"INMUNOPRECIPITACION DE COMPLEJOS POLIPROTEICOS VIRALES DESDE CELULAS CHSE-214, INFECTADAS CON EL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREATICA INFECCIOSA (IPNV)"

TESIS

Facultad de Ciencias del Mar
Universidad de Valparaíso

Para optar al Grado de Licenciado y al
Título Profesional de Biólogo Marino

DANIEL P. BLANCHARD VERA

2000

M
B639i
2000

Marc 52649

M
B639i
2000

"INMUNOPRECIPITACION DE COMPLEJOS POLIPROTEICOS VIRALES DESDE CELULAS CHSE-214, INFECTADAS CON EL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREATICA INFECCIOSA (IPNV)"



TESIS

PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO Y AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO MARINO

UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA

DANIEL P. BLANCHARD VERA

2000

Esta Tesis es parte de los requisitos para obtener el Grado de Licenciado en Biología Marina y el Título Profesional de Biólogo Marino

DANIEL P. BLANCHARD VERA

Aprobada por la Comisión de Tesis en junio de 2000

Dr. Juan Kuznar Hammarstand

Director de Tesis

Msc. Juan Carlos Espinoza Ibañez. Sub director de Tesis

Profesora Gloria Collantes Saá

Dra. Guillermina Tapia Dominguez

Agradecimientos

Agradezco al doctor Juan Kuznar por soportarme en su laboratorio, por todo el conocimiento que trató de traspasarme y toda la pedagogía que debió emplear en cada una de nuestras múltiples y extensas conversaciones.

A Juan Carlos Espinoza por todas las "paleteadas" y el buen humor sin el cual las largas jornadas de experimentación se hubiesen tornado insostenibles.

A la señora Nina cuyo esfuerzo posibilitó la constante disponibilidad de materiales y por hacer más gratas las colaciones y escuetas pausas en el trabajo.

A los integrantes de la comisión por la paciencia que deberán desplegar en la corrección de este documento.

A mis padres, Marisol y Daniel, sin cuyo apoyo, tanto económico como moral, no hubiese sido posible la realización de esta tesis.

Y a mi novia Dayana por darme la alegría necesaria para soportar este extensísimo período de trabajo.

RESUMEN

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) es un importante patógeno de salmónidos en el hemisferio norte y actualmente está causando grandes pérdidas en la industria salmonera chilena (Enriquez &Lobos 2000).

Pese a que se han realizado numerosos estudios al respecto, muchos aspectos de su biología son desconocidos. Entre estos se encuentra la forma en que las proteínas de la cápside interactúan entre sí y con el material genético para conformar un virión maduro (morfogénesis).

A fin de estudiar el proceso morfogenético del virus, se empleó una estrategia experimental consistente en inmunoprecipitar, con 2 anticuerpos monoclonales (Am1 y Am14), las 2 proteínas virales componentes de la cápside (VP2 yVP3).

Al inmunoprecipitar células lisadas por efecto de la progresión de la infección viral (etapas tardías de la infección) se determinó que Am1 (anti VP3) permite coinmunoprecipitar VP2.

Por otra parte al utilizar Am14 solamente se pudo inmunprecipitar VP2, probablemente debido a que el epítope de ésta proteína, al cual se une el anticuerpo, se obstruye cuando VP2 se asocia a VP3.

El análisis de inmunoprecipitados obtenidos a diferentes horas post infección (hpi) permitió visualizar que VP2 y VP3 se asocian a partir de las 9 hpi, esto es, al menos 6 horas antes de la aparición de viriones maduros.

La formación de complejos que contienen VP2 y VP3 ocurre en forma concomitante al momento de máxima síntesis del RNAds siendo probable que exista una relación entre ambos hechos.

A partir de los resultados obtenidos y la información disponible se elaboró el siguiente modelo para la secuencia de ensamblaje del virus:

VP3 se distribuye por el citoplasma donde se asocia al RNA. La formación de estos complejos favorece la incorporación de VP2, la cual se les une en forma gradual hasta completar el virión maduro.

LISTA DE FIGURAS

1. Representación esquemática de la forma icosahédrica de la cápside.....8

2. Proteínas codificadas por los segmentos A y B del RNA viral.....10

3. Representación esquemática de un gel de poliacrilamida para electroforesis de proteínas.....34

4. Representación esquemática de la inmunoprecipitación de proteínas y complejos proteicos.....36

5. Electroforesis de células infectadas y no infectadas.....46

6. Western blot revelado con Am14.....48

7. Western blot revelado con Am1.....50

8. Quimioluminiscencia.....51

9. Western blot revelado con suero policlonal.....53

10. Marcación Isotópica.....55

11. Células con diferentes hpi inmunoprecipitadas con Am14.....58

12. Células con diferentes hpi inmunoprecipitadas con Am1.....59

Lista de Abreviaturas

IPNV : Infectious Pancreatic Necrosis Virus.

VP1 : Viral protein 1

VP2 : Viral protein 2

VP3 : Viral protein 3

VP4 : Viral protein 4

NS : Non structural peptide

Am1 : Anticuerpo monoclonal 1

Am14 : Anticuerpo monoclonal 14

U.P.F. : Unidad formadora de placa

RNA : Acido ribonucleico

RNAds : Acido ribonucleico de cádena doble.

RNAss : Acido ribonucleico de cadena simple.

RNA-VP3 :complejo conformado por RNA unido a VP3

MEM: Medio mínimo esencial

SDS: Dodecil Sulfato sódico

TEMED :N,N,N',N-tetrametilendiamina

APS :Persulfato de amonio

NBT : Nitro blue tetrazolium chloride

BCIP : 5 Bromo-4chloro-3inadlyl-phosphate

PBS :fosfato buffer salino

INDICE

AGRADECIMIENTOS....iii

RESUMEN....iv

LISTA DE FIGURAS....vi

ABREVIATURAS....vii

INTRODUCCION....6

Patología....7

Morfología....8

Replicación....11

Ensamblaje....12

Modelo 1....12

Modelo 2....14

Enfoque experimental....15

HIPOTESIS....16

OBJETIVOS....17

MATERIALES.....18

Materiales biológicos.....18

Células.....18

Virus.....18

Anticuerpos.....19

Reactivos.....20

Cultivos celulares.....20

Electroforesis.....20

Tinción geles.....22

Secado de geles.....23

Inmunoprecipitado.....23

Western blot.....24

Quimioluminiscencia.....25

Marcación isotópica.....25

Material de plástico.....26

Equipos.....26

METODOS.....28

Células y cultivos celulares.....28

Inoculación.....29

Lisado de las monocapas.....29

Electroforesis.....31

Fundamentos de la técnica.....31

Aplicación de la técnica.....33

Inmunoprecipitación.....35

Fundamento de la técnica.....35

Aplicación de la técnica.....37

Western blot.....38

Fundamento de la técnica.....38

Aplicación de la técnica.....39

Quimioluminiscencia.....40

Tinción de geles.....42

Secado de geles.....43

Marcación isotópica.....43

RESULTADOS.....45

Proteínas virales.....45

Técnicas de tinción.....45

En células infectadas y no infectadas.....45

Inmunoprecipitación de proteínas virales.....47

Inmunoprecipitados revelados con Am14 (anti-VP2).....47

Inmunoprecipitados revelados con Am1(anti-VP3).....49

Optimización de la visualización de los inmunoprecipitados.....50

Quimioluminiscencia.....50

Anticuerpos policlonales.....52

Marcación isotópica.....53

Inmunoprecipitados de lisados de células obtenidos a diferentes horas post infección.....56

Inmunoprecipitados con Am14.....57

Inmunoprecipitados con Am1.....57

DISCUSION.....61

Proteínas virales.....61

Inmunoprecipitación de proteínas virales.....61

Inmunoprecipitados revelados con Am14 (anti-VP2).....63

Inmunoprecipitados revelados con Am1 (anti-VP3).....65

Optimización de la visualización de los inmunoprecipitados.....66

Quimioluminicencia.....66

Anticuerpos policlonales.....67

Marcación isotópica.....68

Inmunoprecipitados de lisados celulares obtenidos a diferentes horas post infección.....69

Inmunoprecipitados con Am14.....70

Inmunoprecipitados con Am1.....71

CONCLUSIONES.....75

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....76

INTRODUCCION

Uno de los sectores productivos que ha experimentado mayor crecimiento en los últimos años, tanto en Chile como a nivel mundial, es la acuicultura (FAO 1996).

En la actualidad se cultiva un gran número de especies, pero la que reviste mayor importancia en Chile, tanto por los niveles de producción como por los réditos generados, es la salmonicultura. La industria salmonera chilena ha crecido sostenidamente en la última década de forma tal que este país se ha constituido en uno de los mayores productores a nivel mundial (FAO 1996).

Pese a su gran rentabilidad las salmoneras sufren, anualmente, considerables pérdidas a causa de enfermedades y parásitos que afectan a las especies cultivadas. Se ha hecho necesario, por tanto, realizar numerosos estudios a fin de desarrollar metodologías de diagnóstico y profilácticas para detener el avance y proliferación de estas enfermedades.

En el presente estudio se tratará uno de estos patógenos; el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), que tiene grandes repercusiones sobre los cultivos de salmones en el hemisferio norte y que actualmente está causando pérdidas importantes en la industria salmonera chilena (Enriquez & Lobos 2000).

Este virus fue descubierto en 1960 (Wolf *et al.*, 1960) y se ha aislado en varias especies de organismos acuáticos, desde peces hasta invertebrados, pero infecta principalmente especies de salmónidos (Hill & Way 1980). Fue aislado y caracterizado por primera vez en Chile en 1984 (Mac Allister & Reyes 1984, Espinoza *et al.*, 1985), pero se distribuye a través de todo el mundo, concentrándose principalmente en el hemisferio norte.

Patología

El IPNV afecta mayoritariamente a larvas y alevines de entre 0-6 meses de vida en los cuales puede producir mortalidades de entre 10 y 90% dependiendo primordialmente de la temperatura del agua. Desde los 6 meses de vida puede causar infecciones subclínicas asintomáticas sin producir pérdidas significativas.

El virus induce la generación de anticuerpos neutralizantes, pero se ubica en áreas inaccesibles para éstos, de manera que los peces infectados se vuelven portadores asintomáticos por tiempo indefinido (Ahne & Thomsen 1986, Bootland *et al.*, 1991).

La infección causada por el virus se caracteriza, externamente, por abultamiento de la zona abdominal, natación errática y circular por sobre un eje longitudinal o bien permanencia de los peces infectados en la parte inferior del tanque, producción de deposiciones mucosas o pseudofecas, decoloración de las agallas y oscurecimiento del cuerpo. Puede ocurrir también que sobrevenga la muerte del pez, sin el desarrollo de algunos o todos estos signos (Dorson 1982, Quaglio1989).

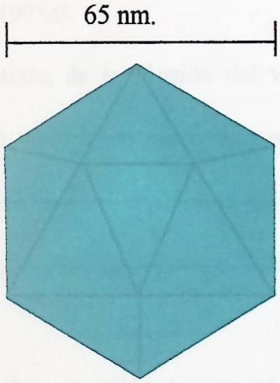
El virus es relativamente sensible a la temperatura, ya que puede infectar entre los 5,5-26 °C, pero su temperatura óptima es de aproximadamente 20°C. Se transmite a través de agua contaminada, equipos, alimentos, aves, parásitos hematófagos y peces portadores asintomáticos por fecas y transmisión vertical (Schlotfelt *et al.*, 1995). Desde el agua o elementos contaminados, la infección ocurre por incorporación a través de las agallas y boca, en tanto que la transmisión vertical se asocia con la cubierta de las ovas (Quaglio1989).

Morfología

Pertenece a la familia *Birnaviridae* [que fue separada de los Reovirus (Kelly & Loh 1972, Dobos *et al.*, 1979)], y al género *Aquavirnavirus* (Cohen *et al.*, 1973).

El tamaño promedio de los viriones es aproximadamente de 60-65 nm. Tienen simetría icosahédrica (Ôzel & Genderbloom 1985) (figura N°1) y no presentan membrana lipídica (Lightner & Post 1969), por lo cual pertenecen a la categoría de los virus desnudos.

Figura N°1 Representación esquemática de la forma icosahedríca de la cápside



Este virión es uno de los más simples que existe, ya que consta de una cápside, compuesta de 2 proteínas, la cual encapsula dos hebras de RNA bicatenario (RNAds) asociadas a proteínas ligadas al genoma denominadas VPg (Dobos 1977, 1995a).

El IPNV contiene un 8,7% de RNA y un 91% de proteínas. Este 91% consta de 4 proteínas; VP1 o VPg, VP2, VP3 y VP3a (Dobos 1977, 1995a) y actualmente se discute la presencia de una quinta proteína, previamente denominada NS (non structural), en el virus maduro o capaz de infectar (Magyar & Dobos 1994a).

VP1 es una proteína no estructural, de 91 kDa, cuya función tiene relación con la replicación ya que actuaría de partidor (Dobos 1995b), así como también de RNA polimerasa (Peter *et al.*, 1982). Se la puede encontrar asociada al material genómico o separada de éste, es decir que puede o no actuar como VPg o proteína genómica (Magyar *et al.*, 1998).

VP2 es un polipéptido de 60 KDa, que constituye la parte externa de la cápside del virión (Estay *et al.*, 1990) y corresponde a un 62% de su masa total, con 544 unidades por cada virión maduro (Dobos 1977, 1995a).

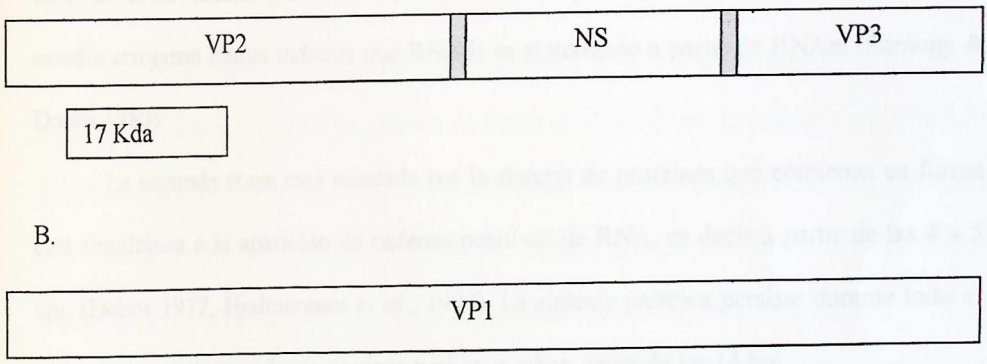
VP3 conforma la parte interna de la cápside del virión (Estay *et al.*, 1990). Se encuentran aproximadamente 550 unidades de ésta proteína en el virus completo, pero debido a su bajo peso molecular, de 30 KDa, constituye únicamente un 32% del peso total del mismo. Esta proteína da origen, mediante clivaje, a un cuarto péptido denominado VP3a (Dobos 1977, 1995a).

Este virus presenta dos hebras de RNA bicatenario, la primera de las cuales es denominada segmento A. Tiene un peso molecular de $2,5*10^6$ KDa y contiene la información para 4 péptidos (figura 2); VP2, NS VP3, y uno de 17 KDa, rico en arginina. (Macdonald & Dobos 1981). Originalmente se desconocía la existencia del cuarto péptido y se planteaba que VP2, VP3 y NS provenían de un RNA policistrónico que originaba un RNA mensajero para cada proteína (Somogy & Dobos 1980). Posteriormente se determinó

que el segmento A (figura 2) del RNA viral contiene dos marcos abiertos de lectura u ORF (Open Reading Frames) sobrepuestos, el primero de los cuales codifica una poliproteína, la cual es posteriormente clivada por una peptidasa viral, a saber, el péptido denominado NS (Duncan *et al.*,1987). Esta poliproteína ha sido visualizada en estudios recientes. El segundo ORF codifica el péptido de 17 KDa. cuya función se desconoce (Magyar & Dobos 1994b, Dobos 1995a).

La segunda cadena, denominada cadena B es de $2,3*10^6$ KDa y codifica la información necesaria para la síntesis de VP1(figura 2).

Figura N° 2. Proteínas codificadas por los segmentos A y B del RNA Viral



El ciclo infectivo de IPNV consta de varias fases. La primera de ellas consiste en la unión del virus activo a la superficie celular para lo cual interactúa con receptores específicos en la membrana de la célula y luego es endocitado en forma de vesícula (Kuznar *et al.*, 1995). Dicha vesícula libera, mediante un mecanismo desconocido, el virión

al citoplasma donde tiene lugar el ciclo replicativo (Espinoza 1997). La siguiente fase es la síntesis de las proteínas y material genético viral, y el último paso es el ensamblaje de estos elementos para formar el virión completo.

Replicación

El proceso replicativo del virus ocurre en el citoplasma de la célula infectada (Malsberg & Cernini 1962) y puede separarse en 3 etapas.

La etapa primaria, caracterizada por la síntesis activa de RNA viral, comienza con la aparición de cadenas positivas de RNA (RNAss) en el citoplasma. En un estudio previo se observó RNA 24S (RNAss) de origen viral a partir de las 4 horas post infección (hpi) y de RNA de doble cadena (RNAds.) a partir de las 6 hpi. Experimentos realizados en dicho estudio arrojaron claros indicios que RNAds es sintetizado a partir de RNAss (Somogy & Dobos 1980).

La segunda etapa está marcada por la síntesis de proteínas que comienza en forma casi simultánea a la aparición de cadenas positivas de RNA, es decir a partir de las 4 a 5 hpi. (Dobos 1977, Hjalmarsson *et al.*, 1999). La síntesis proteica persiste durante todo el ciclo viral pero decrece hacia tiempos tardíos, a saber, cerca de las 14 hpi.

En la tercera etapa se produce el ensamblaje de las proteínas virales entre sí y con RNA para conformar los viriones maduros, finalizando con la lísis de las células y posterior liberación de los mismos.

Ensamblaje

Como producto de la replicación del virus se obtienen proteínas y material genético viral. El proceso de ensamblaje es el mecanismo por el cual dichas especies interactúan entre sí de manera coordinada para dar origen a un virión maduro o capaz de infectar. La forma y momento en que se unen las proteínas y el material genético de IPNV son, hasta el momento, desconocidas y constituyen el motivo de este estudio.

En base a la información existente relativa a la morfogénesis de virus con características comunes a IPNV (reovirus y poliovirus), así como trabajos relacionados a las proteínas y material genético del mismo, se proponen dos modelos de ensamblaje.

MODELO 1

El primer modelo de ensamblaje corresponde a aquel postulado para reovirus, que al igual que birnavirus, presenta su genoma en forma de RNA de doble cadena (lo que indujo a los investigadores a clasificar a IPNV dentro de dicho grupo filogénetico). Sin embargo, este virus posee 10-12 segmentos de RNA, una cápside compuesta de tres capas proteicas icosahédricas y un número mucho mayor de proteínas (10-13) (Nilbert *et al.*, 1996).

Se ha demostrado tanto para reovirus como para rotavirus, ambos pertenecientes a la familia *Reoviridae*, que el proceso morfogenético comienza con la síntesis de moléculas de RNA de cadena simple (RNAss), a las cuales se asocian proteínas no estructurales, la polimerasa viral (VP1) y posteriormente, proteínas de la capa interna de la cápside. Estas uniones resultan en la formación de complejos replicativos dentro de los cuales se sintetiza

RNAds a partir de RNAss. El proceso finaliza con la liberación gradual de las proteínas no estructurales teniendo como resultado la formación de partículas virales que contienen RNAds encapsulado por una cápside simple (de dos capas de proteínas), que son de estructura similar a IPNV (Gallegos & Patton 1989, Antzak & Joklik 1992). Este proceso se ha denominado modelo para el ensamblaje de partículas de cápside simple.

Dado que los reo y rotavirus son más complejos que IPN, su proceso morfogénetico no concluye hasta que las proteínas constituyentes de la capa externa son acopladas a la partícula viral de capa simple. Por otra parte ambos virus poseen entre 4 y 5 proteínas no estructurales las cuales, pese a no realizar directamente la replicación del genoma, se asocian a éste asegurando que cada partícula replicativa contenga todas las hebras de RNAds (entre 10 y 12) y sea capaz de realizar la replicación (Poncet *et al.*, 1993, Aponte *et al.*, 1996).

En estudios recientes realizados en IPNV, se ha observado que VP3 se asocia al RNA viral (Hjalmarsson *et al.*, 1999) y se han aislado complejos RNA-VP3 en células lisadas por la progresión de la infección viral (Hjalmarsson & Everitt 1999).

En base a esta información y los modelos de ensamblaje de partículas de cápside simple de reo y rota virus se puede postular el siguiente modelo de ensamblaje:

Hebras de RNAss se unen a VP3 y VP1 formando complejos replicativos los cuales sintetizan RNAds a partir de RNAss. Una vez concluida la síntesis de RNAds se incorpora VP2 en forma gradual. El ensamblaje concluye cuando esta proteína encapsula completamente los complejos replicativos.

MODELO 2

Experimentos realizados en rotavirus han demostrado que una de las proteínas de la capa interna de la cápside de este virus (VP2) tiene la facultad de autoensamblarse formando cápsides vacías y agregados proteicos *in vitro* (Labbé *et al.*, 1991). Estos agregados pueden adquirir diversas formas debido a cambios estructurales reversibles en las partículas individuales de VP2 (Zeng *et al.*, 1994). Trabajos recientes, realizados en IPNV han demostrado la presencia de agregados de VP2 en la célula infectada (Espinoza *et al.*, 2000).

Por otra parte se ha observado en polivirus (un virus cuyo material genético consiste de RNAss y que carece de membrana), que proteínas de la cápside se unen formando pentámeros asociados a sistemas membranosos de origen celular (Pfister *et al.*, 1992). Se ha determinado que estos pentámeros tienen una participación activa en el encapsulamiento del RNA viral (Pfister *et al.*, 1995).

A partir de ésta información y la capacidad de VP2 (tanto en rotavirus como en IPNV) de formar agregados, se puede proponer un segundo modelo morfogenético: Al igual que en el modelo anterior, VP3 se asocia a RNA formado complejos nucleoproteicos. Simultáneamente VP2 forma agregados que paulatinamente van incorporando unidades de ésta proteína hasta conformar procápsides. Finalmente, cuando las procápsides se encuentran completas incorporan los complejos VP3- RNA maduros.

Enfoque experimental

Para discernir cual de estos modelos de ensamblaje representa mejor la morfogénesis de IPNV se pretende emplear un enfoque experimental cuyo fundamento se describe a continuación.

La inmunoprecipitación es un método que permite capturar, desde una muestra poliproteica, un antígeno específico (figura 4). Al capturar una determinada proteína se obtiene de igual manera cualquier otro elemento que se encuentre asociada a ésta en el momento de la captura.

En trabajos anteriores realizados en este laboratorio se establecieron las condiciones para inmunoprecipitar proteínas virales y se obtuvieron resultados preliminares relativos a la unión de proteínas virales y celulares (Reyes 1996, Pérez 1998). Aprovechando esta información se pretende precipitar, separadamente, las proteínas virales VP2 y VP3, en diferentes momentos de la infección. Dichos momentos se eligieron de forma tal, que fuesen lo más representativos de los hechos clave dentro del desarrollo de la infección.

Por ello se optó por inmunoprecipitar en las siguientes etapas: comienzo de la síntesis de RNA de doble cadena (7 hpi), declinación en la síntesis de RNA de doble cadena (13 hpi), aparición de las primeras partículas maduras (15 hpi) y tiempos intermedios (9 y 11 hpi) (Dobos 1977, Somogy & Dobos 1980).

De acuerdo al momento de aparición de complejos proteicos, así como su composición relativa, se pretende obtener evidencia relevante sobre el proceso morfogenético y definir cual de los modelos planteados resulta más representativo.

HIPOTESIS

Hipótesis de trabajo

- Mediante la inmunoprecipitación es posible aislar complejos poliproteicos cuya aparición temporal y composición permite determinar aspectos importantes de la morfogénesis del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV).

Hipótesis alternativa

- La inmunoprecipitación permite determinar la existencia de complejos poliproteicos virales en células infectadas con el virus de la necrosis pancreática infecciosa, pero no establecer si éstos son parte relevante en la secuencia morfogenética del virión.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Identificar y caracterizar, a través de la inmunoprecipitación de las proteínas de la cápside (VP3 y VP2), los intermediarios morfogenéticos del virus de la necrosis pancreática infecciosa.

Objetivos específicos

- Establecer la factibilidad de visualizar separadamente las proteínas virales de las celulares mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (P.A.G.E.) efectuadas a lisados de células CHSE-214 infectadas con IPNV.

- Inmunoprecipitar complejos de proteínas virales desde lisados de células CHSE-214, infectadas con IPNV.

- Caracterizar la composición proteica de los inmunoprecipitados obtenidos en diferentes momentos del ciclo infectivo del virus.

- Proponer un modelo preliminar de la secuencia de interacción de las partículas involucradas en la morfogénesis del virus IPN.

MATERIALES

MATERIALES BIOLOGICOS

Células.

Línea celular CHSE-214 (Chinook Salmon Embryo) (ATCC CRL 1681) correspondiente a células embrionarias epiteliales de *Oncorynchus tschawyscha.*

Virus.

Serotipo VR299 (Espinoza *et al.*, 1985) del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa en forma de inóculos, con títulos entre $1* 10^7$, y $1* 10^8$ UPF/ml (unidades formadoras de placa/ml.), obtenidos en el Laboratorio de Virología de la Universidad de Valparaíso.

Anticuerpos.

Dos anticuerpos monoclonales, IgG2a anti VP3/3a (Am1) e IgG2b anti VP2 (Am14), producidos en ratón, en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Lund, Suecia.

Anticuerpo policlonal producido en conejo en el Laboratorio de Virología de la Universidad de Valparaíso.

IgG anti ratón (Molécula completa) (Sigma) conjugado con fosfatasa alcalina producido en conejo.

IgG anti ratón (molécula completa) (Sigma) conjugado con peroxidasa producido en cabra.

IgG anti conejo (molécula completa) (Sigma) conjugado con fosfatasa alcalina producido en cabra.

REACTIVOS

Cultivos celulares.

Medio mínimo esencial Eagle (MEM)	(Sigma)
Medio deficiente en Metionina.	(Sigma)
Suero Fetal Bovino.	(Sigma)
Gentamicina	(Laboratorio Chile)
Bicarbonato de Sodio	(Sigma)
Actinomicina D	(Calbiochem)

Electroforesis.

SOLUCION STOCK ACRILAMIDA BISACRILAMIDA:

Acrilamida	(Merck)
N.N'-metil-bis-acrilamida	(Sigma)
Agua destilada	

TAMPON SEPARADOR:

Trizma-HCl	1,5 M pH 8,8	(Sigma)
Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)	0,4% p/v	(Sigma)

TAMPON CONCENTRADOR:

Trizma-HCl	0,5 M pH 8,8	(Sigma)
SDS	0,4 % p/v	(Sigma)

TAMPON DE CORRIDA:

Trizma OH	0,5 M pH 6,8	(Sigma)
SDS	0,4 % p/v	(Sigma)

TAMPON DE RUPTURA:

Trizma HCl	0,02 M pH 6,8	(Sigma)
SDS	1,0 % p/v	(Sigma)
Glicerol	10 % v/v	(Merck)
2-ßmercaptoetanol	2,0 % p/v	(Sigma)
Azul de bromafenol	0,001 % p/v	(Sigma)

GEL SEPARADOR 12%:

Solución stock Acrilamida/bisacrilamida	3 ml.	
Agua destilada	3 ml.	
Tampón Separador	2 ml.	
APS (Persulfato de amonio) (al 1% en solución acuosa).	45 µl.	(Sigma)
TEMED (N,N,N',N-tetrametilendiamina)	15 µl.	(Sigma)

GEL CONCENTRADOR:

Sol. Acrilamida-bisacrilamida	750 µl.	
Agua destilada	1,25 ml.	
APS (Sol. acuosa)	15 µl.	(Sigma)
TEMED	5 µl	(Sigma)

Tinción Geles

AZUL DE COOMASIE:

Azul brillante R 250	(Sigma)
Acido Acético Glacial	(Merck)
Etanol	(Merck)
Agua destilada	

NITRATO DE PLATA:

Etanol	(Merck)
Acido Acético Glacial	(Merck)
Agua desionizada	(Laboratorio Control de calidad Universidad Católica de Valparaíso)
Solución Nitrato de Plata	(Sigma)
Solución reveladora 1	(Sigma)
Solución reveladora 2	(Sigma)
Solución reductora A	(Sigma)
Solución reductora B	(Sigma)
Solución reductora C	(Sigma)

Secado de geles

Film plástico transparente	(Europlas)
Papel filtro N°1	(Whatman)

Inmunoprecipitación

TAMPON DE LISIS:

NaCl	150 mM	(Merck)
NP-40	1 % v/v	(Sigma)
Trizma base (OH)	50 mM pH 7,6	(Sigma)
Floruro de Fenilmetilsulfonilo	1mM	(Sigma)

TAMPON FOSFATO SALINO:

NaCl	1,37 mM	(Sigma)
KCl	2,68 mM	(Merck)
Na_2HPO_4	8,10 mM	(Merck)
KH_2PO_4	1,47 mM	(Merck)

SOLUCION PROTEINA A-SEFAROSA:

Proteína A-Sefarosa	200 µl	(Pierce)
Agua destilada	800 µl	

Western blot

Filtro de papel N°1		(Whatman)
Nitocelulosa		(Hibond)

TAMPON DE TRANSFERENCIA:

Etanol		(Sigma)
Agua destilada		
Trizma Hcl		(Sigma)

TAMPON FOSFATASA ALCALINA:

NaCl		(Backer)
MgCL2		(Merck)
Trizma OH		(Sigma)

SOLUCION NBT:

Sal disódica NBT (Nitro-Blue-tetrazolium-Chloride)	0,5 grs.	(Amresco)
Dimetilformamida	7 ml.	(Sigma)
Agua destilada	3ml.	

SOLUCION BCIP:

Sal disódica BCIP (5-Bromo-4Chloro-3Inadylyl-Phosphate)	0,5 grs.	(Amresco)
Dimetilformamida	10 ml.	(Sigma)

SOLUCION DE BLOQUEO:

Leche descremada	5grs.	(Nestlé)
PBS (Buffer fosfato salino)	100ml	

Quimioluminiscencia

Solución reveladora Luminol	(Pierce)
Solución de Peroxidasa estable	(Pierce)
Película Autorradiográfica Hyper ßmax	(Amershamm)
Revelador para películas de rayos X	(Kodak D197D72)

Marcación Isotópica

Metionina $-S^{35}$ (Neg-072; 73%L-Met-S^{35} y 22 % L-Cist-S^{35})	(NEN)
Película Autorradiográfica Hyper ßmax	(Amershamm)
Revelador para película de rayos X	(Kodak D19/D72)
Acido Tricloroacético (TCA)	(Merck)

Material de plástico

Placas Petri de 35 mm de diámetro	(NUNC)
Pacas Petri de 60 mm de diámetro	(NUNC)
Multiplacas de 24 pocillos	(Costar)
Botellas de cultivo de 50 ml	(Falcon)
Botellas de cultivo de 75 ml	(Falcon)

EQUIPOS

Cámara de flujo laminar.	(Factomed)
Microscopio óptico	(Leitz)
Balanza analítica	(Sartorius)
Medidor de pH digital	(Beckman 3560)
Minifuga	(Beckman L2-65B)
Centrífuga refrigerada	(Sorval)
Contador Geiger	(Technical Associates)
Contador de centelleo líquido	(Beckman LS1800)
Celda de electroforesis Mini-Protean II	(Bio-Rad)
Secador de geles laminares	(Bio-Rad)
Cámara semi seca de transferencia de geles	
Casette para placas autorradiográficas.	

Agitador	(Thermoline)
Agitador Magnético	(Thermoline)
Cámara de cultivo de 20 °C	(Trotter)
Bomba de vacío	(Jencons)
Micropipeta de 5-50 µl	(Finnpipette)
Micropipeta de 5-200 µl	(Gilson)
Micropipeta de 10-1000 µl	(Gilson)

METODOS

Células y cultivos celulares.

Para determinar los diferentes aspectos de la biología del virus de la necrosis pancreática infecciosa, se emplearon células embrionarias de salmón CHSE-214 (Chinook salmon embryo). Estas células fueron adquiridas de laboratorios comerciales y se cultivaron mediante el método descrito por Fryer *et al.*, en 1965.

Células provenientes de botellas de cultivo fueron despegadas de las mismas mediante el uso de tripsina al 0,1% en buffer fosfato salino (PBS). Luego se retiró este tampón, se reemplazó por medio mínimo esencial eagle (MEM) y se agitó violentamente la botella a fin de lograr el desprendimiento de las células.

Una vez desprendidas, en una cámara de flujo laminar, se vertió el contenido de la botella de cultivo en placas petri de 35 y 60 milímetros de diámetro, o en botellas de cultivo de 50 ml de capacidad, según la finalidad y el número total de células requeridas para cada experimento.

Finalmente se dejaron las placas y/o botellas de cultivo en una cámara de cultivo a una temperatura de 20 °C durante al menos 24 horas y hasta 48 horas, dependiendo de la concentración en que se encontraban las células en el MEM, a fin que desarrollaran monocapas celulares sobre la superficie de las placas o botellas.

Inoculación

Monocapas de células CHSE-214, en estado sub confluente (90% de confluencia), fueron infectadas con serotipo VR-299 de virus de la necrosis pancreática infecciosa aislado en Chile (Espinoza *et al.*, 1985), previo retiro y cambio del medio mínimo esencial llevando la botella o placa hasta un volumen final de 0,5-1,5 ml. Se le agregó, a cada botella o placa, un volumen de inóculo viral de 30-50 µl con un título de $3,5 * 10^7 - 3,5*10^8$ UPF/ml. Posteriormente se procedió a agitar las placas suavemente, en una bandeja agitadora, durante una hora, el final de la cual se consideró como inicio de la infección.

Lisado de las monocapas

Según el propósito para el cual fueron cultivadas y el tiempo de infección al que se sometieron las muestras, se realizaron tres métodos de lisis diferentes.

Algunas de las células se cultivaron a fin de elaborar muestras celulares lisadas por la progresión de la infección viral. Dichas células fueron expuestas a tiempos de infección superiores a las 48 horas. Durante tal período, la infección viral cumplió con todo su ciclo por lo cual el virus lisó las células de manera que no fue necesario aplicarles mayor tratamiento que una agitación violenta a fin de remover las pocas células que pudieran haber quedado adheridas a la superficie de la botella o placa de cultivo y para romper los agregados celulares que puedan haber quedado en suspención. Una vez que fueron agitadas, las muestras se procesaron como se describirá más adelante.

Otras muestras fueron cultivadas a fin de obtener información relativa a su contenido proteico de manera que, una vez concluido el período de infección correspondiente, se procedió a congelarlas y descongelarlas en el MEM en que fueron cultivadas. El congelamiento se llevó a cabo a -20 grados °C y el descongelamiento a temperatura ambiente (15-20 °C, app.). El proceso se repitió tres veces después de lo cual las muestras fueron procesadas.

El tercer tratamiento de lisis se efectuó en las muestras destinadas a la inmunoprecipitación para lo cual se empleó el detergente no iónico NP-40 (Sigma). Una vez finalizadas las correspondientes horas de infección se procedió a vaciar el MEM contenido en las botellas y/o placas de cultivo y seguidamente se adicionaron 1,5 ml de tampón de lísis a 4°C.

Las muestras se incubaron con dicho tampón durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación constante luego de lo cual se procedió a alicuotar el contenido en tubos Eppendorff de 1,5µl dosificando 500 µl por tubo y obteniendo así tres tubos por cada muestra.

Electroforesis

FUNDAMENTOS DE LA TECNICA

La electroforesis de proteínas se basa en la separación de las mismas de acuerdo a su peso molecular, mediante la aplicación de un campo eléctrico dentro de un gel separador (Laemmli 1970).

Al combinar acrilamida/bisacrilamida con determinados reactivos, se logra que la soluciones así constituidas polimericen, originando un gel compuesto de dos fases. La primera de ellas es el gel concentrador el cual, debido a su pH, agrupa las proteínas contenidas en la muestra. La segunda fase está constituida por un gel separador cuyo pH, diferente al del gel de stacking, permite la separación de estas proteínas.

Las muestras cuyo contenido proteico se intenta separar son tratadas con un tampón de ruptura el cual contiene dodecil sulfato sódico (SDS) y ß mercapto estanol que, además de romper los enlaces entre las proteínas, les confiere una carga negativa. Para asegurar que la ruptura de los enlaces proteicos sea completa, se someten las muestras con el tampón de ruptura a un período de calentamiento.

Las muestras así tratadas son posteriormente ubicadas en pocillos especialmente preparados en la parte superior del gel (figura 3). El gel es seguidamente depositado en una cámara cuyo diseño determina que la parte superior del mismo se encuentre en contacto con un compartimento separado de aquel que se encuentra en contacto con su parte inferior. Ambos compartimentos son llenados con un tampón de corrida el cual tiene la particularidad de ser buen conductor de electricidad y que además posee un pH de 7,6.

Finalmente se aplica un campo eléctrico a la cámara de electroforesis asegurando que la polaridad del mismo determine que el polo negativo se encuentre en contacto con la parte superior del gel y el polo positivo con la inferior. De ésta manera las proteínas que, como se especificó anteriormente, se encuentran cargadas negativamente, migran desde la parte superior a la parte inferior del gel (figura3).

Esta migración se ve obstaculizada por el diámetro de poro del gel separador empleado, parámetro dependiente del porcentaje de acrilamida/bisacrilamida utilizado en la solución y determinado por el investigador de acuerdo del rango de tamaño de las proteínas que se pretenda separar.

Tal obstaculización causa que las proteínas de menor tamaño migren con más rapidez que aquellas de mayor tamaño. De esta manera, luego de un determinado tiempo de aplicación del campo eléctrico, las proteínas son separadas por tamaño, quedando las de menor peso molecular más cerca de la parte inferior del gel, en tanto aquellas con mayor peso molecular se ubican más próximas al origen del mismo.

APLICACION DE LA TECNICA

Los lisados celulares obtenidos mediante los procedimientos antes descrito fueron sometidos a electroforesis en geles de acrilamida/bisacrilamida al 12%. Para ello se empleó la metodología descrita por Laemmli (1970).

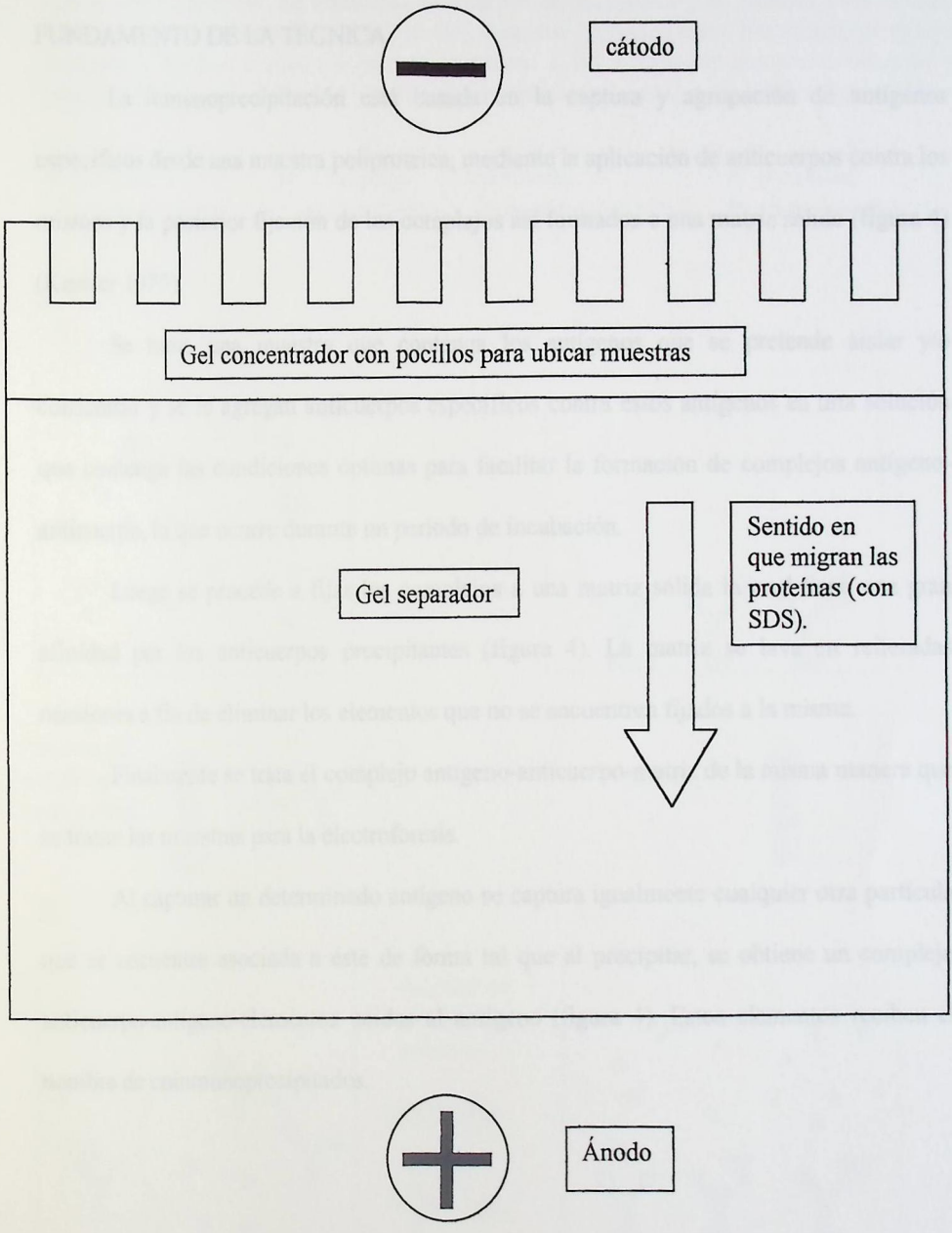
Se utilizaron 3 ml de una solución stock de acrilamida/bisacrilamida al 30%. Dicha solución fue diluida en 3 ml de agua destilada y 2 ml de tampón separador. Se le agregaron 45 µl de persulfato de amonio (APS) al 1% y 15 µl de T.E.M.E.D. (N,N,N',N-tetrametilendiamina).

La solución así constituida fue vertida en un molde Bio Rad y se la dejó polimerizar durante 40 minutos. Luego se elaboró una solución consistente en 0,75 ml de solución stock de acrilamida/bisacrilamida, 3 ml de agua destilada, 1,25 ml de tampón de stacking, 15 µl de solución de APS y 5 µl de T.E.M.E.D. Esta solución fue vertida sobre el molde que contenía el gel separador ya polimerizado y luego se ubicó, en la parte superior del gel, una peineta con el propósito de formar los pocillos que contendrían las muestras.

Posteriormente se dejó polimerizar el gel durante 40 minutos. Una vez que ambas porciones del gel se encontraron polimerizadas, se procedió a agregar las muestras previamente tratadas con tampón de ruptura y calentadas en agua hirviendo durante 3 minutos. Una vez enfriadas, las muestras fueron cargadas en el gel, mediante el uso de una micropipeta, aplicando 30 µl por carril.

Finalmente se sumergió el molde con el gel en una cámara con tampón de corrida la cual se conectó a una fuente de poder Bio Rad. Se le aplicaron 160 volts durante 60 minutos y luego se procedió a tratar el gel resultante.

Figura N°3. Representación esquemática de un gel de poliacrilamida para electroforesis de proteínas.



Inmunoprecipitación

FUNDAMENTO DE LA TECNICA

La inmunoprecipitación está basada en la captura y agrupación de antígenos específicos desde una muestra poliproteica, mediante la aplicación de anticuerpos contra los mismos y la posterior fijación de los complejos así formados a una matriz sólida (figura 4) (Kessler 1975).

Se toma una muestra que contenga los antígenos que se pretende aislar y/o concentrar y se le agregan anticuerpos específicos contra estos antígenos en una solución que contenga las condiciones óptimas para facilitar la formación de complejos antígeno-anticuerpo, la que ocurre durante un período de incubación.

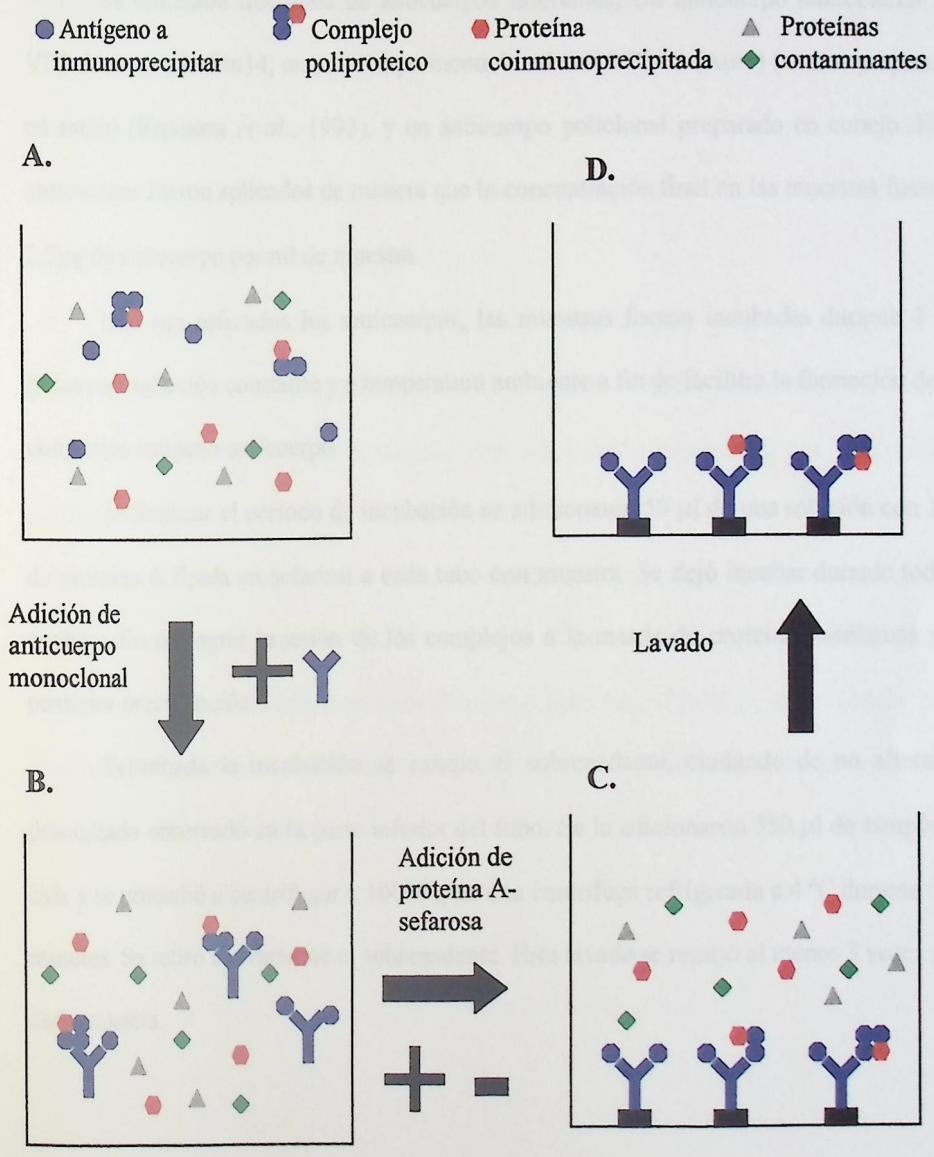
Luego se procede a fijar los complejos a una matriz sólida la cual tiene una gran afinidad por los anticuerpos precipitantes (figura 4). La matriz se lava en reiteradas ocasiones a fin de eliminar los elementos que no se encuentren fijados a la misma.

Finalmente se trata el complejo antígeno-anticuerpo-matriz de la misma manera que se tratan las muestras para la electroforesis.

Al capturar un determinado antígeno se captura igualmente cualquier otra partícula que se encuentre asociada a éste de forma tal que al precipitar, se obtiene un complejo anticuerpo-antígeno-elementos unidos al antígeno (figura 4). Estos elementos reciben el nombre de coinmunoprecipitados.

Figura N°4. Representación esquemática de la inmunoprecipitación de proteínas y complejos proteicos.

La figura 4A corresponde a la muestra poliproteica donde se encuentra el antígeno que se desea precipitar. Se adicionan anticuerpos monoclonales y se incuban para obtener complejos antígeno-anticuerpo (figura 4B). Una vez formados estos complejos, se agrega proteína A fijada en sefarosa la cual se asocia a los complejos proteína-anticuerpo y precipita (figura 4C). Se lava la muestra eliminando las proteínas no deseadas (figura 4D).



APLICACION DE LA TECNICA

Los productos de los lisados celulares contenidos en los tubos Eppendorff fueron tratados de la siguiente manera (Kessler 1975, Thurston & Henley 1988); Se les agregaron anticuerpos cuya naturaleza dependió del propósito específico del experimento.

Se utilizaron tres tipos de anticuerpos diferentes; Un anticuerpo monoclonal anti VP2 denominado Am14, un anticuerpo monoclonal anti VP3/3a (Am1) (ambos preparados en ratón) (Espinoza *et al.*, 1993), y un anticuerpo policlonal preparado en conejo. Estos anticuerpos fueron aplicados de manera que la concentración final en las muestras fuese de 2,5µg de anticuerpo por ml de muestra.

Una vez aplicados los anticuerpos, las muestras fueron incubadas durante 1 a 2 horas con agitación constante y a temperatura ambiente a fin de facilitar la formación de los complejos antígeno-anticuerpo.

Al finalizar el período de incubación se adicionaron 50 µl de una solución con 10% de proteína A fijada en sefarosa a cada tubo con muestra. Se dejó incubar durante toda la noche a fin de lograr la unión de los complejos a la matriz de proteína A-sefarosa y su posterior precipitación.

Terminada la incubación se extrajo el sobrenadante, cuidando de no alterar el precipitado observado en la parte inferior del tubo. Se le adicionaron 350 µl de tampón de lísis y se procedió a centrifugar a 10000 g en una centrífuga refrigerada a 4 °C durante 5-10 minutos. Se retiró nuevamente el sobrenadante. Este lavado se repitió al menos 3 veces para cada muestra.

Al final del último lavado, se retiró el sobrenadante procurando eliminar la mayor cantidad del mismo sin alterar el precipitado. Seguidamente se aplicó el mismo tampón de ruptura descrito para la electroforesis y se calentó a bañomaría durante 3 minutos. Se esperó hasta que se enfriara y se procedió a centrifugar a 10.000 g durante 3 minutos para finalmente retirar el sobrenadante y someterlo a electroforesis.

Western blot

FUNDAMENTO DE LA TECNICA

Esta técnica se basa en la transferencia de bandas proteicas desde un gel electroforético a una matriz fijadora, mediante la aplicación de un campo eléctrico. Una vez en la matriz, las proteínas son tratadas con anticuerpos específicos (ya sea mono o policlonales) que reconocen uno o más antígenos objetivo.

Hay dos formas de detectar antígenos desde la nitrocelulosa. En la detección directa se adicionan anticuerpos específicos contra el o los antígenos que se desea detectar conjugados con una enzima (fosfatasa alcalina o peroxidasa) la cual, en presencia de un determinado substrato, genera una reacción cromática observable. En el caso de la detección indirecta un anticuerpo secundario unido a una enzima reconoce al anticuerpo primario dirigido contra el antígeno objetivo.

APLICACION DE LA TECNICA

En el presente trabajo se transfirieron las bandas de proteínas virales conjuntamente con las proteínas celulares, obtenidas mediante electroforesis, a matrices de nitrocelulosa.

Las transferencias se realizaron en una cámara semi seca. Para ello, se lavaron los geles a ser transferidos y las matrices de nitrocelulosa en agua destilada.

Se ubicaron en la parte inferior de la cámara de transferencia, 3 láminas de papeles filtro Whatman N°1 previamente empapados con tampón de transferencia. Sobre estos se ubicó la nitrocelulosa y luego el gel. Sobre éste se pusieron otras tres capas de papel secante empapado de tampón de transferencia.

Finalmente se cerró la cámara y se aplicó un campo eléctrico de 50 mA durante 45 minutos. Se cuidó que el campo eléctrico estuviese orientado de manera que el polo positivo se encontrase bajo la nitrocelulosa y el polo negativo se ubicase sobre el gel de a fin que, al migrar las proteínas del polo negativo al positivo, fueran transferidas a la nitrocelulosa.

Una vez que las proteínas fueron transferidas, se realizó un bloqueo de los sitios restantes de la nitrocelulosa. Para ello, la matriz de nitrocelulosa se mantuvo toda la noche en una solución de leche descremada al 5% en PBS. El propósito de este paso fue lograr que los anticuerpos reveladores no se unieran a sitios inespecíficos de la nitrocelulosa aparte de aquellos en que se encontraban las bandas de proteínas a identificar ya que la nitrocelulosa fija cualquier tipo de proteínas.

Luego, la nitrocelulosa se incubó con anticuerpos monoclonales durante 90 minutos con agitación constante, empleándose alternativamente Am1 y Am14 dependiendo del

propósito del experimento. También se usó un suero policlonal como fuente de anticuerpos primarios

Cuando se emplearon anticuerpos monoclonales se utilizó un anticuerpo secundario anti ratón producidos en cabra, conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma).

En el caso de los experimentos tratados con anticuerpo policlonal se utilizó un anticuerpo anti conejo desarrollado en cabra y conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma). Ambos anticuerpos secundarios se aplicaron en una concentración de 1µg/ml.

Terminada la aplicación de los anticuerpos secundarios se procedió a sumergir el blot en una solución reveladora, compuesta de las sales NBT y BCIP (Pierce) en dimetil formamida (Sigma) disueltas en tampón con fosfatasa alcalina, durante 45 minutos o hasta que las bandas se hicieron claramente identificables.

Quimioluminiscencia

Es una forma de Western blot que difiere únicamente en que la enzima reveladora reacciona con un substrato que contiene fotósforos de manera que, en lugar de generar una señal cromática, emite luz, la cual es captada en una película autorradiográfica, lo que le confiere una mayor sensibilidad.

La transferencia de las proteínas a la nitrocelulosa, el bloqueo de la misma mediante leche descremada y la incubación con ambos anticuerpos primarios se llevó a cabo según lo descrito en el protocolo de Western blot. Para este reactivo se empleó PBS con 0.005% Tween 20, como tampón de lavado.

Se incubó durante 1 hora con un anticuerpo anti ratón desarrollado en cabra conjugado con peroxidasa, ya que el substrato empleado reacciona con esa enzima. Debido a la sensibilidad del método y a fin de reducir el fondo, este anticuerpo fue empleado a una dilución de 1:10.000 de una solución stock con una concentración de 1 mg/ml. Se retiró el anticuerpo y se efectuaron 6 lavados con el tampón antes mencionado.

Posteriormente la nitrocelulosa se incubó durante 5 minutos, en 5 ml de una solución de trabajo compuesta por 50% de solución luminol/enhancer y 50% de solución peroxidasa estable.

Pasado ese tiempo se retiró la nitrocelulosa de la solución de trabajo y se la recubrió con una delgada membrana plástica asegurando que no quedaran burbujas entre ésta y la nitrocelulosa. Este proceso se efectuó rápidamente a fin que la nitrocelulosa no se secara.

Se trasladó la nitrocelulosa recubierta a un cuarto oscuro donde se expuso a una película autorradiográfica por un período de 2 minutos.

Inmediatamente después se procedió a revelar la película para lo cual se sumergió en líquido fijador por 5-10 minutos, se lavó con agua de la llave y finalmente se sumergió de 5-10 minutos en líquido revelador.

Tinción de geles

Una vez que se obtuvieron los geles, se trataron con dos metodología diferentes destinadas a teñir las proteínas contenidas en ellos.

COOMASIE

Las proteínas contenidas en un gel electroforético fueron fijadas mediante la aplicación de una solución de ácido acético y etanol en agua destilada. Luego de fijar las proteínas se procedió a teñir el gel, para lo cual se dejó cerca de 2 horas en una solución cuyo principal componente es el azul brillante de Coomasie R 250 (Sigma). Finalmente se dejó el gel en una solución decolorante durante 48 horas, renovando la misma cada 12 horas

NITRATO DE PLATA

Los geles procedentes de electroforesis fueron dejados en 20 ml de una solución fijadora durante 60 minutos con renovación de la misma cada 20 minutos.

Una vez fijado, el gel se lavó 3 veces con 50 ml de agua desionizada. Cada lavado duró 10 minutos. Seguidamente se aplicaron 50 ml de una solución de nitrato de plata durante 30 minutos.

Posteriormente los geles fueron tratados 2 veces, por 10 minutos cada vez, con una solución reveladora. Finalmente se procedió a lavar los geles con agua corriente por 10 minutos. Los geles teñidos por ambos métodos así como aquellos destinados a la autorradiografía, fueron posteriormente secados.

SECADO DE GELES

Una vez tratados, los geles se ubicaron sobre papel de filtro Whatman N°1 y fueron recubiertos con una membrana plástica. Seguidamente se pusieron en una cámara secadora de geles laminares conectada a una bomba de vacío donde se dejaron por 1 hora.

MARCACION ISOTOPICA

Se cultivaron 4 placas p35 con células CHSE-214 según el método previamente descrito. Una vez que las monocapas celulares se encontraron en un estado de 90% de confluencia, se procedió a retirar el MEM normal y a cambiarlo por MEM carente de metionina. Transcurrida 1 hora, se inocularon 2 placas con IPNV y las 2 restantes con MEM estéril a modo de control.

Se incubó durante una hora, luego de lo cual se retiraron los medios, tanto con inóculo falso como viral, y se adicionó un medio de marcaje compuesto por 5 µl de metionina S^{35} en una solución con 95% de MEM sin metionina y 5% de MEM normal.

Luego de un período de 24 h, se retiró el medio de marcaje y se lavaron las monocapas 3 veces con PBS. Se agregaron 500µl de tampón de lísis (NP40) y se incubó durante 1 hora con agitación constante. Se retiraron los lisados así obtenidos y se pusieron en tubos Eppendorff de 1,5 µl de capacidad, de modo que el contenido de cada p35 quedara en un tubo separado.

Se realizó una inmunoprecipitación según el método descrito con anterioridad empleando Am1, sobre un lisado de células infectadas y uno de no infectadas. Los dos tubos restantes se congelaron a –20 °C

Tanto las muestras obtenidas como producto de la inmunoprecipitación como los lisados celulares fueron sometidos a electroforesis en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 12%.

Los geles así obtenidos fueron secados y posteriormente llevados a un cuarto oscuro donde se ubicaron en un cassette para placas autorradiográficas siendo expuestos a una película autorradiográfica. Luego de un período de exposición de 10 días se procedió al revelado.

RESULTADOS

Proteínas Virales

TECNICA DE TINCION

Al comparar la tinción por Coomasie y nitrato de plata se observó que esta última presenta una sensibilidad mayor sin incremento del fondo. Por tanto, se optó por emplear la tinción con nitrato de plata para los experimentos siguientes (resultados no mostrados).

EN CELULAS INFECTADAS Y NO INFECTADAS

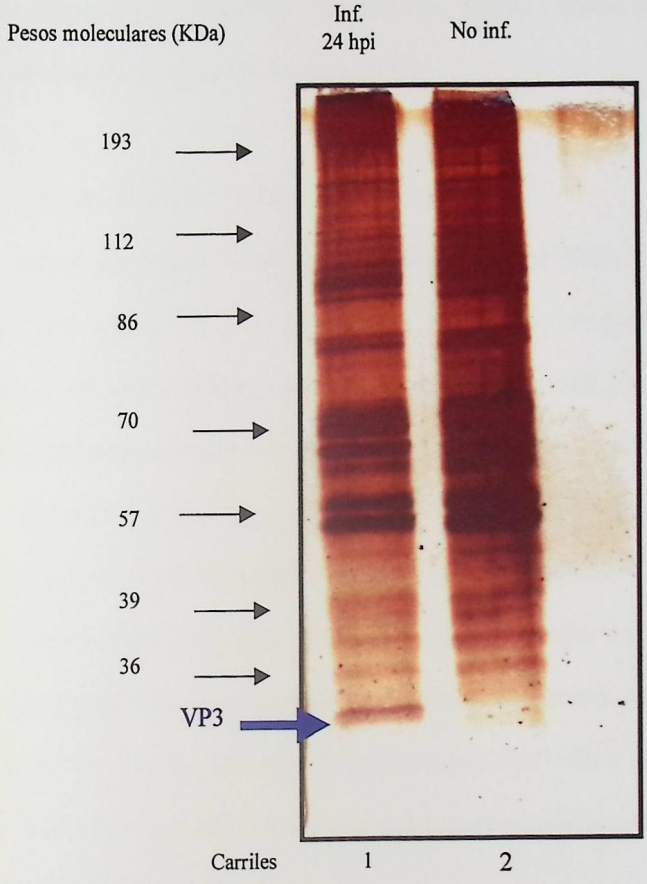
Una vez elegida la técnica de tinción, se procedió a comparar el contenido proteico de una muestra infectada con aquel de una muestra no infectada, en un gel electroforético teñido mediante nitrato de plata, a fin de visualizar proteínas virales sobre un fondo de proteínas celulares (figura 5).

La muestra infectada (Carril 1 = C1) presenta una banda claramente definida a la altura de los 30 KDa que corresponde a la proteína viral VP3, la cual no se observa en la muestra control.

En términos generales, la muestra no infectada exhibe una mayor concentración de proteínas que la muestra infectada. Sin embargo, ésta última presenta al menos una proteína nueva, con respecto a la anterior.

Figura N° 5. Electroforesis de células infectadas y no infectadas.

Comparación entre células CHSE-214 lisadas por la progresión de la infección viral y un lisado de una monocapa de las mismas células no infectadas, reveladas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata.



Inmunoprecipitación de proteínas virales

Para obtener complejos que contienen proteínas virales se empleó la inmunoprecipitación. Inicialmente se efectuaron inmunoprecipitados revelados con nitrato de plata (resultados no mostrados). Sin embargo, debido a que se obtuvo un alto nivel de fondo, se optó por el revelado con western blot.

INMUNOPRECIPITADOS REVELADOS CON Am14

La próxima electroforesis se efectuó para visualizar VP2 y los complejos de los que forma parte (figura 6). Este experimento muestra la comparación realizada entre inmunoprecipitados efectuados en lisados de células infectadas y no infectadas empleando ambos anticuerpos separadamente, revelados mediante western blot con Am14.

Se incluyeron en el gel, a modo de control, un lisado de células infectadas (C5) y un lisado de células no infectadas (C6), ambos sin inmunoprecipitar.

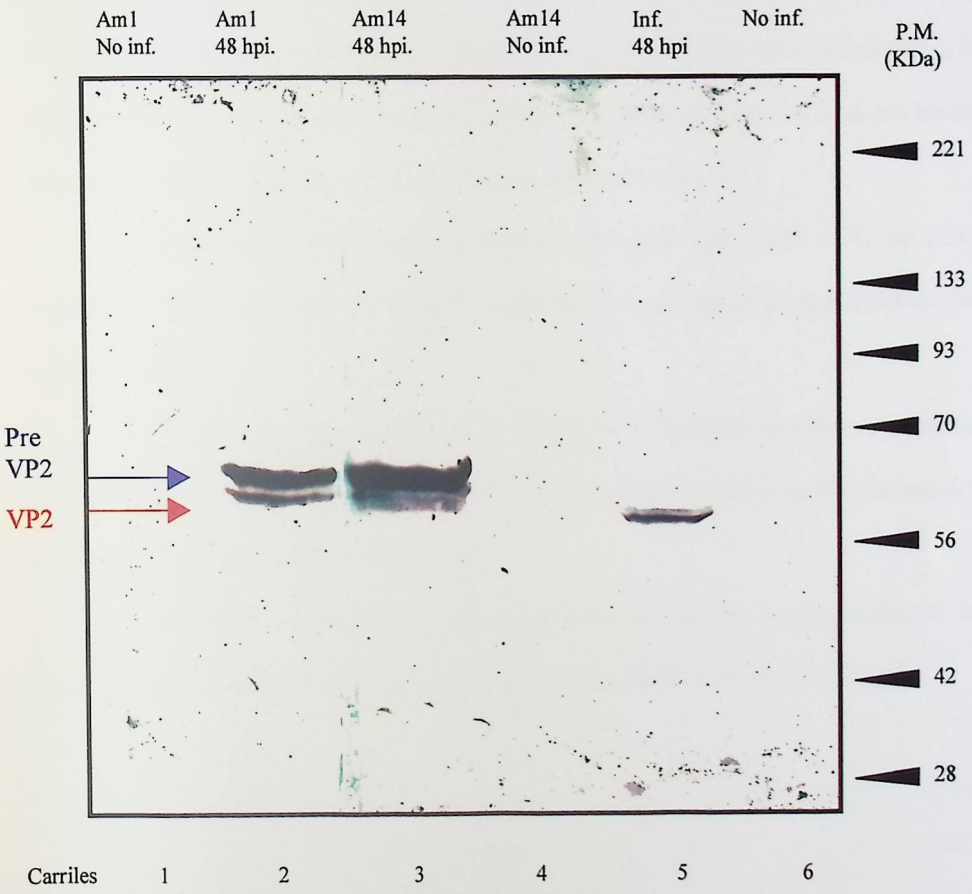
Tanto al inmunoprecipitar lisados de células infectadas con Am1, como con Am14 (C2 y C3 respectivamente), se obtuvieron dos bandas claramente definidas alrededor de los 60 y 63 KDa, las cuales corresponden a la proteína viral VP2 y su precursor PreVP2. El grosor relativo de las bandas sugiere que sé inmunoprecipitó una mayor cantidad de ambas proteínas al emplear Am14.

Al inmunoprecipitar células no infectadas con ambos anticuerpos monoclonales (C1 y C4) no se nota la aparición de banda alguna, al igual que en el carril correspondiente al lisado de células no infectadas que no fue previamente sometido a inmunoprecipitación(C6).

En la muestra de células lisadas por la progresión de la infección viral, sin inmunoprecipitar, se observa la aparición de una única banda correspondiente a la proteína viral VP2 pero no se observa rastro alguno de preVP2 (C5).

Figura N°6. Western blot revelado con Am14.

Western blot en el cual se comparan inmunoprecipitados de células infectadas y no infectadas, realizados con ambos anticuerpos separadamente. Se incluyeron una muestra de células lisadas por el progreso de la infección viral y un lisado de células no infectadas, ambos sin inmunoprecipitar, a modo de control.



INMUNOPRECIPITADOS REVELADOS CON Am1

Se realizó un western blot revelado mediante el empleo de Am1, a fin de observar VP3 y los complejos de los cuales forma parte. En éste experimento se compararon inmunoprecipitados realizados sobre muestras infectadas y no infectadas con ambos anticuerpos monoclonales separadamente, además de una muestra de células lisadas por el progreso de la infección viral, sin inmunoprecipitar (figura N°7).

En el inmunoprecipitado con Am1 de un lisado de células no infectadas se observa la total ausencia de bandas (C1), en tanto, al inmunoprecipitar lisados de células infectadas con el mismo anticuerpo, aparece una banda cerca de los 30 KDa que corresponde a la proteína viral VP3. Por debajo de esta banda (alrededor de los 28 KDa), se nota una banda mucho más tenue la cual corresponde a la cadena liviana de Am1 (C2).

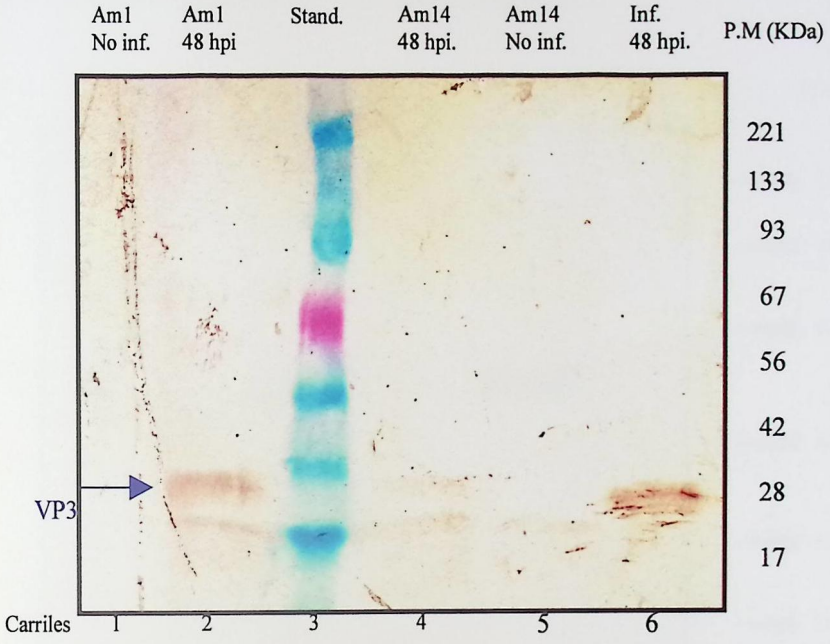
Al inmunoprecipitar un lisado de células infectadas con Am14 (C4), se pudo visualizar la tenue aparición de dos bandas ubicadas a la misma altura que aquellas del segundo carril.

El inmunoprecipitado con Am14 de células no infectadas contiene una banda apenas visible ubicada cerca de los 28 KDa (C5), la cual representa la cadena liviana del anticuerpo empleado para inmunoprecipitar.

Por último, al revelar una muestra de células lisadas por la progresión de la infección viral, sin inmunoprecipitar, se notó la aparición de VP3 en los 30 KDa (C6).

Figura N°7. Western blot revelado con Am1.

Western blot en el cual se comparan inmunoprecipitados de células infectadas y no infectadas, realizados con ambos anticuerpos separadamente. Se incluyó una muestra de células lisadas por la progresión de la infección sin inmunoprecipitar, a modo de control.



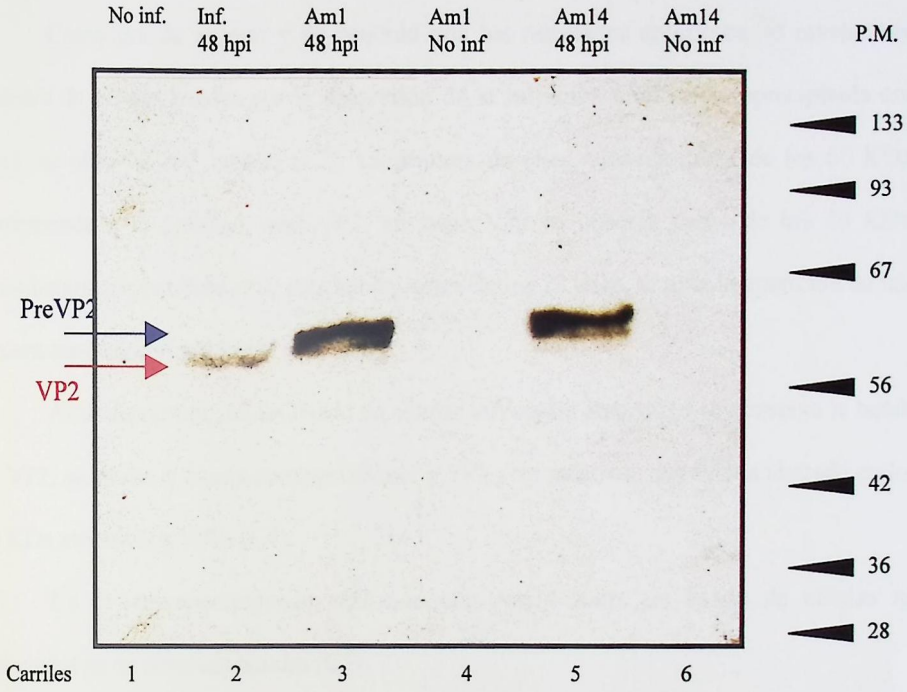
Optimización de la visualización de los inmunoprecipitados.

QUIMIOLUMINICENCIA

Con el propósito de obtener una mayor definición de las bandas proteicas, se probó revelar los western blots con luminol, obteniéndose la figura N°8, en la cual se muestran inmunoprecipitados realizados con Am1 (C3 y C4) y Am14 (C5 y C6) así como un lisado de células infectadas (C2) y no infectadas (C1), revelados sin previa inmunoprecipitación.

Figura N°8. Quimioluminiscencia.

Western blot revelado con Am14, en el cual se comparan inmunoprecipitados de células infectadas y no infectadas, realizados con Am1 y Am14 separadamente, así como un lisado de células no infectadas y una muestra de células lisadas por la progresión de la infección viral, ambos sin inmunoprecipitar. La nitrocelulosa fue revelada mediante Quimioluminiscencia y expuesta a una placa autorradiográfica.



La placa autorradiográfica así obtenida difiere muy poco de la Figura N°6 observándose en los inmunoprecipitados realizados con Am1 y Am14 sobre células infectadas pre VP2 y VP2, y únicamente esta última proteína en la muestra de células lisadas por la progresión de la infección viral, no inmunoprecipitada.

Al igual que en la figura 6 los inmunoprecipitados realizados con ambos anticuerpos sobre células no infectadas no revelan banda alguna.

ANTICUERPOS POLICLÓNALES.

A fin de observar tanto VP2 como VP3 en un mismo gel, se realizaron los mismos inmunoprecipitados que las figuras anteriores pero esta vez se revelaron mediante el empleo de anticuerpos policlonales contra todas las proteínas virales (figura 9).

Como era de esperar y de acuerdo con los resultados anteriores, al revelar una muestra de células lisadas por la progresión de la infección viral inmunoprecipitada con Am1, se obtuvieron 3 bandas (C2). La primera de ellas, ubicada cerca de los 60 KDa, corresponde a la proteína viral VP2, en tanto VP3 se observa cerca de los 30 KDa. Inmediatamente por debajo de esta banda, cerca de los 28 KDa, se nota la aparición de una tercera banda correspondiente a VP3a.

Al inmunoprecipitar un lisado de células infectadas con Am14 se conserva la banda de VP2, se pierde la banda correspondiente a VP3 y se mantiene una banda ubicada en los 28 KDa atribuible a VP3a (C4).

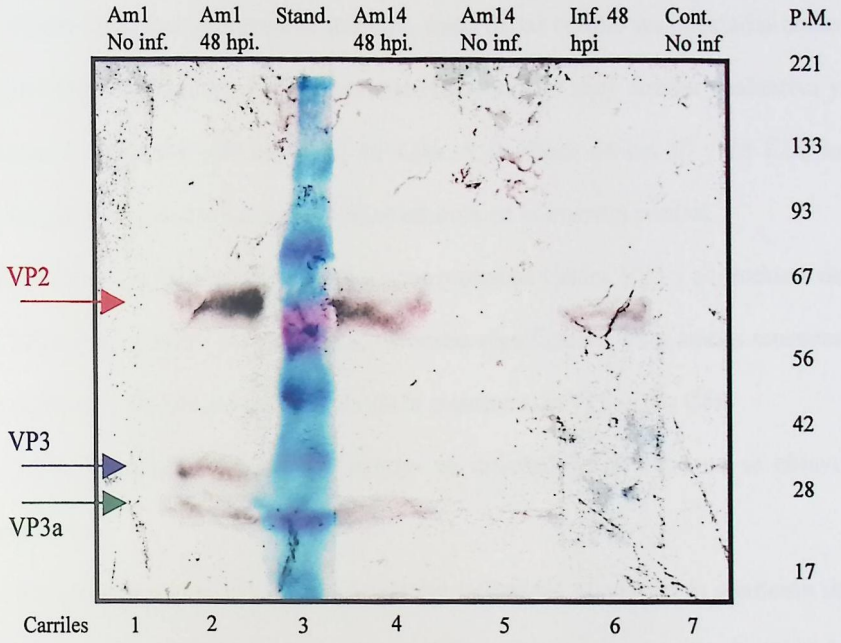
En el inmunoprecipitado realizado con Am14 sobre un lisado de células no infectadas no se observan bandas (C5).

La muestra de células lisadas por la progresión de la infección viral, sin inmunoprecipitar, contiene una sola banda en los 60 KDa correspondiente a VP2 (C6).

Un lisado de células no infectadas sin inmunoprecipitar es empleado a modo de control y no se observan en él banda alguna (C7).

Figura N°9.Western blot revelado con suero policlonal.

Western blot en el cual se comparan inmunoprecipitados de células infectadas y no infectadas, realizados con ambos anticuerpos separadamente. Se incluyó una muestra de células lisadas por la progresión de la infección viral y un lisado de células no infectadas, ambos sin inmunoprecipitar, a modo de control.



MARCACION ISOTOPICA

Dado que el revelado con luminol no permitió un incremento en la sensibilidad se optó por probar el marcaje mediante metionina S^{35}. Esta técnica tiene mayor sensibilidad y además no involucra el empleo de anticuerpos en el revelado, lo cual descarta las cadenas livianas y pesadas de los mismos. De esta manera, permite observar con mayor claridad la identidad de las bandas obtenidas en los inmunoprecipitados anteriores.

En la figura 10 se observa una comparación entre un lisado de células infectadas (24 hpi) (C1), un lisado de células no infectadas (C5) e inmunoprecipitados con Am1 obtenidos de un lisado de células con igual período de infección (C4) y de un lisado de células no infectadas (C3).

Es posible notar que el contenido proteico, tanto de las células no infectadas como del lisado de células infectadas (C1 y C5 respectivamente), es muy similar cualitativa y cuantitativamente desde los 200 hasta los 40 KDa. A la altura de los 30 y 28 KDa la muestra infectada presenta dos bandas que no se observa en la muestra control.

Estas bandas claramente corresponden a las proteínas virales VP3 y el producto de su clivaje VP3a. Sin embargo, no existe una diferencia significativa entre ambas muestras a la altura de los 60 KDa que permita evidenciar la presencia de VP2 (C1 y C5).

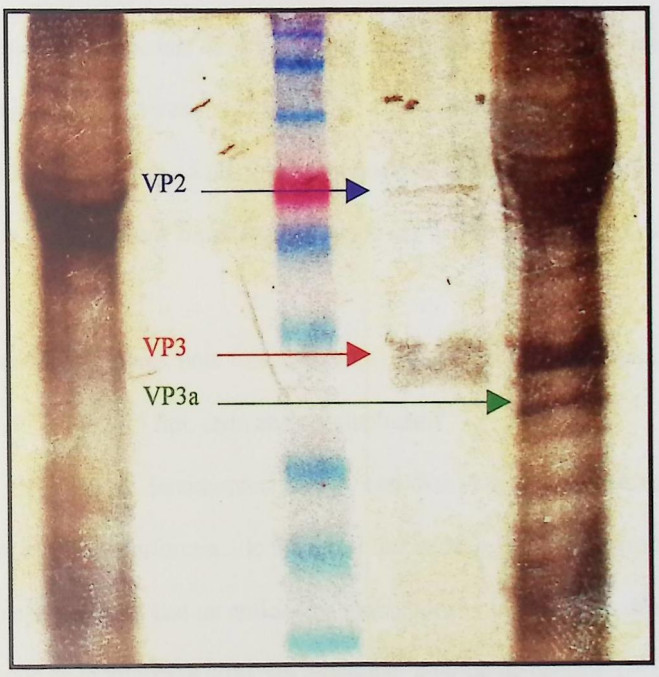
Al inmunoprecipitar un lisado de células no infectadas con Am1 no se obtuvo ninguna banda (C3).

La inmunoprecipitación con Am1 de células infectadas resultó en la aparición de una banda gruesa en los 30 KDa correspondiente a VP3 y de una tenue banda a la altura de los 60 KDa, la cual corresponde a VP2, que se obtiene como coinmunoprecipitado (C4).

Cabe por tanto resaltar el hecho que la inmunoprecipitación logró efectivamente capturar y concentrar la proteína objetivo, esto es, VP3. Igualmente, resulta destacable la ausencia en el inmunoprecipitado de la proteína VP3a.

Figura N°10. Marcación isotópica.

Esta figura muestra las diferencias observadas entre un lisado de células infectadas y un lisado de células no infectadas. Contiene también un inmunoprecipitado realizado mediante la aplicación de Am1 sobre un lisado de células infectadas y otro inmunoprecipitado con el mismo anticuerpo sobre un lisado de células no infectadas. Todas las muestras fueron marcadas con metionina S^{35} y reveladas mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida seguido de una autorradiografía.



Inmunoprecipitados de lisados de células obtenidos a diferentes horas post infección.

Una vez establecida la identidad de las proteínas y complejos proteicos virales susceptibles de ser inmunoprecipitados, se procedió al análisis del contenido proteico de inmunoprecipitados realizados en células con diferentes períodos de infección, a fin de intentar determinar la secuencia de unión entre las proteínas virales y su relevancia en el proceso morfogenético del virus.

Para ello, se utilizaron 14 placas con monocapas confluentes de células CHSE-214, y se infectaron 12 de manera simultánea, dejando las 2 restantes a modo de controles no infectados.

A determinadas horas post infección (hpi) se detuvo la infección a fin de lograr células con 7, 9, 11, 13 y 15 hpi, cada una por duplicado.

Estas muestras se inmunoprecipitaron con Am14 y Am1 separadamente y se analizaron mediante electroforesis., de forma tal que cada gel contuviera muestras con 0 a 15 hpi, inmunoprecipitadas con un anticuerpo monoclonal y una muestra de células lisadas por la progresión de la infección viral, sin precipitar, a modo de control. De esta manera se obtuvieron las figuras 11 y 12.

INMUNOPRECIPITADOS CON AM14

En la figura 11 (Inmunoprecipitados con Am14) se observa, de derecha a izquierda, una cinética de infección que comienza con el inmunoprecipitado de un lisado de células no infectadas (C8). Es posible notar la total ausencia de bandas al igual que en los carriles correspondientes a las 7 y 9 horas post infección (C7 y C6 respectivamente).

A partir de las 11 horas post infección (C4) se nota la aparición de dos bandas, la primera de ellas ubicada a la altura de los 115 KDa, corresponde a la poliproteína viral. La segunda banda, ubicada en los 60 KDa, corresponde a VP2.

A las 13 hpi (C3), la banda de VP2 se intensifica indicando un incremento en la cantidad de dicha proteína en la muestra. La cantidad de poliproteína, en tanto, permanece constante.

A las 15 hpi (C2), se mantiene constante la cantidad de VP2 indicando que ésta proteína habría alcanzado su máxima concentración en la célula, en tanto la cantidad de poliproteína decrece con respecto al momento anterior.

La muestra de células lisadas por la progresión de la infección viral, sin inmunoprecipitar, permite corroborar la ubicación relativa de VP2 así como demostrar que el método de revelado posibilita la visualización de VP3 y VP3a (C1).

INMUNOPRECIPITADOS CON Am1

La figura 12 muestra la segunda parte del experimento anterior, es decir, lisados de células con 0 a 15 hpi inmunoprecipitados con Am1.

Al inmunoprecipitar un lisado de células no infectadas no se obtiene banda alguna, al igual que al inmunoprecipitar a las 7 hpi (C7 y C6 respectivamente).

A las 9 horas post infección (C4) comienza a notarse una tenue banda (VP2) cerca de los 60 KDa, esta proteína es obtenida como coinmunoprecipitado de VP3.

A partir de las 13 horas post infección (C3) se nota la aparición de VP3 en forma de una banda conspicua ubicada a la altura de los 30 KDa, en tanto la banda superior se intensifica levemente resultando aún tenue.

Figura N° 11. Células inmunoprecipitadas con Am14 a diferentes hpi.
Western blot de lisados de células CHSE-214 no infectadas y sometidas a diferentes horas de infección reveladas con Am1 y Am14 simultáneamente. Se incluyó una muestra de células lisadas por la progresión de la infección viral, sin inmunoprecipitar, a modo de control.

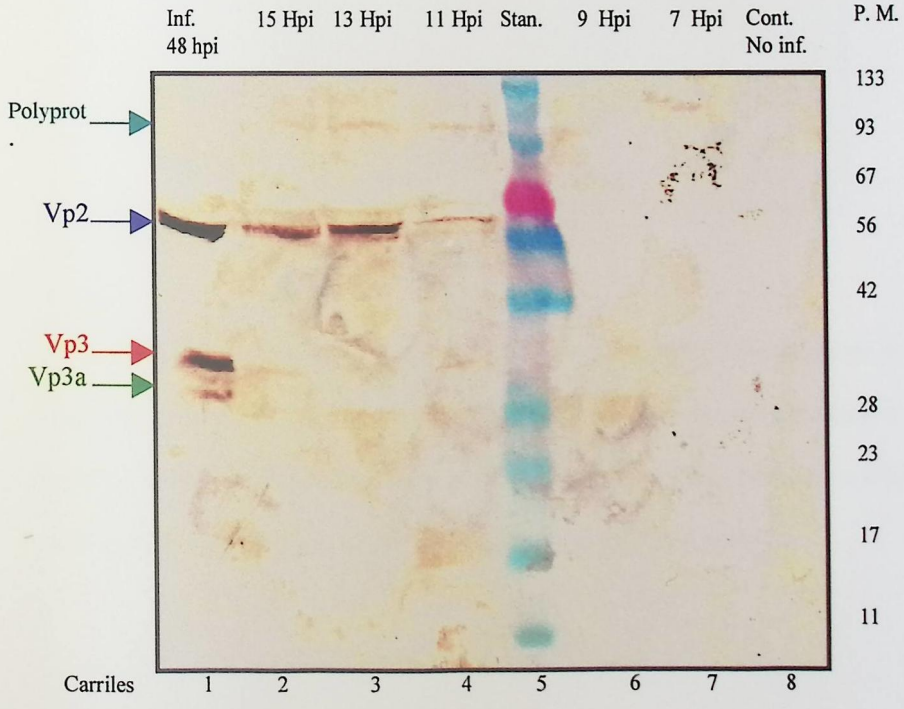
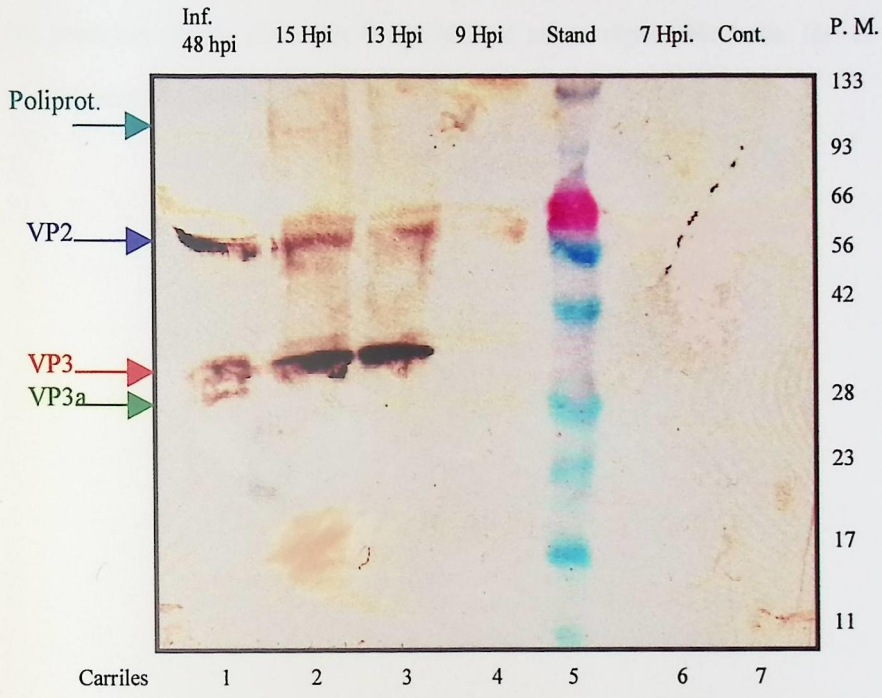


Figura N°12. Células inmunoprecipitada con Am1 a diferentes hpi.
Western blot de lisados de células CHSE-214 no infectadas y sometidas a diferentes horas de infección, reveladas con Am1y Am14 simultáneamente. Se incluyó una muestra de células lisadas por la progresión de la infección viral, sin inmunoprecipitar, a modo de control.



A las 15 hpi (C2) VP3 aparece claramente y la banda correspondiente a VP2 se hace más intensa indicando un incremento en la cantidad de esta proteína unida a VP3. A las 13 y 15 horas post infección aparece también la poliproteína viral pero es difícilmente perceptible y en modo alguno tan clara como en el western blot anterior.

Al igual que en el blot anterior, se reveló una muestra de células lisadas por la progresión de la infección viral, en el cual se observan claramente las proteínas virales VP2 y VP3 junto con VP3a (C1), proteína que no se observa en la cinética de infección.

Este último resultado (inmunoprecipitado con Am1), muestra una asociación entre las proteínas virales desde las 9 hpi la cual no es observable hasta las 15 hpi al inmunoprecipitar con Am14.

DISCUSION

Proteínas virales

Con el propósito de observar proteínas virales dentro de un lisado de células infectadas y por tanto diferenciarlas de las proteínas celulares contenidas en éste, se revelaron lisados de células infectadas y no infectadas mediante electroforesis y tinción con nitrato de plata (figura N°5).

Solamente fue posible visualizar una de las proteínas virales (VP3) ya que las restantes se encontraron enmascaradas por las de origen celular. Este hecho era esperable dado que IPNV es un virus cuya producción proteica es relativamente baja, por lo que otros investigadores (Dobos 1977, 1995a) encontraron igual dificultad optando por emplear bloqueadores de la síntesis de proteínas celulares.

Por otra parte, la separación de proteínas por electroforesis es insuficiente para lograr los objetivos planteados porque no permite capturar complejos poliproteicos.

Inmunoprecipitación de proteínas virales.

Luego de corroborar que solamente VP3 puede ser visualizada por sobre un fondo de proteínas celulares se procedió a la siguiente fase experimental que corresponde a la inmunoprecipitación.

Esta técnica permite la aislación y concentración de antígenos específicos (en este caso las proteínas virales) y de los complejos de los cuales dichos antígenos forman parte constituyente. Por ello, se efectuaron inmunoprecipitados sobre inóculos empleando anticuerpos monoclonales contra las dos principales proteínas virales, VP2 y VP3/3a.

Los anticuerpos empleados para inmunoprecipitar son, al igual que los antígenos objetivo, de naturaleza proteica lo que los hace susceptibles de ser teñidos por el nitrato de plata.

Por otra parte al ser sometidos al tratamiento con tampón de ruptura, (calentamiento durante 3 minutos) se separan en 2 cadenas pesadas y 2 cadenas livianas, de 27 y 58 KDa respectivamente (Harlow & Lane 1988). El peso molecular de estas cadenas es similar al de las proteínas que se pretende ver y al ser teñidas por el nitrato de plata pueden originar bandas que enmascaren las de origen viral.

Al revelar los inmunoprecipitados con nitrato de plata, además de las cadenas de los anticuerpos, se obtuvieron una serie de proteínas contaminantes tanto de origen celular como contenidas en la solución de anticuerpos, que enmascararon a las proteínas virales (resultados no mostrados).

La dificultad de observar claramente las proteínas de origen viral mediante tinción por nitrato de plata hizo necesario un cambio en la estrategia experimental que consistió en el revelado de los inmunoprecipitados mediante western blot.

Esta técnica tiene como ventaja una gran especificidad pese a que no escapa del problema relativo a la aparición de las cadenas livianas y pesadas de los anticuerpos empleados para inmunoprecipitar.

Esto se debe a que, al carecer de anticuerpos monoclonales conjugados a una enzima (ya sea fosfatasa o peroxidasa), se debió recurrir a anticuerpos secundarios conjugados a fosfatasa. Estos anticuerpos se adhieren igualmente a las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos inmunoprecipitantes, ya que los anticuerpos empleados para inmunoprecipitar son los mismos que se utilizaron para reconocer las bandas proteicas contenidas en el western blot.

Aún así, esta técnica permite descartar cualquier proteína contaminante ya sea de origen celular, o contenida en la solución de los anticuerpos. Por ello, inmunoprecipitados de células infectadas y no infectadas fueron revelados por western blot con cada anticuerpo separadamente.

INMUNOPRECIPITADOS REVELADOS CON Am14 (ANTI-VP2)

Los inmunoprecipitados de células lisadas por la progresión de la infección viral, realizados con ambos anticuerpos monoclonales separadamente y revelados mediante western blot con Am14 (Figura 6), permitieron observar de manera clara la presencia de VP2 y mostraron una cantidad sorprendente de pre VP2 en forma de una gruesa banda ubicada por sobre ésta.

Esta banda podría haberse atribuido a la cadena pesada de Am1 pero tal hipótesis fue descartada por dos razones. En primer lugar no se obtuvo una banda a la altura de los 27 KDa, que hubiese sido el producto lógico de la cadena liviana del anticuerpo precipitante y por otra parte se efectuó un control en el cual se inmunoprecipitó, bajo las mismas condiciones, un lisado de células no infectadas en el que no se obtuvo banda

alguna. Finalmente, en otro trabajo, se obtuvo la misma banda de preVP2 al revelar lisados celulares con anticuerpos monoclonales anti VP2 y VP3 (Magyar & Dobos 1994b).

La identidad de la banda de VP2 fue confirmada mediante el revelado, empleando igual técnica, de un lisado de células infectadas sin inmunoprecitación previa, lográndose una banda de la misma ubicación y características que aquella observada en el inmunoprecipitado del lisado de células infectadas (figura 6 C2 y C4).

La aparición de VP2 en el inmunoprecipitado de células infectadas realizado con Am1 (C2) resultó interesante dado que dicho anticuerpo es específico contra VP3/3a, de manera que la banda de VP2 corresponde a un coinmunoprecipitado, esto es, que en el momento de precipitar se encontraba unida a VP3, probablemente formando una estructura como la cápside.

VP3 se ubica internamente en la cápside siendo recubierta por VP2 (Estay *et al.*, 1989), debido a ello cabe preguntarse como Am1 fue capaz de capturar VP3 contenida en viriones completos. La explicación de este fenómeno es ilustrada por lo que ocurre en bluetongue (Grimes *et al.*, 1998), un virus similar a IPNV, y se encuentra en el hecho que VP3 no está completamente enmascarada, presentando áreas expuestas. Esto se ha confirmado en IPNV (Espinoza *et al.*, 1993). Otra explicación es la presencia de viriones incompletos en la muestra.

Por otra parte, la ocurrencia de un efecto citopático masivo en las células, ocasionado por una infección de IPNV, resulta en la liberación de proteínas virales libres y agregados de las mismas (Hjalmarsson & Everitt 1999), siendo los principales componentes observados; VP3 libre, cúmulos de pre VP2, heterodímeros de VP2/VP3 y complejos ribonucleoproteicos.

Bajo esta perspectiva resulta razonable suponer que una parte de la banda de VP2 coinmunoprecipitada proviene de los complejos de esta proteína con VP3.

El origen de la gruesa banda de preVP2 podría encontrarse en los agregados de la misma, lo que resultaría lógico en los inmunoprecipitados con Am14. Sin embargo, dado que preVP2 también se obtiene como coinmunoprecipitado de VP3, cabe suponer que se encuentra formando complejos con ésta. Además, el virión completo contiene pre VP2.

INMUNOPRECIPITADOS REVELADOS CON Am1(ANTI-VP3)

Posteriormente, se procedió a investigar el efecto de la inmunoprecipitación sobre la segunda proteína viral relevante en el presente estudio, esto es, VP3.

Para ello se revelaron con Am14 inmunoprecipitados realizados con ambos anticuerpos separadamente, sobre células lisadas por la progresión de la infección viral y lisados de células no infectadas. También se reveló una muestra de células lisadas por la progresión de la infección viral sin inmunoprecipitar (figura 7).

A diferencia de lo que ocurre con VP2, VP3 prácticamente no se obtuvo como coinmunoprecipitado. Esto podría deberse al hecho que el epítope o punto de unión de Am14 con VP2 se ve obstruido cuando ésta proteína forma complejos con VP3, o bien que los complejos están constituidos mayoritariamente por VP2 y una escasa cantidad de VP3.

Al inmunoprecipitar con Am1 se observa la aparición de una banda por debajo de VP3. Su movilidad electroforética permitiría suponer que se trata de VP3a, pero ésta hipótesis se ve refutada en los inmunoprecipitados efectuados con Am14 a una muestra células lisadas por la progresión de la infección viral y a un lisado de células no infectadas.

En ambos casos se nota la aparición de una banda de las mismas características y ubicación que la banda de supuesta VP3a (figura 7 C4 y C5).

En el caso del inmunoprecipitado de células lisadas por la progresión de la infección viral, se podría argumentar que dicha banda corresponde a un coinmunoprecipitado pero la escasez de VP3 obliga a rechazar tal supuesto. Como ésta banda aparece también en el inmunoprecipitado del lisado de células no infectadas, se hace claro que es producto de la cadena liviana del anticuerpo.

Queda aún por clarificar la ausencia de la cadena pesada en todos los inmunoprecipitados. La explicación de este fenómeno podría encontrarse en que el anticuerpo secundario sea más afín a la cadena liviana del anticuerpo precipitante pese a que el fabricante (Sigma) especifica que dicho anticuerpo se une toda la molécula del anticuerpo precipitante.

La muestra de células lisadas por la progresión de la infección viral sin inmunoprecipitar, permite observar con claridad la ubicación de VP3, corroborando la identidad de ésta banda en los restantes carriles (figura 7 C6). También es posible notar la ausencia de la banda de la cadena liviana del anticuerpo usado para precipitar.

Optimización de la visualización de los inmunoprecipitados

QUIMIOLUMINISCENCIA

La limitada sensibilidad del western blot teñido con fosfatasa alcalina y el substrato NBT-BCIP, determinó que se tuviese que emplear un volumen de células considerable para cada

experimento. A fin de minimizar el gasto de células y para obtener bandas más claras se probó una técnica de tinción diferente; la quimioluminiscencia, que según la literatura posee una sensibilidad mucho mayor que el revelado mediante BCIP-NBT. Para este tipo de técnica se usó otro tipo de enzima, la peroxidasa. Esta, al reaccionar con luminol, produce luz que es captada por una película autorradiográfica.

Se obtuvo así la figura 8, en la cual se observan los mismos inmunoprecipitados que en la figura 6 pero revelados con luminol. Sin embargo, en las condiciones en que fue empleada la técnica, no se logró un incremento importante en la sensibilidad debido a lo cual se optó por revelar los restantes experimentos con otras metodologías.

ANTICUERPOS POLICLONALES.

Una vez que se visualizaron las proteínas virales y los complejos proteicos formados por éstas en geles separados, se procedió a revelar, con un suero policlonal, inmunoprecipitados realizados con ambos anticuerpos separadamente a fin de contemplar todas las proteínas en una sola muestra y de ratificar las observaciones anteriores (figura 9).

Los anticuerpos policlonales permitieron ver VP3 y VP2 de manera simultánea ya que ambas se obtuvieron como resultado de la inmunoprecipitación con Am1 de lisados de células infectadas (C2).

Estos resultados confirman los anteriores en varios sentidos; en primer lugar se vuelve a notar la ausencia de Vp3 como coinmunoprecipitado de VP2, en tanto esta última aparece nuevamente como coinmunoprecipitado de VP3.

Sin embargo, tanto al inmunoprecipitar con Am1 como con Am14, se obtuvo una banda de igual ubicación y características que la banda atribuida a la cadena liviana de los

anticuerpos en los experimentos anteriores (C2 y C4). Dado que el anticuerpo secundario empleado en este experimento es anti conejo, no puede reconocer las cadenas del anticuerpo primario pues este fue producido en ratón. Por este motivo resulta claro que las bandas observadas corresponden a una proteína de origen viral, a saber;VP3a.

MARCACION ISOTOPICA

A fin de lograr una mayor sensibilidad en el revelado de las bandas y para esclarecer en forma inequívoca la identidad de las proteínas inmunoprecipitadas se recurrió al marcaje de proteínas con metionina S^{35}.

Esta técnica permite marcar proteínas contenidas en una muestra con una gran eficacia. Como su revelado no involucra el empleo de anticuerpos, se descartan las cadenas livianas y pesadas de los mismos.

Se marcaron con metionina S^{35} una muestra infectada, un lisado de células no infectadas y 2 inmunoprecipitados efectuados con Am1 sobre lisados de células infectadas y no infectadas.

Se optó por este anticuerpo por 2 razones; En primer lugar los inmunoprecipitados realizados con Am1 permiten la obtención de coinmunoprecipitados de manera que aportan la información más relevante para el objetivo de esta tesis. Por otra parte, permiten clarificar la situación respecto a la factibilidad de inmunoprecipitar VP3a y su relación con la cadena liviana del anticuerpo inmunoprecipitante, situación no aclarada totalmente por los experimentos anteriores.

La autorradiografía reveló claras diferencias entre un lisado de células infectadas y no infectadas ya que en el primero se nota claramente la aparición de VP3 y VP3a (figura 10, C1 y C5).

No es posible observar VP1 o VP2 en el lisado de células infectadas (ya que se ven enmascaradas por proteínas de origen celular) lo cual está de acuerdo con lo observado por otros investigadores con igual metodología (Dobos 1977).

Al inmunoprecipitar un lisado de células infectadas con Am1 se obtiene una banda ancha correspondiente a VP3, confirmándose de esta manera que el método de inmunoprecipitación utilizado no sólo captura sino que concentra la proteína objetivo (C4).

VP3a no aparece como inmunoprecipitado lo cual ratifica que las bandas observadas a la altura de los 27 KDa en los inmunoprecipitados anteriores se deben a la cadena liviana de los anticuerpos usados para inmunoprecipitar.

Al igual que en los inmunoprecipitados anteriores, VP2 aparece como coinmunoprecipitado de Vp3 aunque en forma muy tenue.

En general la marcación isotópica permitió corroborar la efectividad de la inmunoprecipitación así como la identidad de las proteínas inmunoprecipitadas.

Sin embargo, no aportó mucha información nueva o particularmente relevante por lo que no se empleó en los restantes experimentos.

Inmunoprecipitados de lisados celulares obtenidos a diferentes horas post infección.

A fin de observar la secuencia de unión entre VP2 y VP3, y su relación con la morfogénesis del virus se inmunoprecipitaron, con Am14 y Am1 separadamente, lisados celulares obtenidos a diferentes horas de infección (hpi). Los inmunoprecipitados se revelaron con ambos anticuerpos monoclonales con el propósito de visualizar las 2 proteínas virales simultáneamente.

INMUNOPRECIPITADOS CON Am14

Se observa la aparición de VP2 desde las 11 hpi (figura 11). Junto a VP2 se visualiza la poliproteína viral la cual origina, previo clivaje, VP2, VP3 y un péptido no estructural denominado NS (Magyar & Dobos 1994a, 1994b).

La poliproteína aparece en una concentración levemente inferior a VP2 y no fue observable en los inmunoprecipitados anteriores puesto que no forma parte del virión maduro ni es liberada como agregado proteico (Dobos 1995, Hjalmarsson & Everitt 1999).

VP2 se ha observado desde las 4 a 6 hpi por autorradiografía (Dobos 1977, 1995) y a partir de las 8 hpi por inmunofluorescencia (Hjalmarsson *et al.*, 1999). Dado que a las 9 hpi no se observó por western blot, resulta claro que se encuentra en cantidades insuficientes como para ser registrada por éste método.

Una explicación de lo observado es que a partir de las 11 hpi la poliproteína estaría siendo activamente clivada obteniéndose una concentración máxima de VP2 a las 13 hpi.

A las 15 hpi la cantidad de poliproteína decrece, en tanto la concentración de VP2 permanece constante, lo cual coincidiría con el término de la síntesis de péptidos virales. En

este momento se nota la tenue aparición de VP3 en forma de coinmunoprecipitado. Coincidentemente la formación de virus maduros se observa a partir de las 15 horas post infección.

Si se analiza éste resultado en forma independiente, se podría suponer que VP2 forma una procápside o agregado, la cual incorporaría posteriormente un complejo VP3-RNA.

Esta hipótesis estaría sustentada en la capacidad demostrada en la proteína VP2 de reovirus de autoensamblarse, conformando cápsides vacías en ausencia de las restantes proteínas del virus (Labbe *et al.*, 1991). Además, se ha observado en estudios recientes que a partir de las 8 horas pos infección VP2 comienza a formar agregados en tanto VP3 se distribuye a través del citoplasma (Espinoza *et al.*, 2000). Se podría suponer entonces que VP3 forma complejos nucleoproteicos que se asocian, posteriormente, a los agregados de VP2.

Sin embargo, los experimentos anteriores demostraron que el coinmunoprecipitado obtenido mediante el empleo de Am14 es en extremo escaso, en desmedro de las posibles uniones entre las proteínas objetivo y las restantes proteínas virales, haciéndose necesaria una comprobación ulterior.

INMUNOPRECIPITADOS CON Am1

La inmunoprecipitación con Am1 de lisados de células obtenidos a diferentes hpi (figura 12) originó resultados algo imprevistos. En primer lugar VP2 aparece como coinmunoprecipitado a las 9 hpi, aún antes que VP3 sea inmunoprecipitada directamente. Se ha observado que en etapas tempranas de la infección ambas proteínas virales se

localizan en los mismos compartimentos en forma de gránulos. Al avanzar la infección (entre la 10-12 hpi), VP3 aparece homogéneamente distribuida por el citoplasma en tanto VP2 forma agregados los cuales se ubican por sobre los restantes gránulos de VP3 (Espinoza *et al.*, 2000).

Bajo esta perspectiva es posible especular que el anticuerpo monoclonal empleado (Am1) cazó VP3 unida a estos agregados de VP2, lo cual resultó en la obtención de la banda de ésta proteína y no así de VP3.

Igualmente, resulta claro que la unión entre ambas proteínas se observa desde las 9 hpi, esto es, al menos 6 horas antes que se registre la aparición de viriones maduros, lo que podría demostrar que el ensamblaje del virus involucra la formación de complejos que contienen VP2 y VP3.

Por otra parte la cantidad de VP2 coinmunoprecipitada aumenta en las 13 y 15 hpi, lo cual indicaría un progresivo incremento de estos complejos o de la cantidad de sus proteínas constituyentes.

A las 9 hpi ocurre la mayor síntesis de RNAds para luego declinar hacia las 14 hpi (Somogy & Dobos 1980). Si se considera que los complejos que contienen VP2 y VP3 se visualizan desde las 9 hpi y que la cantidad de coinmunoprecipitado tiene su mayor intensidad entre las 13-15 hpi, parece claro que existe una relación entre la síntesis de RNAds y la formación de complejos que contienen proteínas virales.

Por otra parte, se ha demostrado que VP3 se asocia a RNA viral y se han aislado complejos RNA-VP3 en células lisadas por la progresión de la infección viral (Hjalmarsson & Everitt 1999, Hjalmarsson *et al.*, 1999).

En base a esta información y al momento de aparición de los coinmunoprecipitados, se propone el siguiente modelo para la secuencia de ensamblaje de IPNV.

Vp3 se distribuye por el citoplasma y se asocia a RNA viral. Esta asociación favorece la incorporación de VP2 por lo que ésta proteína se une a los complejos VP3-RNA en forma gradual. La secuencia de ensamblaje concluye cuando VP2 completa la formación de la cápside y subsecuentemente, del virión maduro.

Este modelo es tentativo pues aún se desconocen numerosos aspectos clave dentro del proceso morfogenético del virus. Uno de estos aspectos, que tiene particular relevancia para el modelo propuesto, es el tipo de RNA con la cual se asocia VP3 y de acuerdo a esto, las características de los complejos formados. Se postulan 2 posibles formas en que ocurre ésta asociación:

VP3 se une a hebras positivas de RNA constituyendo complejos replicativos. Dentro de estos complejos RNAds se sintetizaría a partir de RNAss, como ocurre en reovirus (Gallegos & Patton 1989, Aponte *et al.*, 1996). La aparición de los complejos RNAds-VP3 así sintetizados favorecería la incorporación de VP2.

Una segunda opción implica la unión de RNAds, previamente sintetizado, a VP3. Al igual que en el esquema anterior la aparición de los complejos RNAds-VP3 induciría la incorporación de VP2.

Los resultados obtenidos en ésta tesis no aportaron información que permita aclarar estos puntos, por lo que se sugieren las siguientes estrategias experimentales para trabajos futuros:

Determinar, a través de sondas, la citolocalización del RNA de origen viral en diferentes momentos de la infección y compararla con la citolocalización temporal de VP3 y VP2.

Utilizar la técnica de formación de complejos covalentes mediante irradiación con luz UV. Con ésta, se puede establecer la relación de cercanía entre diferentes moléculas de un complejo induciendo la formación de uniones entre los vecinos inmediatos. Los complejos así formados deberán ser posteriormente analizados en geles de agarosa.

Inmunoprecipitar, desde células sometidas a diferentes horas post infección e irradiadas con luz U.V., complejos virales nucleoproteicos y analizar los inmunoprecipitados en geles de agarosa.

CONCLUSIONES

- El método de electroforesis seguido de tinción por nitrato de plata no permite la identificación de las proteínas virales VP1 y VP2 a partir de células infectadas, puesto que estas se ven enmascaradas por proteínas celulares.

- Es posible capturar y visualizar VP2, VP3, complejos formados por ambas y la poliproteína viral a partir de inmunoprecipitados de lisados de células infectadas, revelados por electroforesis seguida de western blot.

- VP2 y VP3 forman complejos proteicos, compuestos mayoritariamente por la primera, en momentos tempranos de la infección (9-11hpi).

- La formación de complejos que contienen proteínas virales (VP2 y VP3) ocurre en forma concomitante a la máxima síntesis RNA genómico. Este paralelismo podría indicar la existencia de una relación entre ambos eventos, dentro del ciclo morfogénetico de IPNV.

- Nuestros resultados y aquellos de otros investigadores son coherentes con el siguiente modelo de ensamblaje. Este proceso comienza con la aparición de RNA al cual se une VP3. Los complejos así formados (RNS-VP3) incorporan VP2 en forma gradual hasta conformar al virión maduro.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ahne W. and. Thomsen I. (1986). "Infectious Pancreatic Necrosis: Detection of Viruses and Antibodies in Rainbow trout IPNV-Carrier (*salmo gairdneri*)". J. Vet. Med. B, 33, pp: 552-554.

2. Antczak J. and Joklik W. (1992). "Reovirus Genome Segment Assortment into Progeny Genomes Studied by the Use of Monoclonal Antibodies directed Against Reovirus Proteins". Virology 187, pp: 760-776.

3. Aponte C., Poncet C. and Cohen J. (1996). "Recovery and Characterization of a Rotavirus Replicase Complex in Rotavirus Infected Cells by Using a Monoclonal Antibody Against NSP2". J. Virol. Feb, pp: 985-991.

4. Bootland L., Dobos P. and Stevenson R. (1991). "The IPNV Carrier State and demostration of Vertical Transmission in Experimentally Infected Brook trout". Dis. Aquat. Org. March 8, Vol 10, pp:13-21.

5. Cohen J., Poinsard, A., and Scherrer, R. (1973). "Physico-chemical and Morphological features of Infectious Pancreatic Necrosis Virus". J. Virol. 21, pp: 485-498.

6. Dobos P. (1977). "Virus-Specific Protein Synthesis in Cells Infected by Infectious Pancreatic Necrosis Virus". .J. Virol. Jan, pp: 242-258.

7. Dobos P. (1995a). "The Molecular Biology of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV)". Annual Review of Fish Diseases. Vol. 5, pp: 25-54.

8. Dobos P. (1995b). "Protein Primed RNA Synthesis *in Vitro* by the Virion-Associated RNA Polymerase of Infectious Pancreatic Necrosis Virus". Virology 208, pp:19-25.

9. Dobos P., Hallet, R., Kells, DTC., Sorencen, O. and Rowe, D. (1977). "Biophysical Studies of Infectious Pancreatic Necrosis Virus". J. Virol. 22, pp: 150-159

10. Dobos P., Hill B., Hallett R., Kells D., Becht H. and Teninges D. (1979). "Byophisical and Biochemical Characterization of Five Animal Viruses with Bisegmented Double-Stranded RNA Genomes". J. Virol. November, pp:593-605

11. Dorson M. (1982). "Infectiuos Pancreatic Necrosis Virus: Overview of Current Problems". Labortoire d'Ichtopatologie, INRA, Route de Thiverval, 78850, Thiverval, Grignon, France.

12. Duncan R., Nagy E., Krell P. and Dobos P. (1987). "Synthesis of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Polyprotein, Detection of a Virus Encoded Protease, and a Fine Structure Mapping of Genome Segment A Coding Regions". J. Virol. December, pp: 3655-3664.

13. Enriquez R. and Lobos C. (2000). "Situación Epidemiologica Chilena y Mundial de Manejo y Control del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) en Salmónidos". Programa nacional de salud de la industria salmonicultora. Seminario internacional. Instituto tecnológico del salmón. Puerto Montt, Chile.

14. Espinoza E., Farias G., Soler M. and Kuznar J. (1985). "Identity Between Infectious Pancreatic Necrosis Virus VR-299 and a Chilean Isolate". Intervirology 24. pp.: 58-60.

15. Espinoza J. C. (1997). "Efecto del pH Sobre el Mecanismo de Penetración del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa". Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias. Universidad Católica de Valparaíso.

16. Espinoza JC,. Everitt E., Vargas J., Soler M. and Kuznar J. (1993). "Reactividad de dos Anticuerpos Monoclonales Preparados Contra el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa". Acta Microbiológica. Vol. 4, pp: 23-32.

17. Espinoza J. C., Hjalmarsson A., Everitt E. and Kuznar J. (2000). "Temporal and Subellular Localization of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Specific Structural Proteins". Arch. Virol. In press.

18. Estay A., Farias, G., Soler, M. and Kuznar J. (1990). "Further Analisis on the Structural Proteins of Infectious Pancreatic Necrosis Virus". Virus Research 15, pp: 85-96.

19. Fryer J., Yusha A. and Pilcher K.S. (1965). "The In Vitro Cultivation of Tissue and Cells of Pacific Salmon and Steelhead Trout". Ann. N.Y. Acad. Sci., 126, pp: 566-586.

20. FAO. (1996) "Estadísticas de la Producción de Acuicultura 1985-1996". FAO. Circular de pesca. N° 815. Revisión 8. Roma, Italia.

21. Gallegos C. and Patton J. (1989). "Characterization of Rotavirus Replication Intermediates: A Model for the Assembly of Single-Shelled Particles". Virology 172, pp:616-627

22. Grimes J., Burroghs N., Gouet P., Diprose J., Malby R., Ziéntara S., Mertens P. and Stuart D. (1998). "The Atomic Substructure of Bluetongue Virus Core". Nature. Vol 395, pp: 470-478.

23. Harlow E. and Lane. D. (1988). "Antibodies a Laboratory Manual". Cold Springs Harbor Laboratory. New York. USA.

24. Hill B. and Way K. (1980). "Properties and Interrelationship of Bisegmented Double-Stranded Viruses of Fish and Shellfish. Proceedings of the Conference of on Aquatic Animal Viruses". 22 May, Institute Pasteur, Paris, pp: 22-24.

25. Hjalmarsson A. and Everitt E.(1999). "Identification of Specific Components Released from Productively Infected RTG Following Massive Cytopathic Effect". Department of Microbiology, Lund University, Sôlvegatan, SE 223 62 LUND, Sweden.

26. Hjalmarsson A., Carlemalm E. and Everitt E. (1999). "Infectious Pancreatic Necrosis Virus: Identification of a VP3-Containing Ribonucleoprotein core structure and evidence for O-Linked Glycosilation of the Capsid Protein VP2.". J. Virol. 73(4), pp:xx-xx. In press.

27. Kelly R. and Loh P. (1972). "Electron Microscopical and Biochemical Characterization of Infectious Pancreatic Necrosis Virus". J. Virol. Oct, pp:824-834

28. .Kessler S. (1975). "Rapid Isolation of Antigens from Cells Infected with a Staphylococcal Protein A-Antibody Adsorbent: Parameters of the Interaction of Antibody–Antigen Complexes with Protein A". The Journal Of Inmunology. Vol. 115, N° 6, pp:1617-1624.

29. Kuznar J., Soler M., Farias G. and Espinoza J. C. (1995). "Attachment Entry of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) into CHSE-214 Cells". Arch. Virol. Vol. 140, pp: 1833-1840.

30. Labbé M., Charpilienne A., Crawford S., Estes M. and Cohen J. (1991). "Expression of Rotavirus VP2 Produces Empty Corelike Particles". J. Virol. 1991, pp: 2946-2952.

31. Laemmli U. (1970). "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head Bacteriophage T4". Nature (*London*) 227, pp: 680-685.

32. Lightner D. and Post G. (1969). "Morphological Characteristics of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Trout Pancreatic Tissue". J. Fish. Res. Bd. Canada 26, pp: 2247-2250.

33. Mac Allister P. and Reyes X. (1984). "Infectious Pancreatic Necrosis Virus: Isolation from Rainbow Trout *Salmo gairdnieri* Richardson, Imported into Chile". Journal of Fish Diseases vol 7, pp: 319-322.

34. Macdonald R. and Dobos P. (1981). "Identification of the Proteins Encoded by Each Segment of Infectious Pancreatic Necrosis Virus". Virology 114, pp: 414-422.

35. Magyar G. and Dobos P. (1994a). "Evidence for the Detection of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Polyprotein and the 17-KDa Polypeptide in Infected Cells and of the NS Protease in Purified Virus". Virology 204, pp: 580-589.

36. Magyar G. and Dobos P. (1994b). "Expression of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Polyprotein and VP1 in Insect Cells and Detection of the Polyprotein in Purified Virus". Virology 198, pp: 437-445

37. Magyar G., Kyun Chung H. and Dobos P. (1998). "Conversion of VP1 to VPg in Cells Infected by Infectious Pancreatic Necrosis Virus". Virology 245, pp: 142-150.

38. Malsberg R. and Cernini C. (1962). "Multiplication of Infectious Pancreatic Necrosis Virus". Ann. N. Y. Acad. Sci. 126, pp:320-327.

39. Nilbert M., Schiff L. and Fields B. (1996). "Reoviruses and their Replication". Fundamental Virology third edition. Chap 24, pp: 691-731. Philadelphia, U.S.A.

40. Ôzel M. and Gelderblom H. (1985). "Capsid Simetry of Viruses of the Proposed Birnavirus Group". Arch. Virol. 84, pp: 149-161.

41. Perez D. (1998). "Estudio Preliminar de la Morfogénesis del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV): Efecto de la Brefeldina A (BFA) e inmunoprecipitación de complejos intermediarios". Tesis para optar al titulo de químico farmacéutico. Universidad de Valparaíso, Chile.

42. Peter P., Mertens C., Peter B., Jamieson B. and Dobos P. (1982). "In Vitro Synthesis of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Associated RNA Polymerase". J. Gen. Virol. Vol 59, pp : 47-53.

43. Pfister T., Egger D. and Bienz K. (1995). "Poliovirus Subviral Particles Associated with Progeny RNA in the Replicational Complex". J. Gen. Virol. 76, pp: 63-71.

44. Pfister T., Pasmontes L., Troxler M., Egger D. and Bienz K. (1992). "Inmunocytochemical Localization of Capsid-Related Particles in Subcellular Fractions of Poliovirus-Infected Cells". Virology 188, pp: 676-684.

45. Poncet D., Aponte C. and Cohen J. (1993). "Rotavirus Protein NSP3 (NS34) is Bound to the 3' End of Consensus Secuence of Viral mRNAs in Infected Cells". J. Virol, June, pp: 3159-3165.

46. Quaglio F. (1989). "Infectious Desease from Birnavirus with Particular Reference to Infectious Pancreatic Necrosis of Salmonids". Riv. Ita. Acuacol. 24. pp:167-179.

47. Reyes M. (1996). "Determinación de las Condiciones Experimentales Adecuadas Para el Estudio del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa". Tesis para optar al titulo de químico farmacéutico. Universidad de Valparaíso, Chile.

48. Schlotfeld H., Alderman D., Baudin-Laurencin F., Bernoth E., Bruno D., Daelman W., Kleingeld D., Lorenzen E. and Thorud K. (1995). "What Should I do? A Practical Guide for Fish Farmers". Bulletin of The European Association of Fish Patologist 15(4), 195. Supplement.

49. Somogyi P. and Dobos P. (1980). "Virus Specific RNA Synthesis in Cells Infected by Infectious Pancreatic Necrosis Virus". J Virol. Enero, pp: 129-139.

50. Thurston Ch. and Henley L. (1988). "Direct Inmunoprecipitation of Proteins. Methods in Molecular Biology". New Protein Techniques. The Human Press Inc. Clifton New Jersey, U.S.A. Vol 3, pp:149-159.

51. Wolf K., Snieszko S. and Dumbar C. (1960). "Virus Nature of Infectious Pancreatic Necrosis in Trout". Proc. Soc. Expert. Biol. Med. 104, pp: 105-108.

52. Zeng C., Labbé M., Cohen J., Prasad B., Chen D., Ramig R. And Estes M. (1994). "Characterization of Rotavirus Particles". Virology 201, pp:55-65.