

## INFORME PRELIMINAR

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"  
UNIVERSIDAD DE CHAPELL HILL

### Caracterización genómica de la cepa cubana de efecto citopático ligero

*Lic. Mayling Álvarez Vera,<sup>1</sup> Lic. Luis Sarmiento Pérez,<sup>1</sup> Dra. María Guadalupe Guzmán Tirado,<sup>1</sup> Dra. Melinda Beck,<sup>2</sup> Téc. Qing Shi,<sup>2</sup> Dra. Jean Handy<sup>2</sup> y Dr. Pedro Más Lago<sup>1</sup>*

#### RESUMEN

Se presenta la caracterización genómica de la cepa de efecto citopático ligero por secuenciación nucleotídica. Se logró secuenciar el 90 % de la cepa de efecto citopático ligero, se mostró una estrecha relación con los Coxsackie A9 y las mayores mutaciones ocurrieron en la región del genoma que codifica para las proteínas estructurales. De ahí que se pueda considerar una variante de Coxsackie A9 no reportada antes.

**Descriptor DeCS:** GENOMA VIRAL; COXSACKIEVIRUS A/ genética; EFECTO CITOPATOGENICO VIRAL/ genética; SECUENCIA DE BASES; NEURITIS/ epidemiología.

Durante los años 1992-1993 se reportó en Cuba un brote de neuropatía epidémica (NE) que comenzó en la parte occidental del país y después se extendió a las regiones central y oriental. La enfermedad afectó a 50 000 personas, sobre todo adultos y se caracterizó por 2 formas clínicas principales: óptica y periférica.<sup>1,2</sup>

A partir de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes de NE se aislaron en células Vero, varias cepas de *Enterovirus* identificadas como Coxsackie A9, así como un agente productor de efecto citopático (ECP) ligero de progresión lenta.

Hallazgos posteriores demostraron que las cepas identificadas como Coxsackie A9 y los agentes de ECP ligero estaban relacionados antigénicamente pero fue imposible identificar la cepa de ECP ligero por pruebas de neutralización mediante sueros específicos.<sup>3,4</sup>

Además, se observaron características fenotípicas de los agentes de ECP ligero como su lento crecimiento

en cultivo de células, su pequeño tamaño de placas y la ausencia de las proteínas de la cápside en los experimentos de Western Blot (WB).<sup>3</sup>

De ahí que, con el objetivo de caracterizar genómicamente a uno de los agentes de ECP ligero aislados se pasaron en células de línea de riñón de mono verde africano, Vero, las siguientes cepas: la 47/93IPK, aislada a partir del LCR de un paciente con la forma óptica de la enfermedad que contaba con 4 pases en células Vero e identificada como Coxsackie A9, y la cepa de ECP ligero 44/93IPK, con 5 pases en las mismas células; y las cepas de referencia Coxsackie A9 y Coxsackie B4, ambas con 3 pases en células Vero.

Las células se observaron a diario hasta que mostraron un ECP de 3 cruces, momento en el cual se realizó la lisis de las células mediante 3 ciclos de congelación y descongelación. La concentración de los virus se realizó empleando NaCl 2,2 % y PEG al 7 % a 4 °C

<sup>1</sup> Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

<sup>2</sup> Universidad de Chapell Hill, Carolina del Norte, EE.UU.

durante toda la noche. Más tarde, después de 20 min de centrifugación a 3 000 r.p.m. se añadieron 200  $\mu$ L de *buffer* lisis (50 mM EDTA, 2 mM NaCl, 142 mM 2-mercaptoetanol, 1 % SDS, proteinasa K 100-400  $\mu$ g/ $\mu$ L) al pellet y se incubó 1 h a 50 °C.

La purificación del ácido ribonucleico (ARN) viral se realizó mediante extracción con fenol-cloroformo/cloroformo y la precipitación del ARN se logró empleando glucógeno,  $\text{NH}_4\text{Ac}$  y etanol durante 2 h a -70 °C.

Para la síntesis de la copia del ácido desoxirribonucleico viral cADN se utilizaron los componentes siguientes: *buffer* RCP 10X, 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10mM dNTPs, 100mM DTT, 500  $\mu$ g/ $\mu$ L Random Primers, los que se dejaron por 2 min a 68 °C y después se pusieron 5 min en hielo. Al cabo de este tiempo se añadieron 20 U/ $\mu$ L de RNAsin y 8 U/ $\mu$ L de reverso transcriptasa. El ciclaje utilizado fue 37 °C por 15 min, 42 °C por 30 min y 99 °C por 5 min.

Para la reacción en cadena de la polimerasa se emplearon los componentes siguientes: *buffer* RCP 10X, 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM dNTPs, 2,5 U/ $\mu$ L amplitaq DNA polimerasa y 8 juegos de primers que abarcaban todo el genoma y que mostraban homología con las cepas de referencia de Coxsackie A9 y Coxsackie B4. Para ello se empleó un programa con el ciclaje siguiente: 60 °C por 25 s, 72 °C 25 s, y 94 °C por 20 s; por 35 veces.<sup>5</sup>

Los 8 juegos de primers diseñados funcionaron con las cepas de referencia empleadas. El control celular funcionó de forma satisfactoria pues no se observó amplificación con ninguno de los juegos de primers. La cepa 47/93IPK previamente identificada como Coxsackie A9 se amplificó con los 8 juegos de primers, sin embargo, la cepa de ECP ligero no se amplificó con el juego de primers correspondiente a la porción del genoma que codifica para la síntesis de las proteínas estructurales VP<sub>1</sub> y VP<sub>3</sub> e inicio de la proteinasa 2A.

Este resultado evidencia la homología nucleotídica de los agentes de ECP ligero con las cepas de referencia utilizadas, ya que sólo un juego de primers no funcionó y las amplificaciones del resto del genoma se corresponden en tallas con las obtenidas para las cepas de referencia. Además, se corresponde con la imposibilidad de identificar los agentes de ECP ligero por pruebas de neutralización pues no se logró la amplificación con la porción del genoma correspondiente a la síntesis de las proteínas estructurales contra las cuales se levantan los anticuerpos neutralizantes y corrobora la ausencia de las proteínas de la cápside en los experimentos de WB.

Después, a partir de los 8 fragmentos amplificados de la cepa de ECP ligero se realizó la secuenciación nucleotídica de ésta. Se emplearon juegos de primers que se solapaban y se encontraban a 400 pb de distancia para

realizar la secuencia nucleotídica de ésta. Para ello se empleó un *kit* de secuencia Sequenase Version 2.0 y un Secuenciador Automático Modelo 373A Applied Biosystems. Los primers empleados son específicos para los *Enterovirus* y se han utilizado previamente para la secuenciación de los Coxsackie B3 por *Melinda Beck* y otros.<sup>5</sup>

Se logró secuenciar el 90 % de la cepa de ECP ligero (alrededor de 6 648 pb de 7 400 que poseen los *Enterovirus*). La mayoría de las diferencias nucleotídicas fueron observadas en el tercer nucleótido, no resultando en cambios aminoacídicos (aa). La mayoría de las diferencias aa en las proteínas de la cápside, se observaron en las regiones de los lazos, las que están expuestas en la superficie del virión. Esto está en correspondencia con los reportes de *Ryan* y *Flint*,<sup>6</sup> quienes encontraron la mayoría de las diferencias aa en las proteínas de la cápside en las regiones de los lazos para los Coxsackie A9 y plantean que éstos ocurren debido a la presión del sistema inmune. No se observaron mutaciones en los sitios de clivaje de las proteínas de la cápside.

La cepa de ECP ligero está estrechamente relacionada con los Coxsackie A9 y presentan 82 % de homología. Esto se obtuvo con un nivel de confianza estadística del 95 %. El agrupamiento en que se ubica a la cepa de ECP ligero está en correspondencia con los estudios de *Hyypia* y otros,<sup>7</sup> quienes agrupan igualmente a los Coxsackie A9 con los Coxsackie B, Echo 11, Echo 12 y con el virus de la enfermedad vesicular del cerdo. Además, la cepa de ECP ligero tiene la misma extensión del extremo C terminal de la proteína de la cápside VP1 de los Coxsackie A9 la que es diferente a la de otros *Enterovirus*.

Las mayores mutaciones ocurrieron en el sitio activo His de la proteinasa 2A encargada del clivaje primario del precursor de las proteínas estructurales de la cápside y que contiene el mayor epítipo antigénico. Estos cambios no han sido encontrados ni con Coxsackie A9 ni con Coxsackie B según estudios realizados por *Chang* y otros.<sup>8</sup> Estos cambios observados pueden alterar las proteínas estructurales del virión y facilitar una infección persistente. Los cambios aminoacídicos en las proteínas 2C y 3A aumentan la homología con la glutamato descaboxilasa y con la proteína básica de la mielina.

Este resultado evidencia la relación antigénica entre los agentes de ECP ligero y el sistema nervioso central (SNC) humano, lo que pudiera favorecer la persistencia viral y los mecanismos de autoinmunidad mediada por virus.

Podemos concluir que la cepa 44/93 IPK se puede considerar una variante de Coxsackie A9 no reportada antes y recomendamos en estudios futuros caracterizar genómicamente otros agentes de ECP ligero aislados durante la epidemia.

**SUMMARY**

The genomic characterization of the strain of light cytopathic effect by nucleotide sequence is presented. It was possible to sequence 90 % of the strain of light cytopathic effect. A close relationship with Coxsackie A9 was observed. The greatest mutations occurred in the region of the genome that codifies for the structural proteins. Therefore, it may be considered as a variant of Coxsackie A9 never reported before.

**Subject headings:** GENOME, VIRAL; COXSACKIE VIRUSES A/genetics; CYTOPATHOGENIC EFFECT, VIRAL/genetics; BASE SEQUENCE; NEURITIS/epidemiology.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Comité Editor. La neuropatía epidémica en Cuba: breve reseña epidemiológica. Bol Epidemiol IPK 1993;Número Especial.
2. Cuba. Neuropathy Field Investigation Team. Epidemic optic neuropathy in Cuba. Clinica characterization and risk factors. N Engl J Med 1995; 333:1176-82.
3. Más P, Pelegrino JL, Guzmán MG, Comelles MM, Resick S, Álvarez M, et al. Viral isolation from cases of epidemic neuropathy in Cuba. Arch Pathol Lab Med 1997; 121(8):825-33.
4. Llanos G, Asher D, Brown P, Gajdusek DC, Mendoza R, Márquez M, et al. Epidemic Neuropathy in Cuba. Epidemiol Bull Pan Am Health Organ 1993;14:1-4.
5. Beck MA, Shi Q, Morris VC, Levander OA. Rapid genomic evolution of a non-virulent coxsackievirus B<sub>3</sub> in selenium-results in virulence. Nature Med 1995;1:433-46.
6. Ryan MD, Flint M. Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. J Gen Virol 1997;78:699-723.
7. Hyypia T, Havi T, Knowles NJ, Stanway G. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. J Gen Virol 1997;78:1-11.
8. Chang KH, Day C, Walker J, Hyypia T, Stanway G. Nucleotide sequences of wild-type Coxsackievirus A<sub>9</sub> strains imply that RGD motifs functionally significant. J Gen Virol 1992; 73:621-6.

Recibido: 25 de mayo de 1998. Aprobado: 17 de julio de 1998.  
Lic. *Mayling Álvarez Vera*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.