

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

ANÁLISIS DE LOS ASTROVIRUS OBTENIDOS
DE PASES CONSECUTIVOS SIN DILUIR
EN CÉLULAS Caco-2

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

MARÍA TERESA FERNÁNDEZ LUNA

LIBRO UN BIRDT ATZ
ADSTOLINIS AIND
DE LA BIBLIOTECA

DIRECTOR DE TESIS DR. ERNESTO MÉNDEZ SALINAS

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE DEL 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, en el laboratorio del Dr. Carlos Arias y la Dra. Susana López, del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la dirección del Dr. Ernesto Méndez Salinas.

Comité tutorial:

Dra. Rosa María Uribe Villegas

Dra. Ma. Lourdes Gutiérrez Xicotencatl

Tutor:

Dr. Ernesto Méndez Salinas

Comité revisor:

Dr. Fernando Esquivel Guadarrama

Dr. Ernesto Méndez Salinas

Dr. Ramón González García-Conde

Dra. Rosa María Uribe Villegas

Dr. Juan Miranda Ríos

Este trabajo se realizó con el apoyo de las siguientes instituciones:

Donativo MENSE31739. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Donativo IN200999 y IN227602. Dirección General de Asuntos de Personal Académico.

ÍNDICE

Resumen.....	1
I. Introducción	
1. Importancia médica.....	2
2. Partícula viral.....	3
3. Organización del Genoma.....	3
II. Antecedentes	
1. Fases del ciclo de replicación de los virus de RNA de polaridad positiva....	5
2. Partículas Defectuosas Interferentes.....	7
III. Justificación.....	9
IV. Objetivos.....	9
V. Métodos	
1. Virus y Células.....	10
2. Generación de partículas defectuosas interferentes (DIs).....	10
3. Rendimiento Viral.....	11
4. Purificación de Yuc8.....	11
5. Purificación de RNA a partir de lisado celular o de virus purificado	12
6. Electroforesis de RNA en gel de agarosa.....	12
7. Transferencia del RNA.....	12
8. Templado para sintetizar la sonda.....	13
9. Marcaje de la Sonda e Hibridación	
a) Marcaje con Digoxigenina.....	13
b) Marcaje con dUTP- ³² P.....	14
c) Marcaje con dCTP- ³² P.....	15
10. RT-PCR a partir de RNA de lisados a alta multiplicidad.....	15
11. RT-PCR a partir de RNA de virus purificado.....	15
VI. Resultados y Discusión.....	
1. Detección de las especies de RNA de polaridad positiva producidas durante una infección con astrovirus.....	16
2. Síntesis de RNA viral en presencia de Actinomicina D.....	16
3. Cinética de síntesis de las especies positivas del RNA viral.....	17
4. Detección de las especies de RNA de polaridad negativa producidas durante una infección con astrovirus.....	17

5. Rendimiento de partículas infecciosas en cada pase de infecciones consecutivas de astrovirus sin diluir.....	18
6. Nivel de expresión de proteínas estructurales de los diferentes pases del virus sin diluir.....	19
* Tabla 1. Condiciones de infección y rendimiento viral de cada pase realizado mediante infecciones consecutivas sin diluir de dos experimentos independientes.....	20
* Tabla 2. Condiciones de infecciones en presencia de diferentes cantidades de lisado celular proveniente de cultivos sin infectar y su rendimiento viral.....	21
* Tabla 3. Condiciones de PCR utilizadas para identificar posibles RNAs defectivos.....	21
7. Análisis de las especies de RNA de los distintos pases de infecciones consecutivas de Yuc8 sin diluir.....	22
8. Amplificación de las especies de RNA presentes en los diferentes pases del virus sin diluir.....	22
9. Análisis de las secuencias de los fragmentos obtenidos por RT-PCR a partir del RNA de los diferentes pases del virus sin diluir.....	23
VII. Conclusiones.....	26
VIII. Perspectivas.....	26
IX. Bibliografía.....	27

RESUMEN

Durante la replicación de los virus de RNA de polaridad positiva el genoma se utiliza como templado para la síntesis del RNA antigenómico, que es una cadena complementaria y de la misma longitud que el RNA genómico. La generación del antigenoma involucra el reconocimiento de elementos dentro del RNA genómico que reclutan y guían al complejo que forma la RdRp viral al sitio de inicio en su extremo 3'. Aunque en astrovirus no se conocen los elementos promotores para la síntesis del RNA viral, se han realizado análisis comparativos de secuencias de diferentes cepas de astrovirus para identificar posibles regiones comunes que pudieran ser importantes en estos procesos. Se ha encontrado que, a nivel de RNA, la NTR-3' y los últimos 19 nt del orf2 están muy conservados entre los ocho tipos de HAst-V descritos. Este hecho sugiere que el extremo 3' del orf2 está sujeto a una presión de selección a nivel de RNA.

En una segunda fase en el ciclo de replicación de los virus de RNA de polaridad positiva, se realiza la síntesis del RNA genómico y del/los RNAsg. De esta manera, el antigenoma es utilizado como templado para la generación del RNA genómico que se utilizará para ensamblarse en la progenie viral. De manera general, se han propuesto dos mecanismos básicos para la generación de los RNAsg en diferentes virus. El primero consiste en una iniciación interna, en el cual la replicasa inicia la transcripción del RNAsg a partir del RNA antigenómico utilizando un promotor interno. El segundo mecanismo consiste en una terminación prematura durante el proceso de síntesis del antigenoma, produciendo un RNA de la misma longitud pero de polaridad contraria al RNAsg, el cual se utiliza como templado para la síntesis del RNAsg. Se piensa que cualquiera de los dos mecanismos podría ser utilizado por astrovirus, ya que los experimentos realizados hasta la fecha no han discriminado la polaridad del RNAsg viral que se encuentra en células infectadas.

Los resultados que se muestran en el presente trabajo corroboran la generación de dos especies de RNA de polaridad positiva durante la infección de astrovirus, descritas previamente, sin embargo no discriminan el mecanismo de generación del RNAsg. Con el propósito de determinar regiones importantes en la replicación de astrovirus, se intentó generar partículas defectuosas mediante pases consecutivos del virus sin diluir. Lo que observamos fue que se generaron errores en la replicación del genoma viral, que no afectan la síntesis de proteína viral, aunque sí tienen efecto sobre el rendimiento de viral.

I. INTRODUCCIÓN

1. Importancia médica.-

Los astrovirus son patógenos importantes causantes de gastroenteritis no bacteriana en niños, durante sus primeros años de vida, así como en personas ancianas y pacientes inmunosuprimidos (9, 12, 29). Estos son virus no envueltos, es decir, que carecen de una membrana, que muestran tropismo hacia células del tracto intestinal en humanos, y a células de diferentes órganos en otras especies como pavos y pollos (16, 19, 22).

La infección por astrovirus humano (HAst-V) provoca una diarrea que dura hasta cuatro días, con vómito, fiebre, anorexia y dolor abdominal; la facilidad para detectar astrovirus se incrementa con la prolongación de la diarrea, debido a la gran cantidad de partículas excretadas (3, 12, 35). La infección por astrovirus se contrae durante la edad temprana, de manera que el 70% de los niños de edad escolar son seropositivos; aunque la infección también es frecuente en la vejez, lo cual sugiere que la inmunidad que se adquiere durante la infancia protege en la vida adulta, no así en la vejez (29).

Por otro lado, la mayoría de los casos de infecciones por astrovirus se detectan en los meses de invierno en regiones templadas, mientras que en los climas más tropicales se detectan en épocas de lluvias (12).

Después de los rotavirus, los astrovirus constituyen el virus más frecuentemente detectado entre los niños con diarrea que requieren atención médica (3, 12). La incidencia de hospitalización debida a gastroenteritis severa inducida por astrovirus en países desarrollados va del 2 al 3%. En contraste, en países en vías de desarrollo contribuye a la mortalidad observada en niños pequeños que viven en condiciones marginadas. Los astrovirus se han reportado como responsables de hasta el 20% de las hospitalizaciones debidas a gastroenteritis (12, 27, 41). En un estudio realizado en una comunidad Maya, la incidencia de astrovirus alcanzó hasta un 61% en la población infantil, y además se asoció con el 26% del total de casos de diarrea reportados para la población estudiada. Este es el registro de incidencia más alto de astrovirus reportado a nivel mundial (27).

La importancia de los astrovirus, como causantes de diarrea infantil ha cobrado relevancia a medida que se han desarrollado métodos de detección más sensibles. En los primeros estudios de epidemiología de los astrovirus, basados en microscopía electrónica, se reportó su presencia en menos del 3% de los casos de niños con diarrea (24, 39). Sin embargo, la generación de un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer un antígeno de grupo, es decir, que reconoce todos los serotipos de astrovirus humano conocidos a la fecha (10), permitió el desarrollo de ensayos inmunoenzimáticos (EIA) para su detección en muestras clínicas (11). Utilizando esta metodología se encontró que los astrovirus están asociados con el 8.6% de los casos

de niños con diarrea, confirmando su importancia médica (12). Más aún, la determinación de la secuencia nucleotídica del genoma de dos cepas de astrovirus humano (17, 48) condujo al desarrollo de ensayos todavía más sensibles para su detección, tal como la transcripción reversa acoplada con una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (20, 37).

A la fecha se han identificado ocho tipos de astrovirus humano basados en su reactividad con anticuerpos policlonales, mediante inmunomicroscopía electrónica, ensayos de inmunofluorescencia (IFA), neutralización, ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) y/o análisis de secuencia (10, 15, 23). El tipo 1 (HAst-V1) es el más frecuentemente encontrado (23, 41) mientras que los tipos 7 y 8 (HAst-V7 y HAst-V8), se consideran raros, ya que sólo se han aislado algunas cepas en el mundo (2, 41), sin embargo, el tipo 8 podría ser más común de lo que se considera actualmente y podría representar un tipo emergente (41).

2. Partícula viral.-

El primer estudio de astrovirus, por microscopía electrónica, reportó que las partículas de astrovirus muestran un tamaño estimado de 28nm de diámetro, y que poseen una estructura en forma de estrella en su superficie a lo que deben su nombre (29); sin embargo, en estudios más recientes se observó que sólo el 10% de los viriones obtenidos a partir de infecciones de células de riñón de mono LLCMK2 exhiben esta morfología y que la presencia de la estructura en forma de estrella podría corresponder a partículas virales inestables. Así, la mayoría de las partículas virales contienen una cápside icosaédrica de 41 nm de diámetro, con espículas en la superficie (42). Las espículas también han sido observadas mediante técnicas de criomicroscopía electrónica (30).

3. Organización del Genoma.-

Los astrovirus pertenecen a la familia *Astroviridae* (17, 25, 40). El virión está formado por una cápside proteica sin envoltura y por un genoma de RNA de aproximadamente 7 Kb, de cadena sencilla y polaridad positiva, es decir que el RNA viral puede funcionar como RNAm para iniciar una infección productiva (17, 40, 48). El genoma de astrovirus está formado por tres marcos abiertos de lectura, denominados orf1a, orf1b y orf2, dos regiones no traducidas (NTR) de aproximadamente 80 nucleótidos (nt) en cada uno de los extremos del genoma, y una secuencia poli (A) de aproximadamente 30 nt en el extremo 3' (fig. 1).

Mediante análisis de la secuencia del orf1a y 1b, se han predicho productos proteicos que poseen motivos indicativos de proteínas no estructurales. El producto predicho de la traducción del orf1a contiene un motivo de serín proteasa, una señal de localización nuclear (NLS) y 4 motivos característicos de hélices transmembranales, mientras que el producto de la traducción del orf1b incluye motivos característicos de

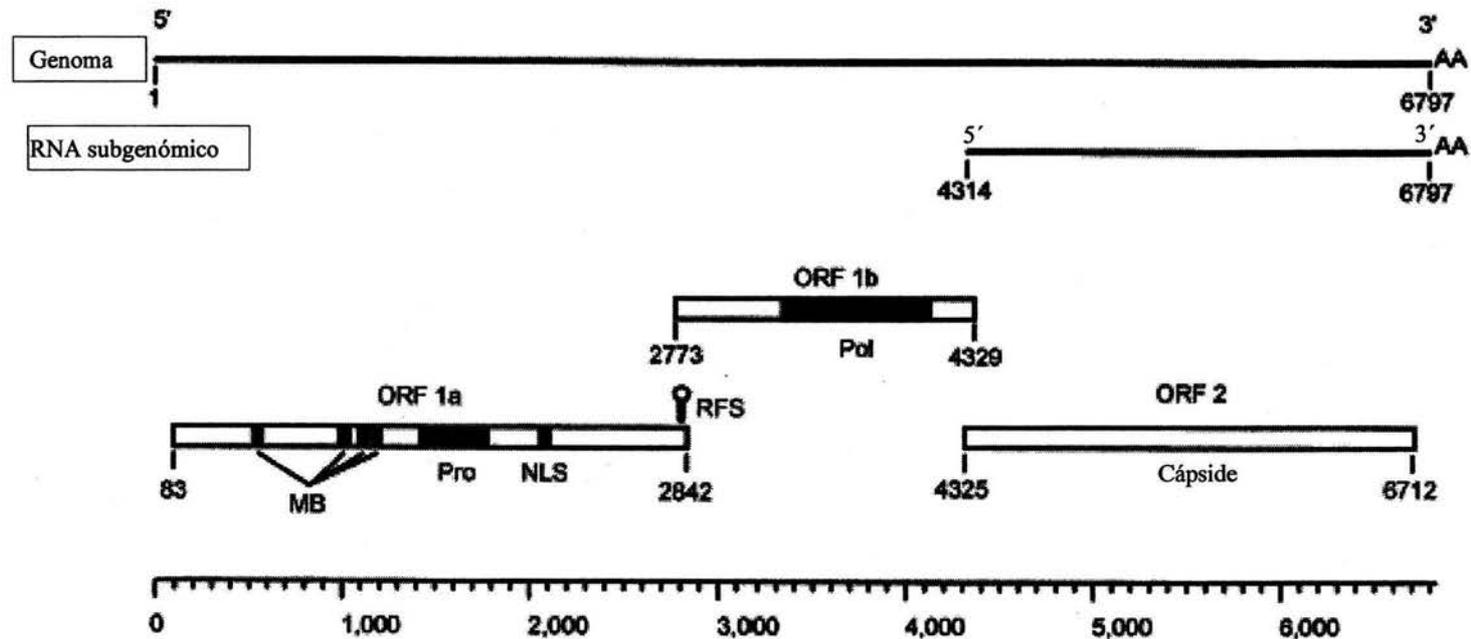


Figura 1. Organización del genoma de HAstV. Está señalada la localización relativa de los tres marcos abiertos de lectura (orf1a, orf1b y orf2), las hélices transmembranales (MB), la proteasa (Pro), la señal de localización nuclear (NLS), la estructura del cambio de lectura ribosomal (RFS), la polimerasa dependiente de RNA (Pol) y dos regiones no traducidas en los extremos del genoma (NTR). Los orfs 1a y 1b codifican para las poliproteínas precursoras de las proteínas no estructurales, mientras que el orf2 codifica para el precursor de la cápside. En la parte superior se muestra la longitud de los RNAs que sirven como RNAm (genómico y subgenómico) (16).

las RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRp) (17, 48). La traducción de los orfs 1a y 1b se lleva a cabo utilizando como templado al RNA genómico una vez que éste se ha liberado al citoplasma después de la infección. La traducción de estos dos orfs produce dos proteínas, una que es el producto de la traducción del orf1a (NSP1a), y la otra, que deriva de los dos, orf1a y orf1b (NSP1ab). El producto que deriva de los dos orfs (NSP1ab) se sintetiza mediante un mecanismo de cambio de fase, que se lleva a cabo gracias a una señal localizada al final del orf1a y que consiste de un heptanucleótido (A AAA AAC) seguido de una estructura de tallo-asa (17, 26, 28). Las proteínas NSP1a y NSP1ab se procesan proteolíticamente para producir las proteínas virales que se cree están implicadas en la replicación del genoma viral. La actividad de la serín proteasa viral y probablemente de alguna proteasa celular son importantes para este procesamiento (8, 21). No se sabe si el motivo de NLS es funcional durante la replicación viral, ya que no se han detectado proteínas virales no estructurales en el núcleo de la célula infectada, sin embargo por experimentos de expresión transitoria se sabe que al fusionarse este motivo con una proteína reportera (GFP), la dirige al núcleo (6). Respecto a las hélices transmembranales predichas, éstas se localizan río arriba de la proteasa y se cree que podrían estar involucradas en el anclaje del complejo de replicación del RNA viral a la membrana. La replicación del genoma viral asociado a membranas es una característica de todos los virus con genoma de RNA (+). Estudios con la cepa Yuc8 de HAst-V han revelado la presencia de algunos productos finales del procesamiento de las proteínas nsp1a y nsp1ab con tamaños de 57, 20, y 19 kDa, así como dos productos de alrededor de 27kDa (33). De estos polipéptidos, el de 57 kDa probablemente representa la RNA polimerasa viral, y los dos productos de 27 kDa podrían corresponder a la proteasa (33). Además de los mencionados, otros autores han reportado productos de 64, 38, 5.5 y 6.5 kDa como productos del procesamiento proteolítico de la proteína NSP1a (21, 47), sin embargo su posición no ha sido determinada.

El orf2, ubicado hacia el extremo 3' del genoma, codifica para la proteína precursora de la cápside del virus (17, 25, 39, 40, 48), la cual contiene aproximadamente 780 aminoácidos. La traducción de esta proteína se da a partir de un RNA subgenómico (RNAsg), que se produce durante la infección y que es colineal con el extremo 3' del RNA genómico (RNAg). En algunos estudios se ha encontrado que el RNAsg puede sintetizarse a niveles más altos que el RNAg (39, 40). El producto primario de la traducción del orf2 de la cepa Yuc8 de astrovirus humano, es una proteína de 90 kDa (VP90) que se ensambla dentro de las células para formar las partículas virales precursoras (4, 32). Posteriormente VP90 es procesada por caspasas (la infección con astrovirus induce apoptosis) en su extremo carboxilo para producir una proteína de 70 kDa (VP70). El procesamiento de VP90 a VP70 promueve la liberación de las partículas virales de la célula (32). La infectividad de los astrovirus depende del procesamiento proteolítico de la proteína de la cápside por tripsina a través de un mecanismo complejo generando intermediarios de 28 - 50 kDa, lo cual

resulta en la generación de las proteínas estructurales finales VP34, VP27 y VP25, y el incremento concomitante en la infectividad (31). El mecanismo por el que ocurre el aumento en la infectividad se desconoce.

II. ANTECEDENTES

1. Fases del ciclo de replicación de los virus de RNA de polaridad positiva.-

La primera fase en el ciclo de replicación de los virus de RNA de polaridad positiva, después de su entrada a la célula, es la traducción de su genoma para sintetizar las proteínas responsables de la replicación del mismo. El genoma se utiliza como templado para la síntesis del RNA antigenómico, que es una cadena complementaria y de la misma longitud que el RNA genómico (7). La generación del antigenoma involucra el reconocimiento de elementos dentro del RNA genómico que reclutan y guían al complejo que forma la RdRp viral al sitio de inicio en su extremo 3'. Por lo que secuencias y estructuras del RNA que actúan como promotores podrían estar localizados en el extremo 3' del genoma (7); aunque en algunos casos, elementos de RNA que contribuyen al reclutamiento de la RdRp se han localizado en regiones distales del extremo 3' (1).

Aunque en astrovirus no se conocen los elementos promotores para la síntesis del RNA viral (genómico o antigenómico), se han realizado análisis comparativos de secuencias de diferentes cepas de astrovirus para identificar posibles regiones comunes que pudieran ser importantes en estos procesos. Se ha encontrado que, a nivel de RNA, la NTR-3' y los últimos 19 nt del orf2 están muy conservados entre los ocho tipos de HAst-V descritos. En cambio, a nivel de proteína, la región que corresponde a la mitad carboxilo de la proteína precursora de la cápside codificada por el orf2 es altamente variable entre los diferentes virus, con identidades tan bajas como el 30%. Este hecho sugiere que el extremo 3' del orf2 está sujeto a una presión de selección a nivel de RNA, y no en la secuencia de aminoácidos (38). Al analizar la posible estructura secundaria del RNA en esta región del genoma, se ha encontrado que la secuencia de la mayoría de las cepas analizadas es capaz de formar ocho tallos-asa desde el nucleótido 6500 hasta el 6820 (fig. 2) (38). El primer tallo-asa que se forma a partir del extremo 3', tallo-asa I, presenta dos pares de nucleótidos no apareados en su base, y a pesar de que las secuencias de los diferentes tipos presentan variaciones nucleotídicas en estas posiciones, estas burbujas están conservadas (38, 40). Por otro lado, en el asa de esta estructura se localiza una secuencia octamérica que es complementaria a una secuencia en la NTR-5' (38). En el caso del tallo-asa II presenta variaciones en la secuencia nucleotídica en los diferentes serotipos de HAst-V, que corresponden a cambios compensatorios que mantienen el apareamiento de la estructura predicha (38, 40). El tallo-asa III, a pesar de presentar una secuencia nucleotídica diferente, mantiene una estructura secundaria similar predicha (40), sin

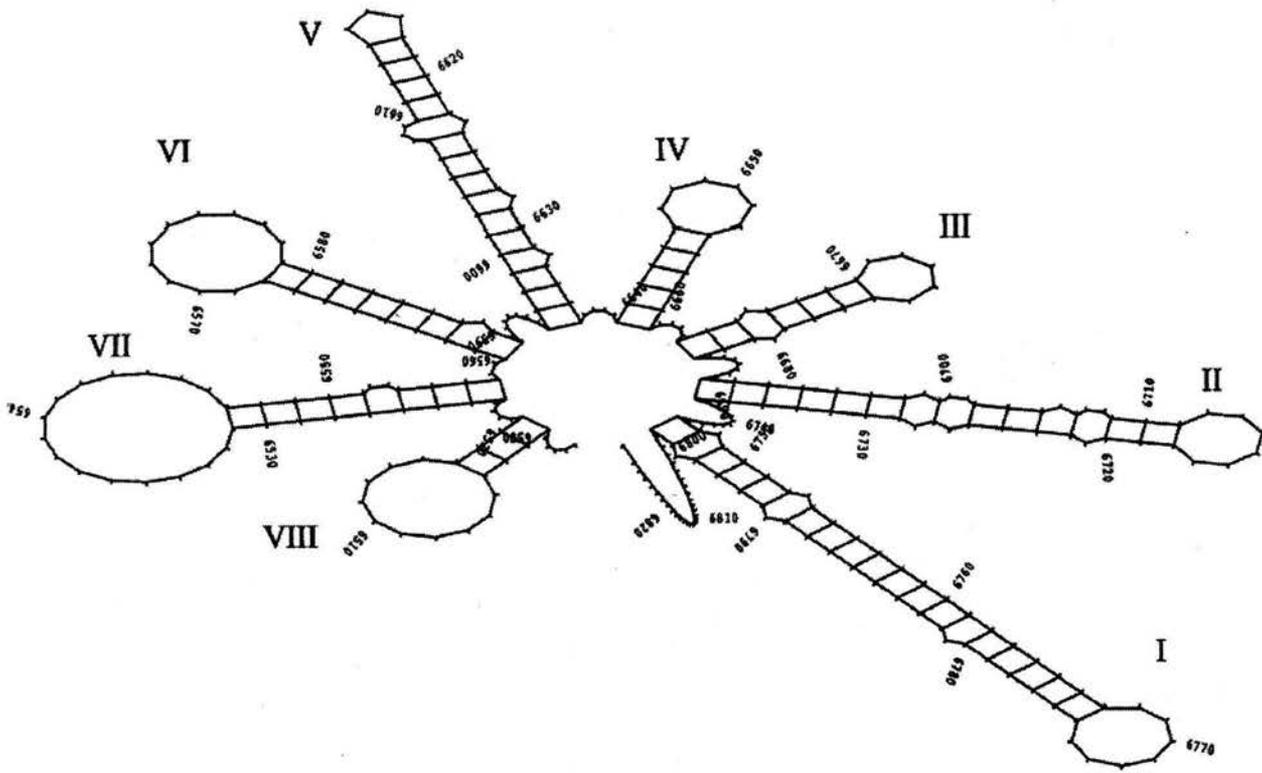


Figura 2. Estructura secundaria predicha del extremo 3' del RNA de HAst-V2. La estructura forma ocho tallos-asa, e incluye desde el nucleótido 6500 hasta el 6820, lo que corresponde a la región 3' no traducida y los últimos 19 nt del orf2 (36).

embargo tanto este tallo-asa como los tallos-asa IV al VIII varían en longitud entre los diferentes serotipos (38). Como antes se mencionó, la estructura secundaria conservada en el extremo 3' del genoma podría funcionar como sitio de reconocimiento durante la replicación del RNA viral (40). Se ha sugerido que el extremo 3' del RNA genómico viral podría tener varias funciones al interactuar con factores de la célula huésped, con proteínas virales, ó con otras regiones del RNA viral (18).

Además de los motivos conservados en la NTR-3', en la NTR- 5' del genoma sólo se ha encontrado un bajo grado de similitud en secuencia y por lo tanto no se ha podido predecir algún tipo de estructura secundaria conservada entre virus de diferente serotipo. Por otro lado, al comparar las NTR de los extremos 3' y 5' de astrovirus, se ha encontrado una secuencia de 8 nt complementaria entre estas dos regiones (nucleótidos 6766-6773 del extremo 3' y 13-20 del extremo 5'). Esto indicaría, que esta secuencia de 8 nt se encuentra tanto en el extremo 3' del RNA genómico como del RNA antigenómico. El hecho de que este octámero esté conservado entre los HAst-V que se han descrito (algunos contienen un cambio en una sola posición) (38), sugiere que esta secuencia podría ser importante en la replicación del genoma viral.

Durante la segunda fase en el ciclo de replicación de los virus de RNA de polaridad positiva, se realiza la síntesis del RNA genómico y del/los RNAsg (según corresponda). De esta manera, el antigenoma es utilizado como templado para la generación del RNA genómico que se utilizará para ensamblarse en la progenie viral y, en algunos casos, para la síntesis de uno o varios RNAsg. En el caso de astrovirus, se piensa que la replicación de su genoma y la producción del RNAsg utilizado como templado para la síntesis de las proteínas estructurales, sigue los pasos descritos previamente, ya que se han detectado dos especies de RNA de polaridad positiva, correspondientes al RNA genómico y al RNAsg. De manera general, se han propuesto dos mecanismos básicos para la generación de los RNAsg en diferentes virus. El primero consiste en una iniciación interna, en el cual la replicasa inicia la transcripción del RNAsg a partir del RNA antigenómico utilizando un promotor interno (fig. 3.A). El segundo mecanismo consiste en una terminación prematura durante el proceso de síntesis del antigenoma, produciendo un RNA de la misma longitud pero de polaridad contraria al RNAsg, el cual se utiliza como templado para la síntesis del RNAsg (fig. 3.B) (36, 46). Se piensa que cualquiera de los dos mecanismos podría ser utilizado por astrovirus, ya que los experimentos realizados hasta la fecha (40) no han discriminado la polaridad del RNAsg viral que se encuentra en células infectadas.

Considerando que la transcripción del RNAsg de astrovirus pudiera realizarse mediante un promotor interno, se esperaría que éste estuviera localizado en la región de transición entre el orf1b y el orf2. El análisis de una secuencia de 120 nt localizada en la región de transición entre el orf1b y el orf2, reveló un alto grado de identidad

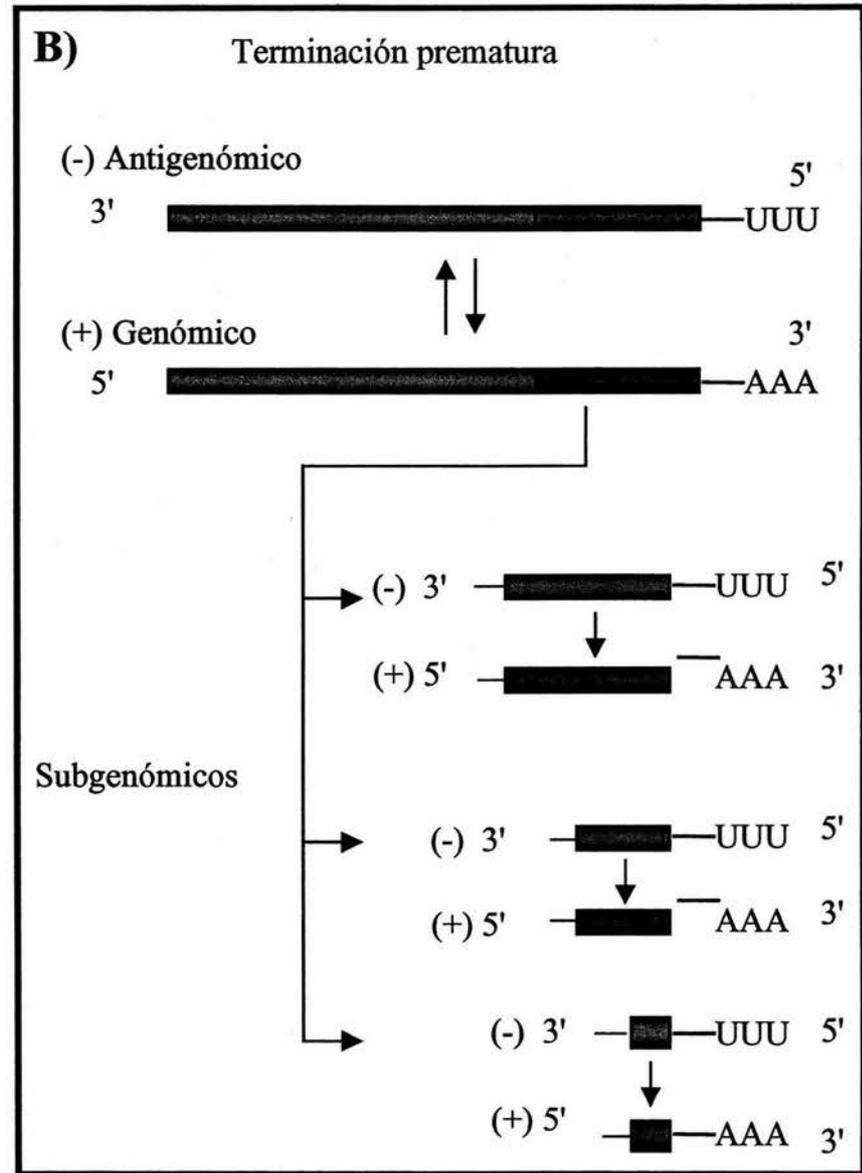
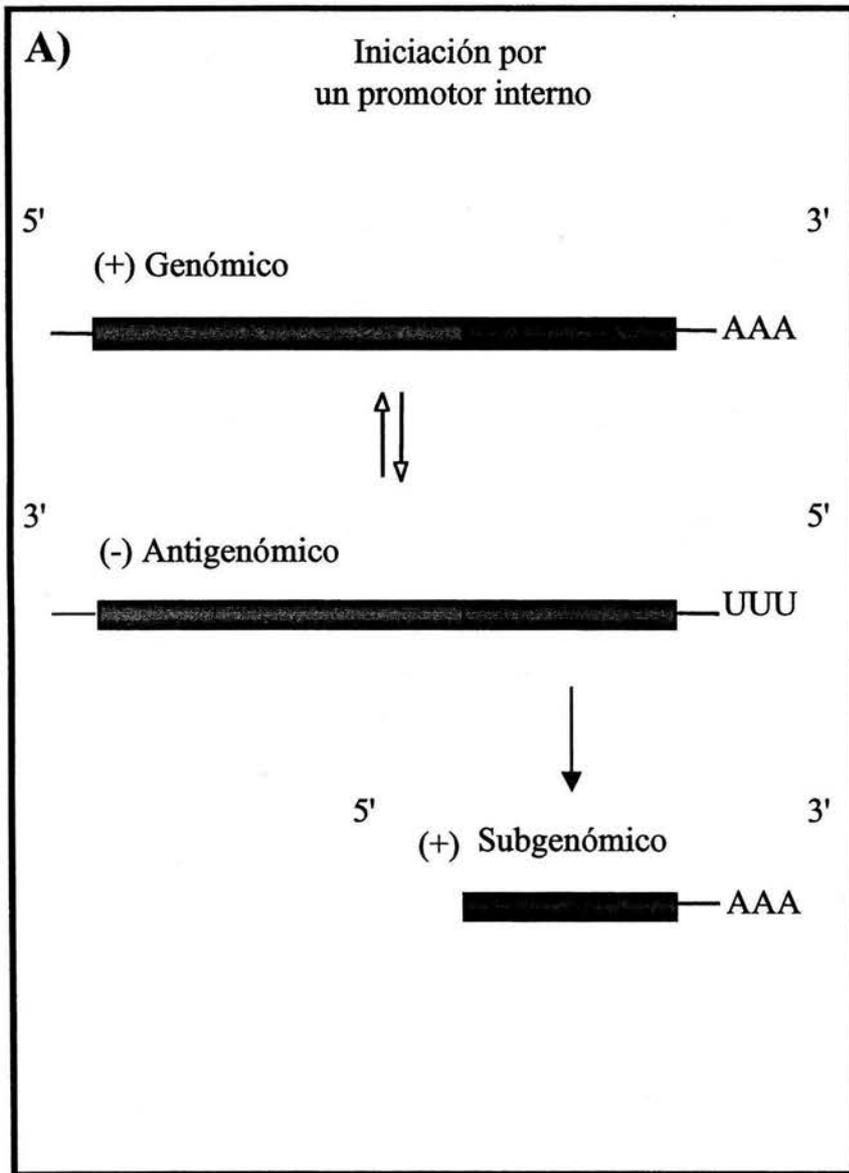


Figura 3. Mecanismos de síntesis de RNA sg. A) Iniciación interna, en *Alfavirus*; B) Terminación prematura, en *Coronavirus*.

(93-98%) entre todas las cepas humanas; limitando el análisis a solo 52 nt en esa región, el grado de identidad se incrementó a 99-100% (45). Al analizar la formación de posibles estructuras secundarias del RNA en esta región se predijo una conformación muy estable con tres tallo-asa (fig. 4). Como se esperaba, debido a la alta identidad en secuencia, todas las cepas humanas son potencialmente capaces de formar esta estructura en el RNA. La estructura predicha incluye el codón de inicio para la proteína de la cápside, así como el codón de término para la RNA-polimerasa (45). Considerando que el inicio del RNAsg ha sido mapeado once nucleótidos antes del codón de inicio de la proteína de la cápside (40), el sitio de inicio de la transcripción del RNAsg estaría incluido en esta estructura (45).

2. Partículas Defectuosas Interferentes.-

Durante la infección de una célula con cualquier tipo de virus, independientemente de la clase de genoma que contenga, se generan defectos a distintos niveles del ciclo replicativo que resultan en partículas virales incapaces de replicarse por sí mismas. Entre éstas, las partículas virales defectuosas interferentes, comúnmente nombradas DIs, son mutantes con genomas incompletos, que se enriquecen en los lisados de manera cíclica, de acuerdo a los niveles de replicación del virus silvestre (fig. 5). El ensamblaje de las partículas DIs y la replicación del genoma deletado que contienen éstas, requiere de que partículas parentales, denominadas “ayudadoras”, infecten simultáneamente a la célula huésped, ya que éstas deben proporcionar las funciones de las que carecen las DIs para lograr su replicación y ensamblarse. Las DIs, a su vez, interfieren con la replicación del virus infeccioso parental al secuestrar su maquinaria de replicación y encapsidación. De manera que la acumulación de errores durante la replicación resultan en partículas virales incapaces de replicarse por sí mismas; y cuando la maquinaria de replicación del genoma silvestre no es suficiente para replicar ambos tipos de genomas, la población del genoma silvestre comienza a disminuir. Una reducción en la disponibilidad de la maquinaria de replicación del genoma silvestre, provoca una disminución en las DIs. Cuando la concentración de DIs alcanza niveles muy bajos, de manera que su efecto de interferencia en la replicación del genoma silvestre no es significativo, la población silvestre empieza de nuevo a recuperarse a sus niveles normales. El incremento de genomas silvestres resulta en la disponibilidad de maquinaria de replicación, lo que permite una nueva acumulación de DIs. Este efecto de interferencia y la facilidad con la que se generan estos RNAs defectuosos puede depender del tipo celular en el que se propagan los virus (13, 14, 44). La mayoría de las partículas DIs interfieren marcadamente con la replicación del virus ayudador, sin embargo, existen DIs que provocan muy poca interferencia. Las deleciones en el genoma de las DIs implican la pérdida de diferentes regiones del genoma del virus parental que las generó (fig. 6). El porcentaje del genoma viral perdido durante las deleciones puede variar desde uno muy bajo hasta más del 90%; sin embargo el hecho

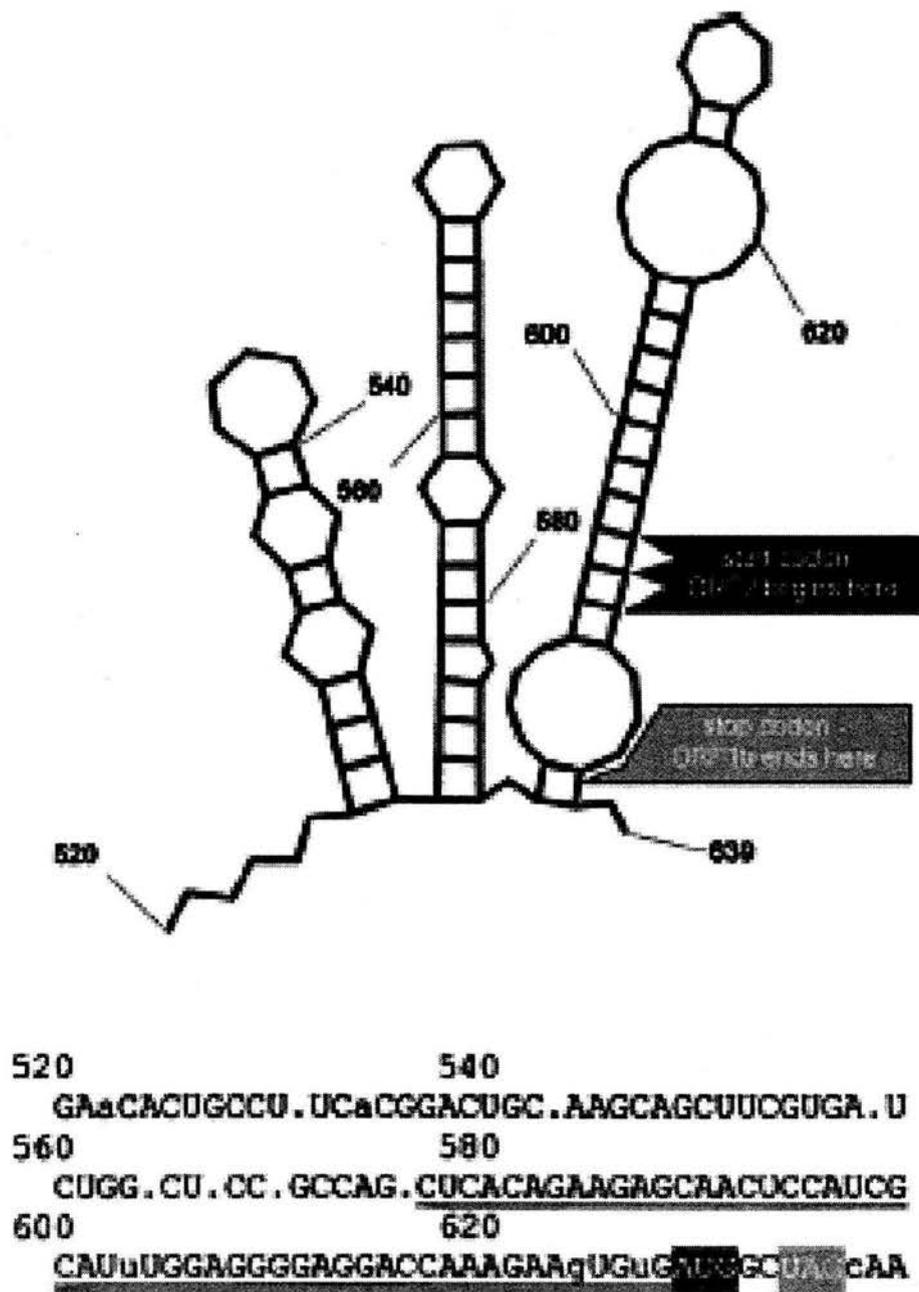


Figura 4. Estructura secundaria predicha del RNA que corresponde a la región de transición entre el orf1b y el orf2. En la estructura de tallo-asa están señaladas las posiciones del codón de inicio del orf2 y del codón de paro del orf1b. En la base de la figura se señala la secuencia consenso de la región de transición de los 8 serotipos humanos. Los nucleótidos marcados en minúscula indican 89% de identidad y los marcados en mayúsculas indican 100% de identidad entre los 8 serotipos humanos. Los puntos representan las posiciones divergentes de la secuencia, y la secuencia subrayada señala los 52nt que forman la región que presenta 99-100% de identidad entre los 8 serotipos humanos. En la secuencia consenso están señalados, en recuadros, el codón de inicio del orf2 y el codón de paro del orf1b (43).

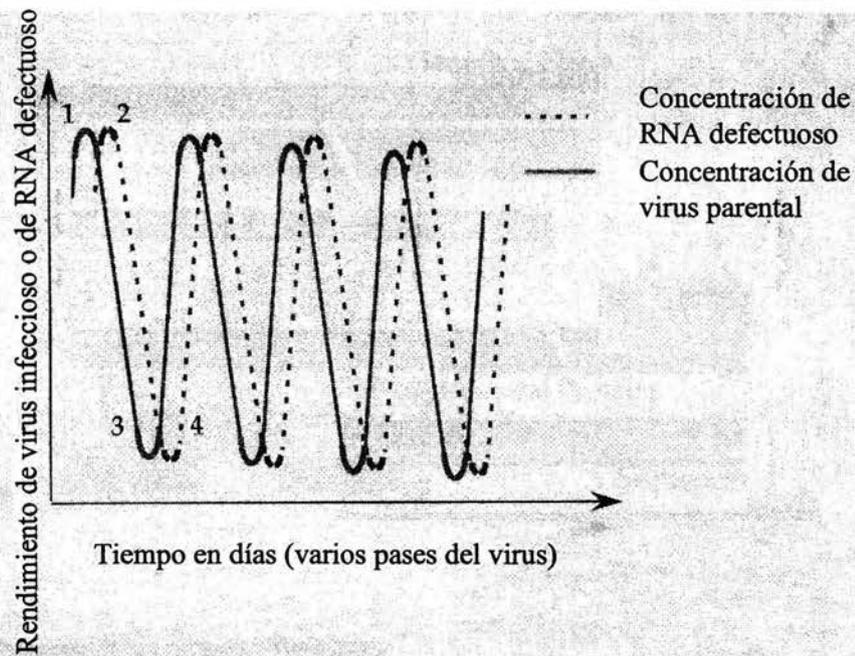


Figura 5. En los primeros pases sin diluir el virus parental se replica normalmente, mientras se inicia la acumulación de DIs (1). Cuando la replicación de las DIs alcanza los niveles de replicación del virus parental (2), y la maquinaria de replicación sintetizada por el virus parental ya no es suficiente para replicar ambos tipos de genomas, provocando una disminución de la población del virus parental (3). De esta manera, la función "ayudadora" del virus parental se ve disminuida, por lo que la replicación de las DIs también decrece (4). Con la baja replicación de las DIs, se disminuye su efecto de interferencia, lo que permite que la población del virus parental aumente iniciando un nuevo ciclo. La línea punteada representa la concentración de partículas defectivas en un lisado viral. La línea continua representa la concentración de partículas parentales, modificado de (42).

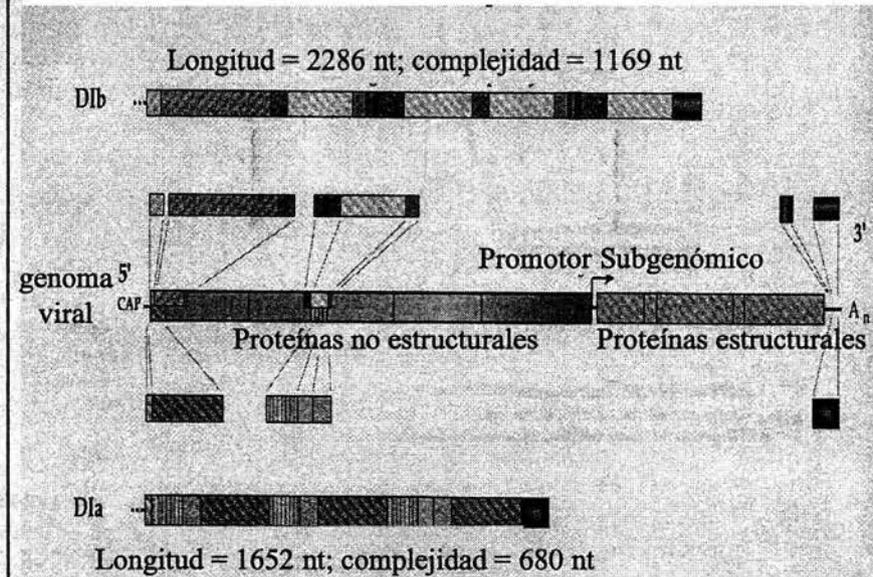


Figura 6. Representación esquemática del RNA de DIs del virus Semliki Forest. El bloque central representa el genoma del virus silvestre, con líneas verticales que demarcan los cuatro polipéptidos no estructurales y los cinco estructurales. En la parte superior e inferior, se muestran ampliados los bloques de secuencias que componen dos DIs diferentes. La correspondencia entre las secuencias que componen a las DIs y las del genoma no defectuoso se ilustra con bloques igualmente sombreados (42).

de que este genoma sea replicado y ensamblado implica que debe contener las señales importantes en estos eventos de la replicación (44).

A pesar de la variabilidad en la estructura del genoma y en la estrategia de replicación de los virus con genoma de RNA en los que se han estudiado las DIs, se ha observado que en la generación de estos genomas deletados parecen existir factores comunes. La estructura secundaria que forma el RNA viral en ciertas regiones parece contribuir a la generación de deleciones o recombinaciones, a través de un mecanismo de selección de copiado ("copy-choice") (13) en el que la replicasa se libera de su templado y se lleva consigo la cadena naciente para terminar la síntesis y continuar la elongación de la cadena naciente de RNA en un nuevo templado, o en un nuevo sitio sobre el templado original. Cabe mencionar que en el caso de astrovirus, el análisis de una cepa aislada de humanos ha revelado que la región que representa el posible promotor para el RNAsg y que podría formar estructuras secundarias estables, se ha descrito como un posible sitio de recombinación (45).

Es importante enfatizar que pueden generarse muchos tipos diferentes de deleciones durante la replicación de un virus, sin embargo, pueden no detectarse porque carezcan de ventajas para generar una población más grande que la silvestre. Para ser viable, incrementar su población y provocar una disminución del genoma silvestre, el RNA de las partículas DIs debe contar con secuencias eficientes para el inicio de su replicación en el extremo 3' tanto de la cadena positiva como de la negativa y con las regiones necesarias para ser encapsidado (13, 14).

III. JUSTIFICACIÓN

Son pocos los estudios que se han realizado para conocer el mecanismo de replicación del genoma de astrovirus y de los determinantes presentes en el RNA viral que están involucrados en la replicación. Por similitud de la organización genómica de astrovirus con respecto al genoma de virus pertenecientes a la familia *Alphaviridae*, se piensa que existen algunos elementos en común, que se podrían extrapolar. Sin embargo, existen muchas diferencias que hacen pensar que el mecanismo de replicación podría ser diferente. Un ejemplo de esto es el hecho de que astrovirus no codifica para proteínas con motivos de RNA helicasa y guanilil-transferasa. De esta manera, no se sabe con precisión si el genoma viral posee "cap" en su extremo 5', cómo ocurre la síntesis del RNAsg, cuáles son las regiones del RNA viral que podrían actuar como promotores durante la replicación y transcripción del genoma, etc.

Con el presente trabajo se inició la caracterización de las especies de RNA viral presentes durante la infección, así como las regiones importantes para su replicación mediante análisis de partículas defectuosas, con el propósito de acercarnos al mecanismo de síntesis del RNAsg en astrovirus.

IV. OBJETIVOS

- a) Identificar las diferentes especies de RNA de origen viral producidas durante una infección con la cepa Yuc8 de astrovirus.
- b) Analizar la posible generación de partículas defectuosas.

V. MÉTODOS

1. Virus y Células.-

Se utilizó una línea celular derivada de un Adenocarcinoma de colon humano (Caco-2). Las células se cultivaron en monocapa bajo una atmósfera de 15% de CO² a 37°C con Advanced D-MEM (GIBCO) suplementado con glutamina (2mM), 1000 unidades/ml de penicilina, 10µg/ml de estreptomycin, y 2% de suero fetal bovino. Se utilizó la cepa de astrovirus denominada Yuc8, previamente caracterizada y adaptada a crecer en células Caco-2 (34) Para la propagación del virus Yuc8, las células se lavaron dos veces con Medio Mínimo Esencial, MEM (SIGMA), suplementado de igual manera que el D-MEM, pero sin suero fetal bovino; se inocularon con Yuc8 que había sido tratado previamente con 200µg/ml de tripsina durante 1 hora a 37°C. El inoculo viral se diluyó con MEM hasta una concentración de 20 µg/ml de tripsina previo a la adsorción del virus a las células. Las células se incubaron a 37°C 1 hora para permitir la adsorción del virus a las células. Finalmente, se añadió suficiente MEM sin suero para que la concentración de tripsina se mantuviera a 3.3µg/ml. Las células así infectadas se incubaron a 37°C y el virus se cosechó a las 24 horas post-infección.

2. Generación de partículas defectuosas interferentes (DIs).-

Como se ha descrito previamente (13, 14, 44), la generación de partículas DI se facilita al realizar pases consecutivos de un virus sin diluir. Para ello se iniciaron los pases con un lisado de título viral de 3.1×10^7 de pase 23, y 8.4×10^7 de pase 25. La infección se realizó sobre tubos de 5 cm² de células Caco-2 como se describió previamente, pero con algunas modificaciones: El inoculo con el que se realizaron las infecciones se trató con un inhibidor de tripsina (Sigma) a 400µg/ml después del paso de activación de la infectividad y antes de la inoculación, para evitar que la monocapa celular se desprendiera antes de cosechar el RNA total. Posterior a la adsorción del virus, se añadieron 2 ml de MEM sin suero y se incubó 4 horas a 37°C para permitir la adsorción y penetración del mayor número de partículas infecciosas, después de lo cual el inoculo se removió, las células se lavaron dos veces y se añadió MEM. Se incubó a 37 °C para que la infección prosiguiera. Debido a que a tiempos tardíos de la infección se acumula el RNA, se realizaron infecciones paralelas para hacer cosechas a las 12 y a las 24 horas post-infección, para ello las células infectadas se incubaron a 37 °C y a las 12 horas post-infección se cosecharon con trizol para el análisis de RNA por Northern Blot y por RT-PCR, y a las 24 horas post-infección se congelaron para la obtención de lisado enriquecido en DIs. El lisado de cada uno de los pases de las DIs se utilizó para realizar el siguiente pase consecutivo sin diluir y para un ensayo de

rendimiento viral.

3. Rendimiento Viral.-

Con la finalidad de determinar el nivel de infectividad de los lisados enriquecidos en partículas defectuosas, se realizaron ensayos de titulación por inmunocitoquímica como se describe a continuación: Se sembraron células Caco-2 en cajas de 96 pozos y se infectaron como se describió antes, realizando varias diluciones de cada uno de los diferentes lisados. Después de incubar a 37 °C por 16 a 18 horas, las células se fijaron con acetona (80%) durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente la monocapa de células se lavó dos veces con PBS (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.115% Na₂HPO₄, 0.024% KH₂PO₄; pH 7.4). Como anticuerpo primario se utilizó un suero dirigido contra la partícula viral purificada, (Anti-Yuc) y para la detección se usó proteína A-peroxidasa; la incubación de cada reactivo fue de dos horas a 37°C. Las células se lavaron dos veces con PBS, después de cada incubación, posteriormente se añadió el sustrato de la peroxidasa, carbazol (1.5ml Carbazol-4mg/ml en Dimetilformamida-, 4ml de Buffer de Acetatos y 10 µl de H₂O₂), para la detección de las células infectadas. Finalmente la infectividad de cada uno de los lisados se determinó mediante cuantificación de las células infectadas, y se reportó como partículas infecciosas por mililitro.

4. Purificación de Yuc8.-

El lisado total de células Caco-2 infectadas con Yuc8 proveniente de 1,120 cm² de células se congeló y descongeló 3 veces y se centrifugó a 125,892g durante 4 horas (rotor Beckman SW28). Durante la purificación, todos los pasos se realizaron a 4°C. El "pellet" se resuspendió en 5 ml de buffer TNE (50mM Tris pH 7.4, 0.1M NaCl, 10mM EDTA), y se agregaron 2 vol de Genetrón (trichlorotrifluorometano; Cydsa11/Quimiobásicos) para realizar una extracción; el sobrenadante se colectó después de una centrifugación a 4,020g durante 30 minutos (rotor Brinkmann 16F6-38). Este sobrenadante se centrifugó a 240,000g durante 2 horas (rotor Beckman SW.50.1) para obtener el virus en una pastilla, la cual se resuspendió en 500µl de buffer TNE y luego se colocó en una solución de Cloruro de Cesio con una densidad inicial de 1.36 gr/cm³ en TNE. El virus se separó de acuerdo a su densidad después de centrifugar de 16 a 20 horas a 210,000g (rotor Beckman SW.50.1), y se observó como una banda opalescente la cual se colectó por punción. Para eliminar el CsCl, la muestra extraída del gradiente se aforó a 5 ml en buffer TNE y se centrifugó a 240,000g por 2.5 horas (rotor Beckman SW.50.1). El pellet se resuspendió en 200µl de TNE, y se almacenó a 4°C hasta su uso.

5. Purificación de RNA a partir de lisado celular o de virus purificado.-

Para el análisis del RNA, éste se purificó a partir de un lisado de células infectadas o de virus purificado por gradiente de Cloruro de Cesio. En el primer caso, monocapas de células infectadas con Yuc8, a las 4, 6, 8, 10 y 12 horas post-infección se lavaron una vez con PBS libre de RNAsas y se homogeneizaron con trizol (1 ml por cada 10 cm² de células). Después se agregó 1/10 del volumen de cloroformo, y se agitó vigorosamente; las muestras se centrifugaron a 25,000g durante 5 minutos, para separar la fase acuosa donde se queda el RNA. Para precipitar el RNA se agregó 1 volumen de isopropanol, se incubó 10 minutos a -20°C y se centrifugó a 25,000g por 25 minutos. Posteriormente se lavó el pellet de RNA con etanol absoluto frío para después disolverlo en agua libre de RNAsas. Para la extracción de RNA a partir de virus purificado por gradiente de Cloruro de Cesio, una muestra de éste se mezcló en una proporción 1/1vol con fenol. Después se agregó 1/2 del volumen de cloroformo, y se agitó vigorosamente; las muestras se centrifugaron a 25,000g durante 5 minutos, para separar la fase acuosa donde se queda el RNA. Para precipitar el RNA se agregó 1/10 volumen de acetato de sodio, 2.5vol de etanol absoluto, se incubó 30 minutos a -20°C y se centrifugó a 25,000g por 25 minutos a 4°C. Posteriormente se lavó el pellet de RNA con etanol absoluto frío para después disolverlo en agua libre de RNAsas.

6. Electroforesis de RNA en gel de agarosa.-

El RNA se separó por electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa, como se describe a continuación. Para desnaturalizar el RNA, éste se mezcla en una proporción 1:5 volúmenes con el buffer para la reacción de glioxal (Dimetil Sulfoxide -DMSO- 60%, Glioxal desionizado 1.2 M, glicerol 4.8%, EtdBr 0.2mg/ml, en buffer BTPE). La muestra se dejó incubar a 55°C durante 1 hora y se cargó en un gel de agarosa (Sigma) al 1%, con buffer BTPE (Bis-Tris 30 mM y PIPES 10mM, pH 6.5) manteniendo la corrida durante 3 horas a 5 volts/cm. La migración del RNA se monitoreó con una lámpara de luz UV, ya que el RNA se tiñe por el EtBr contenido en el buffer de muestra. El marcador para RNA que se utilizó fue el RNA Ladder 0.24 - 9.5 Kb (Invitrogen). Al finalizar la corrida se capturó la imagen del gel, bajo iluminación con luz UV.

7. Transferencia del RNA.-

El RNA contenido en los geles se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon (NEN, o Hybond-N de Amersham). La transferencia se realizó con buffer alcalino (NaOH 7.5mM, NaCl 3M) y con 30 capas de papel Whatman de 3MM durante 6 horas a temperatura ambiente. Con la finalidad de verificar que la cantidad de RNA cargada en cada carril fuera homogénea, se verificó el contenido de RNA ribosomal. Después de la transferencia las membranas se enjuagaron con 2xSSC/0.1%

SDS para eliminar cualquier resto de agarosa que se hubiera quedado adherido a éstas, y finalmente el RNA se fijó con luz UV (Biotechniques).

8. Templado para sintetizar la sonda.-

Uno de los plásmidos utilizados fue el pGEM3Zf(+) que contiene dos promotores que son reconocidos por la RNA polimerasa de los fagos T7 y SP6, lo cual permite sintetizar sondas específicas complementarias al RNA a ser detectado. Este plásmido fue utilizado para dos construcciones, una que contiene un fragmento de 337nt del orf 1a, pGEM3Zf-orf1a (esquema 1.A) y una segunda de 573 nt que contiene un fragmento del orf2, pGEM3Zf-orf2 (esquema 1.B).

Un tercer plásmido utilizado para generar sondas de astrovirus fue el polyEMC, el cual contiene insertado un fragmento de 2.9 Kb, que corresponde al orf 2 completo del genoma de Yuc8, polyEMC-orf2L (esquema 1.C).

Para obtener una cantidad suficiente de templado, se crecieron bacterias transformadas con cada una de las construcciones mencionadas previamente, utilizando medio Luria con Carbenicilina, a 37°C, toda la noche. Los plásmidos se purificaron utilizando columnas Wizard (Promega) para minipreps, o por el sistema de purificación QiaFilter Midikit (Qiagen).

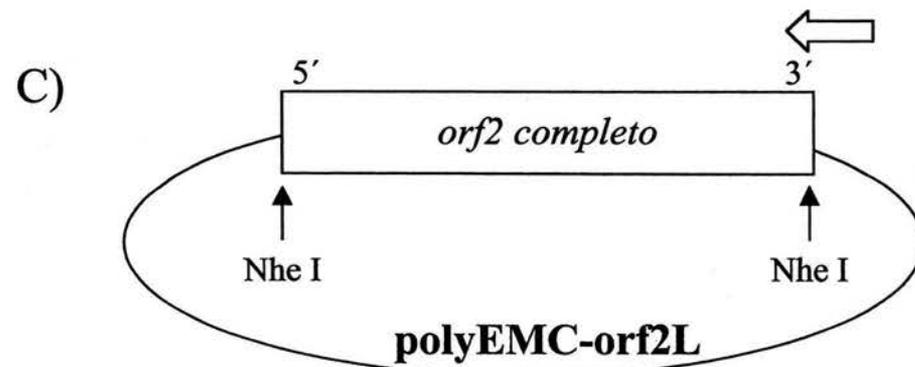
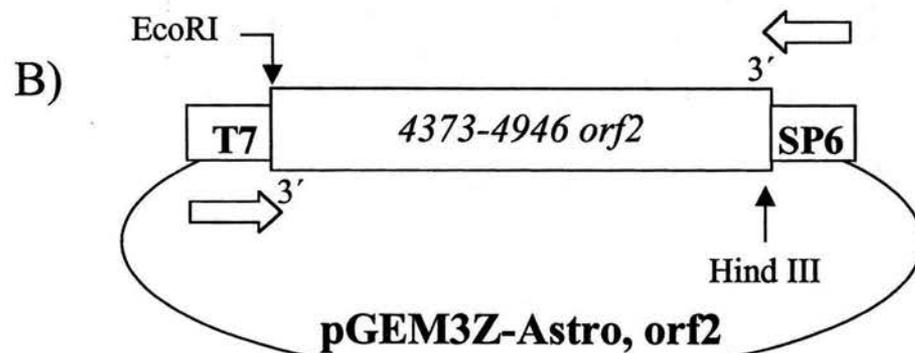
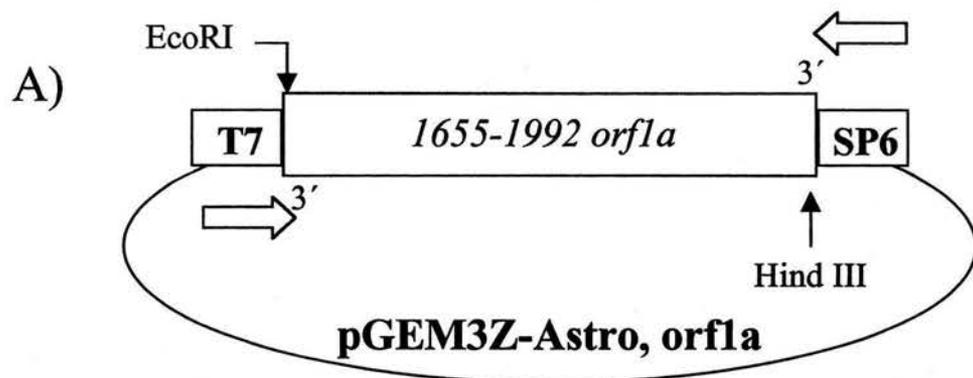
En el caso de las construcciones pGEM3Zf-orf1a y pGEM3Zf-orf2, se linearizaron utilizando un sitio de restricción distal al promotor a ser utilizado durante la transcripción. Para eliminar las enzimas de restricción, se extrajo el DNA con fenol-cloroformo, y se precipitó con acetato de sodio. Este DNA se utilizó como templado para sintetizar ribo-sondas por transcripción *in vitro* utilizando la RNA polimerasa correspondiente (esquema 2).

El inserto de la construcción polyEMC-orf2L, se utilizó como fuente del templado para sintetizar una sonda de DNA mediante Random Primer (esquema 2). Para obtener el templado, el plásmido se trató con NheI que genera un fragmento de 2.9kb. El fragmento se purificó por separación en un gel de agarosa al 1.5% utilizando Resina y columnas Wizard. El DNA contenido en la columna se lavó con isopropanol y se eluyó con agua.

9. Marcaje de la Sonda e Hibridación

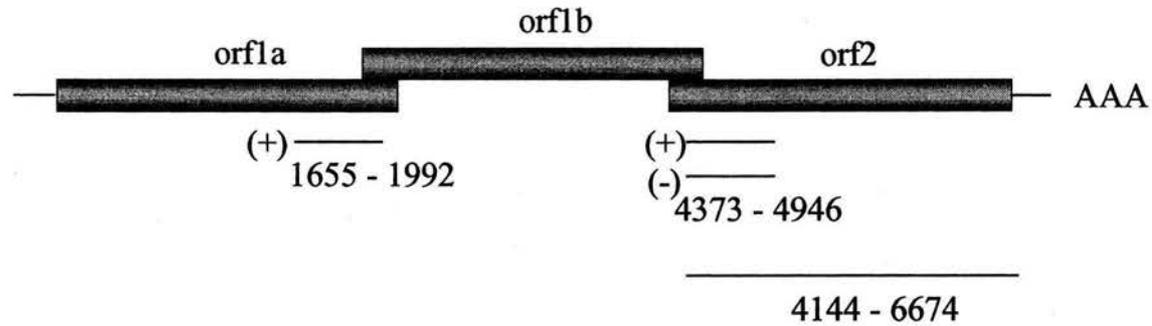
a) Marcaje con Digoxigenina.-

La transcripción a partir de los plásmidos pGEM3Zf-orf1a y pGEM3Zf-orf2 se hizo en presencia de Digoxigenina siguiendo el protocolo que se sugiere en el DIG Northern Starter Kit (ROCHE) y que se describe brevemente a continuación: 1 µg del templado de DNA purificado, una mezcla de 4 nucleótidos que contiene UTP-11-DIG, buffer de transcripción, inhibidores de RNAsas, y 40 unidades de RNA polimerasa SP6 o T7. La mezcla se incubó durante una hora a 37°C y posteriormente



Esquema 1. Diagrama de las construcciones utilizadas para obtener sondas para la detección de especies de RNA derivadas de la infección con Astrovirus. Construcción utilizada para obtener ribosondas por transcripción *in vitro*, formada por el plásmido pGEM-3Zf (+) con un fragmento del orf1a del genoma de Yuc8 insertado (A), o con un fragmento del orf2 (B). La sonda que se sintetiza a partir del promotor SP6 es de polaridad negativa y por tanto es complementaria a las especies de polaridad positiva; mientras que la sonda que se sintetiza a partir del promotor T7 es de polaridad positiva y por tanto es complementaria a las especies de polaridad negativa. Construcción utilizada para obtener una sonda de DNA por Random Primer formada por el plásmido polyEMC con el orf2 completo del genoma de Yuc8 insertado (C).

A)



B)

Región donde mapea	Marcaje	Construcción	Promotor utilizado para transcribir	Polaridad de la sonda producida	Polaridad de la especie detectada
orf2	Digoxigenina	pGEM3Z-Yuc8 orf2	SP6	Negativa	Positiva
			T7	Positiva	Negativa
orf2(1)	UTP- ³² P	pGEM3Z-Yuc8 orf2	SP6	Negativa	Positiva
			T7	Positiva	Negativa
orf1a (2)	Digoxigenina	pGEM3Z-Yuc8 orf1a	SP6	Negativa	Positiva

C)

Región donde mapea	Marcaje	Construcción	Especies detectadas
orf2L	dCTP-P ³²	polyEMC orf2L	Positivas y Negativas

Esquema 2. Sondas que se utilizaron para la detección de las especies de RNA de astrovirus. Posición relativa de las sondas utilizadas en este trabajo, en el genoma de astrovirus (A), características de las sondas de RNA generadas por transcripción *in vitro* (B), y de la sonda de DNA generada por Random Primer (C).

se añade Dnasa I para remover el templado de DNA. Para determinar la eficiencia del marcaje se realizó una serie de diluciones 1:10 del transcrito marcado y se aplicó 1µl de la muestra en una membrana de nylon. Este se fijó con luz UV, y luego se incubó en una solución para bloquear durante 30 minutos. Finalmente se realizó una inmunodetección con anticuerpos anti-digoxigenina acoplada a fosfatasa alcalina y el transcrito se visualizó con el sustrato quimioluminiscente CDP-Star, para finalmente exponerse en un film.

Hibridación.- La membrana se prehibridó con la solución Dig Easy Hyb precalentada a la temperatura de hibridación (68°C) durante 30 minutos. Se desnaturalizó la sonda de RNA marcada con DIG hirviéndola durante 5 minutos. La sonda desnaturalizada se añadió a una solución precalentada de DIG Easy Hyb. Se desechó la solución de prehibridación y se añadió la mezcla de hibridación y la sonda. Se dejó incubar toda la noche a 68°C. Posterior a la hibridación se realizaron dos lavados en 2xSSC [SSC 10X (150mM Cloruro de sodio, 15mM Citrato de sodio)], 0.1% SDS a 25°C, y dos lavados más en 0.1xSSC, 0.1% SDS a 68°C, para finalmente realizar la detección con anticuerpos.

b) Marcaje con dUTP-³²P.-

Para marcar la sonda con UTP-³²P por transcripción *in vitro* se utilizó como templado las construcciones pGEM3Zf-orf1a y pGEM3Zf-orf2 linealizadas, con la enzima de restricción correspondiente, y se siguió el protocolo que se sugiere en el Strip-EZ RNA kit (Ambion), que se describe a continuación: la reacción de transcripción se montó en un tubo a temperatura ambiente añadiendo agua libre de RNAsas, 1µg de templado de DNA, buffer de transcripción, 500µM ATP, 100µM CTP modificado, 500µM GTP, 250µM UTP, 10µCi UTP-³²P, 20 unidades de RNA Polimerasa SP6 ó T7. Esta mezcla se incubó 1 hora a 37°C. Para remover el templado de DNA se agregó DNasa I y se incubó 15 minutos a 37°C. Para remover los nucleótidos libres, la reacción se precipitó con acetato de amonio/etanol, y para verificar la eficiencia de incorporación de los nucleótidos radiomarcados en la sonda, se precipitó una alícuota con ácido tricloroacético (TCA 5%) para después cuantificar el marcaje en el contador de centelleo.

Hibridación.- Se prehibridó la membrana con la solución Dig Easy Hyb precalentada a la temperatura de hibridación (68°C) durante toda la noche. Se desnaturalizó la sonda de RNA marcada con DIG hirviéndola durante 5 minutos. La sonda desnaturalizada se añadió a una solución precalentada de DIG Easy Hyb. Se desechó la solución de prehibridación y se añadió la mezcla de hibridación y sonda. Se dejó incubar 6 horas a 68°C. Posterior a la hibridación se realizaron dos lavados en 2xSSC, 0.1% SDS a 25°C, y dos lavados más en 0.1xSSC, 0.1% SDS a 68°C, para finalmente exponerse en una película.

c) **Marcaje con dCTP-³²P.-**

Para marcar el fragmento de Yuc8 insertado en la construcción polyEMC-orf2 mediante Random primer se utilizó el Random Primer Labeling kit (STRATAGENE). El marcaje se realizó como se describe a continuación: el templado más la mezcla de random primer se hirvieron durante 5 minutos, a lo cual se añadió “primer buffer” dCTP, dCTP-³²P (50µCi), enzima Klenow Exo-, y se incubó a 37°C durante 10 minutos. Para eliminar los nucleótidos no incorporados, la reacción se precipitó con acetato de sodio, y para verificar la eficiencia de la incorporación de la marca se precipitó con ácido tricloroacético (TCA 5%) y se determinó la radioactividad en el contador de centelleo.

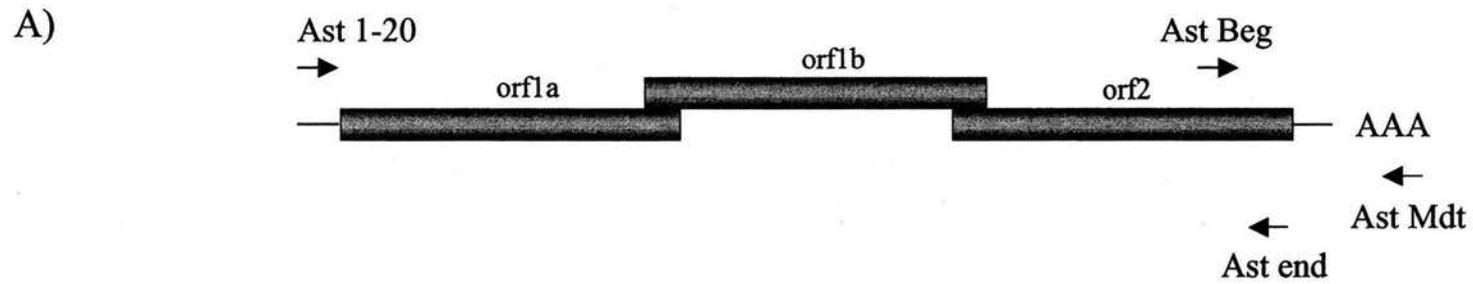
Hibridación.- Se prehibridó la membrana con la solución Dig Easy Hyb precalentada a la temperatura de hibridación (55°C) durante 2 horas. Se desnaturalizó la sonda hirviéndola durante 5 minutos. La sonda desnaturalizada se añadió a una solución precalentada de DIG Easy Hyb. Se desechó la solución de prehibridación y se añadió la mezcla de hibridación y sonda. Se dejó incubar 6 horas a 55°C. Posterior a la hibridación se realizaron dos lavados en 2xSSC, 0.1% SDS a 50°C, y dos lavados más en 0.1xSSC, 0.1% SDS a 55°C, para finalmente exponerse en un film.

10. RT-PCR a partir de RNA de lisados a alta multiplicidad.-

Con el RNA obtenido a partir de infecciones de los diferentes pases consecutivos sin diluir se realizaron RT-PCR con oligos que hibridan en los extremos del genoma de Yuc8 (esquema 3). Las especies obtenidas fueron el producto de una transcripción reversa con el oligo Ast-end y de una amplificación con los oligos Ast 1-20 y Ast-end (esquema 3). Las especies detectadas mediante RT-PCR se separaron en geles de agarosa 1.5% de bajo punto de fusión y se purificaron por columna Wizard. Posteriormente la secuenciación se realizó con el oligo Ast-end y se analizaron las secuencias mediante alineamientos con el programa Clustal-W.

11. RT-PCR a partir de RNA de virus purificado.-

Con el RNA obtenido a partir de virus purificado a por gradientes de Cloruro de Cesio se realizaron RT-PCR con oligos que hibridan en los extremos del genoma de Yuc8. Las especies obtenidas fueron el producto de una transcripción reversa con el oligo Ast-end y de una amplificación con los oligos Ast 1-20 y Ast-end (esq. 3).



B)

OLIGO	POLARIDAD	POSICION
<i>Ast 1-20</i>	+	1 - 20 nt
<i>Ast end</i>	-	6658 - 6676 nt
<i>Ast Mdt</i>	-	6758 - 6774 nt
<i>Ast Beg</i>	+	6436 - 6454 nt

Esquema 3. Oligonucleótidos utilizados para la detección de posibles especies de RNA defectivas. (A) Esquema del genoma de Yuc8 y de la posición relativa de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. En (B) se muestran algunas características de estos oligonucleótidos.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se sabe que durante la replicación de astrovirus se producen dos especies de RNA de polaridad positiva, (RNAg y RNAsg), sin embargo no se ha estudiado la presencia del RNA antigenómico ni la posible generación de un RNA antesubgenómico. Debido a que no se sabe cual de los dos mecanismos para generar el RNAsg (si iniciación interna o replicación truncada, descritos en antecedentes) opera en astrovirus, el estudio de las diferentes especies de RNA presentes en células infectadas con astrovirus podría sugerir cual es el mecanismo de su síntesis.

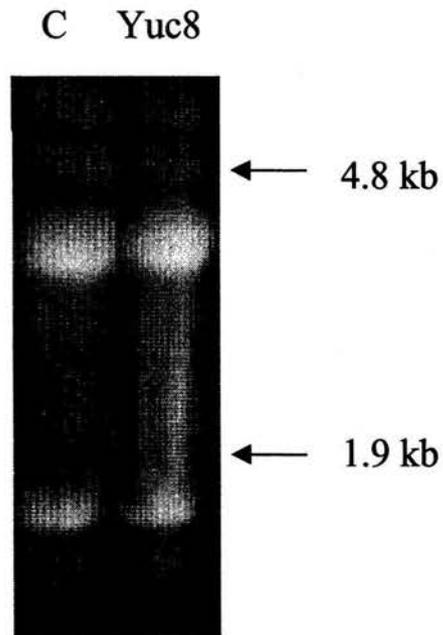
1. Detección de las especies de RNA de polaridad positiva producidas durante una infección con astrovirus.-

Para estudiar las especies negativas y positivas del RNA viral, decidimos generar ribosondas por transcripción *in vitro* a partir de plásmidos que contuvieran secuencias de diferentes regiones del genoma de astrovirus flanqueadas por promotores para las RNA polimerasas de los fagos T7 y SP6 (esquema 1, métodos). De esta manera, se generarían sondas para detectar específicamente las cadenas positivas y negativas. Iniciamos el trabajo montando las condiciones para detectar el RNA viral a partir de cultivos de células Caco-2 infectadas con la cepa Yuc8 de astrovirus por la técnica de Northern Blot. Para obtener la ribosonda se realizó transcripción *in vitro* a partir de los plásmidos previamente descritos, en presencia de digoxigenina. La sonda que se utilizó inicialmente permitiría detectar tanto el RNA genómico como el subgenómico, ya que contiene clonada una porción del orf2. Como se observa en la figura 7.B, al analizar el RNA viral, 8 hpi con esta sonda, se detectaron el RNA genómico (7kb) y el RNA subgenómico (2.4kb). Como era de esperarse, al utilizar la sonda negativa derivada de la transcripción del plásmido pGEM3z-YucORF1a se detectó únicamente al RNA genómico (resultados no mostrados).

2. Síntesis de RNA viral en presencia de Actinomicina D.-

De manera general, la mayoría de los virus con genoma de RNA codifican para su propia RNA polimerasa. Existen sin embargo algunos virus como Influenza que, a pesar de que sintetizan su RNA polimerasa, requieren de una RNA polimerasa celular activa en algún paso de su ciclo replicativo para generar transcritos celulares que son utilizados por el virus para expresar sus genes (43). De esta manera, la presencia de drogas como Actinomicina D que bloquean la síntesis del RNA cuando se usa como templado el DNA, afectan la replicación del virus Influenza. Para determinar si en el caso de astrovirus se requiere la transcripción de genes celulares para la replicación de su genoma, analizamos el RNA viral proveniente de cultivos infectados en presencia de Actinomicina D. Encontramos que los niveles de RNA

A)



B)

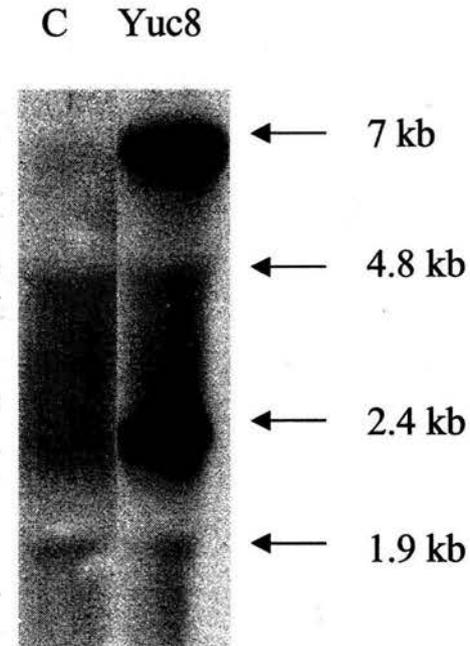


Figura 7. Análisis de RNA de astrovirus en células infectadas. Células Caco-2 se infectaron con la cepa Yuc8 de astrovirus a una multiplicidad (moi) de 2. 8 hpi, el RNA se extrajo con trizol, se separó en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes y se transfirió a una membrana de Nylon. La detección se realizó con EtBr para verificar la integridad del RNAr (A) y por hibridación con una ribosonda de polaridad negativa marcada con digixigenina que comprende los nucleótidos 4373-4946 del genoma del virus (B) C: células sin infectar; Yuc8: RNA de Yuc8.

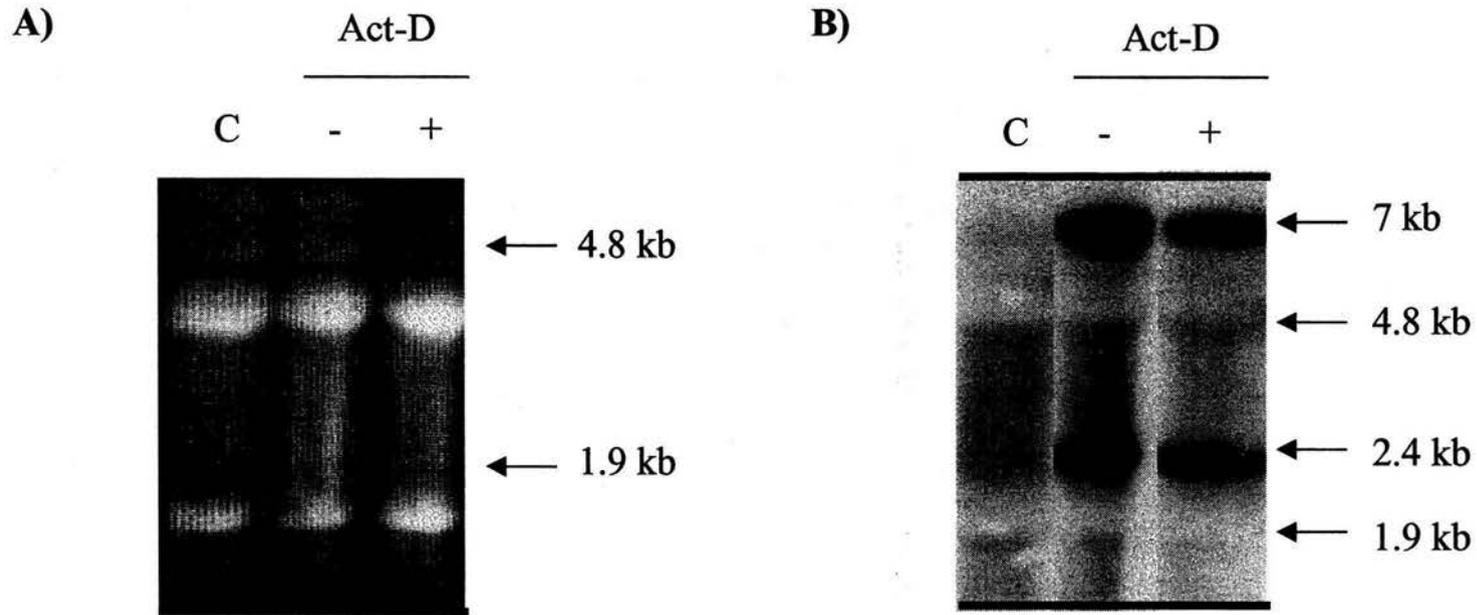


Figura 8. Análisis del RNA viral proveniente de cultivos infectados en presencia de Actinomicina D. Células Caco-2 se infectaron con la cepa Yuc8 de astrovirus (HAst-V8) a una moi de 2 en presencia de 1.5µg/ml de Actinomicina D. 8 o 10 hpi, el RNA se extrajo con trizol, se separó en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes y se transfirió a una membrana de Nylon. La detección se realizó con EtBr para verificar la integridad del RNAr (A) y por hibridación con una ribosonda de polaridad negativa marcada con digoxigenina que comprende los nucleótidos 4373-4946 del genoma del virus (B). Act-D: Actinomicina D. C: células sin infectar; (- / +) infección en ausencia o presencia de Act-D.

viral genómico y subgenómico no parecen ser afectados de manera significativa por la presencia de esta droga (fig. 8). Esto implica que los astrovirus no parecen necesitar la transcripción de genes celulares, ni la expresión de proteínas celulares, para completar la síntesis de su RNA, ya que experimentos realizados en el laboratorio confirmaron esta observación al encontrar que la Actinomicina D no afecta el rendimiento de partículas infecciosas (resultados no mostrados). Los resultados obtenidos con sondas de RNA marcadas con Digoxigenina fueron poco reproducibles y poco sensibles, por lo que en experimentos posteriores marcamos las sondas producidas por transcripción *in vitro* con UTP-P³².

3. Cinética de síntesis de las especies positivas del RNA viral.-

Con la finalidad de definir el tiempo al cual se empieza a detectar la síntesis de las especies positivas del RNA viral se obtuvo RNA de células infectadas con astrovirus a distintos tiempos de infección. Los resultados mostrados en la figura 9 revelan que bajo estas condiciones de infección y detección con la ribsonda marcada con UTP-P³², la acumulación de los RNA genómico y subgenómico es claramente observable a las 6 hpi, aunque el RNAsg parece empezar a detectarse desde las 4 horas. En este experimento en particular parece haber más RNAsg que RNAg, sin embargo esto no fue reproducible y probablemente las proporciones observadas en este experimento se deban a una ligera degradación del RNA.

4. Detección de las especies de RNA de polaridad negativa producidas durante una infección con astrovirus.-

Se han propuesto dos mecanismos básicos para la generación de los RNAsg en diferentes virus (descritos en antecedentes). En el primero ocurre una iniciación interna, debido al reconocimiento de un promotor sobre el RNA antígenómico; mientras que en el segundo mecanismo ocurre una terminación prematura para generar un RNA subgenómico de polaridad negativa, el cual después sirve como templado para la síntesis del RNAsg positivo. Para definir el mecanismo que utiliza astrovirus, se investigó la presencia de las especies de polaridad negativa, que se generan durante la replicación del genoma de Yuc8 utilizando una sonda de polaridad positiva, producida por transcripción *in vitro* a partir del plásmido pGEM3Z-Yuc8orf2. La sonda reconoció una sola especie de polaridad negativa en extractos de células infectadas con Yuc8, que corresponde a la cadena complementaria del RNA genómico (resultados no mostrados). Estos datos sugieren que el RNAsg no se sintetiza a partir de una especie truncada de RNA sino que se estaría sintetizando a partir de la misma molécula de RNA que el RNA genómico. Sin embargo este resultado no se pudo repetir, por lo que no es conclusivo. Los resultados con sondas de RNA producidos por transcripción *in vitro* no fueron reproducibles en nuestras condiciones debido en parte a la posible degradación de éstas. Para tratar de resolver

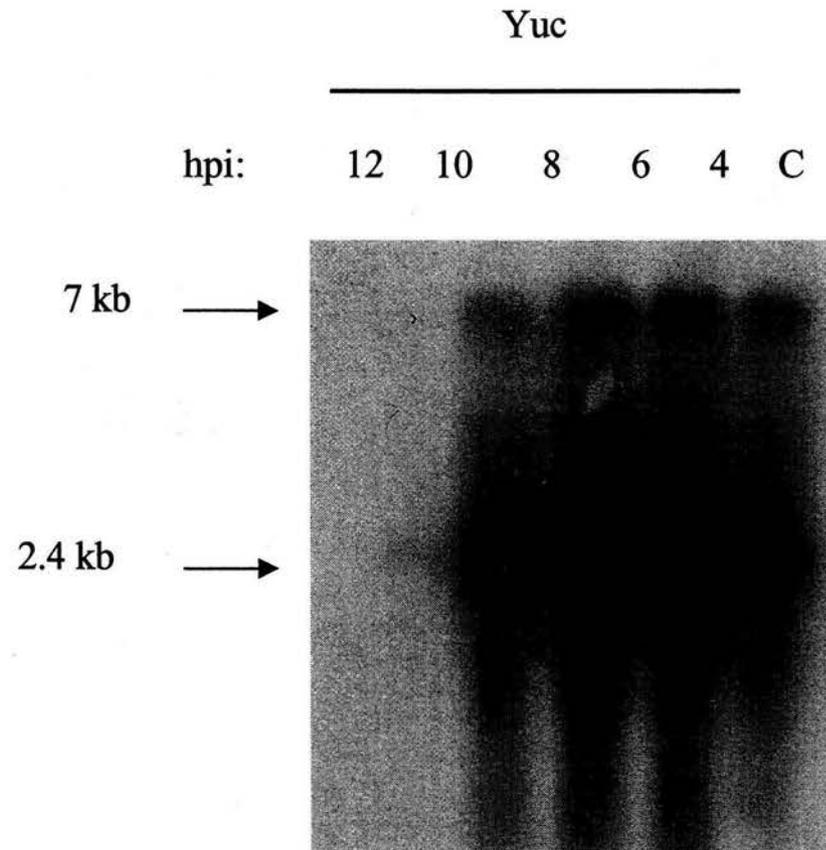


Figura 9. Cinética de síntesis de especies positivas del RNA viral. Células Caco-2 se infectaron con la cepa Yuc8 de astrovirus (HAst-V8) a una moi de 2. A las 4, 6, 8, 10 y 12 horas post infección (hpi), el RNA se extrajo con trizol, se separó en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes y se transfirió a una membrana de Nylon. La detección se realizó por hibridación con una ribosonda de polaridad negativa marcada con UTP-P³² que comprende los nucleótidos 4373-4946 del genoma del virus C: células sin infectar; Yuc8: RNA de Yuc8.

estos problemas, en experimentos posteriores utilizamos sondas de DNA marcando con CTP- ^{32}P por Random Primer. Estas sondas sin embargo, no permitirían distinguir la polaridad de los RNAs.

5. Rendimiento de partículas infecciosas en cada pase de infecciones consecutivas de astrovirus sin diluir.-

Además del análisis de los RNAs de origen viral, intentamos generar y caracterizar genomas de partículas DIs, las cuales podrían revelar posibles regiones importantes en la replicación del genoma de astrovirus. Como se mencionó en antecedentes, los RNAs de las partículas DI representan genomas con deleciones que conservan la capacidad de replicarse y encapsidarse con la ayuda del virus silvestre. Pensamos que al caracterizar el RNA de partículas DI generadas por pases consecutivos de astrovirus en cultivo, podríamos encontrar regiones del genoma importantes en su replicación. Para la obtención de DIs de astrovirus se realizaron pases consecutivos del virus sin diluir; tal como se ha descrito para otros virus (44). Debido a que las DIs son partículas que interfieren con la replicación de las partículas silvestres, y por tanto bloquean la infección, el análisis del título de partículas infecciosas en cada pase y la ausencia de efecto citopático podría indicar el pase en el que se generan este tipo de partículas (tabla 1). Además, esperábamos que al analizar el RNA total extraído de células infectadas por tinción con EtBr se observara una banda adicional correspondiente al RNA DI, probablemente más pequeña, debido a que los genomas de las DIs generalmente son mucho más abundantes que el RNA silvestre.

La presencia de partículas defectuosas en un cultivo, provoca que el rendimiento de partículas infecciosas disminuya, de manera tal que en pases consecutivos, el título se comporte de manera cíclica entre niveles altos y bajos (44). Al cuantificar el rendimiento viral resultado de cada pase, observamos una variación en el rendimiento de partículas infecciosas entre los diferentes pases resultando en una diferencia de hasta dos órdenes de magnitud entre el título más alto y el más bajo (fig. 10). El análisis de estos resultados sugería que en el pase que presentó el título más bajo podrían haberse generado las partículas defectuosas interferentes.

Considerando que la infección en cada pase se hizo con el lisado total de células infectadas, la disminución en el título viral podría deberse a un efecto inespecífico de algún factor celular. Para evaluar esta posibilidad, hicimos dos experimentos: en el primero, incubamos monocapas de células no infectadas con diferentes cantidades de un lisado celular proveniente de células no infectadas, pero tratado de la misma manera que un lisado celular infectado, previo a la infección con Yuc8 y determinamos el rendimiento viral; en el segundo experimento, mezclamos diferentes cantidades de lisado celular con la misma cantidad de virus antes y durante el período de adsorción y determinamos el título viral. Con estos experimentos esperábamos observar que si algún factor de origen celular fuera responsable de

Tabla 1. Condiciones de infección y rendimiento viral de cada pase realizado mediante infecciones consecutivas sin diluir de dos experimentos independientes.

1)

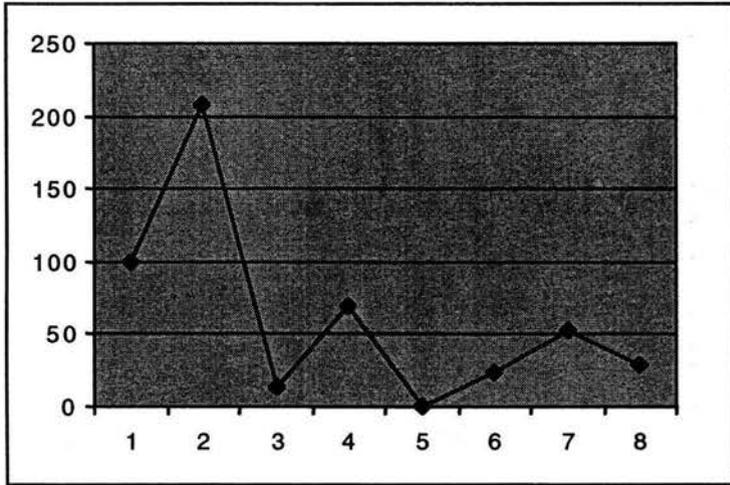
Número de pase	moi utilizada	Rendimiento	Efecto citopático
1	66	4.6×10^7	Pronunciado
2	36	9.5×10^7	Pronunciado
3	75	6.5×10^6	Pronunciado
4	5	3.2×10^7	Pronunciado
5	25	3.2×10^5	Reducido
6	0.25	1.1×10^7	Pronunciado
7	8.7	2.4×10^7	Pronunciado
8	19	1.3×10^7	Reducido

2)

Número de pase	moi utilizada	Rendimiento	Efecto citopático
1	23	1.89×10^7	Pronunciado
2	15	1.09×10^7	Pronunciado
3	8.5	8.7×10^7	Pronunciado
4	70	2.63×10^7	Pronunciado
5	21	3.1×10^7	Pronunciado
6	24	8.6×10^5	Pronunciado
7	0.6	6.9×10^6	Pronunciado
8	5	1.6×10^7	Reducido

A)

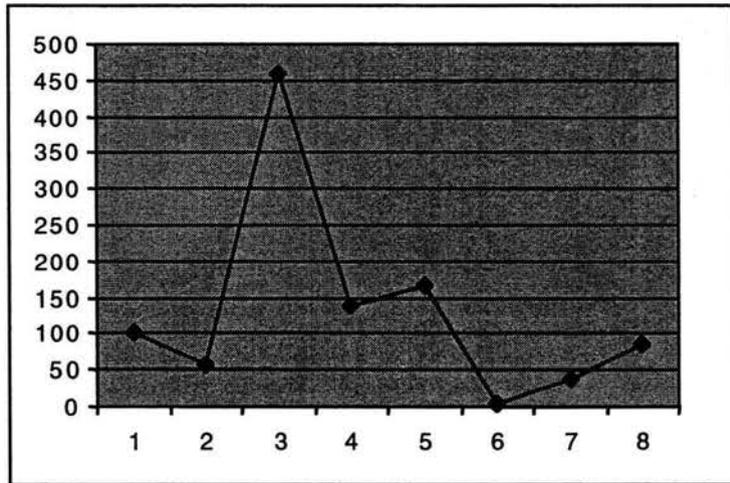
Variación en la infectividad (%)



Pase

B)

Variación en la infectividad (%)



Pase

Figura 10. Rendimiento de partículas infecciosas en cada pase de infecciones consecutivas de astrovirus sin diluir. Se realizaron infecciones consecutivas del virus sin diluir en células Caco2 en dos experimentos independientes (A) y (B). El lisado se cosechó 24 hpi y se determinó la variación del rendimiento de partículas infecciosas mediante cuantificación de células infectadas por tinción con peroxidasa. Esta se expresa como porcentaje de variación con respecto al pase 1.

interferir al virus, se vería una disminución en el título viral. En ninguno de los dos casos se afectó el título viral de la manera en que se afectó en los experimentos mostrados en la figura 10 (tabla 2). Con base en estos resultados, dedujimos que la disminución en el título viral por pases consecutivos del virus sin diluir podría deberse a la generación de partículas DIs en el cultivo.

6. Nivel de expresión de proteínas estructurales de los diferentes pases del virus sin diluir.-

Una disminución en el título de partículas infecciosas durante el experimento mostrado en la figura 10 podría reflejar una disminución concomitante en la expresión de la proteína estructural, producto del RNAsg; sin embargo la expresión de la proteína en cantidades equivalentes podría significar que ésta se estaba produciendo y ensamblando en partículas virales, infecciosas ó no infecciosas. Para determinar el nivel de expresión de las proteínas estructurales, realizamos un Western Blot con lisados provenientes de cada uno de los pases del virus del experimento mostrado en la figura 10.B utilizando un suero producido contra virus purificado, que reconoce a las proteínas estructurales de Yuc8. Lo que encontramos fue que se sintetizaron cantidades equivalentes de proteína total en todos los pases, sin embargo existieron diferencias en las proteínas detectadas. El suero fue capaz de reconocer, en todos los pases, a una de las proteínas finales del procesamiento de la cápside por tripsina, la proteína VP27, y sólo en los pases 3, 4, 5 y 7, a uno de los intermediarios del procesamiento por tripsina, la proteína de 50 kDa (fig. 11). Estos resultados sugieren que: a) Debe existir RNAsg funcional que sirva como templado para la síntesis de la proteína de la cápside, la cual probablemente se está ensamblando en partículas virales, silvestres o defectuosas; b) Posiblemente parte de la proteína sintetizada no está siendo correctamente procesada por la tripsina.

Tabla 2. Condiciones de infecciones en presencia de diferentes cantidades de lisado celular proveniente de cultivos sin infectar y su rendimiento viral.

Una misma cantidad de virus se pre-incubó con diferentes cantidades de un lisado control, y posteriormente se analizó el rendimiento viral de cada una de las muestras.

VIRUS	LISADO CONTROL	RENDIMIENTO VIRAL
200µl	0µl	6,4 X 10 ⁷
200µl	50µl	4,3 X 10 ⁸
200µl	100µl	2,1 X 10 ⁸
200µl	200µl	1,4 X 10 ⁸

La monocapa de células se pre-incubó con diferentes diluciones de un lisado control, y posteriormente se analizó el rendimiento viral de cada una de las muestras.

DILUCIÓN DE LISADO CONTROL	TITULO VIRAL
Sin diluir	2,5 X 10 ⁶
1:2	8,5 X 10 ⁵
1:4	2,1 X 10 ⁶
1:8	3,5 X 10 ⁶

Tabla 3. Condiciones de PCR utilizadas para identificar posibles RNAs defectivos.

Par de oligonucleótidos	Temperatura annealing	Fragmento obtenido
Ast 1 – 20 / AstMdt	48°C	1.4 Kb
	52°C	Ninguno
	58°C	Ninguno
Ast 1 – 20 / Ast end	50°C	0,3kb y 1,1 Kb
	55°C	0,3kb y 1,1 Kb
	60°C	0,3kb y 1,1 Kb

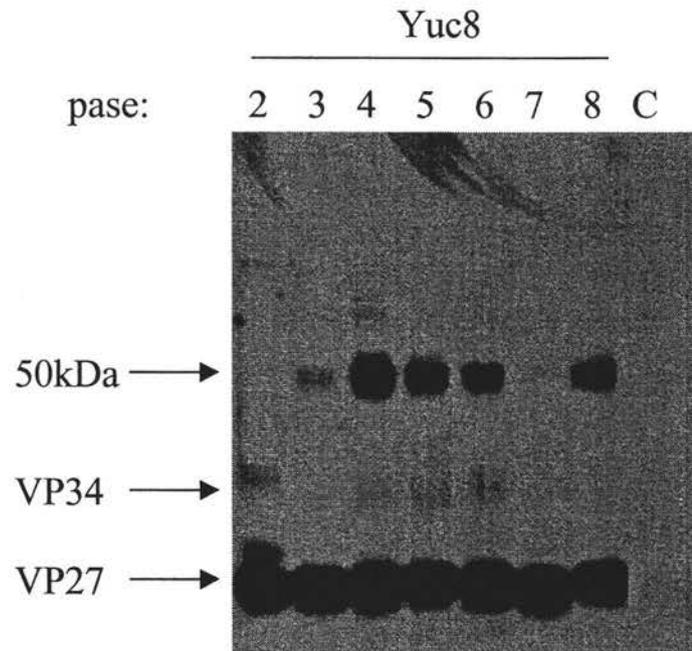


Figura 11. Nivel de expresión de proteínas estructurales de los diferentes pases del virus sin diluir. Se realizaron infecciones consecutivas del virus sin diluir en células Caco-2. El lisado se cosechó 24 hpi y se analizó por Western blot utilizando anticuerpos policlonales contra las proteínas estructurales de Yuc8. C: células sin infectar. Las proteínas virales están señaladas con flechas.

7. Análisis de las especies de RNA de los distintos pases de infecciones consecutivas de Yuc8 sin diluir.-

Para evaluar la posible presencia de RNAs con deleciones de origen viral, se realizaron experimentos tipo Northern Blot, utilizando una sonda derivada del orf2. Esta sonda incluye la secuencia 3' del genoma viral que está conservada entre los astrovirus, de manera que esperábamos detectar RNAs que contuvieran esta región del genoma. Para verificar que esta sonda, marcada con dCTP-³²P por Random Primer estuviera funcionando adecuadamente, la evaluamos con RNA obtenido de cultivos infectados en condiciones normales cosechados a diferentes tiempos post-infección. Como se muestra en la figura 12, esta sonda es capaz de reconocer tanto al RNA genómico como al RNA subgenómico de manera específica. Con base en este experimento, determinamos cosechar el RNA 12hpi para tener suficiente RNA viral acumulado y para asegurar que el RNA ribosomal, que sirvió como control de carga, no estuviera degradado, ya que se ha visto que la infección con astrovirus induce apoptosis en la célula y en estas condiciones el RNA ribosomal se degrada (5). Al analizar el RNA viral derivado de los diferentes pases del virus sin diluir, con la sonda del orf2, encontramos, como se esperaba, la presencia del RNA genómico y del RNA subgenómico, pero no detectamos RNAs adicionales aún en condiciones de baja astringencia (fig. 13). Existieron, sin embargo diferencias en la cantidad del RNA viral, especialmente en el pase 6, en donde se detectó muy poco. El hecho de que el RNA genómico y subgenómico se detectara en muy poca cantidad no coincide con el hecho de encontrar mucha proteína estructural en esa preparación (fig. 11).

8. Amplificación de las especies de RNA presentes en los diferentes pases del virus sin diluir.-

Considerando que muchos RNAs defectuosos caracterizados en varias familias de virus contienen deleciones con respecto al genoma silvestre, pero se conservan los extremos 5' y 3' del genoma viral, pensamos que se podrían identificar posibles RNAs defectuosos realizando RT-PCR con oligonucleótidos de los extremos del genoma. Se aisló RNA de células infectadas con cada uno de los pases del virus y se utilizó para obtener cDNA con el oligonucleótido AstMdt (esquema 3; métodos). El cDNA se amplificó por PCR con los oligonucleótidos Ast 1-20 y Ast-end (esquema 3; métodos), bajo condiciones en las que se buscaba amplificar fragmentos menores de 3 Kb. Estos oligonucleótidos se utilizaron porque su secuencia está contenida en regiones altamente conservadas entre los astrovirus y que se han predicho como regiones que podrían ser importantes en la replicación del genoma. Con el RNA extraído de células infectadas con el virus del pase 8 se obtuvieron dos fragmentos (de 0.3 y de 1.1 Kb) cuando se usó el par de oligonucleótidos Ast 1-20 / Ast-end a diferentes temperaturas de apareamiento (fig. 14.B), aún a 60°C, condiciones consideradas como más estrictas. Se obtuvo un fragmento de DNA de 1.4 Kb cuando

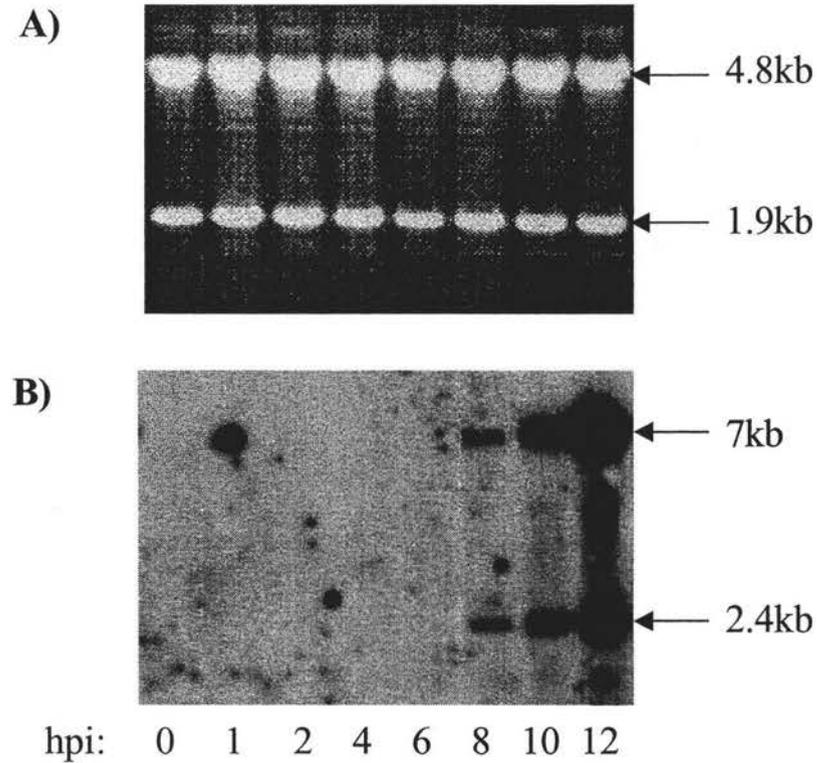
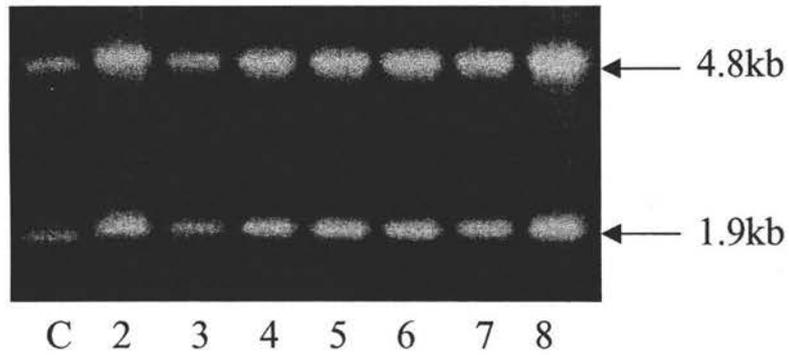


Figura 12. Determinación de las condiciones de cosecha de RNA para el análisis de RNAs DI, y verificación de especificidad de la sonda. Células Caco-2 se infectaron con la cepa Yuc8 de astrovirus (HAst-V8) a una moi de 2. A las 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas post infección (hpi), el RNA se extrajo con trizol, se separó en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes y se transfirió a una membrana de Nylon. La detección se realizó con EtBr para verificar la integridad del RNAr (A) y por hibridación con una sonda de DNA marcada con dCTP-³²P que contiene la secuencia del orf2 a partir del primer AUG hasta el codón de paro (B).

A)



B)

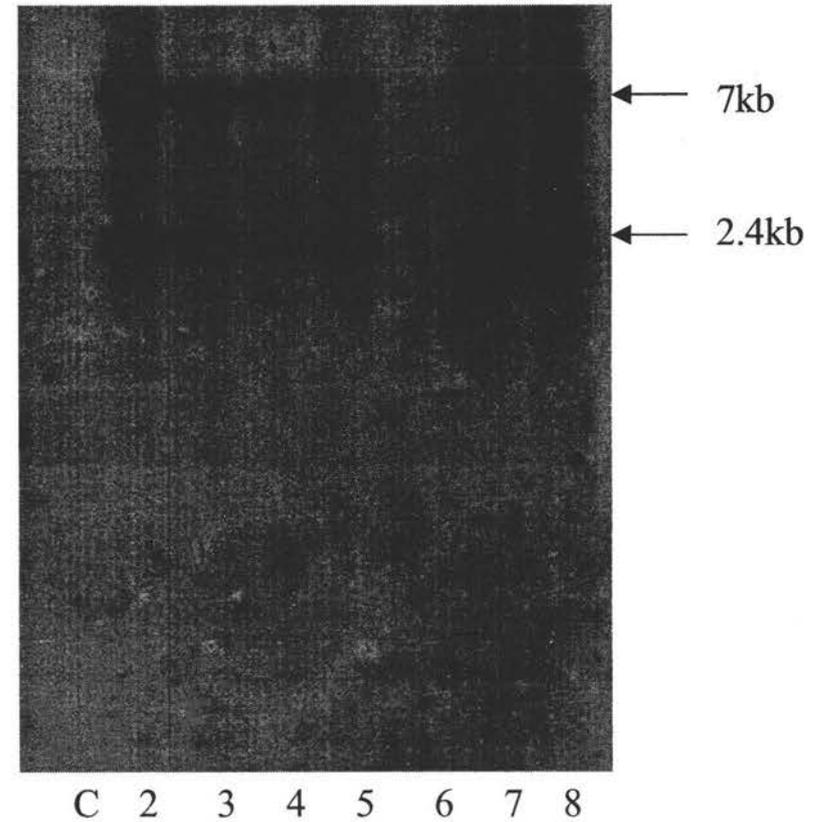
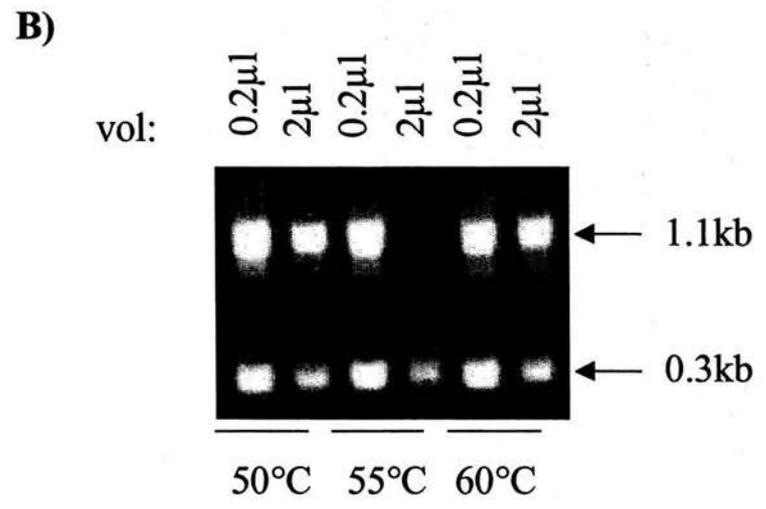
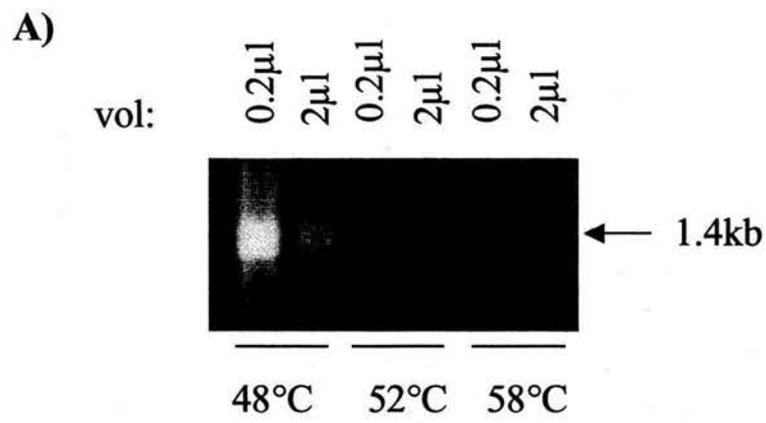


Figura 13. Análisis de RNA de los distintos pases de infecciones consecutivas de Yuc8 sin diluir. El RNA de los pases del virus sin diluir se extrajo con trizol 12 hpi, se separó en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes y se transfirió a una membrana de Nylon. La detección se realizó con EtBr para verificar la integridad del RNAr (A) y por hibridación con una sonda marcada con dCTP-³²P por Random Primer, que contiene la secuencia del orf2 a partir del primer AUG hasta el codón de paro (B). C: células sin infectar.



C)

Oligonucleótidos	Temperatura annealing	Fragmento obtenido
Ast 1-20/AstMdt	48 ° C	1.4kb
	52 ° C	Ninguno
	58 ° C	Ninguno
Ast 1-20/Ast end	50 ° C	0.3kb y 1.1kb
	55 ° C	0.3kb y 1.1kb
	60 ° C	0.3kb y 1.1kb

Figura 14. RT-PCR de las especies de RNA presentes en en el pase 8 de virus sin diluir. El RNA del pase 8 de infecciones consecutivas sin diluir se extrajo con trizol a las 12 horas post infección. Con este RNA se realizó RT con el oligo AstMdt, y el cDNA resultante se amplificó por PCR con los oligos: Ast1-20/AstMdt (A), y Ast1-20/Ast-end (B). (C) Tabla con los productos del RT-PCR en las diferentes condiciones ensayadas. vol: volumen utilizado de cDNA para la reacción de PCR.

se usó el par de oligonucleótidos Ast 1-20 / AstMdt, aunque en este caso, sólo se obtuvo este fragmento cuando la temperatura de apareamiento fue de 48°C (fig. 14.A). Debido a su tamaño y al hecho de que fueron amplificados con oligonucleótidos derivados de los extremos 5' y 3' no traducidos pensamos que los fragmentos obtenidos por PCR, podrían representar moléculas equivalentes a RNAs defectuosos. Si se tratara de este tipo de RNAs, se esperaría que estuvieran presentes en pases altos del virus pero no en los pases iniciales del virus, por lo que se realizó RT-PCR con RNA extraído de cada uno de estos pases, para verificar su presencia. Encontramos que el fragmento de 0.3 Kb se generó a partir del RNA extraído de los pases 4, 5, 6, 7, 8, y aunque en muy poca cantidad, también en el pase 1 (fig. 15), sugiriendo que las especies de RNA, a partir de las cuales se sintetizan, podrían generarse regularmente en el cultivo ó haberse generado rápidamente en los pases del virus sin diluir. Por otro lado, el fragmento de 1.1 Kb se detectó claramente a partir del RNA extraído de los pases 4,5 6 y 8; aunque también se amplificó pobremente a partir de los pases 1 y 7 (fig. 15). El hecho de encontrar estos dos fragmentos claramente a partir del pase 4 del virus, podría significar que los RNAs a partir de los que se están generando los fragmentos de DNA son más abundantes en esos pases.

Debido a que en los experimentos tipo Northern no identificamos RNAs que pudieran corresponder al tamaño de los DNAs amplificados, cabía la posibilidad de que fueran artefactos de la técnica de PCR al amplificar el RNA silvestre. Para descartar esta posibilidad, se realizó RT-PCR con RNA extraído de partículas virales purificadas por gradientes de Cloruro de Cesio utilizando dos diferentes oligonucleótidos para la reacción de transcripción reversa y 4 diferentes oligonucleótidos para PCR. Se incluyeron reacciones de PCR con un solo oligonucleótido para valorar si los productos de PCR pudieran ser un artefacto de la técnica. No se detectó producto alguno cuando se utilizó un sólo oligonucleótido en la reacción de PCR. La reacción de PCR con los oligonucleótidos Ast end/Ast Beg, que sirvió como control de la integridad del RNA, rindieron el producto esperado de acuerdo a su localización (esquema 3, métodos) lo cual indica que el RNA viral se encontraba en buen estado. Así mismo, encontramos que el fragmento de 0.3kb también se generó a partir de RNA de virus purificado, no así el de 1.1 Kb (fig. 16). El hecho de detectar fragmentos de DNA de tamaño similar (0.3 Kb) con dos pares de oligonucleótidos, uno de los cuales es común (Ast end) a partir del RNA de virus purificado sugiere que el fragmento de 0.3 Kb obtenido con los oligonucleótidos Ast1-20/Astend podría ser producto de una amplificación inespecífica a partir del RNA silvestre.

9. Análisis de las secuencias de los fragmentos obtenidos por RT-PCR a partir del RNA de los diferentes pases del virus sin diluir.-

Para verificar el origen de estos fragmentos decidimos secuenciar los fragmentos de 0.3, y 1.1 Kb (obtenidos con Ast 1-20 / Ast end) y de 1.4 (obtenido con

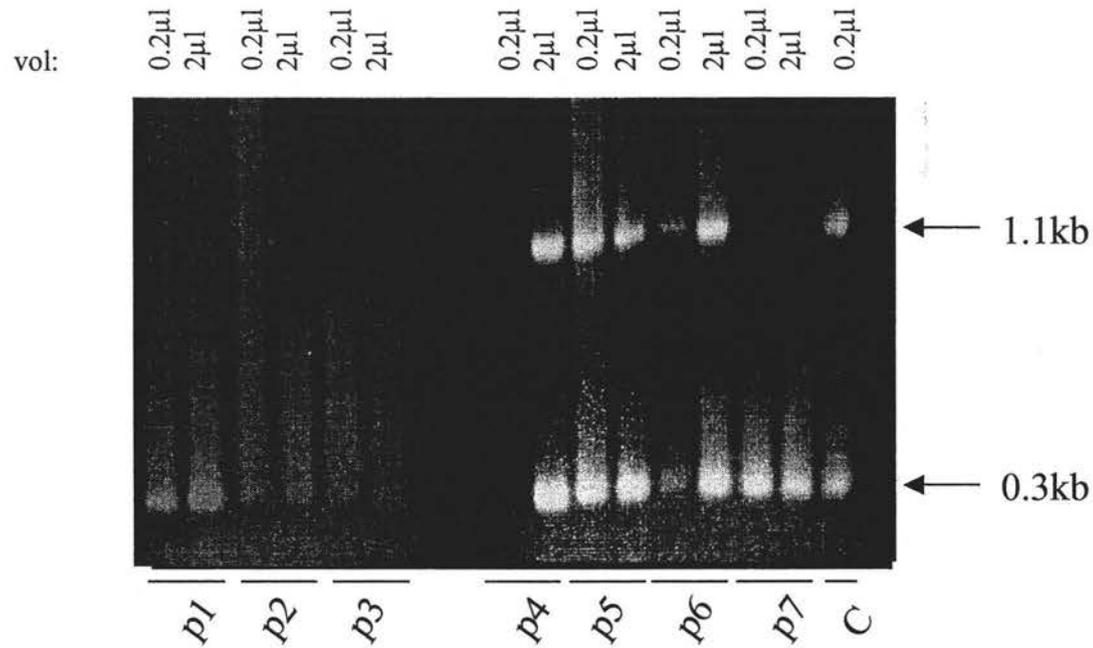


Figura 15. Amplificación de las especies de RNA presentes en los diferentes pases del virus sin diluir. El RNA de los pases de infecciones consecutivas sin diluir se extrajo con trizol a las 12 horas post infección. Con este RNA se realizó RT con el oligo AstMdt, y el cDNA resultante se amplificó por PCR con los oligos Ast1-20/Ast-end, a una temperatura de annealing de 55°C. (p): número de pase a partir del cual se extrajo el RNA; (C): control, RT del pase 8, que previamente había amplificado los fragmentos de 0.3 y 1.1kb; vol: volumen utilizado de cDNA para la reacción de PCR.

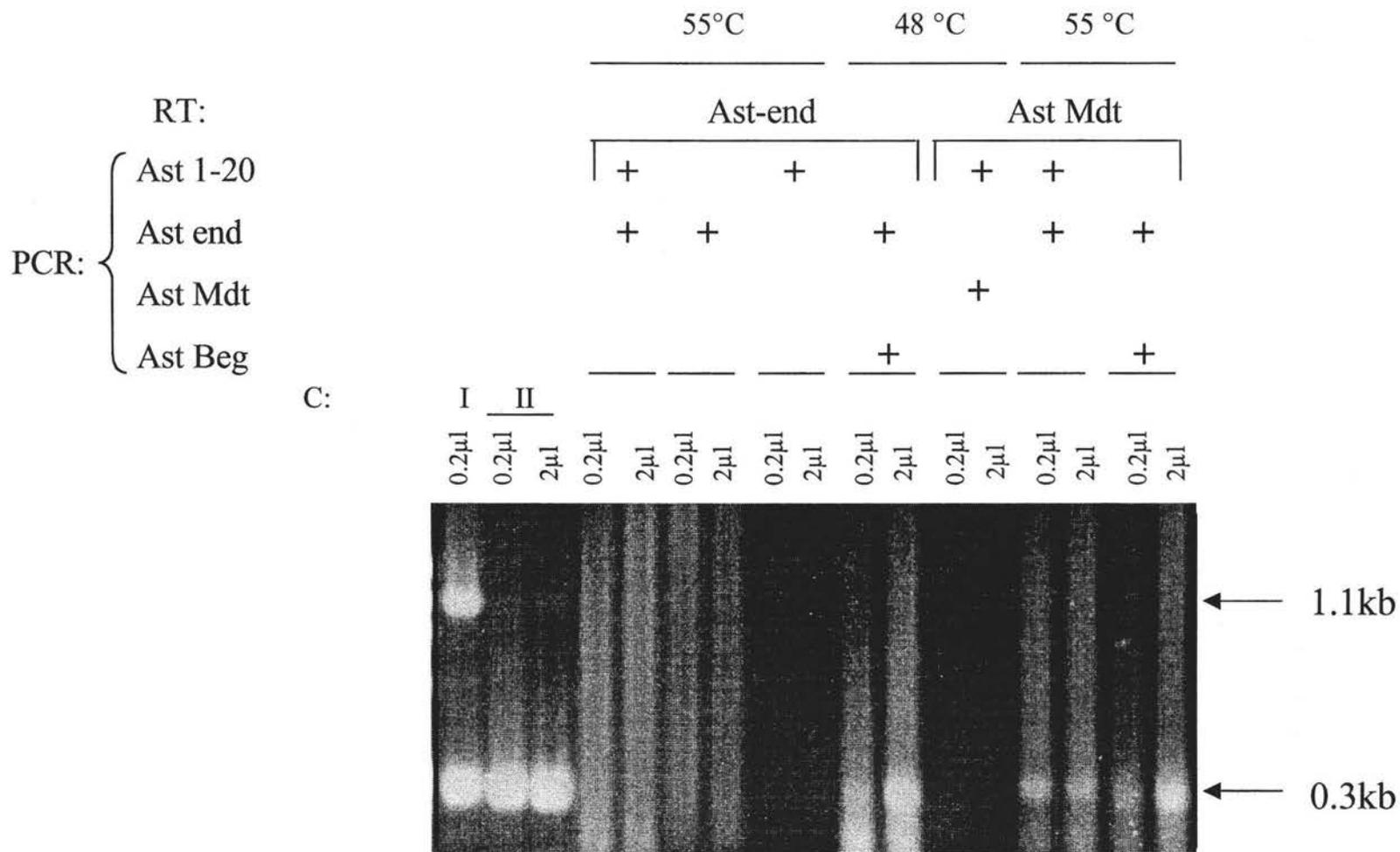


Figura 16. RT-PCR a partir de RNA de virus purificado. Células Caco-2 se infectaron con la cepa Yuc8 de astrovirus (HAst-V8) a una *moi* de 1 cosechando a las 24 horas post infección (hpi), Se purificó el virus por gradientes de Cloruro de Cesio. El RNA de las partículas purificadas se extrajo con fenol/cloroforno. Con este RNA se realizó transcripción reversa (RT) con los oligos Ast end o Ast Mdt, y el cDNA resultante se amplificó por PCR con los oligos Ast1-20, Ast-end, Ast Mdt y Ast Beg a una temperatura de annealing de 55°C o 48 °C como se indica. Se incluyeron controles con solo uno de los oligonucleótidos como se indica. C, control: I) RNA del pase 8 del virus sin diluir; II) RNA purificado a partir de una infección en condiciones normales con Yuc8 cosechada a 12hpi.

Ast 1-20 / Ast Mdt). La secuencia se determinó con el oligo Ast end. El análisis de la secuencia de los fragmentos de 0.3, 1.1 y 1.4kb reveló lo siguiente: El fragmento de 1.4 Kb es idéntico a la secuencia del virus silvestre entre los nucleótidos 5381 y 6180. La amplificación de este fragmento se explica si se considera que el oligo positivo 5' es capaz de hibridar entre los nucleótidos 5364 y 5380 del genoma silvestre; este fragmento es, por lo tanto, producto de un PCR inespecífico. Con respecto al fragmento de 1.1 Kb, resultó que su secuencia estaba mezclada por lo que no se pudieron identificar las bases en algunas posiciones, a pesar de lo cual resultó ser similar a la secuencia de Yuc8 entre los nt 5698 y 6703 cuando se alineó con el genoma completo de Yuc8, usando el programa Clustal-W (fig. 17). La secuencia del fragmento de 0.3 Kb tampoco resultó ser una secuencia completamente limpia, aunque también pudo alinearse con el extremo 3' del orf2 de Yuc8 (nt 6401 al 6669) usando el mismo programa.

El hecho de que los fragmentos de 0.3 y 1.1 Kb tuvieran una secuencia mezclada, a pesar de ser productos muy homogéneos por RT-PCR podría sugerir que éstos se generan de RNAs con secuencia heterogénea presentes en los lisados analizados. No es claro si los fragmentos de 0.3 Kb y 1.1 Kb representan productos de RNAs defectivos, aunque en este caso, estos debían encontrarse de manera poco abundante, ya que no fue posible su detección por la técnica de Northern.

Para determinar si existían cambios de estos fragmentos a lo largo de los pases, se determinó la secuencia del fragmento de 0.3 Kb, resultante de los pases 1, 4, 5, 6, 7 y 8, y se comparó con la secuencia del virus silvestre. La secuencia derivada de cada uno de los distintos pases es diferente, incluyendo inserciones/deleciones pequeñas, y en muchos casos, una mezcla en ciertas posiciones. Al alinear las secuencias obtenidas, se observó que el fragmento de 0.3 Kb corresponde a la región de astrovirus que va del nucleótido 6401 al 6669 (últimos 269 nucleótidos del orf2 en el genoma de Yuc8) con un porcentaje de identidad que va del 43 al 91%. Como se puede observar en la figura 18, la secuencia derivada del pase 1 es la más parecida a la secuencia del virus silvestre, existiendo solo unas cuantas diferencias. A partir del pase 4, empiezan a notarse inserciones/deleciones, cambios y una mezcla de secuencias, lo que sugiere que, como resultado de los pases del virus en las condiciones utilizadas en este trabajo pueden estarse generando errores en la replicación que resultan en RNAs con secuencias distintas. La región del genoma de Yuc8 con la cual muestra identidad el fragmento de 0.3 Kb corresponde a los tallos II al VIII de la estructura de ocho tallos asa de RNA predicha como importante para la replicación de los astrovirus (38).

Con base en los resultados mostrados anteriormente, no hemos demostrado la generación de partículas defectivas interferentes de astrovirus. Los pases consecutivos del virus en cultivo parecen ser importantes en la generación y acumulación de errores en la replicación de su genoma, lo cual podría explicar la disminución en el rendimiento de partículas virales infecciosas a lo largo de los pases. Esta observación,

yuc8 TCCCACCCGAGAACCAGTACACAGTTAAAATTGGTATAGACCTTGAGCATTATACCACAA 5758
p5 -NCNNTANGNGGGNTTGNNAGNNCNTAACNTTNNNNGGGNTTNCCNTNNATCTNNTTNGAG 59
* * * * * * * * * * * * * *

yuc8 TGCAGGGATTTACCCCTGTTGA-GAGTGTGAGTTGGTACACAGCTGATTTCCAACCTCT 5817
p5 NAAAANNNGNTCCCGTNTTTNTCNANTCNNNTCTGGNTTNANANNGGGNGGNAANCN--- 116
* * * * * * * * * * * * * *

yuc8 GATGAGCCCAGCCCAATACCCGGGCTATATGCCCGCGTGAATAACACCAAGAAGGCTGAT 5877
p5 -ACNNGCCCN--TTGTTNNTNTNGTCCTCNGTNNTNNGANAACACNNTNAGTATNTTCTT 173
* * * * * * * * * * * * * *

yuc8 GTGTATGGTGTGCAACAGTTTAAAAGCTCACACACCAATAATAGACACCAGATAACCAGT 5937
p5 CTNNAANCNGGGGGCTCNTCAGGCAAGGGGNCANCCNANATNNGNNAGGNAGNTTCCNTN 233
* * * * * * * * * * * * * *

yuc8 GTATTTCTTGTGAGGGTGACAACTAGCTTC-CAGGTGATAAACTACACCAGCTACTTCAT 5996
p5 NGNTCNNGNNTTTAGNNAAGCACNAGTNNGGCAAGTTNNACANAANGTCTGTTAATNCGN 293
* * * * * * * * * * * * * *

yuc8 AAGAGGTGCTGAAAGTGGCTCAAATGTCTCTAATCTAAAGATTAGAGACCAAACATACCA 6056
p5 AAT-GGTGANAGGTNTGAACAAGGNGCNTCACCNCTGCANCTN---ACTCNAGGNTNCA 348
* * * * * * * * * * * * * *

yuc8 CACACCACTACAGTTTACACAGGGTAAGTGGTACCTGCTAACTAGCACAGTTATGCATGA 6116
p5 NTGGTGCTT---GNTTAGCTAGNGCATNTTACGCCAACNNGAGCCCTCNACATTNTNGGG 405
* * * * * * * * * * * * * *

yuc8 TGGCCCCACATCATCAGGCTGGGTTTGGATGAATCAAGAGCTAACTAACAACATTGCATA 6176
p5 CTGATGTATGCNATAA--CTGTGACTAGCTNANCTAGGTANCCATCNTCACCANAGAGTT 463
* * ** * *** * * * * * * * * * * * * * * * * *

yuc8 TAGAGTTGATCCAGGTATGA---TGTACCTTATCACACCTC--CCCCAGCCGCATCACAA 6231
p5 NAACNNTAAGTGNTGTGNGACCATGTTCNCGTCCCTCCNNCATCCGCATNAGCANAACTA 523
* *

yuc8 CTTTATTTTGAACGCATACTG-TGCTTCCTCAAGCA--AGATCAGAG--GAACCTGAGA 6286
p5 TTTNNTTTCCACTTGCAGCCTGCTGCTTNTTCAGAGAGAAGNTGAGAGTTNANCTNCATG 583
* *

yuc8 CATA-TGTGGATG---CCCCCTTGCCTGAGGA--GCCACCAA---TTGAAGAAGAAGAGA 6337
p5 CATAATGTNGGTAGTCCACCCTNGNCCNAAGNAAGNCACTNGATTNTAAGNAGTACTATN 643
* *

yuc8 CAG-ACAGTGATTT---TGAGAGTACAGAGG-----ACGAAAACGATGAAGTGGACAGGT 6388
p5 CAGTGNAGTGNTTAGTGTNGTNGTACNGAGTGCCNCACCAAGAATNCAAGNNGCACTNGG 703
* *

yuc8 TCGAT---CTCCATCCCTCTTCTGA-ATCAGATGATGATG-ATGTTGAGAACGAC--CG 6440
p5 TTGGTCTANCNATACCCGGTCCNGATACCCCNCTGGTATNGGATGTNGGACTCCACACCG 763
* *

yuc8 TGCAACCTCCTCTCT-ACCCTCCTC--AACCAAGGAATTT---CAGTGG-AGCGGCCA 6493
p5 TGNAACCTCCTCTCTGACCCTCCTCCTACCCAAGTAANTTTACNAGTGGCAGCGTGCCC 823
* *

sin embargo, no está de acuerdo con la cantidad de proteína viral observada en el experimento de la figura 11.

El presente trabajo se llevó a cabo con el fin de entender algunos aspectos de la replicación del genoma de astrovirus de la cual se conoce muy poco. Finalmente, el estudio del mecanismo de replicación de astrovirus cobra importancia al ser un potencial agente de control, como vector de expresión, de enfermedades gastrointestinales.

yuc8 --CTCTTCTGAATCAGATGATGAT--GTTGAG-AACGACCGTGCAACCCTCCTCTCTA 6457
p1 -----TNNNTNNTTCTTGGNGTG-GCCGACCGTGTAAACCTCCTCTCTA 46
p4 -----TTTCTNNNTTGGGNG-GNCGGGGGTAAACAATNCTCTCNN 40
p5 -----CTNCTNCCCNGGNTG-GCCACCCGGTACNCCNCTCTCTA 40
p6 CINNCCNNTNGGGGNGCCGCTCCNACTCGGNGTGTGCCCGACNGTGTAAACCTCCTCTCNN 60
p7 -----TTCTTACTCGGNGTG-GCCGACCGTGTAAACCTCCTCTCTA 40
p8 -----TTNCTNCTTGGNGTG-GCCGNCNGNTANNCTNCTCTCTN 40
C -----tTctNctNgtNgtG-gcCgaCcGtGtAaccCctCctCTCTcta

yuc8 CCCTCCTCAACCAAGGAATTT--CAGTGGAGCCG-GCCACTAGAATCACTA---ATGGTG 6511
p1 CCCTCCTCAACCAAGGAATTT--CAGTGGAGCCG-GCCACTAGAATCACTA---ATGGTG 100
p4 NCCACGTCA^NCCANCGGAATTT--NAGTGGAGNGC-GNCAC^TNGAATCAC^NATATGTGTA 97
p5 CCCACCNCANCCAA^{CG}ANTNCTG^CAGTGNAGCCG-NCCAC^TNA^{AA}NCACNA-ATCTGTNA 98
p6 CCCTCCTCAN^NCAAGNAATTT--CAGTGGAGNG^TGCCACTANAATCACTA---ATGGTG 115
p7 CCCTCCTCAACCAAGGAATTT--CAGTGGAGCCG-GCCACTANAATCACTA---ATGGTG 94
p8 NCCACNTCAN^{CC}AAGGAATTT--CAGTGGAGCCG-GCCACTANAATCACTA^{TATATGTG}- 96
C ccCtCctCAaccAaggAaTtt--cAGTgGAGcGc-gccACTagAatCACTa---aTggtg

yuc8 CATTCCCAACACCGCGCC---G-CTAG-AGTGAGGCGCA-GT-GTCTA-CAATGA-C-CTG 6561
p1 CATTCCCAACACCGCGCC---G-CTAG-AGTGAGGCGCA-GT-GTCTA-CAATGA-C-CTG 150
p4 CAT^TNNCAACACCGCGC^N---GACTAGAG^{NN}AGC^NCAG--TACTANA-CAATGN-CTCNG 150
p5 CANNNNNAGCAGCGCCGN^{AG}ACTANAAGC^NAGN^CNNNAGT^{AG}TAC^NCAA^{NG}N-CTC^{NN} 157
p6 CAT^TCCCAACANCGCC---GACTAN^TAGT^{AG}GCGCA-GT-GT^{NN}A-CAATGN^TCTCTG 169
p7 CAT^TCCCAACACCGCGCC---GACTAG-AGTGAGGCGCA-GT-GT^CNA-CAATGN-CTCTG 146
p8 CAT^TNNCAACACCGCG^{CA}---GACTAGAG^{NG}AGGCG^NCAG--T-GT^CNA-CAATGN-CTCNG 149
C CAttcccaAcacGGcc---GaCTAGNagtgaGgcgca-gT-GtcNa-CAATGN-CtCtG

yuc8 T-TGGTTTCC---GGGCT-CAG--CCCTG-GTG--CAGCATGG--TCCCATGCG---TGC 6606
 p1 T-TGGTTTCC---GGGCT-CAG--CCCTG-GTG--CAGCATGG--TCCCATGCG---TGC 195
 p4 T-TGGTTTCCCGCGGGCTTCATG-TCCNNNGTGCAGCCCATGAGTTCGCCATCGNG-TGC 207
 p5 N-TGN-ATTCGGGGGGCTTCATGNGNAGTGGCCACCCNATGAGTTGATCATNAGT-TGC 214
 p6 TCTGGTTTCCCGCGGGCTTCATGTTCCCTCAGTGGCCAGCCATGTTCCCATCTAGTGGCGC 229
 p7 T-TGGTTTCCCGCGGGCT-CATGTTCCCTCAGTGG--CAGCATGAGTTCCCATGCGTGGCGC 202
 p8 T-TGGTTTTC-CCGGGGCTTCATG-TNCNNNGTGCAGCCCATGAGTTNNCA--TNNG-TGC 202
 C t-Tggtattc---GGGCTtcat---ccctgngtgNNcagcatgagtTcccattgcggt-tgc

yuc8 GA-AC-AAGCACGC--AGAG-CAGGTGA--CAAT---CATG-ACCTGCAACTATCTGGAA 6655
 p1 GA-AC-AAGCACGC--AGAG-CAGGTGAG-CAATG--CATG-ACCTGCAACTATTTGAAG 246
 p4 GA-ACAAGCAACG-CAGAAGTCAAGTCAAGCAATAC-ANAGAGCNTGCAAGNATGTG-NAA 263
 p5 GATACAAGCNACGTCNGAANTCAGCGNGG-CAATAG-AA--GGNATGCA-GNATGTATAA 269
 p6 AG-ACAAGCCACGCCAGNAGTCAGGTGNA-CANTAGCGATGGAGCCTGACAGANTTAGCN 287
 p7 AG-ACGAAGCACGC--AGAGTCAGGTGGA-CAATG--CATGGACNTGCCAACTTGNVTGGAA 256
 p8 GA-ACAAGCAACG-CAGAAAG-CACGGNGA-CAATAC-AT-CAGCNTGCCAAGTATGTG-AN 255
 C ga-ACaAgccACGccNgNAgtCAGtgga-CaaTa--NatggacNtgcAaNtatgTggaa

yuc8 -GCCCGGACCACGCCGAGTAGGATCGAGGGTACAGCTTCCCTATCCCTTCTTCTGTCTCT 6714
 p1 -CCC----- 249
 p4 NGNCGC----- 269
 p5 GCACGC----- 275
 p6 TGGAAACAAGCCGCAG----- 303
 p7 AGCCGCG----- 263
 p8 GCGCG----- 260
 C Ngccgc-----

Figura 18. Alineamiento de las secuencias de los fragmentos de 0.3kb que se obtienen por RT-PCR a partir del RNA de infecciones consecutivas de células Caco-2 con la cepa Yuc8 de astrovirus humano. La secuencia del fragmento se compara con la secuencia del virus silvestre. Los guiones señalan gaps, las letras en negrita son los nucleótidos diferentes al consenso del alineamiento, las posiciones subrayadas corresponden a nucleótidos no definidos, C señala la secuencia consenso.

VII. CONCLUSIONES

- * Se corroboró la presencia de dos especies de RNA de polaridad positiva, el RNAg y el RNAsg, durante la infección con astrovirus por la técnica de Northern.
- * Los resultados obtenidos sugieren que la replicación de astrovirus no requiere de la transcripción de genes celulares.
- * No se pudo demostrar la generación de RNAs DI en astrovirus, aunque parece incrementarse el número de errores durante la replicación del genoma viral, en pases del virus sin diluir.
- * La acumulación de errores durante la replicación no parece afectar la síntesis de proteína viral, aunque sí afecta el rendimiento del virus.

VIII. PERSPECTIVAS

- a) Montar un ensayo de replicación *in vitro* que permita evaluar la capacidad de replicación de las posibles DIs.
- b) Realizar genética reversa para el estudio del papel, en la replicación, de la región que forma la estructura de ocho tallos-asa.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. **Barton, D. J., B. J. O'Donnell, and J. B. Flanagan.** 2001. 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *Embo J.* **20**:1439-1448.
2. **Belliot, G., H. Laveran, and S. Monroe.** 1997. Capsid protein composition of reference strains and wild isolates of human astroviruses. *Virus Res.* **49**:49-57.
3. **Cruz, J. R., A. V. Bartlett, J. E. Herrmann, P. Caceres, N. R. Blacklow, and F. Cano.** 1992. Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. *J Clin Microbiol.* **30**:1140-1144.
4. **Dalton, R. M., E. P. Pastrana, and A. Sanchez-Fauquier.** 2003. Vaccinia virus recombinant expressing an 87-kilodalton polyprotein that is sufficient to form astrovirus-like particles. *J Virol.* **77**:9094-9098.
5. **Degen, W., G. Prujin, J. Raats, and W. v. Venrooij.** 2000. Caspase-dependent cleavage of nucleic acids. *Cell Death and Differentiation.* **7**:616-627.
6. **Desselberger, U., and J. Gray (eds.)** 2003 *Viral Gastroenteritis*, vol. 9. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
7. **Dreher, T. W.** 1999. Functions of the 3'-Untranslated Regions of Positive Strand Rna Viral Genomes. *Annu Rev Phytopathol.* **37**:151-174.
8. **Geigenmuller, U., T. Chew, N. Ginzton, and S. M. Matsui.** 2002. Processing of nonstructural protein 1a of human astrovirus. *J Virol.* **76**:2003-2008.
9. **Glass, R., J. Noel, D. Mitchell, J. Herrmann, N. Blacklow, L. Pickering, P. Dennehy, G. Ruiz-Palacios, M. Guerrero, and S. Monroe.** 1996. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch Virol Suppl.* **12**:287-300.
10. **Herrmann, J., R. Hudson, D. Perron-Henry, J. Kurtz, and N. Blacklow.** 1988. Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus-specific monoclonal antibodies. *J Infect Dis.* **158**:182-185.
11. **Herrmann, J., N. Nowak, D. Perron-Henry, R. Hudson, W. Cubitt, and N. Blacklow.** 1990. Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. *J Infect Dis.* **161**:226-229.
12. **Herrmann, J., D. Taylor, P. Echeverria, and N. Blacklow.** 1991. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N Engl J Med.* **324**:1757-1760.

13. **Holland, J. J.** 1985. Generation and Replication of Defective Viral Genomes, p. 77-99. *In* B. N. Fields (ed.), *Fields Virology*, New York.
14. **Huang, A., and D. Baltimore** 1977. Defective Interfering Animal Viruses, p. 73-116. *In* H. Fraenkel-Conrat, and R. Wagner (eds), *Comprehensive Virology*, vol. 10. Plenum Press, New York.
15. **Hudson, R., J. Herrmann, and N. Blacklow.** 1989. Plaque quantitation and virus neutralization assays for human astroviruses. *Arch Virol.* **108**:33-38.
16. **Imada, T., S. Yamaguchi, M. Mase, K. Tsukamoto, M. Kubo, and A. Morooka.** 2000. Avian nephritis virus (ANV) as a new member of the family Astroviridae and construction of infectious ANV cDNA. *J Virol.* **74**:8487-8493.
17. **Jiang, B., S. Monroe, E. Koonin, S. Stine, and R. Glass.** 1993. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:10539-10543.
18. **Jonassen, C., T. Jonassen, and B. Grinde.** 1998. A common RNA motif in the 3' end of the genomes of astroviruses, avian infectious bronchitis virus and an equine rhinovirus. *J Gen Virol.* **79**:715-718.
19. **Jonassen, C. M., T. O. Jonassen, Y. M. Saif, D. R. Snodgrass, H. Ushijima, M. Shimizu, and B. Grinde.** 2001. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *J Gen Virol.* **82**:1061-1067.
20. **Jonassen, T. O., E. Kjeldsberg, and B. Grinde.** 1993. Detection of human astrovirus serotype 1 by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* **44**:83-88.
21. **Kiang, D., and S. M. Matsui.** 2002. Proteolytic processing of a human astrovirus nonstructural protein. *J Gen Virol.* **83**:25-34.
22. **Koci, M. D., B. S. Seal, and S. Schultz-Cherry.** 2000. Development of an RT-PCR diagnostic test for an avian astrovirus. *J Virol Methods.* **90**:79-83.
23. **Lee, T. W., and J. B. Kurtz.** 1994. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-92, with evidence for two new serotypes. *Epidemiol Infect.* **112**:187-193.
24. **Lew, J. F., R. I. Glass, M. Petric, C. W. Lebaron, G. W. Hammond, S. E. Miller, C. Robinson, J. Boutilier, M. Riepenhoff-Talty, C. M. Payne, and et al.** 1990. Six-year retrospective surveillance of gastroenteritis viruses identified at ten electron microscopy centers in the United States and Canada. *Pediatr Infect Dis J.* **9**:709-714.
25. **Lewis, T., H. Greenberg, J. Herrmann, L. Smith, and S. Matsui.** 1994. Analysis of astrovirus serotype 1 RNA, identification of the viral RNA-dependent RNA polymerase motif, and expression of a viral structural protein. *J Virol.* **68**:77-83.

26. **Lewis, T., and S. Matsui.** 1996. Astrovirus ribosomal frameshifting in an infection-transfection transient expression system. *J Virol.* **70**:2869-2875.
27. **Maldonado, Y., M. Cantwell, M. Old, D. Hill, M. L. Sanchez, L. Logan, F. Millan-Velasco, J. L. Valdespino, J. Sepulveda, and S. Matsui.** 1998. Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants. *J Infect Dis.* **178**:334-339.
28. **Marczinke, B., A. Bloys, T. Brown, M. Willcocks, M. Carter, and I. Brierley.** 1994. The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase coding region is expressed by ribosomal frameshifting. *J Virol.* **68**:5588-5595.
29. **Matsui, M., and H. B. Greenberg** 1996. Astroviruses, p. 811-823. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (eds), *Fields Virology*, 3rd ed, vol. 1. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.
30. **Matsui, S. M., D. Kiang, N. Ginzton, T. Chew, and U. Geigenmuller-Gnirke.** 2001. Molecular biology of astroviruses: selected highlights. *Novartis Found Symp.* **238**:219-233; discussion 233-216.
31. **Mendez, E., M. T. Fernandez, S. Lopez, M. Méndez-Toss, and C. F. Arias.** 2002. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J Virol.* **76**:7996-8002.
32. **Mendez, E., E. Salas-Ocampo, and C. F. Arias.** 2004. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *J Virol.* **78**:8601-8608.
33. **Mendez, E., M. P. Salas-Ocampo, M. E. Munguia, and C. F. Arias.** 2003. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. *J Virol.* **77**:11378-11384.
34. **Mendez-Toss, M., P. Romero-Guido, M. E. Munguia, E. Mendez, and C. F. Arias.** 2000. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. *J Gen Virol.* **81**:2891-2897.
35. **Midthun, K., H. Greenberg, J. Kurtz, G. Gary, F. Lin, and A. Kapikian.** 1993. Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. *J Clin Microbiol.* **31**:955-962.
36. **Miller, W. A., and G. Koev.** 2000. Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology.* **273**:1-8.
37. **Mitchell, D., S. Monroe, X. Jiang, D. Matson, R. Glass, and L. Pickering.** 1995. Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* **172**:1437-1444.
38. **Monceyron, C., B. Grinde, and T. Jonassen.** 1997. Molecular characterisation of the 3'-end of the astrovirus genome. *Arch Virol.* **142**:699-706.

39. **Monroe, S., S. Stine, L. Gorelkin, J. Herrmann, N. Blacklow, and R. Glass.** 1991. Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells. *J Virol.* **65**:641-648.
40. **Monroe, S. S., B. Jiang, S. E. Stine, M. Koopmans, and R. I. Glass.** 1993. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. *J Virol.* **67**:3611-3614.
41. **Mustafa, H., E. A. Palombo, and R. F. Bishop.** 2000. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J Clin Microbiol.* **38**:1058-1062.
42. **Risco, C., J. Carrascosa, A. Pedregosa, C. Humphrey, and A. Sanchez-Fauquier.** 1995. Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. *J Gen Virol.* **76**:2075-2080.
43. **Roizman, B., and P. Palese** 1996. Multiplication of Viruses: An Overview, p. 101-111. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (eds), *Fields Virology*, 3rd ed, vol. 1. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.
44. **Strauss, J., and E. Strauss** 2002. Subviral Agents, p. 279-283. *In* J. Strauss, and E. Strauss (eds), *Viruses and Human Disease*. Academic Press, San Diego, California.
45. **Walter, J. E., J. Briggs, M. L. Guerrero, D. O. Matson, L. K. Pickering, G. Ruiz-Palacios, T. Berke, and D. K. Mitchell.** 2001. Molecular characterization of a novel recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children. *Arch Virol.* **146**:2357-2367.
46. **White, K. A.** 2002. The premature termination model: a possible third mechanism for subgenomic mRNA transcription in (+)-strand RNA viruses. *Virology.* **304**:147-154.
47. **Willcocks, M. M., A. S. Boxall, and M. J. Carter.** 1999. Processing and intracellular location of human astrovirus non-structural proteins. *J Gen Virol.* **80**:2607-2611.
48. **Willcocks, M. M., T. D. Brown, C. R. Madeley, and M. J. Carter.** 1994. The complete sequence of a human astrovirus. *J Gen Virol.* **75**:1785-1788.