. (1993).** Phylogeny interference package, version 3.5. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, U.S.A.
- **Filman D.J., Syed R., Chow M., et al. (1989).** Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J* **8**:1567-1579.
- **Flore O., Fricks C.E., Filman D.J., Hogle J.M. (1990).** Conformational changes in poliovirus assembly and cell entry. *Seminars in Virology* **Vol 1**: 429-438.
- **Freire M.C., Cisterna D.M., Rivero K., Palacios G.F., Casas I., Tenorio A., Gómez J.A. (2003).** Analysis of an outbreak of viral meningitis in the province of Tucuman, Argentina. *Rev, Panam, Salud Publica.* **13**(4):246-51.
- **Fricks C.E., Hogle J.M. (1990).** Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J. Virol.* **64**:1934-1945.

- **Gamarnik A.V., and Andino R. (2000).** Interactions of viral protein 3CD and poly(rC) binding protein with the 5' untranslated region of the poliovirus genome. *J. Virol.* **74**:2219–2226.
- **Gomes M. de L., Ferreira L.L., Gomes R.H., Lamarão L.M., da Silveira E., da Silva Rodrigues I., Ferreira da Silva C., Ribeiro de Almeida R. (2007).** RT-PCR for Confirmation of Echovirus 30 Isolated in Belém, Brazil. *BJID* **11**:403-406.
- **Greenacre M. (1984).** Theory and applications of correspondence analysis. Academic Press, London.
- **Grenón S.L., Robledo M.L., Von Specht M.H., Cisterna D.M., Lema C.L., Freire M.C. (2008).** Outbreak of viral meningitis caused by echovirus type 4 in Misiones province. *Rev. Argent. Microbiol.* **40**(1):41-6.
- **Hazel C.L., Bostina M., Filman D.J., Hogle J.M. (2010).** Catching a Virus in the Act of RNA Release: a Novel Poliovirus Uncoating Intermediate Characterized by Cryo-Electron Microscopy *J. of Virology* **84**: 4426–4441.
- **Hewat E.A., Neumann E., Blaas D. (2002).** The concerted conformational changes during human rhinovirus 2 uncoating. *Mol. Cell.* **10**:317–326.
- **Iturriza-Gomara M., Megson B., Gray J. (2006).** Molecular detection and characterization of human enteroviruses directly from clinical samples using RT-PCR and DNA sequencing. *J. Me.d Virol.* **78**:243–53.
- **Jenkins G.M., Holmes E.C. (2003).** The extent of codon usage bias in human RNA viruses and its evolutionary origin. *Virus Res* **92**: 1-7.
- **Jia R., Cheng A., Wang M., Xin H., Guo Y., Zhu D., Qi X., Zhao L., Ge H., Chen X. (2009).** Analysis of synonymous codon usage in the UL24 gene of duck enteritis virus. *Virus Genes* **38**:96-103.
- **Jukes T., Kantor, C. (1969).** Evolution of protein molecules. Academic Press, New York, N.Y.
- **Jurgens C.K., Barton D.J., Sharma N., et al. (2006).** 2Apro is a multifunctional protein that regulates the stability, translation and replication of poliovirus RNA. *Virology* **345**:346-357.
- **Keane T.M., Creevey C.J., Pentony M.M., Naughton T.J., McInerney J.O. (2006).** Assessment of methods of amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol. Biol.* **6**, 29.

- **Kosakovsky S.L., Posada D., Gravenor M.B., Woelk C.H., Frost S.D. (2006).** Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm. *Mol Biol Evol* **23**:1891-1901.
- **Kumar S., Tamura K., y Nei M. (2004).** MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics* **5**, 150-163.
- **Lindberg A.M., Andersson P., Savolainen C., Mulders M.N., Hovi T. (2003).** Evolution of the genome of Human enterovirus B: incongruence between phylogenies of the VP1 and 3CD regions indicates frequent recombination within the species. *J. of Gen. Virology* **84**: 1223–1235.
- **Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., Koroleva G.A., Hinkkanen A.E., Ilonen J. (2003).** Recombination in circulating enteroviruses. *J. Virol.* **77**:10423–10431.
- **Lukashev A.N., Lashkevich VA., Ivanova O.E., Koroleva G.A., Hinkkanen A.E., and Ilonen J. (2005).** Recombination in circulating Human enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions. *J. of Gen.Virology* **86**: 3281–3290.
- **Marcotte L.L., Wass A.B., Gohara D.W., Pathak H.B., Arnold J.J., Filman D.J., Cameron C.E., Hogle1 J.M. (2007).** Crystal Structure of Poliovirus 3CD Protein: Virally Encoded Protease and Precursor to the RNA-Dependent RNA Polymerase. *Journal of Virology* **Apr.:** 3583–3596.
- **Mateu M.G. (1995).** Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Research* **38**: 1-24
- **McWilliam Leitch E.C., Harvala H., Robertson I., Ubbilos I., Templeton K., Simmonds P (2009).** Direct identification of human enterovirus serotypes in cerebrospinal fluid by amplification and sequencing of the VP1 region. *J. Clin. Virol.* **44**, 119-124.
- **Melnick J.L., Rennick V., Hampil B., et al. (1973).** Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: Preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bull World Health Organ,* **48**:263–268.

- **Ministerio de Salud Pública (agosto 2010).** Protocolo de Vigilancia Epidemiológica de Meningitis/Encefalitis y Meningoencefalitis Virales. (www.msp.gub.uy/andocasociado.aspx?4499,19605).
- **Minor P.D., Ferguson M., Evans D.M., et al. (1986).** Antigenic structure of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3. *J. Gen. Virol.* **67**:1283-1291.
- **Mirand A., Henquell C., Archimbaud C., Chambon M., Charbonne F., Peigue-Lafeuille H., et al. (2008).** Prospective identification of enteroviruses involved in meningitis in 2006 through direct genotyping in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* **46**:87–96.
- **Mistchenko A.S., Viegas M., Latta M.P., et al. (2006).** Molecular and epidemiological analysis of enterovirus B neurological infection in Argentine children. *J. Clin. Virol.* **37**, 293-299.
- **Modlin J.F. (2000).** Coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses, p. 1904–1919. In G. L Mandell, J. E. Bennett, and E. Dolin (ed.), Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, 4th ed. Churchill Livingstone, New York, NY.
- **Mong-Cheng L., Yu-Jiun C., Chun-Jen C. (2008).** Epidemiology and diagnostic methodology for enterovirus infection, including cerebrospinal fluid analysis:a 5 years review. *J. Microbiol Immunol Infect.* **41**:450-455.
- **Muckelbauer J.K., Kremer M., Minor I., Tong L., Zlotnick A., Johnson J.E., Rossmann M. G. (1995).** Structure determination of coxsackievirus B3 to 3.5 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **51**:871–887.
- **Muir P., Kämmerer U., Korn K., Mulders M.N., Pöyry T., Weissbrich B., Kandolf R., Cleator G.M., van Loon A.M. for The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. (1998).** Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 202–227.
- **Oberste M.S., Maher K., Flemister M.R., Marchetti G., Kilpatrick D.R., Pallansch M.A. (2000).** Comparison of classic and molecular approaches for the identification of “untypable” enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1170–1174.
- **Oberste M.S., Maher K., Pallansch M.A. (2004a).** Evidence for Frequent Recombination within Species *Human Enterovirus B* Based on Complete Genomic Sequences of All Thirty-Seven Serotypes. *J. of Virology* **78**: 855–867.

- **Oberste M.S., Michele S.M., Maher K., Schnurr D., Cisterna D., Junttila N., Uddin M., Chomel J.J., Lau C.S., Ridha W., Al-Busaidy S., Norder H., Magnius L.O., Pallansch M.A. (2004b).** Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J. Gen. Virol.* **85**:3205–3212.
- **Oberste, M.S., Nix W.A., Maher K., Pallansch M.A. (2003).** Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J. Clin. Virol.* **26**:375–377.
- **Ohlmann T., Rau M., Morley S.J., et al. (1995).** Proteolytic cleavage of initiation factor eIF-4 gamma in the reticulocyte lysate inhibits translation of capped mRNAs but enhances that of uncapped mRNAs. *Nucleic. Acids. Res.* **23**:334-340.
- **Palacios G., Casas I., Tenorio A., Freire C. (2002).** Molecular identification of enterovirus by analyzing a partial VP1 genomic region with different methods. *J. Clin. Microbiol.* **40**:182–92.
- **Pallansch M.A., and Oberste M.S. (2003).** Molecular detection and characterization of human enteroviruses. P. 245–257. In A. Matsumori (ed.), *Cardiomyopathies and heart failure: biomolecular, infectious and immune mechanisms.* Kluwer Academic Publishers, Boston, Mass.
- **Racaniello V. (2007).** Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields in Virology.* Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 5th ed. vol 1, p. 796-831.
- **Rieder E., Paul A.V., Kim D.W., et al. (2000).** Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J. Virol.* **74**:10371-10380.
- **Rodriguez-Wells V., Plotch S.J., De Stefano J.J. (2001).** Primer-dependent synthesis by poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol). *Nucleic. Acids Res.* **29**:2715–2724.
- **Rossmann M.G., Arnold E., Erickson J.W., Frankenberger E.A., Griffith J.P., Hecht H.J., et al. (1985).** Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature* **317**:145–153.
- **Salamano R., Scavone C., Baz M., Rey A., González G., Perna A., Cardinal P., Lewin S., Arbiza J., Ruchanski D. (2009).** Meningitis y encefalitis víricas en Uruguay. Relevamiento mediante técnicas de reacción en cadena de polimerasa aplicadas al líquido cefalorraquídeo de los grupos herpes, enterovirus y arbovirus

- como principales agentes etiológicos. A propósito de 59 casos. *Rev Med Urug*; **25**: 212-218.
- **Shafren D.R., Dorahy D.J., Thorne R.F., Barry R.D. (2000).** Cytoplasmic interactions between decay-accelerating factor and intercellular adhesion molecule-1 are not required for coxsackievirus A21 cell infection. *J. Gen. Virol.* **81**:889–894.
 - **Simmonds P. (2006).** Recombination and selection in the evolution of picornaviruses and other mammalian positive-stranded RNA viruses. *J Virol* **80**: 11124-11140.
 - **Tao, P., Dai, L., Luo, M., Tang, F., Tien, P., Pan, Z. (2009).** Analysis of synonymous codon usage in classical swine fever virus. *Virus Genes* **38**:104-112.
 - **Thoelen I., Moës E., Lemey P., Mostmans S., Wollants E., Lindberg M., Vandamme A., Van Ranst M. (2004).** Analysis of the Serotype and Genotype Correlation of VP1 and the 5' Noncoding Region in an Epidemiological Survey of the Human Enterovirus B Species. *Journal of Clinical Microbiology*, **Mar**:963–971.
 - **Thompson A.A., and Peersen O.B. (2004).** Structural basis for proteolysis-dependent activation of the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *EMBO J.* **23**:3462–3471.
 - **Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* **22**: 4673-4680.
 - **Tosteson M.T., Wang H., Naumov A., Chow M. (2004).** Poliovirus binding to its receptor in lipid bilayers results in particle-specific, temperature-sensitive channels. *J. Gen. Virol.* **85**:1581–1589.
 - **Tuthill T.J., Bubeck D., Rowlands D.J., Hogle J.M. (2006).** Characterization of early steps in the poliovirus infection process: receptor-decorated liposomes induce conversion of the virus to membrane-anchored entryintermediate particles. *J. Virol.* **80**:172–180.
 - **Vetsigian K., Goldenfeld N. (2009).** Genome rhetoric and the emergence of compositional bias. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**:215-220.
 - **Wessa, P., (2010).** Free Statistics Software, Office for Research Development and Education, version 1.1.23-r5. URL: <http://www.wessa.net>.

- **Wildy P. (ed.). (1971).** Classification and nomenclature of viruses, **vol. 5.** S. Karger, Basel, Switzerland.
- **Wright F., (1990).** The “effective number of codons” used in a gene. *Gene* **87**:23-29.
- **Xiao C., Bator C.M., Bowman V.D., Rieder E., Wimmer E. et al. (2001).** Interaction of Coxsackievirus A21 with Its Cellular Receptor, ICAM-1. *J. of Virology*. **75**:2444/2451.
- **Xiao C., Bator-Kelly C.M., Rieder E., et al. (2005).** The crystal structure of coxsackievirus A21 and its interaction with ICAM-1. *Structure* **13**:1019-1033.
- **Yang D., Cheung P., Sun Y., Yuan J., Zhang H., Carthy C.M., et al. (2003).** A Shine-Dalgarno-like sequence mediates in vitro entry and subsequent scanning for translation initiation of coxsackievirus B3 RNA. *Virology* **305**:31–43.
- **Zhanga P., Muellerb S., Moraisa M.C., Batora C.M., Bowmana V.D., Hafensteina S., Wimmer E., Rossmanna M.G. (2008).** Crystal structure of CD155 and electron microscopic studies of its complexes with polioviruses. *PNAS*. **105**:18284-18289.
- **Zhong J., Li Y., Zhao S., Liu S., Zhang Z. (2007).** Mutation pressures shapes codon usage in the GC-Rich genome of foot-and-mouth disease virus. *Virus Genes* **35**:767-776.
- **Zhou J.H., Zhang J., Chen H.T., Ma L.N., Liu Y.S. (2010).** Analysis of synonymous codon usage in foot-and-mouth disease virus. *Vet Res Commun* **34**:393–404.
- **Zhou T., Gu W., Ma J., Sun X., Lu Z. (2005).** Analysis of synonymous codon usage in H5N1 virus and other Influenza A viruses. *Biosystems* **81**:77-86.