

Análisis de la replicación diferencial de variantes del virus de la Fiebre Aftosa en cultivos celulares mediante replicones subgenómicos reporteros

Kelly, JM(1,3); González Mora, RM(2,3); Yarte, M(1,3); Esteban, MJ(1); García Núñez, MS; Cacciabue M(1,3); Taboga O(2,3); Gismondi, MI(1,2,3).

(1) Universidad Nacional de Luján, Departamento de Ciencias Básicas, Argentina; (2) Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular-IABIMO (INTA-CONICET), Hurlingham, Argentina; (3) CONICET, Argentina.
Contacto: juanmkelly@gmail.com

La fiebre aftosa es una enfermedad viral altamente contagiosa que afecta a animales biungulados domésticos y salvajes, ocasionando importantes pérdidas económicas en la industria ganadera. El agente etiológico es el virus de la fiebre aftosa (FMDV), perteneciente al género *Aphthovirus* de la familia *Picornaviridae*. La traducción del genoma viral se inicia a partir de un elemento IRES, produciendo una única poliproteína que es procesada de manera co- y postraduccional por proteasas virales para dar origen a las proteínas estructurales y no estructurales del FMDV. Durante la epizootia de 2000-2002 en Argentina se identificaron dos subtipos de FMDV serotipo A: A/Arg/00 provocó signos clínicos leves en los animales infectados, mientras que A/Arg/01 resultó muy virulento. Con el objetivo de contar con un sistema *in vitro* para el estudio de la replicación de FMDV se construyó un replicón subgenómico de FMDV A/Arg/01 (pRepA01), en el que la secuencia codificante de las proteínas estructurales fue reemplazada por el gen de la proteína verde fluorescente de *Ptilosarcus gurneyi* (ptGFP). El ARN subgenómico se transcribió *in vitro* a partir de pRepA01 y se transfectó en células BHK-21 mediante electroporación. La fluorescencia derivada de la replicación de pRepA01 se evaluó durante 24 horas mediante fluorimetría y microscopía de fluorescencia. En células electroporadas con el ARN de pRepA01, la expresión de ptGFP se evidenció desde las 4 horas postransfección (hpt), incrementándose hasta alcanzar su máximo a las 10 hpt. Asimismo, no se detectó variación de la fluorescencia basal en células electroporadas con un pRepA01 mutado en el sitio activo de la ARN polimerasa viral. De esta forma, se obtuvo una herramienta molecular segura para el estudio de la replicación de FMDV por fuera de laboratorios de alto nivel de bioseguridad. En trabajos previos de nuestro grupo demostramos que la virulencia diferencial observada entre FMDV A/Arg/00 y A/Arg/01 estaba asociada al elemento IRES. En efecto, se registró un retraso en la síntesis de proteínas virales y menor diámetro de las placas de lisis en virus que portaban el IRES de A/Arg/00 respecto del IRES A/Arg/01. A fin de estudiar el efecto de los cambios detectados sobre la replicación viral, se obtuvo un replicón derivado de pRepA01 en el que se reemplazó el IRES completo por la secuencia homóloga de A/Arg/00 (pRepA01_IRES-00). Mientras que la cinética de expresión de ptGFP fue similar entre ambos replicones en células BHK-21, la replicación de

pRepA01 fue significativamente diferente de pRepA01_IRES-00 en una línea celular de riñón ovino. Estos resultados sugieren la existencia de distintos factores transactivadores del IRES de FMDV asociados a la replicación viral en las líneas celulares evaluadas.