



**Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica**

***“Análisis de la multiplicación viral en células BHK-21  
persistentemente infectadas con virus Junín:  
un modelo de restricción multicausal”***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en  
el Área Ciencias Químicas

Autora: Lic. Paula C. Ellenberg

Director: Dr. Luis Alberto Scolaro

Consejero de Estudios: Dra. Elsa Beatriz Damonte

**Laboratorio de Virología  
Departamento de Química Biológica  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Buenos Aires, Mayo 2008**



**“Análisis de la multiplicación viral en células BHK-21 persistentemente infectadas con virus Junín: un modelo de restricción multicausal”**

El virus Junín (JUNV), agente etiológico de la fiebre hemorrágica argentina, pertenece a la familia *Arenaviridae*. Los virus pertenecientes a esta familia son capaces de causar infecciones persistentes en roedores, los cuales actúan como reservorios naturales, asegurándose así su evolución y perpetuación en la naturaleza. Asimismo, son capaces de multiplicar en una amplia variedad de cultivos celulares pudiendo desarrollar el estadio de persistencia en la mayoría de ellos. El objetivo del presente trabajo se centró en el análisis de parámetros virales y celulares característicos que permiten diferenciar una infección persistente de JUNV *in vitro* respecto de una infección aguda. A tal fin, mediante la infección experimental de células BHK-21 con la cepa XJCl<sub>3</sub>, se obtuvo una línea celular persistentemente infectada con dicho virus, denominada K3, que se utilizó como modelo de estudio.

La caracterización de este modelo se realizó durante un período de 3 años, en los que se investigaron distintos parámetros biológicos y bioquímicos de las células K3, de manera comparativa, con aquellos observados durante la etapa aguda de la infección. Dentro de los parámetros biológicos, la estrategia de la investigación se basó en el seguimiento temporal del comportamiento del virus en cuanto a la síntesis y expresión de sus proteínas, producción de infectividad, presencia de partículas defectivas interferentes (D.I.) y aparición de variantes virales. Durante el primer año de la infección se observó un patrón cíclico y alternado de producción de virus y presencia de partículas D.I. en los sobrenadantes del cultivo, no pudiéndose detectar alteraciones genómicas a nivel de los genes de la nucleoproteína viral (N) ni del precursor glicoproteico (GPC) en el virus aislado a partir de dichos sobrenadantes. Transcurrido este lapso, los niveles de infectividad extracelular decayeron de manera constante, mientras los porcentajes de actividad interferente fluctuaron independientemente respecto de los niveles de virus infeccioso producido, indicando la participación de otro/s factor/es involucrados en el control de dicho parámetro. Cuando se secuenciaron los genes de N y GPC a partir del ARN extraído tanto de las células K3 como de los clones virales aislados de las mismas en una etapa tardía de la infección se encontraron varios cambios nucleotídicos y aminoácidos respecto del virus que originó la infección. Estos clones también presentaron diferencias en cuanto a la citopatogenicidad, resultando menos citopáticos que el virus parental y que los clones aislados durante la etapa temprana de la infección. La mutación K58E, observada en la secuencia de N presente en los clones virales aislados en la etapa tardía, se correlacionaría con su comportamiento de multiplicación restringida o su crecimiento retrasado. Asimismo, se pudieron aislar clones virales con comportamientos diferenciales respecto a su susceptibilidad a ser neutralizados por un suero policlonal anti-JUNV y a su inactivación frente al calor.

Las células K3 mostraron una resistencia parcial, no mediada por interferón, ni partículas D.I. a la sobreinfección con virus homólogo o antigénicamente relacionado a JUNV, como lo es el virus Tacaribe (TCRV). Dicha resistencia no se debió a la ausencia de células susceptibles en el cultivo celular o de algún factor soluble que impidiera la infección de las células en el cultivo. JUNV y TCRV fueron capaces de adsorberse a las células K3 con una eficiencia levemente menor respecto de células BHK-21. Sin embargo luego de la sobreinfección el porcentaje de células (+) para N no aumentó evidenciando un bloqueo marcado a nivel de la síntesis de antígenos virales. Por otro lado, se observó que los viriones producidos por las células K3 quedaban asociados a la membrana celular formando, en muchos casos, estructuras aberrantes, siendo, en consecuencia, una alteración a nivel de la brotación, la causa más probable de la restricción en la multiplicación del virus sobreinfectante. A este respecto, se analizó el rol de la proteína celular TSG101, señalada como determinante en la eficiencia de brotación para otros virus con genoma de ARN. Los resultados obtenidos demostraron un aumento en la expresión de TSG101 en las células K3, como así también en los clones celulares aislados a partir de dichas células, que también resultaron resistentes a la sobreinfección. Los niveles de TSG101 pudieron reducirse utilizando un siARN favoreciéndose así la liberación de virus infeccioso al sobrenadante,

tanto de las células K3 como de las K3 sobreinfectadas con JUNV, indicando su participación en el paso de brotación del virus en las mismas. Como puede observarse por lo aquí presentado, el mantenimiento de la persistencia de JUNV en células BHK-21 es un proceso complejo donde son varios los factores que interrelacionados permiten que el virus permanezca a través del tiempo en el cultivo celular. En un período temprano de la persistencia la regulación del potencial citolítico del virus estaría dado por la presencia de partículas D.I. que competirían con el virus salvaje reduciendo su multiplicación. En períodos tardíos, la aparición de variantes virales, de potencial citolítico reducido, como así también la selección de células menos permisivas a la mutiplicación viral serían los factores dominantes en el establecimiento del equilibrio dinámico virus-célula.

*Palabras clave: virus Junín, in vitro, infección persistente, variantes virales, células BHK-21.*

**“Analysis of viral multiplication in BHK-21 cells persistently infected with Junin virus: a multi-cause restriction model”**

Junín virus (JUNV), agent of the Argentine hemorrhagic fever, belongs to the *Arenaviridae* family. Viruses belonging to this family are able to cause persistent infections in several species of rodents that act as reservoirs, allowing viral evolution and perpetuation in nature. Furthermore, these viruses can also persistently infect a wide variety of mammalian cell cultures suitable for virus growth. The aim of this investigation was the analysis and identification of characteristic cellular and viral parameters that allow the distinction of a persistent infection of JUNV *in vitro*, respect to an acute infection. To accomplish this, a persistently JUNV-infected BHK-21 cell line, named K3, was obtained by experimental infection with the XJCl<sub>3</sub> strain, which was used as a model of study.

This investigation was conducted throughout a period of 3 years during which different biological and biochemical parameters in K3 cells were assessed in a comparative way to JUNV acute infection. Regarding biological parameters, we did a time course follow up of the virus parameters such as the synthesis and expression of viral antigens, infectivity and defective interfering particles (D.I.) production, and the presence of viral variants in K3 cells. We observed that during the first year p.i. the levels of extracellular infectivity fluctuated showing a cyclical pattern and were inversely correlated with D.I. levels. During this period, virus isolated from K3 supernatans didn't show nucleotide changes in N or GPC genes respect to XJCl<sub>3</sub>. After the first year p.i., the levels of intracellular infectivity decreased steadily and were not influenced by the presence of D.I. indicating the contribution of other factors to the control of viral production.

After sequencing N and GPC genes from RNA extracted from K3 cells, nucleotide and aminoacidic changes were found respect to the virus that originated the infection. These changes were also found in viral progeny obtained at later times of the persistent infection. Viral clones showing the K58E mutation were found to be less cytopathic and showed slow or restricted multiplication in cell culture. In addition to this, it was possible to obtain viral clones that showed differential neutralization titres and differential inactivation behavior in response to temperature.

K3 cells were able to partially exclude the superinfection of the homologous JUNV and the antigenically related Tacaribe virus (TCRV). This resistance was not mediated by D.I., IFN or the absence of susceptible cells in the culture. In this system, a slight decrease in adsorbed/penetrated JUNV and TCRV to K3 cells was observed. However, after K3 cells were superinfected the percentage of N positive cells didn't increase, indicating a blockade in the synthesis of viral antigens. It was also observed the presence of virions associated to the plasma membrane of K3 cells, in some cases showing aberrant structures that resembled interconnected virions, indicating that budding may be other step of JUNV multiplication cycle impaired in these cells. To this regard, we analyzed the role of TSG101, which is involved in the budding of several RNA viruses. The results obtained in this investigation showed an overexpression of TSG101 in K3 cells and cellular clones that showed to be resistant to JUNV superinfection. The knock-down of TSG101 expression levels in K3 cells allowed the production of extracellular virus indicating the role of this protein in JUNV budding in K3 and K3 superinfected cells.

As can be seen, the maintenance of JUNV persistent infection in BHK-21 cells is shown to be a complex interplay between viral and cellular factors that allow the maintenance of JUNV throughout time in the cellular culture. During an early stage of persistence the virus cytopathic potential is regulated by the presence of D.I. particles that would compete with the wild type virus reducing its replication. Whereas at later stages of the infection the production of viral variants, that shown to be less cytopathic, and the selection of less permissive cells to viral replication would be the principal factors in the maintenance of the dynamic virus-cell equilibrium.

*Key words: Junin virus, persistent infection, in vitro, viral variants, BHK-21 cells.*

## Agradecimientos

En primer lugar le quiero agradecer al Dr. Luis Alberto Scolaro, mi director y *mi maestro*. Le estoy enormemente agradecida por brindarme su apoyo, su “andamiaje” y por darme espacio para crecer desde mis épocas de pichón de bióloga. De él aprendí todo lo que hoy me permite dar este gran paso en mi carrera científica y me permite mirar hacia el futuro con esperanza y seguridad de lo que me he convertido. ¡Gracias *Luisalbert*, desde el fondo de mi corazón, siempre te estaré agradecida!

Le quiero agradecer a la Dra. Elsa Damonte, por abrirme las puertas del laboratorio y por aceptar todos mis “exabruptos” los buenos y malos. Lo más importante, por ser la persona a quien todos recurrimos en busca del consejo sabio, por siempre estar dispuesta a darlo en el momento justo.

A la Dra. Viviana Castilla, le quiero agradecer por sus enseñanzas y por escucharme cada vez que lo necesité, con interminable cariño. Por ser una excelente docente y por compartir conmigo todo su conocimiento del virus Junín, sus opiniones y consejos.

A mi amiga del alma y compañera fiel, la Dra. Cybele Garcia, le quiero dar las gracias por compartir conmigo su amistad invaluable. Por darme el ejemplo a seguir y por creer en mí más de lo que yo creo en mí misma. ¡Te adoro Cybulet!

Dra. Celia Coto, por compartir sus experiencias, anécdotas e historias acerca de los tiempos iniciales del virus Junín.

A mis amigas y compañeras de nicho ecológico, las Dras. Andrea Barquero, Erina Petrerá, Sandra Cordo, Jimena Ruiz y Josefina Carlucci. Gracias por hacer del laboratorio un ambiente lleno de risas. Por las discusiones interminables científicas y *no tanto*. Por todos los momentos compartidos y por soportar mi carácter explosivo estoicamente. ¡Como las extraño!

A las recientes Dras. Erina Petrerá y Laura Talarico, por compartir el escabroso camino de la escritura de la tesis doctoral, por el intercambio de opiniones y sentimientos encontrados provocados por esta *aventura*.

A la nueva generación, el dúo dinámico Florencia Linero y Eliana Acosta, por hacerme sentir valorada y escuchada en cuanto a mis conocimientos experimentales.

A los integrantes del laboratorio de Virología, en especial a las Dras. Nélide Candurra y Mónica Wachsmán, por todos los momentos compartidos, la paciencia, la predisposición para ayudarme y por formar una especie de familia muy especial.

Quiero agradecer a los integrantes del Depto. Química Biológica en especial a los integrantes de los Laboratorios de Inmunología y Genética Bacteriana. Por los momentos compartidos y la catarsis a la hora del almuerzo.

A mi mamá, por disfrutar de mis pequeños logros.

Le quiero agradecer a Mirta por todo su cariño.

Le quiero agradecer muy especialmente a mis hermanos, el futuro “*dotor*” Fede, Vicky y Mecha, por ser mis pilares en todos los momentos que nos tocaron vivir juntos. Por entendernos con una mirada y reírnos de nuestra historia en común. En especial a Vicky, mi hermana y mi mejor amiga, por ser mi confidente y sostén, especialmente durante el proceso emigratorio. ¡Siempre voy a estar con vos Victor!

*I would like to thank my new husband Jonito, for waiting for the completion of this never ending PhD. and encouraging me to believe that the impossible can come true.*

Por último, no tengo palabras para agradecerle a mi papá por su apoyo y empuje desde que la memoria me permite recordar. Por darme la posibilidad de elegir mi camino y acompañarme a caminar. **Y estar siempre presente.** ¿Y que te falta? ¡Creo que con esto termino papi!

***A mi papá.***

	<b>Página</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>4</b>
<b>I.1. Los Arenavirus</b> .....	<b>4</b>
<b>I.1.a. Propiedades estructurales de los arenavirus</b> .....	<b>7</b>
<b>I.1.b. Las proteínas virales</b> .....	<b>10</b>
<b>I.1.b.1. Las Glicoproteínas virales</b> .....	<b>10</b>
<b>I.1.b.2. La nucleoproteína viral</b> .....	<b>11</b>
<b>I.1.b.3. La polimerasa viral</b> .....	<b>12</b>
<b>I.1.b.4. La proteína Z</b> .....	<b>12</b>
<b>I.1.c. El ciclo de multiplicación de los arenavirus</b> .....	<b>13</b>
<b>I.1.d. Fiebre Hemorrágica Argentina y el virus Junín</b> .....	<b>16</b>
<b>I.2. Las infecciones virales</b> .....	<b>19</b>
<b>I.2.a. La infección aguda</b> .....	<b>20</b>
<b>I.2.b. Las infecciones persistentes</b> .....	<b>20</b>
<b>I.2.b.1. Las infecciones persistentes por arenavirus <i>in vivo</i></b> .....	<b>24</b>
<b>I.2.b.2. Las infecciones persistentes por arenavirus <i>in vitro</i></b> .....	<b>31</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>35</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>36</b>
<b>MM.1. Líneas celulares utilizadas</b> .....	<b>36</b>
<b>MM.2. Virus utilizados</b> .....	<b>36</b>
<b>MM.3. Obtención de cultivos persistentemente infectados con JUNV</b> .....	<b>36</b>
<b>MM.4. Ensayo de viabilidad celular (técnica de MTT)</b> .....	<b>37</b>
<b>MM.5. Cuantificación de la infectividad viral</b> .....	<b>37</b>
<b>MM.6. Cuantificación de actividad interferente</b> .....	<b>37</b>
<b>MM.7. Cuantificación de centros infecciosos</b> .....	<b>38</b>
<b>MM.8. Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta</b> .....	<b>38</b>
<b>MM.9. Marcación de los microfilamentos de actina y N</b> .....	<b>39</b>
<b>MM.10. Cuantificación de la actividad fusogénica</b> .....	<b>40</b>
<b>MM.11. Western blot</b> .....	<b>40</b>
<b>MM.12. Fraccionamiento subcelular</b> .....	<b>41</b>
<b>MM.13. Internalización de transferrina</b> .....	<b>41</b>
<b>MM.14. Extracción de ARN</b> .....	<b>41</b>
<b>MM.15. Obtención de cADN</b> .....	<b>42</b>
<b>MM.16. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b> .....	<b>42</b>
<b>MM.17. Marcación y purificación de viriones</b> .....	<b>43</b>
<b>MM.18. Ensayo de adsorción y penetración de virus</b> .....	<b>44</b>
<b>MM.18.a. Ensayo de adsorción de virus marcado</b> .....	<b>44</b>

<b>MM.18.b.</b> Ensayo de adsorción/ internalización de virus marcado .....	44
<b>MM.18.c.</b> Ensayo de infectividad adsorbida .....	44
<b>MM.18.d.</b> Ensayo de internalización (por centros infecciosos) .....	44
<b>MM.19.</b> Transfección de células con lipofectamina .....	45
<b>MM.20.</b> Ensayo de formación de pseudotipos.....	45
<b>MM.21.</b> Microscopía electrónica .....	46
<b>MM.22.</b> Clonado de virus .....	46
<b>MM.23.</b> Curva de crecimiento .....	46
<b>MM.24.</b> Ensayo de neutralización.....	46
<b>MM.25.</b> Ensayo de termosensibilidad y termoestabilidad.....	47
<b>MM.26.</b> Secuenciación de los genes virales.....	47
<b>MM.27.</b> Ensayo de radioinmunoprecipitación.....	50
<b>MM.28.</b> Clonado de células persistentemente infectadas con JUNV .....	50
<b>MM.29.</b> Construcción de plásmido de expresión Z-Flag .....	51
<b>Resultados</b> .....	<b>52</b>
<b>R.I.</b> Caracterización de una línea de células BHK-21 persistentemente infectadas con virus Junin .....	52
<b>R.I.1.</b> Producción de virus y actividad interferente de las células K3 .....	52
<b>R.I.2.</b> Producción y liberación de virus en células K3 .....	55
<b>R.I.3.</b> Detección de genes virales en células K3 .....	57
<b>R.I.4.</b> Expresión de antígenos virales .....	58
<b>R.I.4.a.</b> <i>Glicoproteínas virales</i> .....	58
<b>R.I.4.b.</b> <i>Nucleoproteína viral</i> .....	61
<b>R.I.5.</b> Clonado biológico de las células K3 .....	64
<b>R.I.6.</b> Análisis genómico de las secuencias virales presentes en las células K366	
<b>R.I.6.a.</b> Nucleoproteína .....	66
<b>R.I.6.b.</b> Precursor glicoproteico .....	70
<b>R.I.6.c.</b> Proteína Z .....	74
<b>R.II.</b> Caracterización de clones virales aislados de cultivos de células K3.....	75
<b>R.II.1.</b> Crecimiento de los clones virales.....	75
<b>R.II.2.</b> Termosensibilidad de los clones virales.....	79
<b>R.II.3.</b> Variación antigénica de clones virales .....	83
<b>R.II.4.</b> Caracterización genómica de los clones virales .....	85
<b>R.II.4.a.</b> Nucleoproteína .....	86
<b>R.II.4.b.</b> Precursor glicoproteico .....	89
<b>R.II.5.</b> Expresión de antígenos virales de los clones virales.....	92
<b>R.II.5.a.</b> Glicoproteínas virales.....	92

R.II.5.b. Nucleoproteína viral .....	95
R.III. Sobreinfección de células K3 con JUNV.....	97
R.III.1. Multiplicación de virus homólogo y heterólogo en células K3.....	97
R.III.2. Estudio del ciclo de multiplicación del virus sobreinfectante.....	100
R.III.2.a. Adsorción del virus sobreinfectante a las células K3 .....	101
R.III.2.b. Adsorción y penetración del virus sobreinfectante a las células K3 ....	103
R.III.2.c. Internalización del virus sobreinfectante a las células K3.....	104
R.III.2.d. Síntesis de la cadena viral complementaria .....	105
R.III.2.e. Síntesis de antígenos virales en células K3 sobreinfectadas .....	108
R.III.2.f. Brotación de virus a partir de células K3 .....	110
R.III.3. Participación de proteínas celulares y virales en la brotación viral a partir de células K3.....	112
R.III.3.a. Nucleoproteína y citoesqueleto.....	113
R.III.3.b. Co-localización Nucleoproteína y Z .....	114
R.III.3.c. Expresión de TSG101 y brotación viral a partir de células K3.....	116
R.III.3.c.1. Expresión de TSG101 en células K3 .....	116
R.III.3.c.2. Expresión de TSG101 y la liberación de virus al sobrenadante .....	119
R.III.4. Susceptibilidad a la infección con JUNV de clones celulares aislados de K3 .....	121
<b>Conclusiones y Discusión .....</b>	<b>124</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>134</b>

**ACP:** acción citopática  
**ADN:** ácido desoxirribonucleico  
**ALLV:** virus Allpahuayo  
**AMAV:** virus Amaparí  
**Amp:** ampicilina  
**ARN:** ácido ribonucleico  
**ARNi:** ARN de interferencia  
**BCNV:** virus Bear Canyon  
**BSA:** albúmina sérica bovina  
**C.I.:** centros infecciosos  
**c.p.m:** cuentas por minuto  
**CPXV:** virus Cupixi  
**C-terminal:** carboxilo terminal  
**DABCO:** 1,4-diazabicyclo octano  
**D.I.:** partículas defectivas interferentes  
**DMEM:** medio mínimo esencial modificado por Dulbecco  
**D.O.:** densidad óptica  
**d.p.i.:** días post infección  
**E.O.P.:** eficiencia de plaqueo  
**ECL:** enhanced chemiluminescence  
**FHA:** Fiebre hemorrágica argentina  
**FLEV:** virus Flexal  
**GPC:** Precursor glicoproteico  
**GTOV:** virus Guanarito  
**HIV:** virus de la inmunodeficiencia humana  
**HSV:** virus herpes simplex  
**i.c:** intra cerebral  
**IFI:** Inmunofluorescencia indirecta  
**IFN:** interferón  
**IGR:** región intergénica  
**i.m:** intra muscular  
**i.p:** intra peritoneal  
**ICTV:** International Committee on Taxonomy of Virus  
**IFI:** inmunofluorescencia indirecta  
**IPPYV:** virus Ippy  
**h:** hora  
**h.p.i.:** hora post infección

**JUNV:** virus Junín  
**kDa:** kiloDalton  
**L:** ARN polimerasa viral ARN dependiente  
**LASV:** virus Lassa  
**LATV:** virus Latino  
**LB:** medio Luria Bertoni  
**LCMV:** virus de la Coriomeningitis linfocitaria  
**Log:** logaritmo  
**mA:** mili amper  
**Mab:** anticuerpo monoclonal  
**MACV:** virus Machupo  
**MEM:** medio esencial mínimo  
**min:** minutos  
**MM:** medio de mantenimiento celular  
**MOBV:** virus Mobala  
**m.o.i.:** multiplicidad de infección  
**MOPV:** virus Mopeia  
**MTT:** (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio  
**N:** Nucleoproteína  
**NH:** no hecho  
**N-terminal:** amino terminal  
**OLVV:** virus Oliveros  
**pb:** pares de bases  
**p.i:** post infección  
**PAGE:** electroforesis en geles de poliacrilamida  
**PAMV:** virus Pampa  
**PARV:** virus Paraná  
**PBS:** solución salina de fosfatos  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa  
**PICV:** virus Pichinde  
**PIRV:** virus Pirital  
**PM:** peso molecular  
**PMSF:** fenil-metil-sulfonil-fluoruro  
**PPO:** 2,5-difeniloxazol  
**PVDF:** fluoruro de polivinilideno  
**RIPA:** Ensayo de radioinmuno precipitación  
**SABV:** virus Sabiá

**SFB: Suero fetal bovino**

**seg: segundo**

**segmento L: segmento *Large***

**segmento S: segmento *Small***

**TAMV: virus Tamiami**

**TCRV: virus Tacaribe**

**TSG101: *tumor supressor gene 101***

**Ts: mutantes termosensibles**

**U: unidades**

**UFP: unidades formadoras de placas**

**WB: western blot**

**VSV: virus de la Estomatitis Vesicular**

**WWAV: virus Whitewater Arroyo**

## I. 1. Los arenavirus

La familia *Arenaviridae* incluye, hasta el presente, 24 especies virales cuyos miembros infectan roedores, con la aparente excepción del virus Tacaribe (TCRV), el cual sólo ha podido ser aislado a partir del murciélago *Artibeus sp.* El virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV), prototipo de la familia, es el único de distribución mundial mientras que los demás arenavirus tienen distribución geográfica restringida, al área de distribución del roedor que actúa como hospedador natural de cada especie (Figura I 1, Tabla I 1). A excepción de LCMV, ningún otro miembro de esta familia ha sido aislado en Europa u Oceanía, estando distribuidos ya sea en el “Nuevo Mundo” o en África.

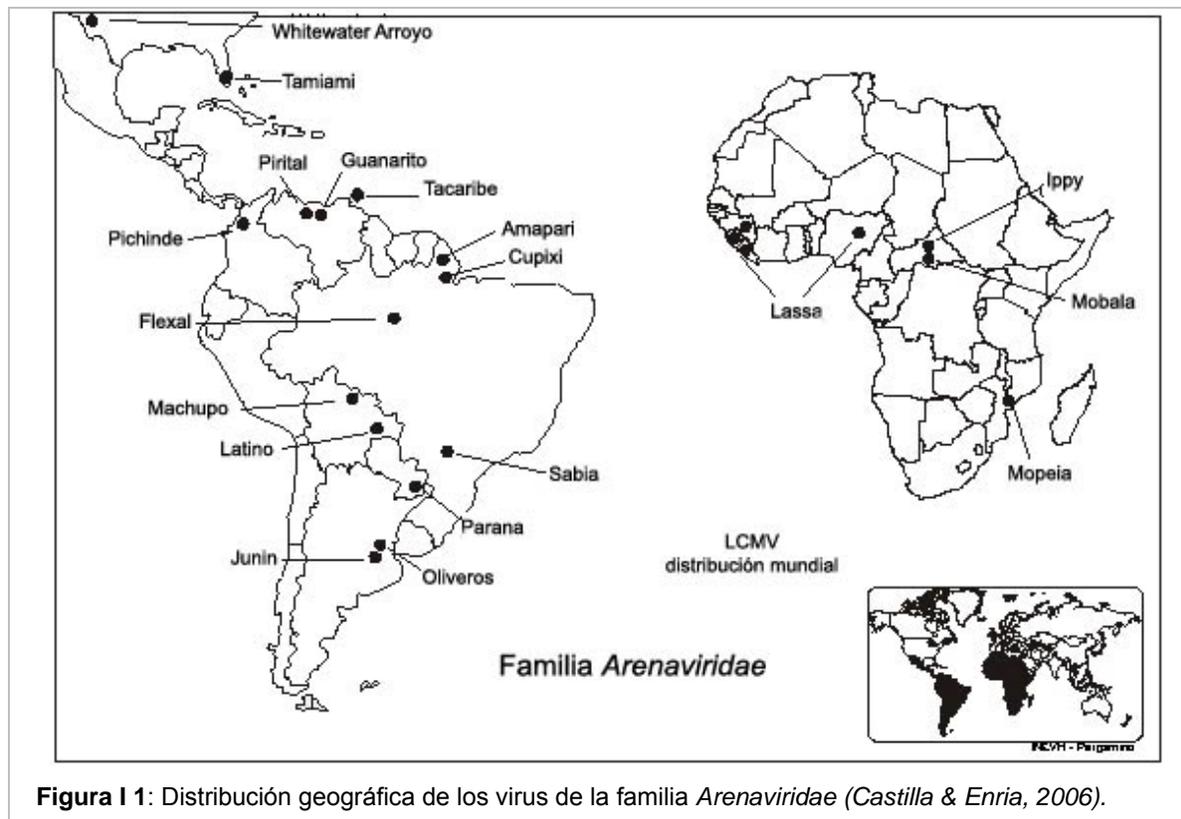
Tabla I 1: Especies de la familia *Arenaviridae*

<i>Especies</i>	<i>Acrónimo</i>	<i>Hospedador natural</i>	<i>Región</i>
<b><i>Arenavirus del Viejo Mundo</i></b>			
Ippy	IPPYV	<i>Arvicanthis sp.</i>	África central
Lassa <sup>a</sup>	LASV	<i>Mastomys sp.</i>	Oeste de África
Coriomeningitis linfocitaria <sup>a1</sup>	LCMV	<i>Mus musculus</i>	Europa, América, Asia
Mobala	MOBV	<i>Praomys sp.</i>	África central
Mopeia	MOPV	<i>Mastomys natalensis</i>	Mozambique, Zimbawe
Kodoko	KDKV	<i>Mus Nannomys</i>	Oeste de África, Guinea
<b><i>Arenavirus del Nuevo Mundo</i></b>			
Allpahuayo	ALLV	<i>Oecomys sp.</i>	Perú
Amaparí	AMAV	<i>Oryzomys capito</i>	Brasil
Bear Canyon	BCNV	<i>Peromyscus californicus</i>	Estados Unidos
Cupixi	CPXV	<i>Oryzomys capito</i>	Brasil
Flexal	FLEV	<i>Oryzomys sp.</i>	Brasil
Guanarito <sup>a</sup>	GTOV	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	Venezuela
Junín <sup>a</sup>	JUNV	<i>Calomys musculinus</i>	Argentina
Latino	LATV	<i>Calomys callosus</i>	Bolivia
Machupo <sup>a</sup>	MACV	<i>Calomys callosus</i>	Bolivia
Oliveros	OLVV	<i>Bolomys obscurus</i>	Argentina
Pampa (especie tentativa)	PAMV	<i>Bolomys obscurus</i>	Argentina
Paraná	PARV	<i>Oryzomys buccinatus</i>	Paraguay
Pichinde	PICV	<i>Oryzomys albigularis</i>	Colombia
Piritai	PIRV	<i>Sigmodon alstoni</i>	Venezuela
Sabiá <sup>a</sup>	SABV	<i>Desconocido</i>	Brasil
Tacaribe	TCRV	<i>Artibeus sp.</i>	Trinidad
Tamiami	TAMV	<i>Sigmodon hispidus</i>	Estados Unidos
Whitewater Arroyo	WWAV	<i>Neotoma albigula</i>	Estados Unidos

<sup>a</sup> Virus patógeno para el hombre, causante de fiebre hemorrágica grave.

<sup>a1</sup> Virus patógeno para el hombre, causante de meningitis aséptica.

Los humanos son hospedadores accidentales de los arenavirus y su infección ocurre a través del contacto del hombre con las excreciones de roedores infectados. Es por este motivo que la dinámica poblacional del reservorio sea probablemente, uno de los parámetros más importantes y determinantes de la epidemiología de la infección en humanos, la cual presenta características, de acuerdo al virus, involucrando cuadros clínicos. Los más graves son los ocasionados por la infección con los virus LASV, JUNV, MACV, GTOV y SABV los que provocan fiebres hemorrágicas en el oeste de África, Argentina, Bolivia, Venezuela y Brasil, respectivamente (Peters 1996, Charrel & de Lamballerie, 2003). Estas patologías graves han llevado a incluir a estos virus dentro de la categoría A de patógenos humanos con gran potencial para generar un impacto adverso en la salud pública de acuerdo con lo establecido por el C.D.C (Center for Disease Control Atlanta Georgia).

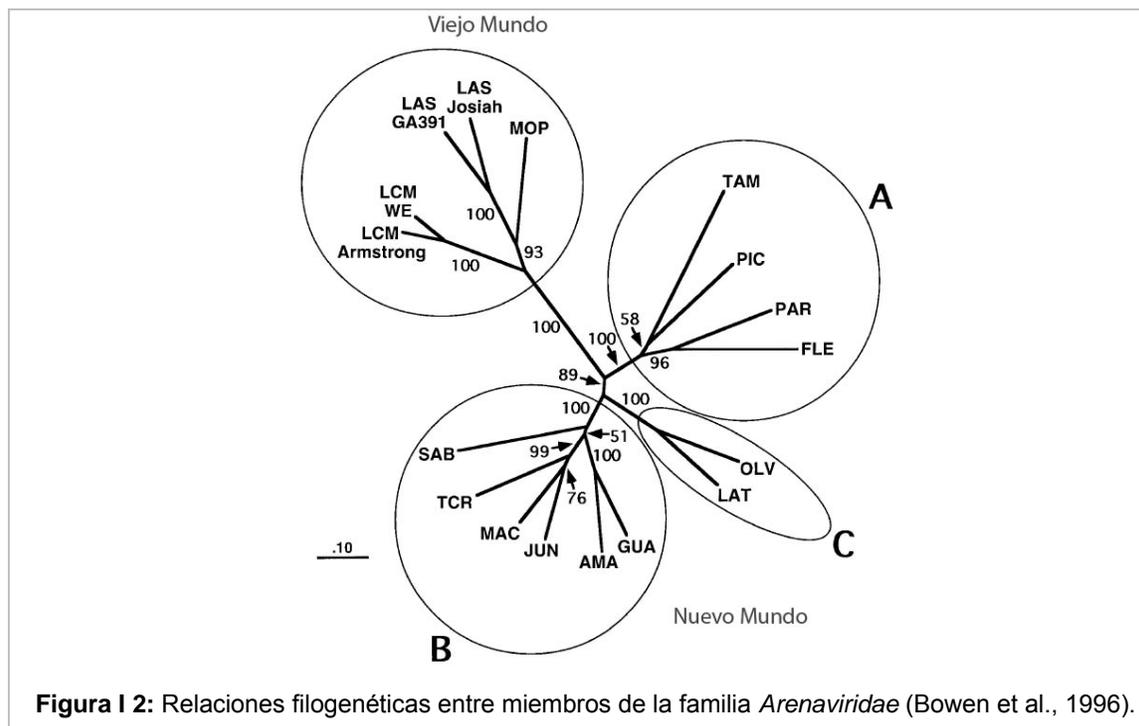


**Figura I 1:** Distribución geográfica de los virus de la familia *Arenaviridae* (Castilla & Enria, 2006).

La identidad de la familia *Arenaviridae* como un grupo, originalmente fue construida en base a características morfológicas y a estudios de reacciones cruzadas en técnicas serológicas tales como fijación de complemento, inmunofluorescencia y neutralización (Howard et al., 1985, Rowe et al., 1970b). Dentro de la familia, la presencia de epitopes comunes en la nucleoproteína viral, permitió agrupar a sus miembros en dos grandes conjuntos: virus del Viejo Mundo y virus del Nuevo Mundo (Howard, 1993). Mas adelante, estudios estructurales del genoma viral y proteínas virales confirmaron esta similitud y

reforzaron la identidad de la familia. Según estudios de RT-PCR analizando regiones conservadas del gen de la nucleoproteína viral de 12 de los arenavirus del Nuevo Mundo se determinó, la presencia en este último grupo de tres linajes (Figura I 2) (Bowen et al., 1996, Bowen et al., 1997). Según estos estudios, LCMV ocuparía un lugar ancestral en el árbol filogenético de los arenavirus. Se evidenció también que la propiedad de causar fiebre hemorrágica en humanos ha sido adquirida en más de una ocasión durante la evolución de esta familia. En el linaje B se ubican los virus sudamericanos causantes de fiebres hemorrágicas, indicando que esta característica pudo haber evolucionado solo en una ocasión para este grupo de virus, sin embargo es claro que esta característica debió haber surgido de manera independiente en el caso del virus del Viejo Mundo LASV.

Otro aspecto interesante en la filogenia de los arenavirus del Nuevo Mundo es que los virus que ocupan el linaje A (FLEV, PARV y PICV) y los virus JUNV y MACV, estrechamente relacionados, tienen como hospedadores naturales a roedores del género *Oryzomys* y *Calomys*, respectivamente, sugiriendo que la relación filogenética de los virus refleja la taxonomía de sus hospedadores, hecho consistente con una situación de co-evolución virus-hospedador en la naturaleza.



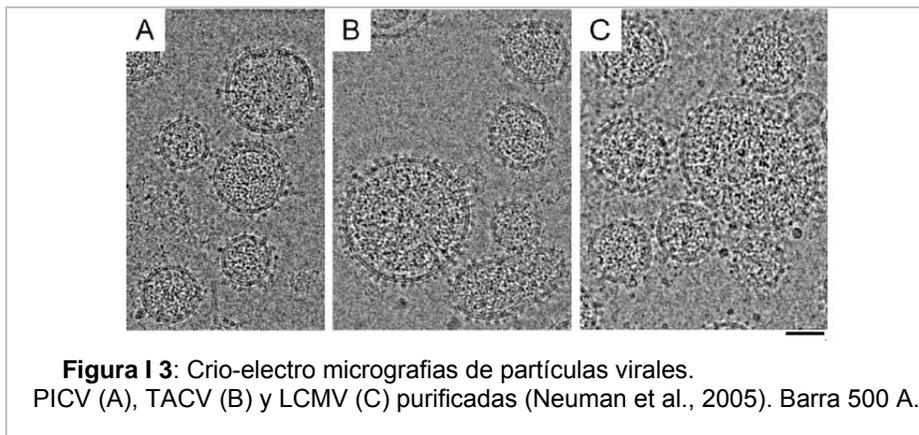
Recientemente, se analizaron las relaciones filogenéticas de 18 arenavirus a partir de las secuencias aminoácidas de la nucleoproteína, del precursor glicoproteico y de la polimerasa viral. En estos estudios se evidenció que el origen de los virus norteamericanos WWAV, TAMV y BCNV estaría dado por un evento de recombinación entre virus de los linajes A y B,

perteneciendo el extremo 5' no codificante del segmento pequeño del genoma viral a este último linaje, mientras que el extremo 3', región intergénica, y el gen de la nucleoproteína corresponderían al linaje A (Charrel et al., 2003).

El genoma de los arenavirus presenta gran plasticidad, la cual fue demostrada en la identificación de genomas formados por eventos de recombinación intra e inter segmentos. Por otro lado, aunque se han obtenido variantes con rearrreglos genómicos entre virus relacionados en el laboratorio, esta clase de variantes no han sido encontradas en la naturaleza (Charrel et al., 2003, Lukashevich, 1992, Riviere et al., 1986). La plasticidad genómica de estos virus le proporcionaría una marcada capacidad adaptativa frente a cambios en el entorno provocados por el sistema inmune del hospedador, terapias antivirales, etc. Asimismo, la co- infección de un hospedador con dos arenavirus diferentes favorecería un escenario propicio para que se produzcan eventos de plasticidad genómica, llevando a la emergencia de nuevas variantes potencialmente peligrosas para el hombre.

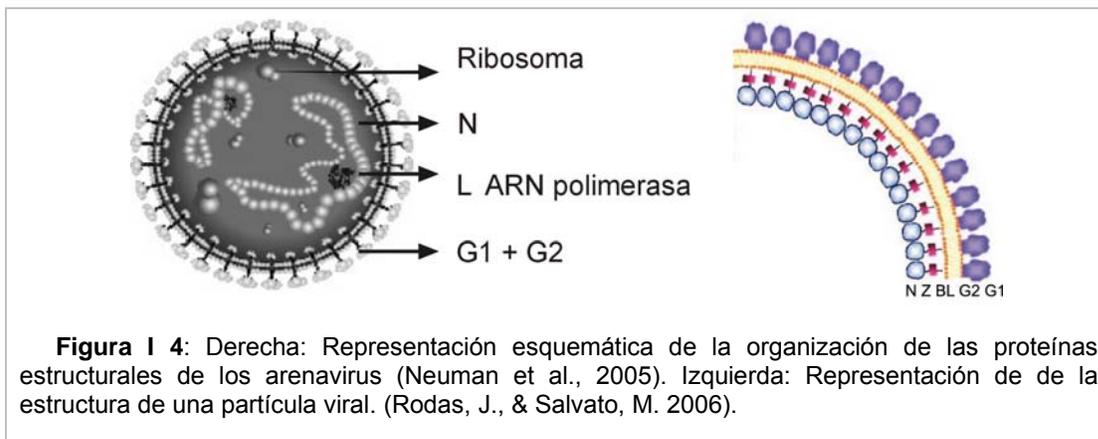
### I.1.a. Propiedades estructurales de los arenavirus

Los arenavirus presentan envoltura lipídica, a partir de la cual se proyectan espículas glicoproteicas. Las partículas virales son de forma esférica o pleomórfica con un diámetro promedio de 120 nm. Mediante estudios de microscopía electrónica se ha observado la presencia de ribosomas (20 -25 nm) dentro de las mismas, lo que le da un aspecto "arenoso", apariencia de la cual deriva el nombre de la familia (Figura I 3) (Buchmeier, 2002, Meyer et al., 2002, Rowe et al., 1970a, Compans, 1993).



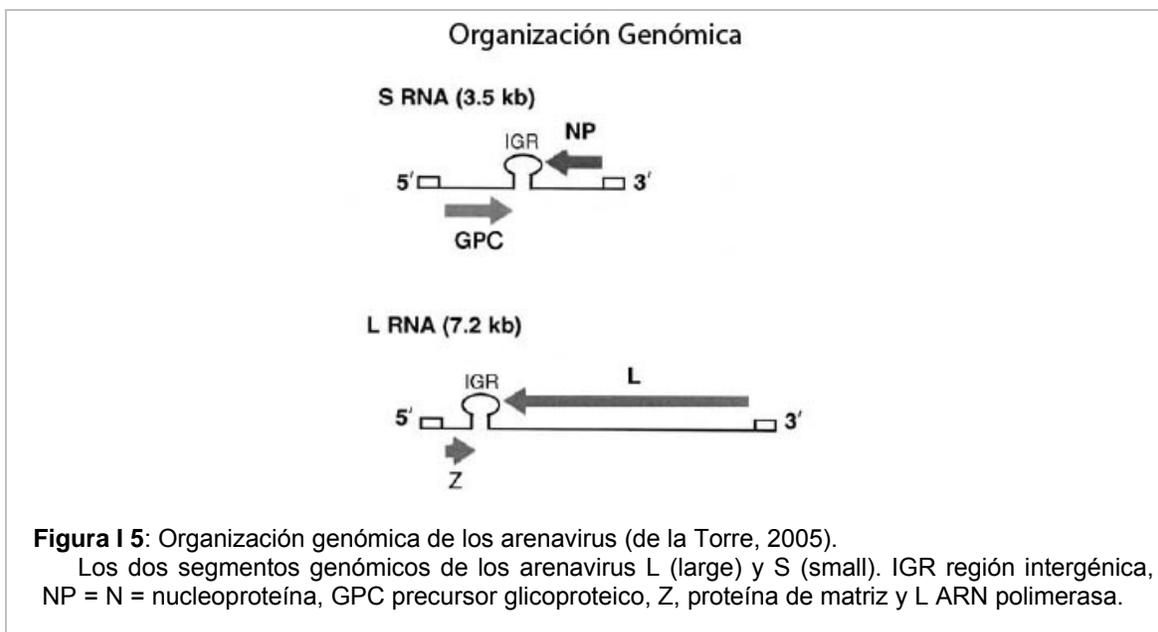
El virión posee las siguientes proteínas estructurales: i) un complejo multimérico formado por las glicoproteínas G1 y G2, ii) un "factor de brotación" Z que regula la transcripción y traducción, iii) una nucleoproteína asociada al ácido nucleico viral, N, iv) un pequeño péptido hidrofóbico organizado de manera similar al observado para la proteína 6K de los alphavirus que sirve como señal de procesamiento de GPC y que es incorporado al virión. Sumado a

estos componentes, se encuentra la ARN polimerasa (L), que junto con N asociada al ARN viral forma la nucleocápside (Figura I 4) (Neuman et al., 2005).

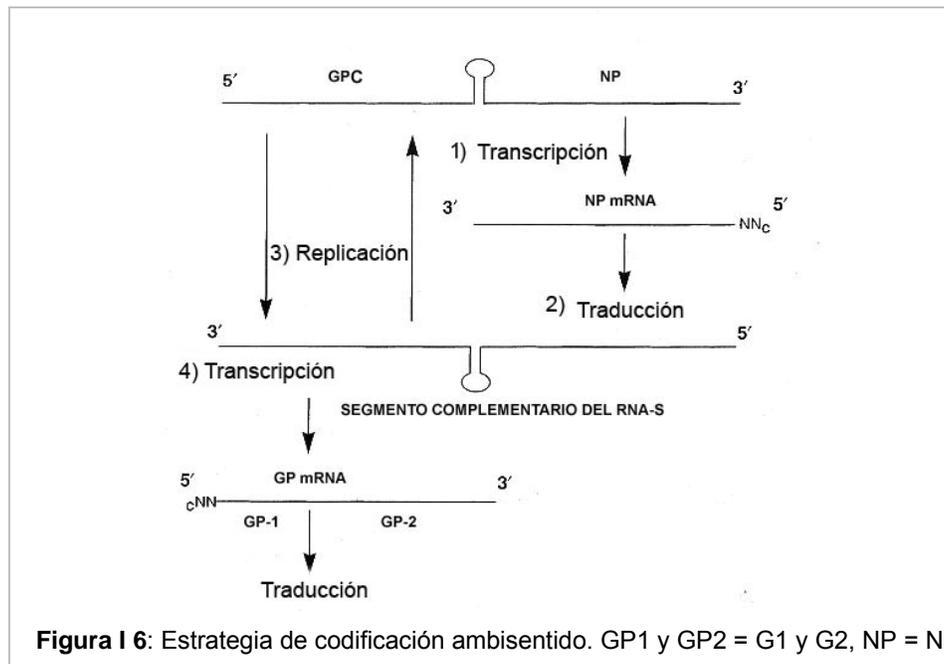


Los viriones contienen un genoma bi-segmentado de ARN de polaridad negativa, el cual esta dispuesto como un complejo ribonucleoproteico en conformaciones circulares. Los segmentos genómicos de los arenavirus fueron designados L (*large*) y S (*small*) (Figura I 5), de acuerdo a su tamaño, de aproximadamente 7,2 y 3,5 kb, respectivamente. La relación entre el segmento S y L encontrada en las partículas virales no es equimolecular, ya que el segmento S se encuentra en mayor proporción que el segmento L (Romanowski & Bishop, 1983, Southern et al., 1987).

El segmento S, codifica para los componentes mayoritarios del virion: N y el precursor glicoproteico (GPC), el cual es procesado post-traduccionalmente para dar origen a las dos glicoproteínas virales. El segmento L codifica para L y Z.



Cada segmento de ARN genómico posee una estrategia de codificación ambi-sentido la cual dirige la síntesis de dos polipéptidos en orientaciones opuestas, separados por una región intergénica (IGR). Las regiones codificantes de N y L son transcriptas a un ARNm complementario al ARN genómico, mientras que por otro lado, las regiones codificantes de GPC y Z son transcriptas a ARNm de sentido genómico (Figura I 6). Es decir, una región de los segmentos S y L tiene sentido negativo, mientras que otra región no solapada con la anterior tiene polaridad pseudo-positiva, ya que todavía no existen evidencias que los ARN S y L puedan ser directamente traducidos a GPC y Z respectivamente (de la Torre, 2005). Asimismo, se ha encontrado dentro de la partícula viral el ARNm de la proteína Z, especulándose que el mismo podría participar en la iniciación de la infección de los arenavirus. Actualmente, no es posible determinar si el ARNm de Z se deba considerar como un componente esencial de la partícula viral, ya sea como componente estructural o de ser inmediatamente traducido en la nueva células infectada o simplemente asumiendo su presencia como consecuencia de un proceso de encapsidación impreciso. Sin embargo, dada la equivalencia molecular alta de esta especie de ARN dentro del virión, es tentador especular acerca de una función específica de este componente durante el inicio de la infección (Salvato et al., 1992, Salvato & Shimomaye, 1989).



La región intergénica (IGR), posee la capacidad de formar un plegamiento estable en forma de horquilla (simple o doble dependiendo del arenavirus), debido a la presencia de secuencias complementarias las que se encuentran conservadas a través de la evolución de esta familia, sugiriendo un significado funcional importante, particularmente en la terminación

transcripcional o, como se sugirió recientemente, en la encapsidación del genoma viral (Auperin et al., 1984, Lopez & Franze-Fernandez, 2007, Pinschewer et al., 2005).

Los arenavirus poseen una secuencia nucleotídica conservada en los extremos 3' de los segmentos genómicos L y S (17 de los primeros 19 nucleótidos son idénticos entre los ARN S y L), mientras que en los extremos 5' de ambos segmentos genómicos se encuentra la secuencia inversa y complementaria de la misma. Se ha sugerido que estas secuencias terminales conservadas podrían representar el sitio de unión de L. Asimismo, se postula la formación de estructuras de duplex intra o inter segmentos con circularización del genoma como consecuencia de la complementariedad de las secuencias terminales, predicción que se encuentra sustentada por datos de microscopía electrónica (Meyer et al., 2002, Young & Howard, 1983).

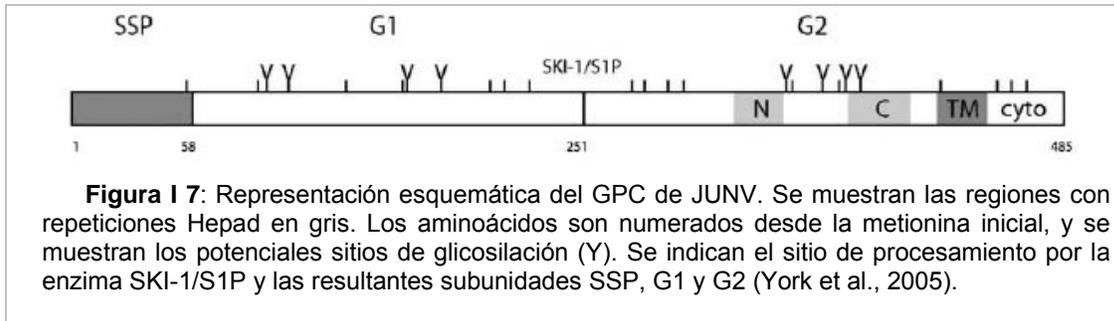
Las secuencias promotoras de la expresión génica y la replicación del genoma residen en los extremos 5' y 3' de los segmentos genómicos. Mediante el uso del sistema de minigenoma para LASV se determinó que el promotor funcionaría como un duplex (genoma circularizado). Mientras las primeras posiciones (1-12) funcionarían de manera "secuencia específica" con el complejo de replicación, las posiciones 13 -19 solo serían importantes para la complementariedad entre el promotor 5' y 3' lo cual sería relevante para la funcionalidad de la región promotora debido a la posibilidad de formación del duplex mencionado (Hass et al., 2006).

### **I.1.b. Las proteínas virales**

#### **I.1.b. 1. Glicoproteínas virales**

Las glicoproteínas virales de los arenavirus se sintetizan como precursores glicoproteicos de aproximadamente 70 kDa, los cuales son procesados post-traduccionalmente en dos pasos secuenciales. El complejo glicoproteico maduro de JUNV, consiste en 3 subunidades asociadas de manera no covalente, obtenidos por clivaje de GPC: un péptido señal (SSP) de 58 aminoácidos, la glicoproteína G1 responsable de la interacción con el receptor celular y la proteína de transmembrana G2 con actividad fusogénica. La estructura espacial de G2 comparte características comunes con otras proteínas de fusión de transmembrana de varias familias de virus. Sus dominios ricos en residuos hidrofóbicos (H) y polares (P) (conocidos como repeticiones "hepad" cuando se configuran en  $\alpha$ -hélices), en los extremos N y C terminal serían los responsables de mediar el evento de fusión célula-célula dependiente de pH (Gallaher et al., 2001, York et al., 2005).

El procesamiento de GPC ocurre tardíamente en la vía secretora entre la red media y el trans Golgi, requiere de previa glicosilación y de la integridad del dominio citoplasmático de G2 (Kunz et al., 2003, Burns & Buchmeier, 1993).



La proteasa responsable del primer evento de procesamiento aún no ha sido identificada. El segundo evento de procesamiento ocurre mediante el reconocimiento de la secuencia consenso R-(R/K/H)-L-(A/L/S/T/F)<sub>265</sub> por una proteasa subtilasa (*subtilisin kexin isozyme-1/site-1-protease*) SKI-1/S1P, enzima que se encuentra involucrada en el metabolismo del colesterol (Beyer et al., 2003, Lenz et al., 2001). Se demostró que el procesamiento no es requerido para la expresión de las glicoproteínas en la membrana celular pero es esencial para la incorporación de las mismas a los viriones y la producción de partículas virales infectivas (Kunz et al., 2003). Ambos eventos de procesamiento, como así también, la presencia del SSP son necesarios para la fusión de la envoltura viral y membrana endosomal mediada por la G2 (York et al., 2004).

### **I.1.b. 2. La nucleoproteína viral**

N junto con a los segmentos genómicos y L constituye las nucleocapsides virales. Es la proteína estructural más abundante en las partículas virales y en células infectadas. Alineamientos de secuencias aminoácidas de diferentes arenavirus han revelado alto grado de conservación, tanto de secuencias como de motivos estructurales. Los residuos de arginina y lisina son abundantes, apareciendo en clusters de dos o tres aminoácidos, presentando el extremo carboxi-terminal un segmento conservado de 4 o 5 residuos básicos que podrían funcionar como un dominio de unión al ARN. Mediante el análisis bioinformático de la secuencias aminoácidas de N de diferentes arenavirus y mediante ensayos de unión a metales, se ha evidenciado la presencia de un dominio de unión a Zn<sup>++</sup>, ubicado también en el extremo carboxi-terminal de esta proteína, el cual estaría involucrado en la unión de N al ARN viral (Parisi et al., 1996, Tortorici et al., 2001b). La estructura de N sería la de una proteína globular, básica y cumpliría una función dual durante el ciclo de multiplicación viral, 1) unirse al ARN viral para formar las nucleocapsides y, de esta manera proteger al ARN viral dentro la célula (Buchmeier, 2002) 2) participar de manera esencial para la transcripción y replicación del genoma junto con la polimerasa viral (Lee et al., 2000).

### **I.1.b. 3. La polimerasa viral**

La proteína L (180-250 kDa) de los arenavirus es una ARN polimerasa ARN dependiente, que comparte secuencias con motivos conservados característicos de las polimerasas de otros virus con genoma de ARN de polaridad negativa. Alineamientos de secuencias muestran la presencia de 6 dominios conservados entre los virus de ARN de polaridad negativa y dos regiones que están conservadas solo entre las polimerasas de arenavirus y bunyavirus. La proteína L, junto con N, es un componente de las nucleocápsides, ya que se ha detectado actividad de polimerasa asociada a estas estructuras (Buchmeier, 2002, Sanchez & de la Torre, 2005).

### **I.1.b. 4. La proteína Z**

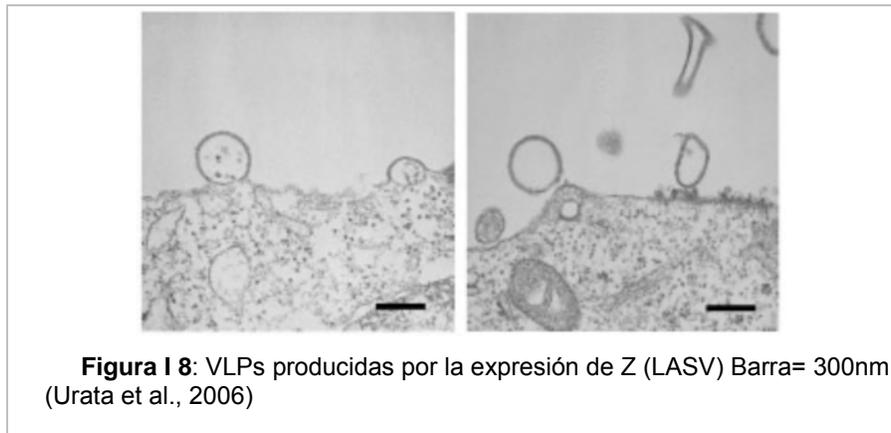
La proteína Z (11 kDa) es la proteína más pequeña codificada por el genoma de los arenavirus. Esta proteína presenta en su secuencia un motivo *RING*-Finger, con capacidad de unión a  $Zn^{++}$ , donde el orden de los residuos es el siguiente: **C X<sub>2</sub> C X<sub>9</sub> C X<sub>2</sub> H X<sub>2</sub> C X<sub>2</sub> C X<sub>10</sub> C X<sub>2</sub> C**. La coordinación de  $Zn^{++}$  entre los residuos de cisteína e histidina favorece la formación de multímeros de Z (Djavani et al., 1997). Se ha reportado la interacción de Z con diversas proteínas celulares, tales como la proteína de leucemia promielocítica (PML) y el factor de iniciación de la traducción eucariota E4 (Borden et al., 1998).

Se ha sugerido que la proteína Z es un componente estructural de la nucleocápside (Buchmeier, 2002), y que además, ejercería un rol fundamental en la brotación de partículas virales a partir de células infectadas (Perez et al., 2003). La función de Z respecto a la regulación de la transcripción y replicación es aún discutida ya que existen trabajos que señalan a Z como inhibitoria de la transcripción y replicación del ARN de LCMV y de TCRV (Cornu & de la Torre, 2001, Lopez et al., 2001), mientras que otros la señalan como necesaria para la síntesis tanto del ARNm como ARN genómico (Garcin et al., 1993). Se ha demostrado que el efecto inhibitorio de Z en la replicación y transcripción es dependiente de la integridad del dominio RING (Cornu & de la Torre, 2002). Las proteínas Z de los diferentes arenavirus poseen en su extremo C- terminal motivos conservados de prolinas (PPxY y P(T/S)AP), similares a los observados en proteínas de matriz de otros virus (Tabla I 2). Estos motivos se denominan motivos tardíos e intervienen en la interacción con diferentes proteínas celulares involucradas en el proceso de brotación viral.

Tabla I 2: Comparación entre los diferentes dominios tardíos de diferentes virus.

Virus	proteína	secuencia
VSV	M	pppyeedtsmeyapsap
Ebola	Vp40	mrrvtvptappayad
HIV-1	p6	lqsrpeptappees
LSV	Z	...saaptapptgaadsirpppysp
LCMV we	Z	...kyp1ptklkvstvpsspppyee
LCMV mx	Z	...kcplptklkistapspppyee
LCMV arm	Z	...kyp1ptrlkistapspppyee
PICV	Z	...cghslptkme flespsappyep
JUNV	Z	...nicwkplpttitvpveptapp
TCRV	Z	...nicwkplptsirvpleasapdl
GTOV	Z	...nicweqlptcitvpeepsappe
MACV	Z	...hicwkplptsitvpvepsapp
SABV	Z	...cgeelptsivvpiepsapped

La comparación de secuencias aminoacídicas de las proteínas Z de diferentes arenavirus señalan la presencia de un sitio de miristilación el cual sería necesario para la localización de Z en la superficie interna de la membrana celular donde ejercería papel fundamental en la brotación viral (Perez et al., 2004). Se ha demostrado a través de la expresión de la proteína Z de LASV, en ausencia de otros componentes virales, que esta proteína es capaz de localizarse en la superficie interna de la membrana celular y de formar estructuras denominadas partículas similares a virus (VLPs) (Figura I 8) (Strecker et al., 2003, Urata et al., 2006).



### I. 1.c. El ciclo de multiplicación de los arenavirus

El ciclo de multiplicación de los arenavirus, cuya duración oscila entre 12-24 horas, ocurre exclusivamente en el citoplasma de las células infectadas y la progenie viral es liberada por brotación a partir de la membrana plasmática (Coto et al., 1970, Meyer et al., 2002) (Figura I 9). Los arenavirus presentan un amplio tropismo celular. Consistente con estas propiedades, se ha identificado al  $\alpha$ -dístroglicano (DG), una proteína de la superficie celular, ampliamente

conservada, como receptor de los arenavirus LCMV, LASV y OLVV (Meyer et al., 2002). Sin embargo estudios recientes demostraron que aunque los virus del viejo mundo utilizan al  $\alpha$ -DG como receptor, solo los virus pertenecientes al clado C del nuevo mundo (Figura 1 2) utilizan el mismo para la entrada a células de embrión de ratón. Recientemente, se ha descrito como receptor celular para los virus del nuevo mundo pertenecientes a los clados A y B, entre los cuales se incluye los altamente patogénicos JUNV, MACV, GTOV y SABV al receptor de transferrina 1 (Radoshitzky et al., 2007). La entrada de los arenavirus a la célula ocurre por un evento de endocitosis mediada por receptor. Se ha documentado para LCMV que la entrada ocurre a través de grandes vesículas desnudas (Borrow & Oldstone, 1994), luego de lo cual las mismas entran a la vía endosomal y son acidificadas al moverse dentro de la célula. El pH intravesicular decrece desde 6.2 en los endosomas tempranos hasta aproximadamente 5 al tiempo de alcanzar los lisosomas, compartimentos finales de la vía. La fusión entre la envoltura viral y la membrana de la vesícula es disparada al descender el pH, siendo 5.3 el pH óptimo para LCMV y JUNV (Castilla et al., 1994, Di Simone & Buchmeier, 1995). Cuando el interior de la vesícula alcanza este pH, el complejo glicoproteico sufre un cambio conformacional irreversible en el cual G1 se disocia del complejo. Esta disociación deja expuesto al péptido de fusión contenido en G2 el cual sufre cambios conformacionales en su estructura y de esta manera provocaría la fusión de la envoltura del virus y la membrana endosomal (Castilla et al., 1994, Di Simone et al., 1994, York et al., 2005).

Una vez liberada la nucleocápside en el citoplasma, la estrategia de codificación ambisentido provee e impone un mecanismo de regulación temporal de la expresión génica de los arenavirus durante el curso de su ciclo de multiplicación. Experimentalmente se ha demostrado que el núcleo es importante para el ciclo de multiplicación, posiblemente la membrana nuclear sería requerida como soporte para la transcripción y replicación del ARN viral. Dado que se ha descrito la presencia de estructuras 5' CAP en los mARN de los arenavirus, se especula que la necesidad del núcleo también podría deberse a la adquisición de CAP mediante un mecanismo de "robado de CAP" del hospedador, similar al documentado para los bunyavirus (Meyer et al., 2002). Todos los ARNm subgenómicos de los arenavirus terminan en la región intergénica y no están poliadenilados (Southern et al., 1987).

La síntesis de N puede ocurrir en las células infectadas que han sido tratadas con inhibidores de la síntesis proteica, pero la progresión del ciclo de multiplicación más allá de esta etapa queda bloqueado. Esto llevó a la especulación que N podría estar involucrada en la regulación de la terminación de la transcripción en la región intergénica. En estadios tempranos de la infección cuando los niveles intracelulares de N son bajos, la progresión de la polimerasa sería arrestada en la región intergénica, y de esta manera solo los mARN de N (segmento S) y mARN L (segmento L) serían sintetizados. A medida que los niveles de N se acumulan en el citoplasma de la célula infectada, N se uniría a la región intergénica de

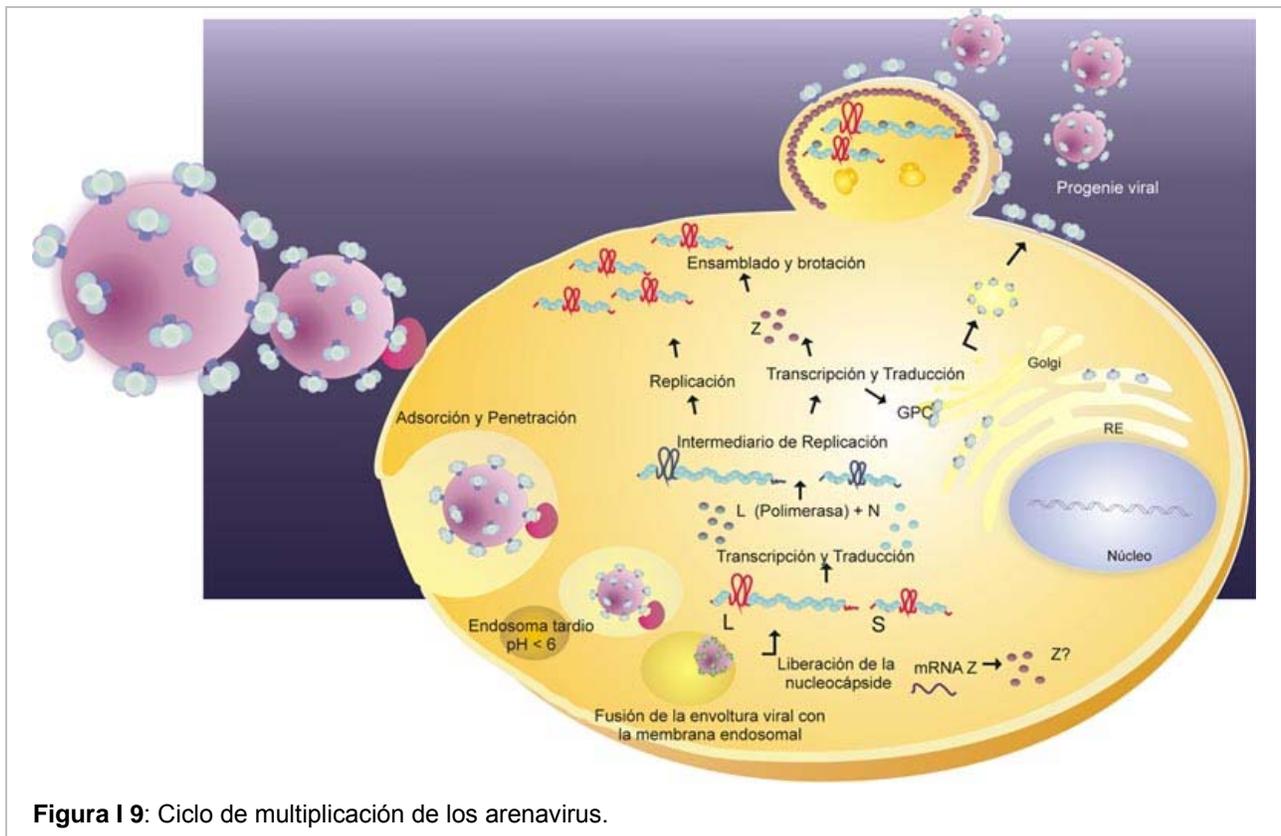
algunas moléculas de molde y permitiría la progresión de la polimerasa hacia el extremo 5' del templado y de esta manera completaría la replicación del ARN antígenómico. Por el contrario el ARNm de GPC no es transcripto hasta que la replicación del ARN ya ha comenzado. Esta separación temporal de la expresión de N y GPC ha sido convalidada mediante estudios de cinética de expresión de estos antígenos virales. Asimismo, basados en la estrategia de codificación ambisense, para las proteínas codificadas por el segmento L se podría esperar que la polimerasa L apareciera en el citoplasma tempranamente respecto de síntesis de Z. Por el contrario si el ARNm de Z se encuentra en el virion, Z se sintetizaría antes que L en el curso del ciclo de multiplicación viral en la célula infectada (Meyer et al., 2002). Según un primer modelo, es muy probable que el contenido intracelular y la distribución de N sean críticos para la regulación de niveles relativos de transcripción y replicación en las células infectadas con arenavirus (Tortorici et al., 2001a). Un modelo alternativo propone la existencia de dos complejos diferentes conteniendo la polimerasa, los cuales estarían comprometidos a la transcripción o a la replicación desde el inicio de dichos procesos, los cuales no competirían entre sí. La polimerasa estaría comprometida a uno de los mismos cuando se produce la iniciación en el extremo 3', ya sea utilizando un primer con *cap* para el proceso de la transcripción o empleando un mecanismo de "*prime-and-realign*" para la replicación del genoma viral (Pinschewer et al., 2003).

La concentración intracelular de la proteína L aumenta marcadamente durante el curso de la infección, sin embargo existe una correlación inversa entre la cantidad de proteína y el nivel de actividad polimerasa. Esta observación podría explicar por que existe una regulación negativa en la transcripción y la replicación viral que ocurre a tiempos tardíos de la infección aguda (Meyer et al., 2002).

Se ha reportado que Z ejercería su función inhibitoria mediante su interacción con la proteína L posiblemente provocando un cambio conformacional en su estructura, lo cual alteraría su capacidad de iniciar la replicación del ARN viral (Jacamo et al., 2003). Altos niveles de Z a tiempos tardíos de la infección podrían ser requeridos para la maduración y brotación viral (Cornu & de la Torre, 2002). Asimismo, se ha sugerido que Z podría interactuar con las estructuras secundarias presentes en la IGR, reclutando al genoma y a los distintos componentes proteicos durante el ensamblado de las partículas virales (Pinschewer et al., 2005). El ARN sintetizado de largo completo y de sentido genómico es utilizado para la formación de la progenie viral. Cabe destacar que solo el ARN genómico y antígenómico se encuentran formando capsides unidos fuertemente a N (Pinschewer et al., 2003).

Los arenavirus brotan desde la membrana plasmática, lo que involucra una asociación entre la ribonucleoproteína viral y la membrana del hospedador enriquecida en glicoproteínas virales. Las proteínas con dominios tardíos tienen un rol esencial en los últimos pasos de la brotación viral. Las proteínas celulares TSG101 y Nedd4, las cuales forman parte del sistema

del direccionamiento vacuolar de proteínas (*VPS vacuolar protein sorting*), interaccionarían con los dominios tardíos P(T/S)AP y PPxY, respectivamente, presentes en las proteínas Z de los diferentes arenavirus. Dicha interacción recluta a estas proteínas al sitio del ensamblado de los componentes virales, lo cual es necesario para la brotación de la progenie viral (Perez et al., 2003). La brotación de las partículas virales desde la membrana plasmática involucraría una compleja interacción entre las proteínas virales y proteínas de la maquinaria celular VPS, incluyendo TSG101, VPS4A y VPS4B (Urata et al., 2006).



**Figura I 9:** Ciclo de multiplicación de los arenavirus.

#### I.1.d. Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) y el virus Junín (JUNV)

La “Fiebre hemorrágica Argentina” (FHA) es una enfermedad endemoepidémica que afecta principalmente a trabajadores rurales de una de las zonas agrícola-ganaderas más importantes de la Argentina (Figura I 10). Su etiología fue establecida mediante el aislamiento del virus a partir de órganos de pacientes fallecidos en el área endémica de la enfermedad en la localidad de Junín, Pcia. De Buenos Aires (Parodi et al., 1958, Pirotsky, 1959). En años posteriores, JUNV pudo ser aislado a partir de roedores capturados en dicha área (Sabattini et al., 1977). JUNV establece una infección persistente en roedores de los géneros *Calomys* y *Akodon*, reservorios del virus en la naturaleza. La enfermedad estacional presenta un pico de frecuencia que ocurre durante la estación de recolección de maíz y sorgo (marzo-junio) lo que se encuentra relacionado con el aumento de la densidad de estos roedores, favoreciéndose

así el contacto del trabajador rural con los reservorios infectados (Carballal & Oubiña, 1991). Durante este período, el 75% de las personas infectadas son trabajadores rurales de sexo masculino (Maiztegui, 1977). JUNV penetra al organismo por la vía cutáneo-mucosa a través de las escoriaciones de la piel o por la mucosa conjuntival, oral o nasal por la inhalación de aerosoles, contaminados con el virus, producido durante la cosecha manual o mecánica. La principal fuente de contagio son las secreciones (orina y saliva) de roedores persistentemente infectados que contaminan pastos y rastros de las áreas endémicas (Carballal & Oubiña, 1991).

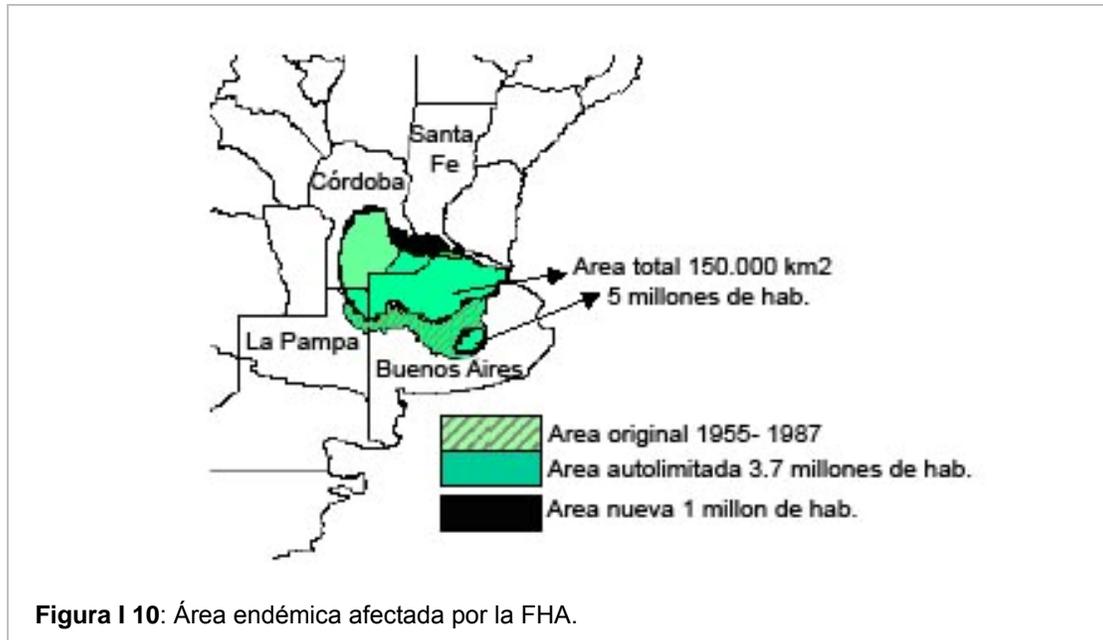
Habitualmente, la infección del ser humano con las cepas salvajes produce enfermedad clínica (formas leves, moderadas o graves y aún mortales). La enfermedad comienza con fiebre, mialgia y malestar luego de un período de incubación de 1-2 semanas. Típicamente luego de 3-4 días los síntomas incrementan su severidad y llevan al paciente a la consulta médica. Luego sobrevienen fallas multisistémicas, particularmente gastrointestinales, dolor abdominal, náuseas y vómitos. Comúnmente se manifiestan mareos, migraña, fotofobia, dolor retro-orbital y desorientación, asimismo, los signos neurológicos también son frecuentes, observándose temblores finos en los dedos de la mano y lengua. Durante la segunda semana, el 70-80% de los pacientes inicia su mejoría. En el 20-30 % restante, se presentan, entre los 8 y 12 días del inicio de los síntomas, manifestaciones hemorrágicas o neurológicas severas, shock y/o complicaciones bacterianas. Las formas graves sean hemorrágicas, neurológicas o mixtas, son fatales en un 90% (Castilla, V & Enria, D. 2006).

Para la FHA se dispone de un tratamiento específico que consiste en la administración de plasma inmune dentro de los primeros 8 días desde el inicio de los síntomas. Este tratamiento reduce la mortalidad de 25% - 35% a menos del 1%, cuando se administra en dosis estandarizadas de anticuerpos neutralizantes contra el virus JUNV (3500 UT/ Kgr) (Castilla, V & Enria, D. 2006).

FHA es endémica de la pampa húmeda, en la región más fértil de la Argentina. Una de las características más sobresalientes de la epidemiología de la enfermedad es la extensión geográfica progresiva de su área de dispersión. En 1958 los casos estaban limitados a un área de aproximadamente 16.000 km<sup>2</sup>, con una población en riesgo de 270.000 habitantes. En 1963 se registraron nuevos casos en Córdoba, mientras que entre 1964-1967 nuevas áreas fueron encontradas en la provincia de Buenos Aires y más tardíamente se registraron casos en Santa Fe. En el presente la región endémica cubre un área aproximada de 150.000 km<sup>2</sup> con una población en riesgo estimada de 5.000.000 de habitantes. La extensión geográfica durante periodos más recientes sugiere una autolimitación de la extensión del área endémica (Enria & Barrera Oro, 2002) (Figura I 10).

La incidencia de la enfermedad tiende a ser inicialmente alta en áreas nuevas, seguido por una disminución de los casos. La dinámica de la enfermedad esta sujeta a variaciones que

podrían deberse al incremento de la seroprevalencia, al cambio de la virulencia del virus circulante a lo largo del tiempo o cambios en la población y hábitos de migración de roedores (Clegg, 2002).



Para la FHA, el control de roedores o del contacto de las personas con las poblaciones de roedores infectados no ha sido posible. Por esta causa, la mayoría de los esfuerzos para la prevención estuvieron dirigidos, a la obtención de una vacuna.

La línea de investigación de virus vivo atenuado había alcanzado hacia la década de 1960 progresos importantes, evidenciados por la obtención de la cepa atenuada XJCl<sub>3</sub>. Esta línea constituyó un antecedente de la vacuna actual de JUNV vivo atenuado, cepa Candid# 1 (Maiztegui et al., 1998).

En 1991 se inició la vacunación de la población adulta expuesta a mayor riesgo natural. El impacto de esta vacunación selectiva se ha visto reflejado en una modificación de los parámetros epidemiológicos clásicos de la enfermedad. La incidencia de la enfermedad desde que se inició esta vacunación selectiva ha ido decreciendo, con epidemias en las que se han registrado el menor número de casos desde la emergencia de la enfermedad en la década de 1950. Sin embargo, debe destacarse que aun con muy buenas coberturas de vacunación, es probable que ocurran casos y brotes pequeños aislados de FHA, dado su carácter de zoonosis con reservorio en roedores silvestres (Castilla, V & Enria, D. 2006).

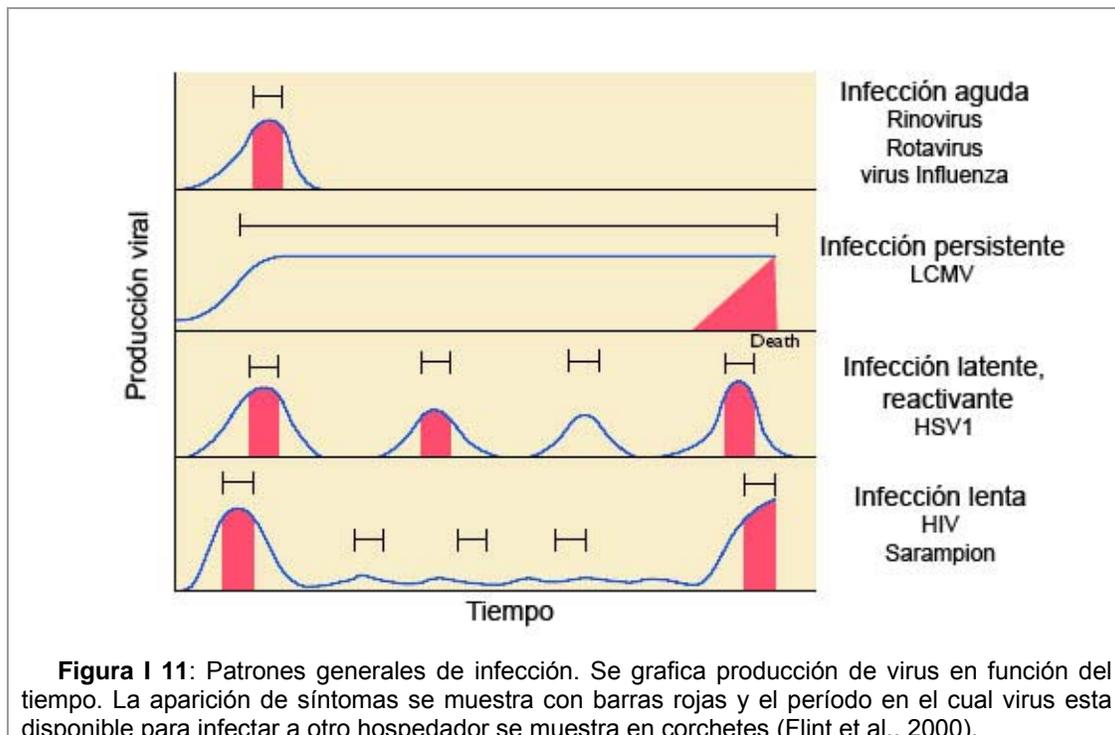
## I. 2. Las infecciones virales

Los virus son parásitos celulares obligados y como tales han desarrollado distintas estrategias como marco en su relación con el hospedador a fin de asegurar su supervivencia en la naturaleza.

Tres requerimientos básicos son necesarios para que el virus logre la infección exitosa de un organismo: suficiente cantidad de virus para dar inicio a la infección, células susceptibles a la multiplicación viral y las defensas antivirales locales del hospedador deben estar ausentes o ser inefectivas (Fields et. al., 2001).

El destino de una infección estaría determinado entonces por la capacidad del agente de infectar y replicar dentro del hospedador y la habilidad del hospedador de responder eficientemente ante la infección a través de su sistema inmune. En algunos casos, la respuesta montada por el hospedador contra el virus se manifiesta como un proceso nocivo para dicho hospedador ya que sus defensas destruyen células infectadas produciéndose una inmunopatología que puede llevar a una falla en los órganos vitales (Thomsen et al., 2000).

A pesar de esta complejidad es posible identificar patrones comunes de infección considerando período/s de producción viral, aparición de síntomas y disponibilidad de virus para infectar otros hospedadores (Figura I 11).



### I. 2.a. La infección aguda

La infección “aguda” se caracteriza por una rápida producción de virus infeccioso seguido por una respuesta inmune efectiva que elimina la infección por parte del hospedador. Como ejemplo de infecciones agudas pueden citarse los ejemplos de los virus influenza y rinovirus. Las mismas son usualmente de corta duración en un hospedador sano ya que las partículas infecciosas y las células infectadas son completamente eliminadas por el sistema inmune en un período corto de tiempo. Aun así, la infección aguda es una estrategia efectiva para la supervivencia del virus, ya que parte de la progenie viral invariablemente va a estar disponible para infectar a otro hospedador susceptible antes de la resolución de la infección (Flint et al., 2000).

### I. 2.b. Las infecciones persistentes

A diferencia de las infecciones agudas, las infecciones persistentes no son resueltas rápidamente y partículas o productos virales se producen por un período largo de tiempo. La persistencia viral *in vivo* ha sido descrita tanto para virus con genoma de ADN o ARN. La misma, está caracterizada en primer lugar por una respuesta inmune inefectiva ya sea para reconocer y/o eliminar al virus o a las células infectadas, lo cual ocurre como consecuencia del despliegue de diferentes estrategias de multiplicación viral (Oldstone, 1989).

Las estrategias implementadas por los virus a fin de escapar del sistema inmune del hospedador abarcan una gran variedad de tácticas (Tabla I 3).

Tabla I 3 Estrategias virales para evadir al sistema inmune (Fields et. al., 2001)

<b>Mecanismo de escape</b>	<b>Ejemplos</b>
Expresión génica restringida (expresión de proteínas virales mínima o ausente)	HSV, VZV: en la infección latente de neuronas. EBV: en linfocitos B HIV en linfocitos T.
Infección de sitios inmunológicamente privilegiados o sitios con escasa vigilancia del sistema inmune.	HSV, VZV, Sarampión: infección de neuronas CMV: infección en el riñón Papiloma: infección en la epidermis.
Variación antigénica: Mutación de sitios antigénicos críticos para el reconocimiento de anticuerpos y células T.	HIV, EBV, LCMV: Variantes de escape HIV, HBV variantes antagonistas del receptor T
Interferencia en el procesado y presentación de antígenos	HSV (ICP47), HCMV (US6), Adenovirus (E3-19K): proteínas que interfieren con el TAP HCMV (pp65): inhibe el procesamiento mediado por proteosoma. HIV: destrucción de linfocitos T CD4+
Alteración en la expresión o tráfico de MHC-1	Adenovirus (E3-19K), HCMV (US3); MCVM (m152): Retención de MHC-1 en el RE

	<p>HCMV (US11): Translocación reversa del MHC-1 del RE al citoplasma.          HIV (Vpu): Degradación del MHC-1.          HIV (Nef): Acumulación del MHC-1 en el aparato de Golgi.</p>
Supresión de las moléculas MHC-1 en la superficie celular requeridas para el reconocimiento de los linfocitos T	Adenovirus (E3-19K), CMV (US2, 3, 11), HIV (Nef, Vpu), BPV (E6)
Expresión de proteínas virales que inhiben la función de citoquinas.	Adenovirus (E1A), CMV: bloquean la transducción de señales de la vía JAK/STAT Adenovirus (VA), EBV (EBER), HIV (RNA TAR): inhiben la función del interferon. EBV (BCRF1 homólogo de IL-10): inhibe la síntesis de IL-2 e IFN y la expresión de TAP.
Tolerancia inmunológica	Delección clonal o anergia de Linfocitos T citotóxicos específicos del virus en portadores de HBV.
Distribución del virus célula a célula mediante la formación de sincicios	HIV y Sarampión.

Además de evadir al sistema inmune, el virus debe sortear un nivel de control secundario que se interrelaciona con el sistema inmune y esta conectado a la dependencia obligada del virus por la célula, por lo tanto este nivel secundario también juega un rol importante en la modulación de la infección a nivel celular. Existen tres categorías de vías regulatorias que proveen un nivel de control secundario en la célula infectada: el ciclo celular, el proceso de apoptosis y las vías intra o extracelulares de transducción de señales (Ghazal et al., 2000).

Para los sistemas virus-célula en los que el virus se comporta como lítico, la infección persistente generalmente requiere de una restricción en la expresión génica viral o la generación de variantes virales atenuadas. El estadio de diferenciación celular puede ser un factor que determine el balance entre infecciones líticas y no líticas (Fields et al., 1996). Se ha demostrado la existencia de una relación entre la multiplicación restringida de HIV y la diferenciación de monocitos (Pauza et al., 1988). Respecto a funciones de células diferenciadas, se ha observado que la infección persistente del virus de la enfermedad de *Borna* (BDV) en células PC12 conlleva a cambios en la morfología celular y en la expresión de genes involucrados en la plasticidad neuronal (Hans et al., 2001). Asimismo, existen ejemplos como el virus Epstein-Barr virus (EBV) que induce eficientemente la multiplicación de las células B humanas previniendo la muerte celular (Wensing & Farrell, 2000).

Respecto del mencionado proceso de apoptosis, se han reportado virus capaces de inducir la muerte celular programada en células blanco así como también se han estudiado ejemplos

de virus que han desarrollado estrategias para limitar o restringir este proceso en las células que infectan (Chuang et al., 2007, Khvalevsky et al., 2007, Velu et al., 2007).

La transducción de señales de la célula hospedadora puede tener un rol importante en el establecimiento de la infección persistente. Se ha descrito la importancia de la vía de señalización de JNK and PI3K/Akt en el establecimiento de la infección persistente de SARS-CoV en células Vero E6 (Mizutani et al., 2005).

Dentro de los factores que dependen de la célula huésped y modulan la persistencia del virus podemos citar al interferón, cuya función antiviral generalmente se presenta asociada con la selección de partículas virales y el estado fisiológico del cultivo. Se ha descrito que proteínas estructurales de HCV juegan un rol importante en el escape de este virus al sistema de interferón, ya sea por que la expresión de proteínas virales interfieren con la señalización de interferón tipo I mediante la reducción de los niveles de STAT1 fosforilada o mediante la unión de la proteína del core directamente a STAT1. Esta vía parece ser crítica para el establecimiento de la infección persistente de HCV y tiene implicancias importantes en el entendimiento de las interacciones complejas entre proteínas virales y las defensas antivirales de la célula hospedadora (Lin et al., 2006, Luquin et al., 2007).

Las infecciones persistentes suelen ser consideradas también como el resultado de un equilibrio dinámico entre mutaciones del genoma viral y alteraciones de la célula blanco, lo cual ha sido descrito para reovirus, coronavirus, picornavirus y parvovirus. Desde el punto de vista de la célula, esta co-evolución de la célula infectada ha sido asociada a una alteración en la expresión de los receptores en la superficie celular o cambios en las vesículas intracelulares y la morfología del RE interrumpiendo el transporte entre el mismo y la membrana celular con el concomitante bloqueo de la vía secretoria (Lusso, 2006, Moffat et al., 2005). Asimismo, procesos tales como: el control post-transcripcional/ traduccional por medio de productos génicos virales o celulares, la estabilidad del ARN o proteica, la regulación del transporte de ARN y proteínas, como así también el transporte vesicular y el control vía factores de transcripción específicos resultan claves para regular el estadio de persistencia (Ghazal et al., 2000).

Una característica particular observada en las infecciones persistentes es la llamada *resistencia homóloga*. La misma se refiere a la propiedad de una infección establecida para prevenir la replicación de un segundo virus, idéntico o relacionado al que le dio origen a la infección. Esta interferencia, la cual no es mediada por interferón o partículas defectivas interferentes, ocurre en varios sistemas virus-célula y puede ser debida a la exclusión del virus sobreinfectante durante las etapas tempranas de adsorción y penetración o bien puede ocurrir luego que el genoma del virus sobreinfectante ha sido liberado en el citoplasma. La entrada de los virus a la célula se da por interacciones específicas del mismo con sus receptores, y ha sido evolutivamente seleccionada para no interferir en los pasos tardíos del

ciclo de multiplicación. Algunos virus tales como HIV, el virus del sarampión, el virus influenza y otros lentivirus han desarrollado mecanismos para solucionar este problema mediante una regulación negativa de la expresión de los receptores luego de la infección (Breiner et al., 2001). Por otro lado, la habilidad de la infección viral establecida de interferir con un virus homólogo sobreinfectante intracelularmente es generalmente atribuida a la habilidad del virus original de competir exitosamente por componentes limitados que son esenciales para la replicación viral (Adams & Brown, 1985).

Respecto a la generación de variantes virales, para muchos virus, el establecimiento de la infección persistente está asociada a la producción de partículas defectivas interferentes (D.I.), que son mutantes de delección subgenómicas que carecen de uno o mas componentes del genoma salvaje. Estos mutantes son incapaces de generar una infección productiva y pueden actuar modulando la infección del virus salvaje tanto *in vivo* como *in vitro* (Cave et al., 1985, Huang, 1973, Huang et al., 1980, Rao & Huang, 1980, Rao & Huang, 1982, Tsai et al., 2007). La presión ejercida por la generación continua de DI hace que se seleccionen mutantes virales que son resistentes a la interferencia producida por las mismas y de esta forma, habría ciclos de D.I. diferentes a lo largo de la infección persistente.

Asimismo, se han reportado la selección de mutantes termosensibles durante la infección persistente de varios virus en cultivos celulares (Chen et al., 1994, Rice & Wolff, 1978, Weber et al., 1985). Dichas mutantes son letales condicionales que pueden presentar alguna mutación en su genoma a modo tal que a la temperatura restrictiva alguna proteína codificada por dicho genoma no se sintetiza o no sería funcional. Las condiciones de cultivo de las células persistentemente infectadas (generalmente 37°C) son semipermisivas para las mutantes *ts*. Dado que estas mutantes son en su mayoría menos citopáticas y tienen menor tasa de crecimiento respecto de los viriones salvajes esto permite una menor producción de progenie por célula resultando en la supervivencia de la célula huésped.

Para algunos virus animales se verifica una tendencia hacia adaptaciones que favorecen un balance dinámico entre el virus y la célula asegurando la supervivencia tanto del hospedador como del agente infeccioso (Ghazal et al., 2000).

### **I.2.b. 1. Infecciones persistentes por arenavirus *in vivo***

Una de las principales características de la biología de los arenavirus es su capacidad para producir infecciones persistentes en sus hospedadores naturales, asegurándose, de esta manera, su perpetuación en la naturaleza. El virus LCMV, prototipo de la familia *Arenaviridae*, está considerado como el sistema modelo más ampliamente estudiado de infección persistente *in vivo*. Dichos estudios, resultaron en el esclarecimiento de conceptos fundamentales en la biología moderna.

La infección persistente producida del ratón con LCMV fue documentada por primera vez por Traub (1936), quien detectó virus infeccioso en tejidos y en la sangre de ratón infectados naturalmente con este virus a lo largo de toda la vida del animal. Se desarrollaron diferentes modelos con el fin de reproducir la infección persistente de LCMV en el ratón. De esta forma, se describieron diferentes respuestas del ratón, las cuales dependen de la edad del animal al momento de la infección, su estado inmunológico y la vía de inoculación del virus.

La inoculación de un ratón adulto inmunocompetente con LCMV por vía intracerebral usualmente lleva a una leptomeningitis aguda, coroiditis y la inflamación del ventrículo y posterior muerte del animal entre los 6-8 días. Siendo los linfocitos T las células efectoras involucradas en esta reacción citotóxica. Por el contrario, cuando el virus es inoculado en un animal adulto inmunocompetente por una vía periférica los animales sobreviven o mueren dependiendo del balance entre las defensas inmunológicas y la injuria inmunopatológica. El animal elimina la infección mediante la expansión clonal de CTLs CD8 (+) para antígenos virales, los cuales son los encargados de eliminar a las células infectadas en la periferia, en cambio, si el virus infecta el tejido leptomeníngeo o células del plexo coroideo en el cerebro, los CTL específicos para el virus inducen la muerte del animal (Oldstone, 2002). El virus puede ser encontrado en diversos órganos: sangre, hígado, bazo, nódulos linfáticos, timo, riñón pulmón y cerebro. También se comprobó que multiplica en macrófagos y linfocitos T y B. En el caso que el animal sobreviva, el virus es eliminado y se establece un *pool* de linfocitos T de memoria estable.

Cuando animales adultos inmunocompetentes son inoculados con una dosis letal del virus junto con un agente inmunosupresor (irradiación, timentomía o anticuerpos anti-linfocitos) o inoculados con una variante viral inmunosupresora, la cual suprime la respuesta CTL específica de LCMV, se logra la infección persistente de este virus, lo que confirma que la patología observada en la infección aguda es timo dependiente (Ahmed et al., 1984, Moskophidis et al., 1993, Zajac et al., 1998).

Asimismo, se ha descrito que cuando se inoculan ratones neonatos (menos de 24 días de vida) por cualquier vía, incluyendo la intracerebral, el virus persiste en tejidos y sangre a lo largo de toda la vida del animal. Sin embargo, la reconstitución de estos neonatos con linfocitos específicos contra LCMV conduce a la eliminación del virus infeccioso y del ácido

nucleico viral de los tejidos de los mismos. En el caso mencionado o cuando el virus fue transmitido verticalmente entre madre y feto, la inmunosupresión observada solo esta restringida para la respuesta T contra LCMV (Oldstone, 2002).

Los requerimientos para la eliminación de la infección persistente de LCMV difieren de aquellos necesarios para la eliminación de la infección aguda. Usualmente cuando ratones adultos inmunocompetentes son inoculados con LCMV, aunque las respuestas innatas incluyen la producción de interferón, macrófagos y células *natural killer*, es la respuesta adaptativa, principalmente linfocitos CD8+ específicos del virus, los responsables de la eliminación del patógeno. Mediante experimentos empleando ratones *knock out* para una variedad de genes codificando para componentes de la respuesta T, citoquinas o moléculas efectoras, como perforina, se demostró que células T CD8+ y perforina eran los requerimientos primordiales para el control de la infección aguda, aunque se postula que las citoquinas IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  pueden actuar modulando la infección. De la misma manera, aunque las células B y/o los anticuerpos neutralizantes no son requeridos para la eliminación del virus, pueden jugar un rol substancial en disminuir la carga viral y pueden actuar de manera sinérgica con las células T antivirales y prevenir la reinfección (Slifka, 2002).

Por otro lado, el control a largo plazo de la infección persistente requiere de la ayuda de las células T CD4+ para sostener la respuesta de las células T CD8+ además de requerir IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  los cuales resultan esenciales para eliminar el virus durante la infección persistente (Oldstone, 2002).

MacFarlane Burnet y Fenner en 1949 postularon la eliminación de células inmunocompetentes como la base de la tolerancia inmunológica para virus persistentes y antígenos propios. En aquel momento, este concepto fue utilizado para explicar la retención de virus infeccioso durante toda la vida del animal, usualmente en ausencia de anticuerpos circulantes y fue definido como un estado refractario en respuesta a un virus (antígeno) previo a la exposición de ese antígeno (Burnet, F.M. & Fenner, F., 1949).

La ausencia de circulación de anticuerpo libre en la infección persistente que se inició *in utero*, durante el nacimiento o en los adultos, se debe a que los anticuerpos en vez de viajar libres en la sangre, se hallan unidos al virus o antígenos virales formando complejos inmunes (Oldstone, 2006). Asimismo, en un primer momento se describió la eliminación clonal irreversible de células T como factor determinante de la infección persistente, sin embargo, mas tarde, mediante la realización de experimentos, se observó que, si por algún mecanismo la infección persistente es eliminada, (por ejemplo mediante inmunoterapia adaptativa), el ratón puede regenerar la respuesta CTL antiviral contra LCMV. Esto llevó a postular que las células T están presentes en los hospedadores persistentemente infectados pero no responden o no son capaces de eliminar la infección postulándose la situación de extenuación

de las células T o impedimento funcional, hechos que sugieren la reversibilidad de la misma (Oldstone, 2006).

Se ha mencionado que los virus poseen diversas estrategias para desbaratar la elaboración de la respuesta inmune, actuando en algún lugar de la vía para la generación de la activación o la expansión de las células T. Entre dichos mecanismos se describe la infección de células del sistema inmune, entre ellas, células dendríticas (DC). Estas células son un nexo entre la respuesta inmune innata y adaptativa y son las células centinelas que protegen al hospedador contra los organismos infecciosos. Las DC en el bazo y los nódulos linfáticos son principalmente las células presentadoras de antígenos más importantes del sistema inmune ya que procesan los antígenos virales, incorporándolos a las moléculas MHC a fin de presentarlos a células T *naive* y de esta manera activarlas para realizar sus funciones efectoras. En el caso de LCMV se describió que, no solo es capaz de multiplicar en estas células, sino que también interfiere en su desarrollo, expansión y función (Hahm et al., 2005, Sevilla et al., 2000, Sevilla et al., 2004). Estas observaciones respecto de la alteración en las funciones sin destrucción de las células fueron extendidas a la infección de linfocitos y macrófagos (Ahmed et al., 1987, Doyle & Oldstone, 1978). En conjunto, esto podría resultar en el impedimento funcional de las células T observado durante la infección *in vivo* de LCMV.

También, se ha documentado la importancia de los tejidos del hospedador en la selección de variantes virales. Se ha descrito la aparición de variantes virales en los tejidos linfoides de animales persistentemente infectados al nacer con LCMV cepa Armstrong. Estas variantes causan persistencia cuando son inoculadas en ratones adultos y están asociadas a supresión en la respuesta de células T. Por otro lado, el virus recuperado a partir del sistema nervioso central se comportó de manera similar a la cepa parental. Las bases moleculares del fenotipo inmunosupresor de estas variantes fue adjudicado a un cambio aminoacídico en la glicoproteína viral (cambio de una fenilalanina a una leucina en la posición 260) (Ahmed et al., 1991). Esta mutación, en conjunto con la mutación en la polimerasa (K a Q en la posición 1079) fueron asociadas al tropismo por los macrófagos, y se ha descrito que ambas son esenciales para el establecimiento de la persistencia *in vivo* (Matloubian et al., 1993). Una de estas variantes, denominada Clon 13 tiene una mayor afinidad por el receptor  $\alpha$ -DG respecto de otras cepas virales, incluyendo la cepa Armstrong. Entre las células del sistema inmune, las células CD11c<sup>+</sup> y las DEC205<sup>+</sup> células dendríticas esplénicas expresan primariamente el receptor celular  $\alpha$ -DG para LCMV. Las variantes que se unen al receptor con alta afinidad están asociadas con la multiplicación viral en la pulpa blanca del bazo, mostrando una replicación preferencial en células CD11c<sup>+</sup> y DEC205<sup>+</sup>, causando inmunosupresión y estableciendo la infección persistente. Por el contrario, variantes y cepas de LCMV que se unen con menor afinidad al receptor, replican preferencialmente en la pulpa roja y solo mínimamente en células CD11c<sup>+</sup> y DEC205<sup>+</sup>, generando una respuesta marcada de las

células T anti LCMV, la que elimina la infección viral. Esta interacción virus/receptor en las DC *in vivo* puede ser un paso esencial en la iniciación de la inmunosupresión inducida por el virus y el establecimiento de la persistencia viral (Oldstone, 2002).

Como se ha mencionado, la infección de neonatos con LCMV in útero o tempranamente luego del nacimiento resulta en una infección persistente de por vida, donde virtualmente todos los tejidos están infectados y en el sistema nervioso central la replicación está restringida a neuronas. Dado que los animales no presentan signos de deterioro y tienen un promedio de vida normal se postuló que la infección persistente ocurría en ausencia de enfermedad, aunque estudios posteriores mostraron una perturbación en las funciones diferenciadas de las células neuronales, alteraciones en el desarrollo del sistema nervioso central y efectos comportamentales diferenciales (Evans et al., 2002).

Respecto de la infección persistente de JUNV *in vivo*, en la década 1970 se encontró que *Calomys musculinus*, roedor que habita la zona endémica, estaba persistentemente infectado con este virus (Sabattini, 1977). A fin de estudiar los mecanismos involucrados en la persistencia viral se desarrollaron modelos experimentales a partir de la infección experimental de *C. musculinus* con la cepa XJCl<sub>3</sub> de JUNV (Frigerio et al., 1982, Gonzalez et al., 1982). Los animales neonatos infectados con cepas salvajes de JUNV presentaron un aumento en la mortalidad tardía respecto a los animales no infectados, su crecimiento resultó retardado y su fertilidad disminuyó (Vitullo et al., 1987). Neonatos (1-10 días) de *C. musculinus* inoculados con JUNV XJCl<sub>3</sub> por vía intraperitoneal desarrollaron la típica infección aguda, la cual se caracteriza por un cuadro encefálico con temblores, convulsiones, excitabilidad acentuada, lateralización de la marcha y parálisis flácida del tren posterior de aparición no regular, con 50-70% de mortalidad. Se pudo aislar virus a partir de cerebro desde el día 6 p.i. con un máximo título viral el día 12 p.i. Fue posible detectar anticuerpos neutralizantes anti JUNV desde el día 11 p.i. y todos los animales crónicamente infectados mostraron presencia continua de los mismos. Durante la etapa aguda de la infección se observó que 40% de los animales desarrollaron linfopenia y neutrofilia con una pequeña variación en la población de monocitos. Asimismo, se observó una hipoglucemia importante respecto de los valores control. Por el contrario, durante la etapa crónica de la infección no se observaron variaciones en los parámetros hematológicos de los animales persistentemente infectados respecto de los animales control (Steyerthal et al., 1990). El virus se localizó en cerebro, tanto en los animales muertos por acción del virus como en los cricétidos que se recuperaron. Estos últimos desarrollaron una infección crónica pero con escasa eliminación de virus por vías naturales. Experimentalmente se detectó transmisión vertical post-parto y transmisión horizontal de JUNV, siendo esta última el mecanismo de contagio mayoritario. Esto último ocurriría mediante el contacto cercano entre animales siendo la saliva la secreción infectiva principal,

aunque la orina también puede estar contaminada. La máxima concentración viral se encontró en las glándulas salivales, y aunque el virus se encontró en diversos órganos, especialmente nódulos linfáticos y bazo, el hecho que la producción viral sea tan alta en las glándulas salivales apoyó la idea que la saliva es la ruta principal de la dispersión del virus en la naturaleza.

La susceptibilidad decrece con la edad, y animales mayores a 20 días resultaron resistentes cuando fueron infectados por vía intraperitoneal. Sin embargo se observó que adultos fueron inoculados por vía intranasal desarrollaron una enfermedad neurológica con 50% de mortalidad, manifestando los sobrevivientes síntomas neurológicos persistentes asociados a una detención del crecimiento. En este último caso, se observó que los sobrevivientes tienen una baja eficiencia reproductiva hecho que indica que la transmisión vertical no sería un mecanismo viable por si mismo para mantener la infección en la naturaleza (Vitullo et al., 1987). Hasta el momento, la infección persistente del JUNV ha sido correlacionada con altos títulos de anticuerpos neutralizante dirigidos hacia el virus (Weissenbacher et al., 1987).

Los mecanismos que llevan a la persistencia viral en *Calomys* se encuentran poco explorados debido a la dificultad de la crianza en cautiverio de este cricétido. Se ha descrito que, virus recuperado durante los días 14 a 61 p.i. a partir de sangre de animales infectados con JUNV XJCl<sub>3</sub>, se comportó de manera diferencial frente a la neutralización con antisuero anti JUNV, respecto del virus parental, concluyéndose que la emergencia de variantes antigénicas virales ocurre tanto en la infección aguda como en la persistente (Alche & Coto, 1986). Asimismo, ensayos de cinética de neutralización permitieron diferenciar entre la cepa parental y las variantes antigénicas aisladas a partir de *C. musculinus* infectados. Estos ensayos también revelaron que el virus obtenido a partir del cerebro del cricétido no era neutralizado eficientemente por el suero del animal a partir del cual se había realizado el aislamiento, indicando un probable un mecanismo de escape a la acción del sistema inmune, lo que permitiría el establecimiento de la infección persistente *in vivo* (Alche & Coto, 1986, Alche & Coto, 1988).

La administración temprana de suero anti-timocito a *C. musculinus* neonatos disminuyó la enfermedad clínica, la mortalidad y el daño cerebral. La administración tardía del suero no modificó el patrón de infección de JUNV, lo que sugirió que algún mecanismo inmune participaría en la patogénesis de JUNV en su reservorio natural (Coulombie et al., 1986).

La búsqueda de modelos de infección de JUNV *in vivo* llevó a la caracterización de varios sistemas virus - hospedador.

En el caso del ratón blanco, los neonatos son susceptibles a cualquier cepa del virus administrada por cualquier vía. Los animales desarrollan una meningoencefalitis letal causada por la inmunidad mediada por células. Los pocos sobrevivientes desarrollan una infección

persistente y el virus puede ser aislado a partir de cerebro hasta el día 140 p.i. (Rabinovich et al., 1987). También se observó persistencia de JUNV cuando se inocularon ratones adultos atímicos por vía intracerebral, ninguno de ellos presentó enfermedad neurológica durante un periodo de observación de 6 meses, aunque se detectaron niveles altos de infectividad en cerebro con un pico al los 32 d.p.i., al mismo tiempo apareció viremia junto con el pico de infectividad en el sistema nervioso central y no fue posible la detección de anticuerpos en circulación. Estos resultados mostraron el rol importante que tienen los linfocitos T en la eliminación del virus en el SNC, dada la persistencia inducida en los ratones adultos atímicos (Weissenbacher et al., 1986).

Respecto a la infección de JUNV en ratas, se observó que hay una estrecha relación entre la edad del huésped y la susceptibilidad a la infección. La mortalidad obtenida en ratas Wistar, inoculadas por vía intracerebral con dos cepas de distinta virulencia de JUNV a distintas edades mostró diferencias significativas. La mortalidad fue baja (5%) en animales inoculados a los 2 días de edad con la cepa patógena XJ, mientras que fue de 100% en animales de la misma edad inoculados con la cepa atenuada XJCl<sub>3</sub>. El tratamiento con suero antitímocito sugiere que el mecanismo patogénico varía con la cepa, aumenta con XJ y disminuye con XJCl<sub>3</sub>, indicando que solamente para esta última cepa la encefalitis tendría un origen inmunológico (Weissenbacher & Damonte, 1983). Se observó que cuando los animales de 2 días de edad se inocularon por vía intraperitoneal con las cepa XJ o XJCl<sub>3</sub> se indujo un efecto patológico inverso al observado por vía intracerebral. Se observa una mortalidad de 85% cuando son inoculados con la cepa patógena mientras que cuando son inoculados con la cepa atenuada, la mortalidad no supera el 15% (Weissenbacher & Damonte, 1983). Luego de la inoculación intracerebral de JUNV, durante la etapa aguda de la infección y en el transcurso de la enfermedad neurológica, se encontró antígeno viral en el 100% de los animales, en la mayoría de neuronas y en un menor grado en astrocitos, cuando se evaluó dicha expresión a los 540 días post infección los niveles fueron del 20%. El antígeno viral gradualmente desapareció del hipocampo pero persistió irregularmente en la corteza cerebral, ganglios basales, células de Purkinje y médula oblonga. Dicho patrón sugiere que sería una subpoblación neuronal en la cual el virus persiste, llevando en ocasiones a un síndrome neurológico retardado (Lascano et al., 1989). Cuando las ratas fueron estudiadas hasta 9 meses después de la infección, no se aisló virus infeccioso en el SNC por aislamiento convencional, pero si por cocultivo de encéfalo con células Vero (Weissenbacher & Damonte, 1983).

En el estudio de JUNV en primates se observó que el virus produce infección en las 5 especies de primates estudiados hasta el momento: *Alouatta carauá*, *Saimiri sciureus*, *Aotus trivirgatus*, *Cebus sp.* y *Callithrix jacchus*. En las primeras tres especies la infección no se manifiesta por enfermedad clínica, ni por aislamiento de virus, ni por alteraciones

hematológicas significativas y solamente se infiere por la aparición de anticuerpos neutralizantes (Frigerio et al., 1982, Weissenbacher et al., 1978). Respecto a *Cebus sp.* la inoculación periférica con la cepa XJ produjo una infección caracterizada por poliadenopatía generalizada, ausencia de cuadro hemorrágico, leuco-plaquetopenia significativa y aislamiento de virus a partir de sangre y fauces y una rápida respuesta humoral. Luego de la segunda semana post infección se observó pérdida de peso en todos los animales. En 4 de los 8 animales se observó signos de cuadro neurológico, mientras que los otros 4 mostraron moderados signos de dicho cuadro. Todos los animales se recuperaron menos 1 el cual desarrollo un coma profundo (Carballal et al., 1983). Animales sobrevivientes a la infección intramuscular e intracerebral con las cepas XJ y XJCl<sub>3</sub> respectivamente no exhibieron persistencia viral. Aunque los mismos fueron tratados con drogas inmunosupresoras, no se aisló virus de sangre ni órganos, aún luego de realizarse pasajes ciegos en ratón o células Vero (Oubina et al., 1984). En el *Callithrix jacchus*, la cepa patógena XJ por vía i.m. produce anorexia, pérdida de peso, trombocitopenia, leucopenia y síntomas neurológicos y hemorrágicos que culminan con la muerte del animal. Se recuperó virus a partir de orina, sangre y de todos los órganos evaluados durante la autopsia (Weissenbacher et al., 1979). Cuando *Callithrix jacchus* fue inoculado con XJCl<sub>3</sub>, los animales no mostraron signos de enfermedad ni mortalidad, aunque se observó viremia desde el día 18 al 40 p.i. Asimismo, se detectaron anticuerpos neutralizantes a partir de la tercera semana p.i. en adelante. Cuando se investigó el establecimiento de la infección persistente, no se detectó virus infeccioso en los días 370, 390, y 420 p.i., aunque el antígeno viral se encontró en órganos, los cuales no presentaban lesiones (Avila et al., 1985).

Respecto a la infección experimental del cobayo, la cepa XJ es patógena para el mismo, el cual reproduce la enfermedad humana con 100% de mortalidad entre los 11-14 días post infección, según la dosis inoculada. El cuadro clínico se caracteriza por fiebre, descenso del peso corporal e hipertermia, presentando los animales autopsiados lesiones hemorrágicas o petequias en tejido celular subcutáneo, intestino, suprarrenales y ganglios linfáticos. La diseminación viral se generaliza a casi todos los órganos, con excepción del SNC, siendo excretado el virus en escasa cantidad por orina y fauces (de Guerrero et al., 1977). A consecuencia de la infección se producen alteraciones hematológicas y se induce una inmunosupresión hacia antígenos no relacionados y hacia el mismo virus ya que no se detectan anticuerpos anti-JUNV en los animales durante todo el transcurso de la enfermedad (Weissenbacher & Damonte, 1983). El cobayo es un excelente modelo experimental para diferenciar cepas de JUNV debido a que la mayor o menor patogenicidad para el hombre de las distintas cepas de virus parece correlacionarse con la morbi-mortalidad que las mismas producen en el cobayo (Weissenbacher & Damonte, 1983). La inoculación del cobayo con la cepa XJCl<sub>3</sub> demostró que esta es atenuada respecto de la cepa XJ, no observándose

destrucción del tejido linfoide y detectándose respuesta inmune hacia el virus. En los animales sobrevivientes a la inoculación con cepas atenuadas por vía i.m., i.p. o i.c. se detectó persistencia viral durante períodos prolongados de tiempo en diversos órganos. En casi todos los casos la persistencia se desarrolló sin enfermedad aparente y se observó la presencia de anticuerpos neutralizantes (Malumbres et al., 1984).

### **I.2.b. 2. Infecciones persistentes por arnavirus *in vitro***

Aunque el comportamiento de los virus en cultivos celulares no es necesariamente un paralelo ni un modelo exacto de la infección causada por el mismo agente en su huésped natural, este sistema artificial permite en la gran medida estudiar los fenómenos de persistencia de distintos virus, en particular aquellos ligados al equilibrio establecido entre la fisiología celular y la multiplicación viral.

A su vez, también debemos considerar el hecho que, como se mencionó, el resultado de la infección de un organismo multicelular por un virus es la consecuencia de una compleja serie de interacciones entre factores virales y factores aportados por el huésped, en particular, el sistema inmune. Para llegar a dilucidar las bases de los mecanismos que controlan este proceso de infección, se debe comenzar, necesariamente, por el esclarecimiento de los eventos a nivel celular, ya que la diseminación o no de un virus va a ocurrir luego de repetidos ciclos de interacción virus-célula huésped.

Cuando se analizan estudios de infecciones persistentes de virus *in vitro* es importante distinguir entre: a) cultivos “*carrier*”, b) cultivos regulados (persistencia verdadera) c) transformantes (Rima & Duprex, 2005, Walker, 1964). Los primeros, están caracterizados por la presencia de células no infectadas en el cultivo, debido a la existencia de un equilibrio dinámico entre células infectadas y no infectadas y entre la liberación de virus y la replicación celular. Contrariamente, las infecciones persistentes *verdaderas* se caracterizan por presentar la totalidad de las células del cultivo infectadas con liberación de virus al medio, en donde el metabolismo y la duplicación celular no se hallan seriamente alterados (Rima & Duprex, 2005). Por último las infecciones transformantes se caracterizan por ser producidas por virus tumorales los cuales son capaces de inducir la proliferación celular y la pérdida de la inhibición por contacto.

Los arnavirus multiplican en una amplia variedad de cultivos celulares y son capaces de establecer infecciones persistentes *in vitro* con facilidad. En los estudios realizados de infecciones persistentes por arnavirus no se han encontrado alteraciones a nivel morfológico, como así tampoco la fisiología celular, ya que los cultivos persistentemente infectados poseen características de crecimiento y requerimientos nutricionales similares a los de las células no

infectadas (Boxaca et al., 1972, Candurra & Damonte, 1985, Damonte & Coto, 1979, Damonte et al., 1981).

El modelo más estudiado hasta el momento y el que ha aportado más información respecto de esta clase de infección es el de la infección persistente *in vitro* producida por el virus LCMV. Hotchin propuso que la infección transitoria de células L con LCMV se debe a ciclos repetidos de infección celular. El virus cumple su ciclo de multiplicación sin provocar la muerte celular solo en algunas células del cultivo, luego de lo cual las células sobrevivientes serían resistentes a la sobreinfección. Finalmente, las células pierden toda evidencia del virus y se convierten en susceptibles a ser re-infectadas. La persistencia según este modelo se mantendría en la población celular por infecciones cíclicas repetidas (Hotchin, 1974).

Este modelo podría completarse con resultados obtenidos a partir de estudios de la producción de D.I. por parte de los cultivos persistentemente infectados, las cuales permitirían la perpetuación del virus en el cultivo celular modulando la multiplicación viral y la capacidad citolítica del virus salvaje (Dutko & Pfau, 1978). Se ha descrito la presencia en abundancia de esta clase de partículas en los sobrenadantes de células persistentemente infectadas, cuyos niveles fluctuaron con un paralelismo opuesto a los niveles de virus infeccioso producidos (Lehmann-Grube et al., 1969, Weber et al., 1983, Welsh & Pfau, 1972). Mas tarde, el modelo de virus defectivo e interferente como causa probable de la persistencia de LCMV *in vitro* se consolidó ya que se hallaron ARN virales con deleciones importantes (Francis & Southern, 1988) e incluso también con pequeñas deleciones y/o sustituciones en regiones terminales no codificantes conservadas que permitirían la replicación pero no la transcripción de dicho genoma (Meyer & Southern, 1997). En cultivos persistentemente infectados no virogénicos se ha asociado la ausencia de DI a la producción de virus infeccioso intracelular (van der Zeijst et al., 1983a). Asimismo, la ausencia de virus infeccioso extracelular ha sido relacionada a la reducción o inhibición de la expresión de las glicoproteínas en la membrana de las células infectadas (Buchmeier et al., 1980, van der Zeijst et al., 1983b).

Como se mencionó anteriormente, los virus que establecen infecciones persistentes pueden mostrar efectos selectivos y únicos sobre la maquinaria transcripcional del huésped. En el caso de la infección persistente del LCMV *in vitro*, se ha descrito que este virus puede selectivamente perturbar la expresión de GAP-43, una proteína que tiene un rol central en la plasticidad neuronal, pero a su vez las neuronas infectadas permanecen libres de injurias estructurales (Cao et al., 1997, de la Torre et al., 1996). Asimismo, se ha descrito que la infección persistente de LCMV en una línea celular de pituitaria de rata interfiere con la síntesis de hormona de crecimiento por parte de estas células sin provocar cambios estructurales en las mismas, lo que ilustra un mecanismo molecular por el cual la infección del virus puede alterar una función celular diferenciada sin perturbar funciones vitales celulares (de la Torre & Oldstone, 1992).

El virus JUNV es capaz de crecer *in vitro* en una amplia variedad de sustratos celulares sin producir efecto citopático aparente, con la excepción de células Vero, HeLa y MRC5 (Weissenbacher & Damonte, 1983, Weber et al., 1985). Este efecto ocurre durante los primeros estadios de la infección, definiendo lo que se conoce como etapa aguda de la misma, en donde los niveles de multiplicación viral son máximos. A partir de 10 días post infección las células sobrevivientes a la acción viral comienzan a repoblar el cultivo estableciéndose un equilibrio entre el virus y la célula, que da origen a lo que se conoce como etapa persistente. De manera similar a lo observado para LCMV, la transición desde la infección aguda a la persistente esta caracterizada por una reducción en la liberación de progenie viral infecciosa y por una reducción de la expresión de las glicoproteína (G1) en la superficie de la célula infectada, mientras que se demostró la presencia de la glicoproteína responsable de la capacidad fusogénica (G2) en dichos cultivos. Asimismo, en algunos casos se observó un patrón de expresión diferencial de la nucleoproteína viral en el citoplasma de las células persistentemente infectadas con JUNV (Carballal et al., 1980, Ellenberg et al., 2002).

Estos cultivos, además de ser morfológicamente indistinguibles de las células no infectadas, se caracterizan por ser resistentes a la sobreinfección con virus homólogo y antigénicamente relacionado (Damonte & Coto, 1979, Damonte et al., 1978, Weber et al., 1985). En un cultivo de células Vero persistentemente infectado con JUNV no virogénico se comprobó que JUNV sobreinfectante fue capaz de adsorberse y penetrar pero no de sintetizar la cadena complementaria del genoma viral, paso intermediario necesario para la replicación del genoma del virus. Asimismo, la resistencia a la sobreinfección observada en estos cultivos fue atribuida a un factor asociado a células, dado que esta resistencia fue conferida a células susceptibles cuando las mismas fueron co-cultivadas junto con células persistentemente infectadas, mientras que sobrenadantes de células persistentemente infectadas no mostraron esta capacidad. Mas aun, la resistencia a la sobreinfección con virus homólogo, que mostraron dichos cultivos, fue correlacionada a la expresión de N en dichas células (Ellenberg et al., 2004).

En la mayoría de los trabajos realizados, en los que se estudiaron cultivos virogénicos, se describe la existencia de un patrón cíclico y niveles reducidos de liberación de virus infeccioso, con períodos de ausencia de liberación de progenie viral y producción en algunos casos de D.I. (Candurra & Damonte, 1985, Help et al., 1976).

Asimismo, a partir de la infección persistente de JUNV *in vitro* se han podido aislar variantes virales, cuya existencia se postula como una condición necesaria en el establecimiento y mantenimiento de este tipo de infecciones (Weissenbacher et al., 1987). Se ha descrito tanto para la infección persistente *in vitro* de JUNV como también para TCRV, la aparición de variantes virales termosensibles, termolábiles y de crecimiento lento respecto del

virus que le dió origen a la infección (D'Aiutolo & Coto, 1986, Damonte & Coto, 1979, Weber et al., 1985).

El objetivo del presente trabajo se centro en el análisis e identificación de parámetros diferenciales que permitan caracterizar una infección del tipo persistente del virus Junín *in vitro* respecto de una infección aguda.

Con este propósito se estudiaron las características de células BHK-21 persistentemente infectadas con JUNV en cuanto a la multiplicación viral, ya sea a través del análisis de la expresión de antígenos virales como así también mediante la caracterización del virus producido por el cultivo y de posibles alteraciones celulares responsables de la restricción de dicha multiplicación durante la persistencia.

El análisis mencionado se llevó a cabo a lo largo de 3 años lo que permitió inferir un perfil “evolutivo” del proceso.

Este análisis se realizó a través de un abordaje biológico y molecular del sistema permitiendo de esta forma completar estudios realizados previamente.

**MM. 1. Líneas celulares utilizadas**

Se utilizó la línea celular BHK-21 (riñón de hámster neonato, ATCC, CRL8544) y la línea celular continua Vero (riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*, ATCC CCL 81). Las líneas fueron subcultivadas semanalmente en medio de cultivo con 50 µg/ml de gentamicina empleando DMEM (medio mínimo esencial modificado por Dulbecco) con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado (56°C durante 30 minutos) y buffer HEPES 20 µM o MEM (medio mínimo esencial) con 5% de suero fetal bovino inactivado, respectivamente.

Los cultivos se crecieron y mantuvieron a 37° C en estufa con 4% de CO<sub>2</sub>.

**MM. 2. Virus utilizados**

Se utilizó la cepa XJCl<sub>3</sub> de virus Junín (JUNV), atenuada para cobayo, derivada de la cepa prototipo XJ (Guerrero et al., 1969, Rugiero et al., 1969). También se emplearon los arenavirus: Tacaribe (TCRV) cepa TRLV 11573, Pichindé (PICV) cepa 3739 y virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), cepa WE y los virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) cepa F y de la estomatitis vesicular (VSV), cepa Indiana, como controles no relacionados.

Los stocks de trabajo de los arenavirus se prepararon infectando células Vero con una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0,1 UFP/cél, utilizando como fuente de virus el sobrenadante del cultivo cosechado al 2<sup>do</sup> y 3<sup>er</sup> día post infección (p.i.) en el caso de LCMV, mientras que para el resto de los arenavirus, el sobrenadante se cosechó al 4<sup>to</sup> y 5<sup>to</sup> día p.i.. Los stocks tuvieron títulos que fluctuaron entre de 10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> UFP/ml. Los stocks de trabajo de HSV-1 y VSV se prepararon en células Vero infectadas a una m.o.i. de 0,1 UFP/cél.. El sobrenadante del cultivo se cosechó a las 24 h.p.i.. Fueron empleados los que tuvieron títulos de 10<sup>7</sup> -10<sup>8</sup> UFP/ml.

Todos los stocks se clarificaron por centrifugación durante 15 min. a 10000 x g, luego de lo cual el sobrenadante fue alicuotado y guardado a -70°C hasta su utilización,

**MM. 3. Obtención de cultivos persistentemente infectados con JUNV**

A partir de las células BHK-21 se obtuvo la línea celular persistentemente infectada con JUNV, denominada K3. Para ello, se inocularon experimentalmente células BHK-21 con la cepa XJCl<sub>3</sub> a una m.o.i. de 0,1 UFP/cél.. Las células K3 se mantuvieron de manera similar a las células no infectadas y resultaron morfológicamente indistinguibles de las mismas. Periódicamente se cosechó el sobrenadante de las células K3 a fin de cuantificar la infectividad producida por las mismas y la presencia de partículas defectivas interferentes (D.I.). Asimismo, durante el período de estudio las células K3 fueron desafiadas, en varios momentos, con distintos virus a fin de estudiar su resistencia a la sobreinfección. El experimento correspondiente a la Figura R26 se realizó a los 737 d.p.i., para ello, las células K3 se sobreinfectaron con los arenavirus: JUNV, TCRV, PICV y LCMV y los virus HSV-1 y

VSV a una m.o.i. de 0,1 UFP/cél.. A diferentes tiempos p.i. los sobrenadantes de cultivo se cosecharon a fin de cuantificar la producción de virus extracelular. El virus total se cuantificó a partir de las suspensiones obtenidas luego de someter a las células junto con el sobrenadante a 3 ciclos de congelado y descongelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ .. En ambos casos, el material se tituló en células Vero por el método de UFP. Como controles se utilizaron células BHK-21 infectadas de la misma forma y células K3 inoculadas con PBS.

#### **MM. 4. Ensayo de viabilidad celular (técnica del MTT)**

Para evaluar el crecimiento de los cultivos celulares, se utilizó el ensayo colorimétrico o técnica del MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil bromuro de tetrazolio). Este compuesto es procesado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa formando cristales de formazán (producto coloreado), siendo la cantidad de los mismos proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Las monocapas de células BHK-21 y K3 fueron crecidas en microplacas de 96 cavidades. Luego de diferentes tiempos post siembra, se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de una solución de MTT (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, USA) en cada cavidad y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 2 h. Transcurrido este período, se descartaron los sobrenadantes y los cristales de formazán fueron disueltos en 200  $\mu\text{l}$  de etanol por cavidad. Se determinó la densidad óptica, utilizando un lector de ELISA a una longitud de onda de muestra de 492 nm y una longitud de onda de referencia de 690 nm.

#### **MM. 5. Cuantificación de la infectividad viral**

La cuantificación de la infectividad viral se llevó a cabo mediante la técnica de unidades formadoras de placas (UFP). Para ello, se infectaron monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades con diluciones seriadas decimales del virus, dejando adsorber el inóculo por 1 h. a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al cabo de ese tiempo, se descartó dicho inóculo y las células se cubrieron con medio de cultivo semisólido formado por una mezcla en partes iguales de metilcelulosa 1,4% y MEM 2x (doble concentrado). Luego de 7 días de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ , para los arenavirus y de 48 h. para HSV-1 y VSV, las células se fijaron con formol 10% durante 1 h. y se tificaron con cristal violeta 1% en etanol 10%.

#### **MM. 6. Cuantificación de actividad interferente**

La presencia de partículas defectivas interferentes (D.I.) en los sobrenadantes de las células K3 se investigó mediante un ensayo de actividad interferente. Para ello, células Vero crecidas en microplaca de 6 cavidades fueron incubadas durante 1 h. con 0,4 ml del material de estudio sin diluir cuya actividad interferente se deseaba determinar. Al cabo de ese tiempo se descartaron los inóculos y la monocapa celular se lavó con PBS. Los cultivos se desafiaron con 150 UFP de JUNV. Como control, se desafiaron células Vero sin tratar con el material

interferente, con el mismo inóculo viral. Los cultivos fueron re-incubados 1 h. a 37°C y luego de finalizado ese período, se descartaron los inóculos y las células se cubrieron con medio de mantenimiento (MM, MEM con 1,5% de SFB) e incubaron a 37°C por 48 h.. Transcurrido ese período, los sobrenadantes se cosecharon y se guardaron a -70°C hasta su posterior titulación por la técnica de UFP.. La actividad interferente (AI) se calculó como el porcentaje de la relación entre la diferencia del título control y el título obtenido en los cultivos que habían sido pretratados con el sobrenadante de las células K3 respecto del título control, es decir:

$$\% AI = \frac{E - I}{E} \times 100$$

Donde I = título de JUNV a las 48 h.p.i. en las células tratadas con el material a estudiar. E = título de JUNV a las 48 h.p.i. en las células no tratadas.

### **MM. 7. Cuantificación de centros infecciosos**

El número de células productoras se estimó mediante la técnica de centros infecciosos. Para ello, monocapas de células K3 y células BHK-21 infectadas con JUNV se tripsinaron y se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 5 min. para luego ser resuspendidas en PBS. Este lavado se repitió 3 veces a fin de eliminar restos de tripsina. Finalmente las células se resuspendieron en medio de cultivo (1 o 0,5 ml) conteniendo una dilución 1:100 de un antisuero policlonal de conejo anti-JUNV y se incubaron durante 15 min. a 37°C. Las células se contaron en cámara de Neubauer y se sembraron (0,2 ml) sobre monocapas de células Vero. Luego de 2 h. de adsorción los cultivos fueron incubados con medio de cultivo semisólido. Transcurridos 7 d.p.i. las células se fijaron con formol 10% y se tiñeron con cristal violeta 1% etanol 10%. Se determinó el número de centros infecciosos contando la cantidad de placas, considerando que cada placa fue originada por una célula infectada productora de virus.

### **MM. 8. Técnica de inmunofluorescencia indirecta**

La expresión de antígenos virales (N y GPC/G1) y de TSG101 se estudió mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Con este fin, células BHK-21 y células K3 fueron crecidas sobre cubreobjetos. A las 24 h. post-siembra las células BHK-21 se infectaron con JUNV. A las 48 h.p.i. (72 h. post-siembra) las células se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con metanol a -20° C, durante 10 min. (IFI total). Para detectar antígenos de membrana, luego de los lavados, se incubaron las células con el anticuerpo correspondiente durante 30 min. a 4°C, se lavaron 2 veces con PBS frío y finalmente se fijaron con metanol a -20° durante 10 min. (IFI de membrana). Luego del período de fijación, se retiró el metanol y se dejó secar al aire. Las células así fijadas pueden almacenarse a -20°C por períodos prolongados, al cabo de los cuales las células se lavaron 3 veces con PBS por 5 min.. El paso siguiente, en el caso de la IFI total, fue la incubación a 37°C por 30 min. en cámara húmeda de las improntas

celulares con los anticuerpos correspondientes diluidos según se indica en la Tabla MM1. Transcurrido este período, se realizaron 3 lavados con PBS de 5 min. cada uno con agitación. Luego de los lavados, se llevó a cabo la incubación a 37°C durante 30 min. en cámara húmeda con el segundo anticuerpo: IgG de cabra anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluido 1/50 en PBS o IgG de cabra anti-conejo conjugado con isotiocianato de rodamina tanto para IFI total como la de membrana. Luego de la incubación con el segundo anticuerpo se realizaron 3 lavados con PBS y un lavado con H<sub>2</sub>O bidestilada. Posteriormente se tiñó a las células con una dilución 1/300 en H<sub>2</sub>O destilada de Azul de Evans 1%, durante 3 min. con agitación, como colorante de contraste.

Los preparados (cubreobjetos) fueron montados invertidos en glicerina tamponada y DABCO 2.5% (Sigma, Aldrich) y luego observados al microscopio de fluorescencia.

*Tabla MM1: Anticuerpos empleados para Inmunofluorescencia*

Anticuerpo	Especificidad	Dilución de trabajo	Tiempo de incubación
Anticuerpo monoclonal GB03-BE08 (Sanchez et al., 1989)	Glicoproteína de JUNV (G1 – GPC)	1/250 en PBS	1 h. a 37° C
Anticuerpo monoclonal NA05AG12 (Sanchez et al., 1989)	Nucleoproteína de JUNV (N)	1/250 en PBS	1 h. a 37° C
Anticuerpo monoclonal anti TSG101 TSG101 (C-2) (sc-7964 Santa Cruz, CA, USA)	Proteína celular TSG101	1/200 en PBS	1 h. a 37° C

### **MM. 9. Marcación de los microfilamentos de actina y N**

Células BHK-21, K3 y células BHK-21 infectadas a una m.o.i. de 5 UFP/cél. y crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades se procesaron a las 48 h.p.i. (72 h. post-siembra). Los cultivos fueron lavados 3 veces con PBS para su posterior fijado con paraformaldehído 4% en PBS por 10 min. a T° ambiente, seguido de 3 lavados con PBS y posterior incubación de 10 min. con NH<sub>4</sub>Cl a T° ambiente. Finalmente, las células se permeabilizaron con Triton X-100 1% por 10 min. a T° ambiente seguido por 3 lavados con PBS. Los preparados se incubaron con el Mab anti-N, NA05AG12, diluido 1/250 en PBS por 1 h. a 37° C. Luego de dicho período se realizaron 3 lavados con PBS de 5 min. cada uno. Posteriormente, los preparados fueron incubados 1 h. a 37°C con una solución del compuesto faloidina-FITC (Sigma, USA) 1/20 y el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con TRITC diluido 1/100 en PBS. Se realizaron 5 lavados con PBS de 10 min. cada uno, en oscuridad. Finalmente se realizó un lavado con H<sub>2</sub>O bidestilada y los preparados se montaron en una solución de glicerina tamponada conteniendo 2,5% de DABCO.

### MM. 10. Cuantificación de la actividad fusogénica

A fin de estimar la actividad fusogénica de las células K3, se emplearon cultivos crecidos por 48 h. sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades. Como control del experimento, se usaron células BHK-21 sin infectar e infectadas con JUNV a una m.o.i. de 5 UFP/cél.. A las 72 h.p.i., se trató a los cultivos con MEM a pH 5 o pH 7, durante 1 h., al cabo de ese tiempo se retiró el medio y se agregó medio fresco a pH 7 durante 24h. de incubación a 37°C, tras lo cual se retiró el medio de cultivo y las células se fijaron con metanol por 15 min. y se tiñeron con colorante de Giemsa 1/25 (Merck): (1 parte de Giemsa, 1 parte de PBS y 23 partes de H<sub>2</sub>O). Finalmente, los vidrios fueron montados sin invertir sobre portaobjetos y se observaron al microscopio.

### MM. 11. Western blot

La síntesis de N, de TSG101 y la presencia de actina se analizó mediante la técnica de western blot (WB). Para ello, células BHK-21 infectadas con JUNV (1 UFP/cél.), células BHK-21 y células K3 crecidas en microplacas de 24 cavidades se lavaron con PBS y se lisaron con buffer de siembra para PAGE (Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, SDS 5%, glicerol 10%,  $\beta$ -Me-OH 2 %, azul de bromofenol 0,005 %) a las 48 h.p.i. o 72 h. post-siembra, respectivamente.

Las proteínas celulares se resolvieron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 10% (PAGE-SDS) (Tris-CIH 0,2M pH 8,8 con SDS 0,1%, utilizando como agentes catalizadores el TEMED y persulfato de amonio). La electroforesis se realizó a 110 V en buffer de corrida (Tris-CIH 0,025M pH 8,3, glicina 0,192M y SDS 0,1%). La transferencia de proteínas fue realizada a una membrana de PVDF (Hybond P, Amersham Pharmacia), utilizando un sistema de electrotransferencia en seco (LKB Electrophoretic transfer 2117 250 Bromma) durante 1 h. 30 min. a 0,8 mA/cm<sup>2</sup> de membrana, previamente activada con metanol y equilibrada con buffer de transferencia (buffer de corrida sin SDS, metanol 20%). Las membranas se bloquearon durante 16 h. a 4°C en leche descremada 5% (Svelty).

Los anticuerpos empleados se encuentran detallados en la Tabla MM2.

*Tabla MM2: Anticuerpos empleados para WB.*

Anticuerpo	Especificidad	Dilución de trabajo	Tiempo de incubación
Anticuerpo de conejo anti-actina	Proteína celular actina	1/2000 en PBS	1 h. a 37° C
Anticuerpo monoclonal anti-N, NA05AG12 (Sanchez et al., 1989)	Nucleoproteína de JUNV (62 kDa) productos de degradación (25 kDa y 40-43 kDa)	1/600 en PBS	1 h. a 37° C
Anticuerpo monoclonal anti-TSG101 (C-2) (sc-7964 Santa Cruz, CA, USA)	Proteína celular TSG101 (45 kDa)	1/100 en PBS	1 h. a 37° C

Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios según indica en la Tabla MM2. Luego se realizaron 5 lavados de 7 min. cada uno con PBS-Tween 20 0,1%. Como reactivo revelador se utilizó un antisuero anti-ratón o anti-conejo conjugado con la enzima peroxidasa (ICN Immunobiologicals 61-204-1 F449), en una dilución 1/1000 en solución de bloqueo. Las membranas fueron incubadas con los mismos por 1 h. a temperatura ambiente con agitación. A continuación se realizaron 7 lavados de 5 min. cada uno con PBS Tween 20 0,1%. Finalmente, el revelado se llevó a cabo mediante la técnica de quimioluminiscencia, utilizando los reactivos ECL™ (*Enhanced chemiluminescence*) (Amersham-Pharmacia, USA), por impresión en película radiográfica.

#### **MM. 12. Fraccionamiento subcelular**

La asociación de N con proteínas del citoesqueleto se analizó mediante un fraccionamiento subcelular empleando detergente. Células BHK-21, BHK-21 infectadas con JUNV (m.o.i. de 5 UFP/cél) y K3 crecidas en microplacas de 24 cavidades se procesaron de la siguiente forma: a las 48 h.p.i. (72 post-siembra), se descartó el medio y los cultivos fueron lavados con PBS, las células se extrajeron sobre hielo durante 30 min. en buffer de extracción TNE/TX-100 (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Tritón X-100 1%, PMSF 0,4 mM, aprotinina 10 µg/ml), previamente enfriado. Se recogió el lisado y se centrifugó durante 15 min. a 12000 x g. El sobrenadante así como el pellet se sometieron a SDS-PAGE y se analizaron por WB como se indica en la sección MM.10.

#### **MM. 13. Internalización de transferrina**

Los ensayos de incorporación de transferrina fueron realizados empleando transferrina humana conjugada a TRITC (Invitrogen). Células BHK-21 y K3 fueron incubadas por 30 min. con MEM sin suero. Luego de este período las células se pre enfriaron a 4°C y se incubaron 20 min. con transferrina-TRITC (15 µg/ml) a 4°C. Las células se incubaron por períodos variables a 37°C. Terminada la incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS se fijaron con metanol por 10 min. a -20°C. Se retiró el metanol y se dejó secar al aire. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se montaron en glicerina tamponada conteniendo 2,5% de DABCO.

#### **MM. 14. Extracción de ARN**

La presencia de ARN viral se determinó en células (sin infectar, infectadas persistentemente o de forma aguda) crecidas en botellas T25. A las 48 h.p.i. (72 h.p.i. post-siembra) los cultivos celulares se procesaron para la obtención de ARN utilizando el kit comercial *TOTALLY ARN* (Ambion, USA) (Chomczynski & Sacchi, 1987). Siguiendo las indicaciones del proveedor, se realizaron 2 extracciones con fenol-cloroformo, tras las cuales

se rescató la fase acuosa. En la primera extracción se utilizó una solución de fenol (pH 6):cloroformo:isoamílico, en una relación 25:24:1. La segunda extracción se realizó, utilizando una solución ácida de fenol (pH 4,7):cloroformo, en una relación 5:1. Posteriormente, se agregó 0,1 vol. de acetato de sodio 3 M y 1 vol. de isopropanol y se incubó por un período de 2 h. a  $-70^{\circ}$  C. Luego de este tiempo, se obtuvo un pellet por centrifugación a 12000 r.p.m. durante 15 min. a  $4^{\circ}$  C, el cual fue lavado con etanol 70% y secado en evaporador (Savant). Finalmente, el pellet se resuspendió en 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril libre de enzimas degradadoras de ARN y se almacenó a  $-20^{\circ}$ C.

### MM. 15. Obtención de cADN

El cADN fue sintetizado, empleando como molde 3.5  $\mu$ l de ARN y utilizando un cebador determinado ya sea para la detección de genes virales o para la detección de la cadena viral complementaria (paso intermedio de la replicación viral). Para ello se utilizó una concentración final de cebadores de 0.5  $\mu$ M, dNTPs 0.5  $\mu$ M, los cuales fueron incubados con el ARN a  $65^{\circ}$ C por 5 min. y enfriados rápidamente en hielo. Posteriormente se agregaron el buffer de reacción (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), DTT a una concentración final de 0,01 M y 200 U de SuperScript II RT (Invitrogen). Esta mezcla de reacción se incubó a  $42^{\circ}$ C por 1 h. y finalmente se inactivó a la enzima 15 min. a  $70^{\circ}$ C.

*Tabla MM3: Cebadores utilizados para la obtención de cADN*

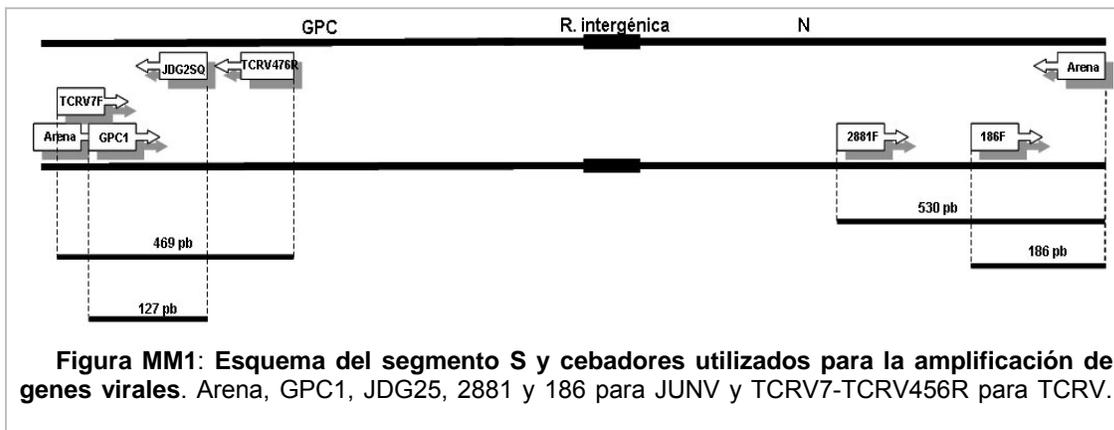
Nombre del cebador	secuencia
Arena	5' - CGCACAGTGGATCCTAGGC- 3'
GPCF	5' - ATGGGGCAGTTCATTAGC- 3'
TCRV7F	5'-TCTTGTCCATATTTGCCTAACTGA-3'

### MM. 16. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las amplificaciones se realizaron en presencia de concentraciones finales de 1X buffer de reacción, 0,2 mM de cada dNTPs, 1  $\mu$ M de cada cebador (Tabla MM4 y Figura MM1), 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 6,25 U la enzima GoTaq (Promega), agregando 1  $\mu$ l del cADN como molde. Los productos de resolvieron por electroforesis en geles de agarosa 1 o 2% en buffer TAE 1X (Tris-acetato 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM) con bromuro de etidio 0,2  $\mu$ g/ml. Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm. Las muestras de ADN se sembraron en el gel, previo agregado de 1/10 vol. de buffer de siembra (azul de bromofenol 0,5 %, glicerol 50%, TAE1X). Luego de la corrida las bandas se visualizaron por iluminación del gel con luz ultravioleta (UV).

Tabla MM4: Cebadores utilizados para PCR

Nombre del cebador	secuencia
Arena	5' - CGCACAGTGGATCCTAGGC- 3'
JDG2SQ	5' - CCCCTTAATGTAAAGATGGC- 3'
GPC1 (87)	5' - ATGGGGCAGTTCATTAG - 3'
186	5'- GGCATCCTTCAGAACATC- 3'
2881F	5'- AGTCCCTTGCTGTTGAAATCCC- 3'
ZF	5'- ATGGGCAACTGCAACGGGGCATC -3'
ZR	5'-CTATGGTTGGTGGTGTCTGTTGGCT -3'
TCRV7F	5'- TCTTGTCCATATTTGCCTAACTGA-3'
TCRV456R	5'- TTAGGAGAGTGAACAAAGACATCG-3'
Acti1	5'- GAGACCTTCAACACCCAGCC -3'
Acti2	5'-GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC -3'



### MM. 17. Marcación y purificación de viriones

La marcación metabólica de viriones se realizó por incorporación de  $^{35}\text{S}$ -metionina y  $^{35}\text{S}$ -cisteína a las proteínas virales. Para ello, células Vero crecidas en botellas T 75 fueron infectadas con JUNV o TCRV a una m.o.i. de 0,1 UFP/cél.. A las 72 h.p.i. se incorporó la marca radioactiva, mezcla de  $^{35}\text{S}$ -metionina y  $^{35}\text{S}$ -cisteína (Expre $^{35}\text{S}^{35}\text{S}$ , 25  $\mu\text{Ci/ml}$ , NEN, USA), al medio sin metionina ni cisteína prosiguiendo con la incubación durante 24 h. en estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ . Se cosechó el sobrenadante de cultivo al 4<sup>to</sup> y 5<sup>to</sup> día p.i. Los sobrenadantes cosechados fueron clarificados por centrifugación a  $5000 \times g$  durante 15 min. Luego se concentró el material por medio de una ultracentrifugación a 26.000 r.p.m. por 2 h. a  $4^\circ\text{C}$  (rotor Beckman SW28). El pellet fue resuspendido por sonicación y sometido a un gradiente discontinuo de sacarosa (15%-60%) mediante ultracentrifugación a 46.000 r.p.m. por 1,5 h. a  $4^\circ\text{C}$  (rotor Beckman SW55 Ti). La banda localizada en la interfase del gradiente de sacarosa fue recolectada con pipeta Pasteur y nuevamente sometida a ultracentrifugación a 46.000 r.p.m. por 1,5 h. a  $4^\circ\text{C}$  (Beckman SW55 Ti). Finalmente, el pellet se resuspendió por sonicación, con el agregado de 100  $\mu\text{l}$  de buffer TES (Tris 0,01 M, NaCl 0,1 M, EDTA 0,001 M, pH 7,4).

**MM. 18. Ensayo de adsorción y penetración de virus***MM. 18.a. Ensayo de adsorción de virus marcado*

JUNV marcado con  $^{35}\text{S}$  y purificado se resuspendió en PBS y se utilizó para infectar monocapas de células BHK-21 y K3 crecidas en microplacas de 24 cavidades y pre-enfriadas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los cultivos se incubaron con  $6,6 \cdot 10^4$  c.p.m., dejándose adsorber por diferentes tiempos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Luego de estos tiempos se descartaron los inóculos y las monocapas se lavaron 3 veces con PBS frío, al cabo de lo cual las células se lisaron con una mezcla de NaOH 0,1M y SDS 1% durante 15 min.. Al material resuspendido se le agregó solución centelladora (tritón X-100 30%, PPO 0,5% y POPOP 0,0001% en tolueno) y se cuantificó la radioactividad en un contador de centelleo líquido (Wallac 1409 DSA, USA).

*MM. 18.b. Ensayo de adsorción/internalización de virus marcado*

JUNV marcado con  $^{35}\text{S}$  y purificado se resuspendió en PBS y se utilizó para infectar monocapas de células BHK-21 y K3 crecidas en microplacas de 24 cavidades y pre-enfriadas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los cultivos fueron incubados por diferentes tiempos con  $10^5$  c.p.m. (0, 5, 15, 30 y 60 minutos) a  $37^{\circ}\text{C}$  a modo de permitir la adsorción e internalización del virus a las células. Al término de dichos tiempos el inóculo fue removido y las células fueron lavadas con PBS y tratadas con proteinasa K 1 mg/ml para remover el virus adsorbido no penetrado. El tratamiento enzimático se frenó agregando fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 1 mM en PBS conteniendo 3% de albúmina. Las células se centrifugaron a  $2000 \times g$  durante 15 min. y el pellet celular se solubilizó con NaOH-SDS para cuantificar el virus penetrado en contador de centelleo líquido.

*MM. 18.c. Ensayo de infectividad adsorbida*

Monocapas de células BHK-21 y K3 crecidas en microplacas de 24 cavidades se infectaron JUNV a una m.o.i. de 5 UFP/cél.. El inóculo se dejó adsorber por distintos tiempos a  $4^{\circ}\text{C}$ , al cabo de los cuales se lo descartó, lavándose las células con PBS frío. Se agregó 200  $\mu\text{l}$  de MEM 5% SFB frío por cavidad y las células se rompieron por 3 ciclos de congelado/descongelado. Los restos celulares se separaron por centrifugación (10 min. a  $3000 \times g$ ) cuantificándose virus infeccioso en el sobrenadante por la técnica de UFP.

*MM. 18.d. Ensayo de internalización (por centros infecciosos)*

Monocapas de células BHK-21 o K3 se infectaron con JUNV o TCRV a una m.o.i. de 5 UFP/cél., dejándose adsorber durante 1 h. a  $4^{\circ}\text{C}$ . Luego de ello se descartó el inóculo, los cultivos se lavaron con PBS frío y se agregó MEM 5% SFB precalentado a  $37^{\circ}\text{C}$  prosiguiéndose la incubación a dicha temperatura por distintos tiempos. Cumplidos dichos tiempos se agregó suero de conejo anti-JUNV para neutralizar el virus que no hubiera

penetrado, prosiguiendo la incubación por 30 min. más. Finalizado este período, se descartó el medio y las monocapas se lavaron 3 veces con PBS y las células se disgregaron con tripsina. El virus internalizado se midió por un ensayo de centros infecciosos en células Vero.

#### **MM. 19. Transfección de células con lipofectamina**

Células BHK-21 y K3 fueron crecidas en microplacas de 24 cavidades hasta 80% de confluencia. Para cada muestra se prepararon mezclas separadas de 1 µg de ADN o ARN en 50µl de OptiMEM sin suero y 2,5µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 50µl del mismo medio. Luego de 5 minutos, se combinaron las soluciones de lipofectamina y ADN, y se incubaron por 40 min. adicionales a T° ambiente para permitir la formación de complejos. Posteriormente, se agregaron los 100 µl de la mezcla a cada una de las cavidades de la microplaca, incubándose los cultivos en estufa de CO<sub>2</sub> durante 5 h.. Finalmente, transcurrido dicho tiempo, se reemplazó el medio con la mezcla de transfección por OptiMEM 5% SFB y se incubaron las células por períodos de 24 o 48 h. dependiendo del experimento a realizar.

Los experimentos de reducción de la expresión de TSG101 se realizaron transfectando dos veces (a intervalos de 24h.) células BHK-21 y K3 crecidas en microplacas de 24 cavidades con ARNi específicos o no específicos para TSG101 (60 nM), empleando el procedimiento descrito en el párrafo anterior. Las células fueron infectadas con JUNV 24h. post-transfección a una m.o.i. de 1 UFP/cél.. A las 24 h.p.i. se determinó virus total y extracelular como se indicó en el *item* MM.3.

Las secuencias blanco, empleadas para el diseño de los ARNi fueron las siguientes:

5'-CCUCCAGUCUUCUCUGUCTT-3' (sense) y 5'-GACGAGAGAAGACUGGAGGTT-3' (antisense) (Invitrogen) (Garrus et al., 2001).

#### **MM. 20. Ensayo de formación de pseudotipos**

Células BHK-21 y K3 crecidas en botellas T25 fueron infectadas y sobreinfectadas, respectivamente, con JUNV o TCRV a una m.o.i. de 0,1 UFP/cél.. Luego de 4 d.p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se neutralizaron con un suero policlonal anti-JUNV o anti-TCRV (dilución 1/50, título de neutralización: 2400) durante 1 h. a 37°C. Como control (sin neutralizar) del experimento, parte del mismo sobrenadante fue tratado con MEM 5% SFB. Posteriormente, los sobrenadantes tratados con los antisueros o con MEM fueron empleados para infectar 5.10<sup>5</sup> células Vero. Luego de 3 d.p.i. estas células se procesaron para extracción de ARN, el cual fue utilizado como molde para sintetizar cADN empleando el cebador Arena. Finalmente, se realizó una reacción de PCR empleando los cebadores TCRV7F/TCRV476R para la detección de TCRV o Arena/2881 para la detección de secuencias de JUNV.

### **MM. 21. Microscopía electrónica**

Células BHK-21 y K3 crecidas en microplacas de 6 cavidades se infectaron o sobreinfectaron, respectivamente, con JUNV a una m.o.i. de 5 UFP/cél.. A las 48 h.p.i. se lavaron con PBS frío y se fijaron con glutaraldehído 1,5%, buffer fosfato 0,2M durante 4h. a 4 °C. Posteriormente, las células fueron cosechadas con rastrillo e incubadas durante 12 h. a 4°C en una solución de sacarosa 0,32M. Transcurrido este período, las células se centrifugaron durante 10 min. a 2000 x g y el pellet celular se resuspendió en OsO<sub>4</sub> 1,5%, sacarosa 0,32 M y se incubó durante 2 h. a 4°C. Luego de esto, las células fueron nuevamente centrifugadas y lavadas con H<sub>2</sub>O destilada. Las células se incubaron durante 12 h. en una solución de acetato de uranilo 2%, luego de lo cual fueron deshidratadas mediante el uso de una serie de gradientes de etanol, seguidos de óxido de propileno. Finalmente fueron embebidas en una resina Epon 812 (TAAB), la cual se dejó polimerizar por 2 días a 70°C. Se realizaron cortes en secciones ultra finas, las cuales fueron nuevamente teñidas con una solución de acetato de uranilo 2% y observadas en el microscopio electrónico C10, Zeiss.

### **MM. 22. Clonado de virus**

Células Vero crecidas en microplacas de 6 cavidades, se infectaron con el sobrenadante de células K3 (días 367 d.p.i. y 809 d.p.i.). El inóculo se dejó adsorber durante 2 h. a 37°C y luego se descartó. Las células se lavaron con PBS y se cubrieron con una mezcla de MEM 2x y agar 2 %. Las microplacas se incubaron invertidas, en estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Al 6<sup>to</sup> d.p.i. se agregó una mezcla de agar 1% y rojo neutro 1/1000. El colorante se dejó difundir 24 h. a 37°C y al 7<sup>mo</sup> d.p.i. se picaron con tips cortados aquellas placas aisladas. El virus recogido se amplificó en células Vero obteniéndose títulos que oscilaron entre 10<sup>4</sup> y 10<sup>5</sup> UFP/ml.

### **MM. 23. Curva de crecimiento**

Monocapas de células Vero y BHK-21 se infectaron con JUNV XJCl<sub>3</sub> o los clones virales obtenidos a partir de las células K3 a una m.o.i. de 0,1 UFP/cél.. Luego de 1 h. de adsorción a 37°C se descartaron los inóculos y las células se cubrieron con MEM 5% SFB. Los cultivos infectados se incubaron a 37°C y a distintos tiempos p.i. se cosecharon los sobrenadantes para su posterior titulación en células Vero.

### **MM. 24. Ensayo de neutralización**

Se utilizó la técnica de virus constante-suero variable, para ello se enfrentaron 200 UFP del virus a neutralizar con diluciones seriadas al medio de los sueros previamente deplementados (30 min. a 56°C). Las mezclas de virus y antisuero se mantuvieron 1 h. a 37°C cuantificándose la infectividad residual de las mismas por el método de UFP. Los títulos

de los antisueros se calcularon como la inversa de la mayor dilución que reduce en un 50% la cantidad de UFP empleadas.

#### **MM. 25. Ensayo de termosensibilidad y termoestabilidad**

La termosensibilidad de los clones virales se analizó cuantificando la infectividad de los mismos a distintas temperaturas. Con este propósito, los virus se titularon por el método de UFP a 39°C (temperatura restrictiva) y a 37°C (temperatura permisiva). Se calculó la eficiencia de plaqueo 39°C/37°C (E.O.P. 39/37) como el cociente entre el título obtenido a la temperatura restrictiva respecto del título obtenido a la temperatura permisiva. Se define como mutante termosensible al virus cuya E.O.P. 39/37 sea igual o menor a 0,01.

A fin de determinar la termolabilidad de los clones virales aislados se preparó una dilución al décimo de los mismos en PBS (0,5 ml de volumen final). La dilución fue calentada a 45°C en baño de agua termostatzado durante distintos tiempos. Transcurridos los mismos, las muestras fueron enfriadas en hielo y guardadas a -70°C para su posterior titulación en células Vero por el método de UFP. El porcentaje de la infectividad remanente se calculó en función del cociente del título de cada muestra luego del calentamiento y el título del control que se mantuvo 60 min en hielo. Se gráfico el logaritmo de dicha infectividad remanente en función del tiempo de calentado. El tiempo de vida media de los diferentes clones virales a 45°C se consideró como el tiempo necesario de calentamiento para reducir la infectividad residual a la mitad de la infectividad inicial (tiempo 0).

#### **MM. 26. Secuenciación de los genes virales**

A fin de secuenciar los genes virales GPC, N y Z obtenidos a partir del cultivo de células K3 y de la cepa parental JUNV XJCl<sub>3</sub> y el gen N y parte del GPC de los diferentes clones virales, se utilizaron cultivos crecidos en botellas T25 de células K3, células BHK-21 infectadas con JUNV XJCl<sub>3</sub> y células Vero infectadas con los diferentes clones virales, procesadas al 4<sup>to</sup> d.p.i.. Se procedió como se indica en los **ítems MM.14 y MM15** para la extracción de ARN y síntesis de cADN, respectivamente. Para este último procedimiento, se utilizó el cebador arena.

Las amplificaciones por PCR se realizaron en presencia de concentraciones finales de 1X buffer de reacción, 1X de solución enhancer, 0,1 mM de cada uno de los dNTPs, 1 µM de cada cebador, 1 mM de MgSO<sub>4</sub> y 6,25 U de la enzima PFX (Invitrogen). Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa 1% en buffer TAE 1X (Tris-acetato 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM) con bromuro de etidio 0,2 µg/ml. Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm. Las muestras de ADN se sembraron en el gel, previo agregado de 1/10 volúmenes de buffer de siembra (azul de bromofenol 0,5 %, glicerol 50 % TAE1X). Luego de la corrida, las bandas testigo se visualizaron por fluorescencia a la luz UV y la region del gel contenido el producto de amplificación se escindió del gel y se purificó empleando el kit QIAGEX II (Quiagen, Germany) según instrucciones del fabricante.

Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

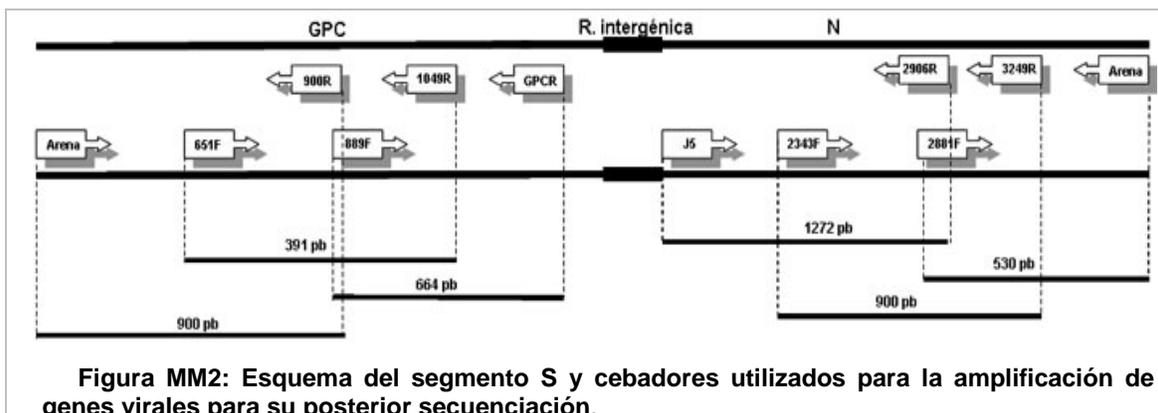
Para la amplificación de los diferentes genes virales a partir de las células K3 y el control de células BHK-21 infectadas en forma aguda con JUNV XJCl<sub>3</sub>, se utilizaron los cebadores ZF/ZR para la amplificación de Z, J5/2906, 2343/3249 y Arena/2881 para la amplificación de N y finalmente los cebadores Arena/900R, 651F/1049R y 889/GPCR para la amplificación del GPC.

Asimismo, para la amplificación del gen N y parte de GPC a partir de células Vero infectadas con los clones virales, se utilizaron los cebadores Arena/J5 y 651F/1049R, respectivamente.

Las secuencias de los cebadores utilizados se encuentran indicadas en la Tabla MM5 y la Figura MM2.

*Tabla MM5: Cebadores empleados para la amplificación de genes a partir del ARN de los clones virales*

Nombre del cebador	secuencia
Arena	5' - CGCACAGTGGATCCTAGGC- 3'
900R	5'-CCAYTITTCIAGRCAGTAICCCAGG- 3'
889F	5' - GAGGCTATTGTCTAGAAGAGTGG- 3'
651F	5'-GCTAAGAAGTTTAAGACTGGC-3'
1049R	5'-TTCATCATTTAGGGTTTTGATAGC-3'
GPCR	5'-CGGGAGGTCTTAGTGTCTCTAC-3'
J5	5'- CTTACAGTGCATAGGCTGC-3'
2906R	5'- CACTGGGATTTCAACAGCAAGGG- 3'
2881F	5' - AGTCCCTTGCTGTTGAAATCCC- 3'
3249R	5' - AGGTCAGATGTTTTTGAAGGACGCC-3'
2343F	5'-TTGTGTTGTCCCATGACCTGCC-3'
ZF	5' - ATGGGCAACTGCAACGGGGCATC -3'
ZR	5' - CTATGGTTGGTGGTGTCTGTTGGCT -3'



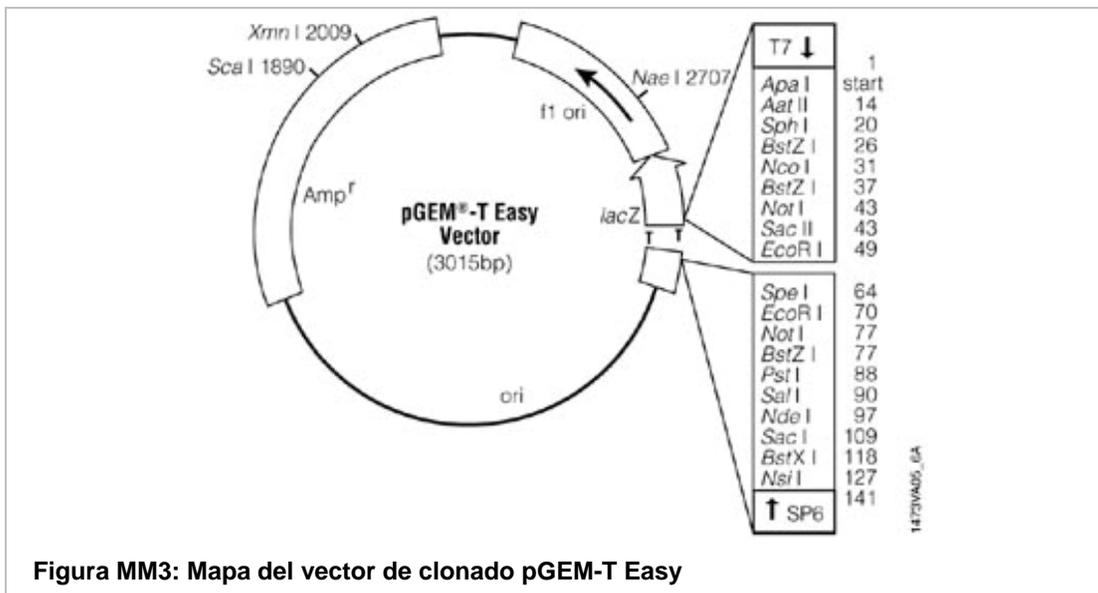
Dado que la amplificación con la enzima PFX no produce productos de amplificación con extremos protuyentes con el nucleótido A, necesarios para su posterior clonado en un plásmido "T", se procedió a realizar una reacción de incorporación de dicho nucleótido a los

fragmentos de PCR purificados. A tal fin se realizó una incubación de 30 min. a 70°C de 7 µl del fragmento de PCR purificado, 1X Buffer Taq, MgCl<sub>2</sub> 2,5 Mm, dATP 0,2 mM y 5U Go Taq (Promega).

Para la cuantificación del ADN obtenido luego de la purificación, se realizó una electroforesis en geles de agarosa en los que se sembró un 10% de los productos purificados junto a cantidades conocidas de ADN del fago lambda digerido con las enzimas Hind III y EcoRI. La cuantificación se realizó por comparación de la intensidad de bandas.

Para el ligado molecular de los diferentes insertos al plásmido pGEM-T Easy (Figura MM3) se utilizaron 1 µg de vector y diferentes relaciones molares vector:inserto (1:1, 1:2 y 1:10). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 µl en presencia de buffer de ligación 1X (30 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT y 1 mM ATP) y 3 U de enzima T4 ligasa (Promega). La reacción se incubó a 25°C toda la noche. A fin de realizar la transformación de bacterias competentes, las mismas fueron incubadas 15 min. en hielo luego de ser descongeladas. Luego de este período, se agregó toda la reacción de ligación a 100 µl de bacterias competentes y se incubó durante 30 min. en hielo. Posteriormente se realizó el shock térmico a 42°C por 1 min, se dejó en hielo por 2 min. adicionales y se agregó 1 ml LB. Las bacterias fueron incubadas por 2 h. a 37°C con agitación, luego de lo cual fueron sembradas en LB-agar con ampicilina 100 µg/ml. Las placas se incubaron toda la noche y las colonias se repicaron a fin de realizar cultivos en 5 ml de LB ampicilina 100 µg/ml.

El ADN plasmídico se preparó utilizando columnas de intercambio aniónico comerciales, *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification system* (Promega), según las indicaciones del proveedor. La purificación se realizó a partir de 5 ml de cultivo saturado de bacterias transformadas, rindiendo aproximadamente una cantidad de 0,3 µg/µl.



El inserto, clonado en el plásmido pGEM-T Easy, se secuenció utilizando los oligonucleótidos SP6 y T7. Asimismo, para la secuenciación del fragmento de 1778 pb correspondiente al extremo 3' del segmento S (conteniendo la región codificante de N) y del fragmento de 1554 pb que contiene la región codificante para GPC completo, además de los mencionados, se emplearon oligonucleótidos internos 2343/3249 y 651F/1049 para N y GPC, respectivamente. En el caso de la secuenciación de parte del gen de GPC de los clones virales, la secuenciación se llevó a cabo empleando los oligonucleótidos 651/1049 a partir del producto de PCR directamente. En el caso del clonado de los fragmentos en el vector, se obtuvieron resultados de 3 colonias independientes. La secuenciación se efectuó en el Servicio de Secuenciación y Genotipado, FCEyN, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

#### **MM. 27. Ensayo de radioinmunoprecipitación**

Monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades fueron infectadas con los clones virales 65, 67, 69 y 83 (m.o.i. de 1 UFP/cél.). Finalizada la hora de adsorción se incubó con MEM 1,5% SFB. A los 4 d.p.i. se incubaron las células con 250 µl de medio de ayuno, el cual carece de los aminoácidos metionina y cisteína, durante 1,5 h.. Transcurrido este período se agregó la marca radioactiva al medio (Expre<sup>35</sup>S<sup>35</sup>S, 25 µCi/ml, NEN, USA) y se incubó por un período de 3 horas a 37°C. Luego de la marcación, las células se lavaron con PBS y se lisaron con 75 µl buffer RIPA (NaCl 0,15M, SDS 0,1%, Triton X-100 1%, PMSF 0,1mM, Aprotinina 10 µg/ml, deoxicolato de Na 1%, Tris-HCl 0,01M pH 7,4). Las muestras fueron sometidas a ciclos de congelado/descongelado y sonicadas. Posteriormente, las mismas se centrifugaron a 10000 r.p.m. por 10 min.. Al sobrenadante obtenido luego de la centrifugación se adicionó 1µl del Mab QC03-BF11 (anti G1-GPC), incubándose esta solución durante 30 min. a 37°C y 90 min. a 4°C. Luego se utilizó como medio de arrastre de los complejos inmunes, 100 µl de proteína A-sefarosa (100 mg/ml) y se incubó durante otros 30 min. a 37°C y 90 min. a 4°C. Se realizaron tres ciclos de lavado con buffer RIPA y el pellet se resuspendió en buffer de siembra para PAGE, se hirvió a 100 °C por 2 min. conservándose el sobrenadante. Las muestras fueron resueltas en SDS-PAGE como se describe en el **item MM. 11**. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con una solución de Coomassie Blue R250 al 0,25% en metanol:H<sub>2</sub>O:acético glacial (50:50:10). Posteriormente, los geles se decoloraron y fueron procesados para fluorografía, realizando lavados de 1 hora en concentraciones crecientes de DMSO, finalizando en una incubación de 3 horas en una solución de PPO (2.5-difeniloxazol, Sigma-USA) en DMSO. Finalmente, los geles se secaron y se expusieron sobre una película Agfa Curix RPI a -80°C hasta su revelado.

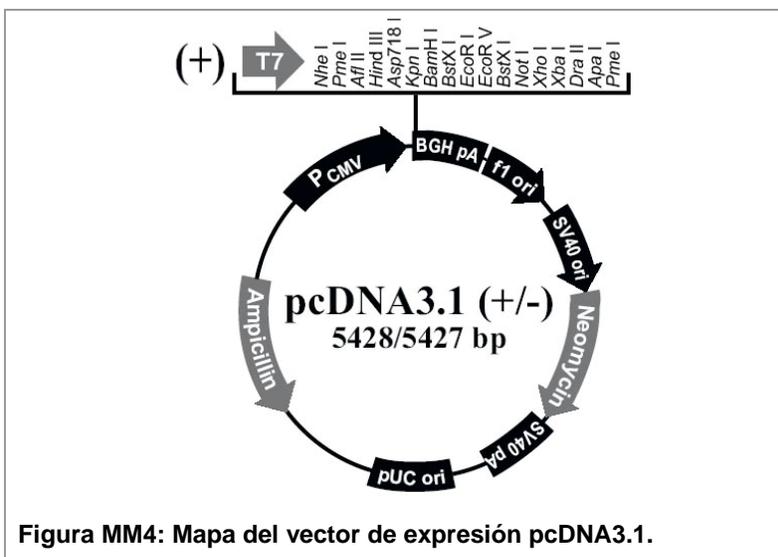
#### **MM. 28. Clonado de células persistentemente infectadas con JUNV**

A partir del cultivo persistentemente infectado K3 se realizó un clonado por dilución límite, a los días 298 y 471 d.p.i., obteniéndose 27 clones celulares. El cultivo de células K3 fue

tripsinado, seguido por recuento de células viables con azul tripán y diluido en medio de crecimiento hasta obtener una concentración aproximada de 0,5 a 1 célula/0,2 ml. El clonado consistió en el sembrado de 0,2 ml de esta dilución en microplacas de 96 cavidades a fin de obtener 1 célula por cavidad. El crecimiento de los clones celulares fue monitoreado diariamente y cuando se hubo formado la monocapa las células fueron subcultivadas a microplacas de 24 cavidades, dicho procedimiento se repitió hasta que las mismas se pasaron a botellas T25. Luego de este período los clones celulares fueron subcultivados semanalmente como los cultivos de células K3 y BHK-21. Los clones se caracterizaron de acuerdo a lo descrito para las células K3. Como controles se utilizaron clones obtenidos de manera similar a partir de células BHK-21.

### MM.29. Construcción de plásmido de expresión de Z-Flag

Con el objetivo de construir un plásmido de expresión de Z en eucariotas, la secuencia codificante de dicha proteína se amplificó por PCR a partir del cADN de células infectadas con JUNV XJCl<sub>3</sub>. Se emplearon el cebador Z-F (5' GGATCCATGGGCAACTGCAACGGGGCATC-3') y el cebador antisense el cual careció del codon STOP Z-trunc-R (5' AAAAGCGCCGC CTGGTGGTGGTGGCTGTTGGCT-3'). Dichos cebadores fueron diseñados a modo de contener en su región 5' los sitios de restricción de las enzimas BamHI y NotI con el objetivo de clonar el fragmento amplificado en dichos sitios del plásmido pCDNA 3.1. (Figura MM4). Posteriormente, se introdujo un oligonucleotido conteniendo la secuencia (GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG) correspondiente al epítopo FLAG (DYKDDDDK) empleando los sitios NotI y XbaI. Esto se realizó a fin de posibilitar la detección de la expresión de la proteína de fusión con un anticuerpo comercial anti-Flag.



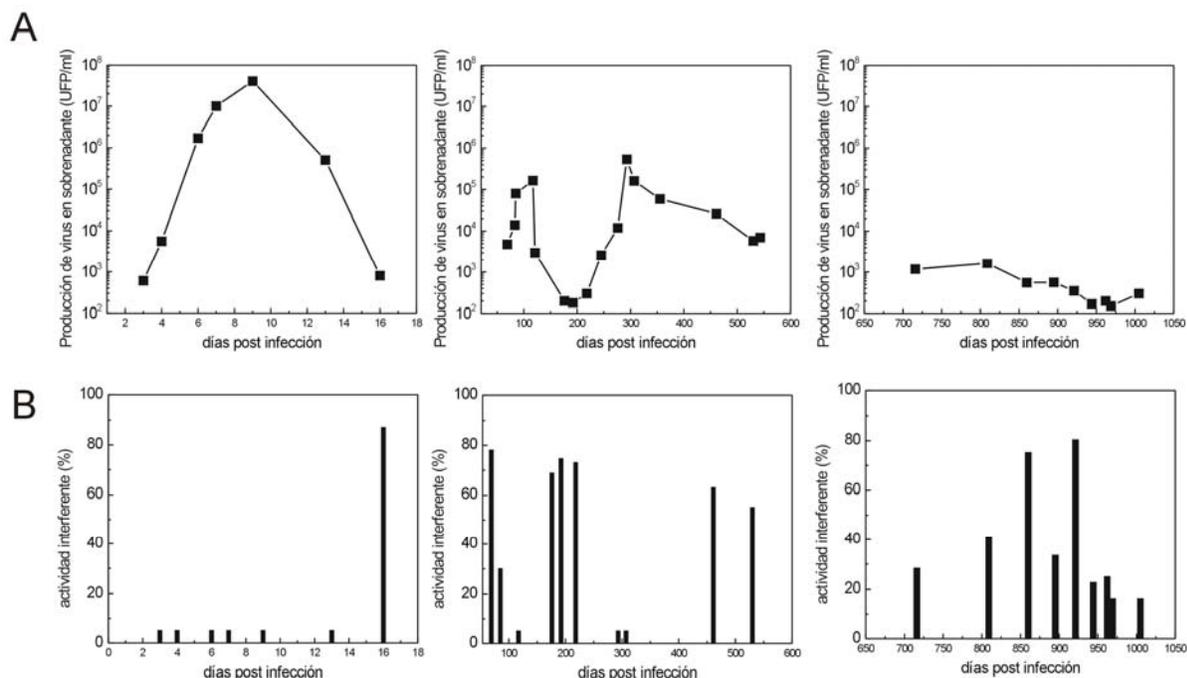
## **R. I. Caracterización de una línea de células BHK-21 persistentemente infectadas con virus Junín**

El modelo de persistencia del virus Junín (JUNV) *in vitro* se estudió en células BHK-21 persistentemente infectadas con este agente. Para ello, células BHK-21 se infectaron experimentalmente con la cepa atenuada de JUNV, XJCl<sub>3</sub> a una m.o.i. de 0.1 UFP/cél.. Al cabo de la tercera semana p.i. y una vez transcurrida la etapa aguda de la infección, el cultivo se mantuvo por repiques quincenales, con cambios periódicos de medio de cultivo periódicos. Las células BHK-21 persistentemente infectadas con JUNV se denominaron células K3 y se estudiaron por un período de tres años.

### **R. I. 1. Producción de virus y actividad interferente de las células K3**

A fin de investigar la producción de virus infeccioso por parte de las células K3 se colectaron muestras de sobrenadante a distintos días p.i. y se ensayaron según la técnica de UFP. Simultáneamente, se analizó la presencia de partículas defectivas interferentes (D.I.), a través de un ensayo de interferencia.

En la Figura R1 se muestran los niveles de infectividad e interferencia en dichos sobrenadantes, detectados a distintos tiempos p.i.. Durante la primera semana p.i. se observaron niveles elevados de infectividad, alcanzándose un título máximo de  $3 \cdot 10^7$  UFP/ml. A partir de la segunda semana p.i. los niveles de infectividad disminuyeron hasta valores que oscilaron alrededor de  $10^2$ - $10^3$  UFP/ml. Por otro lado, como puede observarse en la Figura R1 B, los valores de actividad interferente presente en el sobrenadante, que durante las primeras 2 semanas p.i. habían resultado indetectables, aumentaron significativamente, alcanzando valores de 87% a los 17 d.p.i..



**Figura R1: Producción de infectividad y presencia de actividad interferente en las células K3.** Sobrenadantes de células K3 fueron cosechados a los días p.i. indicados y fueron evaluados en cuanto a producción de virus infeccioso mediante la técnica UFP (B) y a la producción de partículas D.I. mediante el ensayo de interferencia (A).

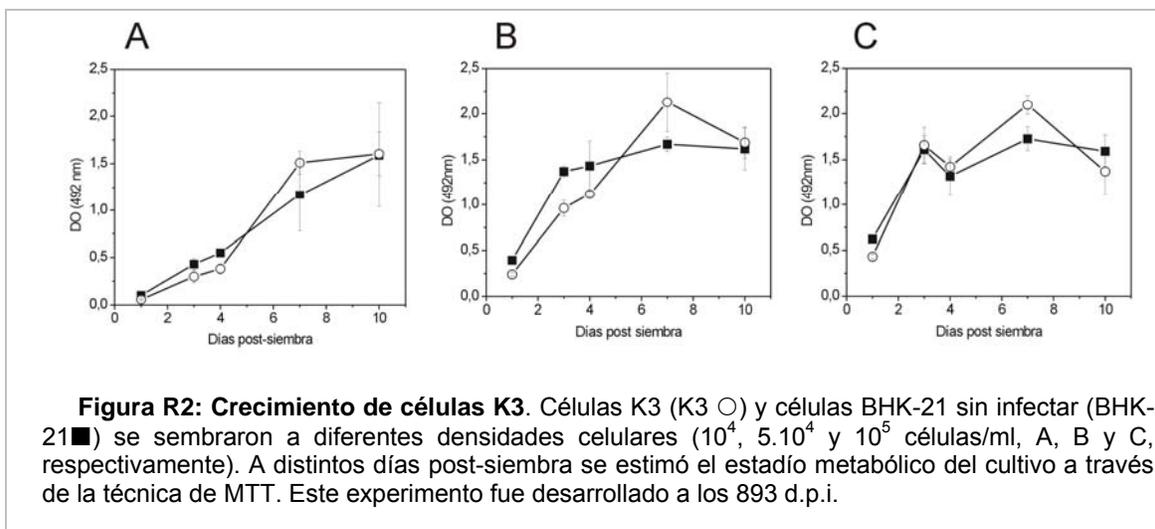
La disminución en el título del virus producido por las células K3 en asociación con el aumento de actividad interferente ocurrido a partir de la 2<sup>da</sup> semana p.i. estarían indicando la transición entre las etapas aguda y persistente de la infección.

La regulación de la infectividad producida por cultivos persistentemente infectados con arnavirus mediante partículas D.I. ha sido propuesto como un mecanismo para el mantenimiento de dicho estadio (Help et al., 1976, Welsh et al., 1972). En el caso de las células K3, pudo observarse que, alrededor de los 200 d.p.i., los niveles de infectividad producidos resultaron bajos, con valores inferiores a  $3 \cdot 10^2$  UFP/ml mientras que aquellos correspondientes a la actividad interferente superaron el 75 %. Por el contrario, alrededor de los 300 d.p.i. se obtuvieron valores de infectividad superiores a  $10^5$  UFP/ml, y niveles de actividad interferente menores a 5%. Estas observaciones reflejan que durante el primer año p.i. los mayores niveles de actividad interferente se correlacionaron con valores bajos de infectividad liberada al sobrenadante y viceversa, siguiendo el patrón característico de la infección persistente *in vitro* de JUNV.

Sin embargo luego de este período, desde los 700 a 1030 d.p.i. los valores de infectividad cayeron de manera constante mientras que los valores de actividad interferente fluctuaron entre 20% y 80%, independientemente de los valores de infectividad detectados (Figura R1 A

y B). Estos resultados sugieren que la presencia de partículas D.I. no sería un factor clave en el control en la producción de virus infeccioso durante estadíos tardíos de la persistencia.

Durante el período analizado en el que se evaluó la producción de virus infeccioso y la presencia de actividad interferente también se investigó el crecimiento de las células K3 de manera comparativa con las células BHK-21 mediante la técnica de MTT. En ningún caso se observó diferencias entre ambos tipos celulares cuando se midió el aumento del metabolismo del cultivo en función del tiempo ocurrido a consecuencia de la multiplicación celular. A modo de ejemplo en la Figura R2 se muestran los datos obtenidos con células K3 durante el tercer año p.i.. Estos resultados muestran que la infección persistente de JUNV no altera la multiplicación de las células K3 las cuales crecen a la misma velocidad que el cultivo de células BHK-21 sin infectar.

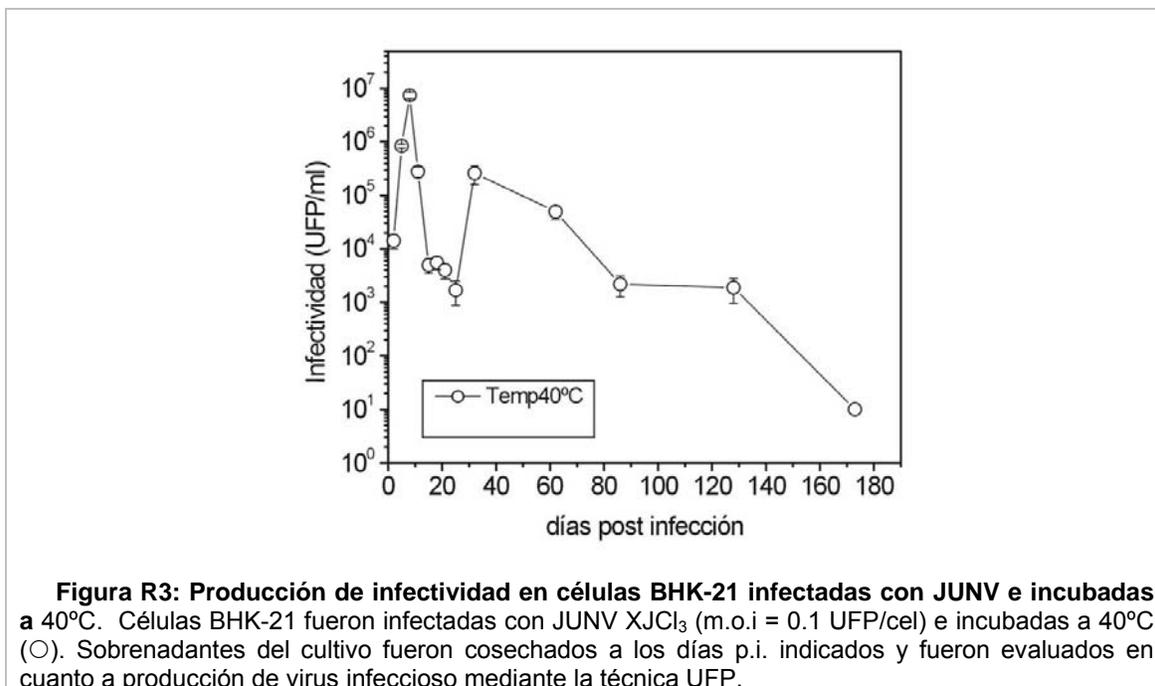


Las curvas obtenidas de D.O. en función del tiempo, no mostraron diferencias en cuanto a la cinética de multiplicación celular de los cultivos persistentemente infectados respecto a los cultivos sin infectar, independientemente de la densidad celular ensayada, como así tampoco en los niveles de crecimiento máximo alcanzado para cada sistema.

Es posible entonces descartar una alteración metabólica de las células K3, observable a través de la funcionalidad de la enzima mitocondrial succinato dehidrogenasa, como responsable de la multiplicación disminuida de JUNV.

Por otro lado, considerando que el tratamiento térmico ha sido descrito como un método para modificar el curso de varias infecciones virales ya sea agudas o persistentes *in vitro*, incluso en el caso de la infección persistente de células Vero con JUNV (Conti et al., 1999, Ellenberg et al., 2004, Ishida et al., 2002), se analizó la producción de infectividad de un cultivo de células BHK-21 infectado con JUNV de manera similar al anterior (m.o.i. = 0,1 UFP/ cel) pero incubado a 40°C. Como se observa en la Figura R3 el cultivo infectado produjo altos

niveles de infectividad que decayeron durante la segunda semana p.i. de manera similar a lo descrito para el cultivo incubado a 37°C, utilizado como control. Sin embargo esta disminución en los niveles de infectividad resultó mas marcada en el cultivo incubado a 40°C respecto del de 37°C llegando a valores menores a 10 UFP/ml luego de los 160 d.p.i. La ausencia de infectividad en los sobrenadantes de dicho cultivo al cabo de este tiempo se correlacionó con la ausencia de expresión de la nucleoproteína viral N y de la glicoproteína G1, por lo que los estudios de caracterización posteriores se desarrollaron con las células K3.



### R. I. 2. Producción y liberación de virus en células K3

La producción disminuida de virus infeccioso liberado al sobrenadante de las células K3, planteó el problema de determinar si los niveles de infectividad producida se correspondían con el número de células productoras de virus en el cultivo. Cabía la posibilidad de que muchas células estuviesen liberando pequeñas cantidades de viriones o que una baja proporción de las mismas produjeran cantidades normales de infectividad. A este fin, la proporción de células productoras de virus en los cultivos de células K3 se determinó por la técnica de centros infecciosos. Esta técnica se llevó a cabo a los 894 y 1237 d.p.i., momentos en los que la producción de virus infeccioso en el sobrenadante mostró valores inferiores a 5.10<sup>2</sup> UFP/ml y no se detectó presencia de actividad interferente. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla R1. La cantidad de células productoras de virus encontradas para ambos cultivos fue de 2,6 10<sup>4</sup> y 1,6 10<sup>5</sup> C.l./ml, siendo estos valores menores a los obtenidos para células BHK-21 infectadas de forma aguda con JUNV (m.o.i = 1, 48 h.p.i.), las que alcanzaron un valor 10 veces mayor.

Asimismo, se evaluó la cantidad de virus producido por célula, para ello se calculó el cociente entre el virus extracelular presente el sobrenadante de cultivo respecto a los centros infecciosos. Se puede observar en la Tabla R1 que las células infectadas durante la etapa aguda de la infección producen de 8,5 a 55 veces más virus que las células productoras durante la infección persistente, siendo dicho cociente de 0.94 virus por célula para las primeras y de 0.11 y 0.017 para las últimas. En base a estos resultados podríamos concluir que la baja infectividad producida por el cultivo persistentemente infectado no se debe fundamentalmente a una disminución en la cantidad de células productoras de virus en el cultivo sino a una producción reducida de virus por cada célula productora.

*Tabla R1: Células productoras de virus en cultivos de células K3.*

Cultivo	Centros infecciosos C.I./ml	Centros infecciosos totales (C.I)	Virus extracelular (Ve) UFP/ml	Virus extracelular total (UFP)	Ve total/C.I. total
BHK+JUNV	$(2,9 \pm 0,5) 10^6$	$(2,9 \pm 0,5) 10^6$	$(4,6 \pm 0,8) 10^5$	$(2,8 \pm 0,5) 10^6$	$0,94 \pm 0,2$
K3 894 d.p.i	$(2,6 \pm 0,5) 10^4$	$(2,6 \pm 0,5) 10^4$	$(5,0 \pm 1,4) 10^2$	$(3,0 \pm 0,8) 10^3$	$0,11 \pm 0,04$
K3 1237 d.p.i.	$(1,6 \pm 0,4) 10^5$	$(1,6 \pm 0,4) 10^5$	$(4,6 \pm 1,6) 10^2$	$(2,8 \pm 0,9) 10^3$	$0,017 \pm 0,006$

La caracterización de la producción de infectividad de las células K3 también incluyó el análisis de los niveles de infectividad extracelular. En la Tabla R2 se muestran los resultados obtenidos al cuantificar la infectividad total y asociada al cultivo. En células BHK-21 infectadas en forma aguda con JUNV, la relación entre el virus total respecto del virus extracelular producido es cercana a 1 indicando que la mayoría del virus producido se liberó al sobrenadante. Por el contrario, cuando se analizó el virus producido en las células K3, esta relación osciló entre 5,3 y 11,4, indicando que la mayor proporción de virus producido por el cultivo de células K3 queda asociado a células, encontrándose los valores mayores para los días 543 y 1147 p.i. los cuales coinciden con valores bajos de producción de infectividad liberada al sobrenadante de cultivo (Tabla R2).

*Tabla R2: Virus total y virus extracelular producido por las células K3*

	K3 117 d.p.i	K3 293 d.p.i	K3 543 d.p.i	K3 1147 d.p.i	BHK + JUNV
Ve (UFP/ml)	$(6 \pm 1,5) 10^5$	$(9,2 \pm 1,9) 10^5$	$(6,7 \pm 1,6) 10^3$	$(5 \pm 1,5) 10^3$	$(7,1 \pm 1,2) 10^6$
Vt (UFP/ml)	$(4,3 \pm 1,3) 10^6$	$(4,9 \pm 1,4) 10^6$	$(5,3 \pm 0,4) 10^4$	$(5,7 \pm 1,5) 10^4$	$(6,6 \pm 5,5) 10^6$
Vt/Ve	$7,1 \pm 2,8$	$5,3 \pm 1,9$	$7,9 \pm 2,1$	$11,4 \pm 3,8$	$0,9 \pm 0,2$

Estos resultados sugieren que la disminución en los niveles de virus extracelular detectados en las células K3 ocurriría a consecuencia de una brotación deficiente lo que llevaría a una acumulación de infectividad asociada a células.

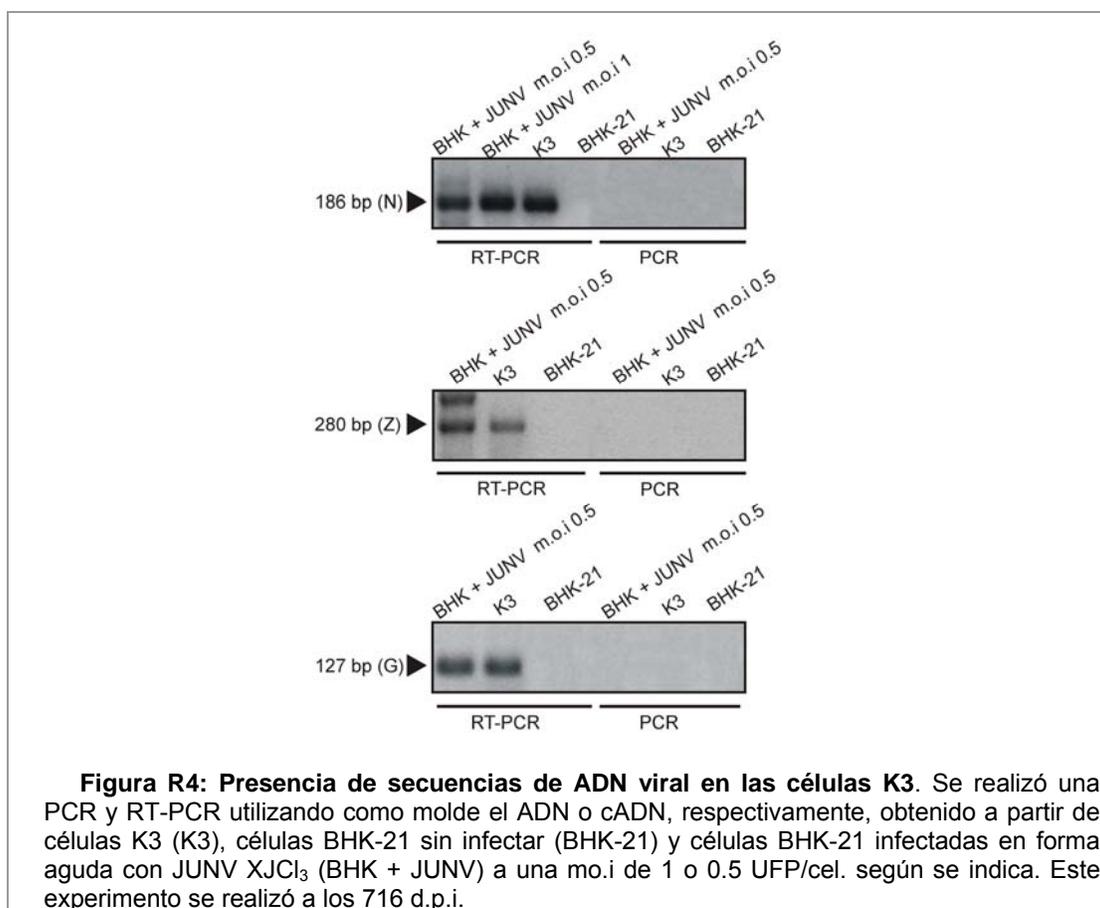
### **R. I. 3. Detección de genes virales en células K3**

La infección persistente de JUNV en el cultivo de células K3 se caracterizó por una producción continua de virus a lo largo del tiempo. Teniendo en cuenta esta situación, se planteó la posibilidad de que el genoma de JUNV permaneciera en las células K3 en forma de ADN, situación que ha sido descripta para LCMV, tanto en el ratón como en cultivos de células BHK-21 (Klenerman et al., 1997). A fin de estudiar la presencia del genoma viral de JUNV en forma de ADN en las células K3, se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) analizándose la presencia de secuencias correspondientes a los genes virales de N, G1 y Z.

Con el objetivo de detectar secuencias correspondientes al gen de N, se emplearon los cebadores Arena/186, los cuales permiten la amplificación de un fragmento de 186 pb correspondiente al extremo 3' del segmento S en sentido genómico, al 5' de su forma antígenómica y al 5' del ARNm de dicho gen. Para la detección del gen de G1 se utilizaron los cebadores GPC F/JDG2SQ, los cuales permiten la amplificación de un fragmento de 127 pb correspondiente al extremo 5' del fragmento S en sentido genómico, al 3' de su forma antígenómica y al 5' del ARNm de dicho gen. Para la detección del marco de lectura abierto del gen de Z se emplearon los cebadores ZF/ZR, los cuales permiten la amplificación de un fragmento de 280 pb correspondientes al extremo 5' del fragmento L, al 3' de su forma antígenómica y al ARNm del mismo.

Como molde para la reacción se utilizó el cADN o el ADN preparados a partir de células K3, empleándose como controles células BHK-21 no infectadas o infectadas de forma aguda con JUNV.

En la Figura R4, se muestran los resultados de la amplificación de los fragmentos esperados para los 3 genes virales analizados. Los productos de amplificación se detectaron tanto cuando se empleó como molde el cADN obtenido a partir de células BHK-21 infectadas de forma aguda, como así también cuando se utilizó como molde el cADN obtenido a partir de células K3. Por el contrario no se observó banda de amplificación cuando se empleó el cADN de células BHK-21 sin infectar. Asimismo, no se logró amplificación de ninguno de los genes virales cuando se empleó como molde de reacción el ADN extraído a partir de células BHK-21 infectadas de forma aguda con JUNV ni a partir de células K3, indicando que el genoma viral no se encontraría en forma de ADN en las células K3.



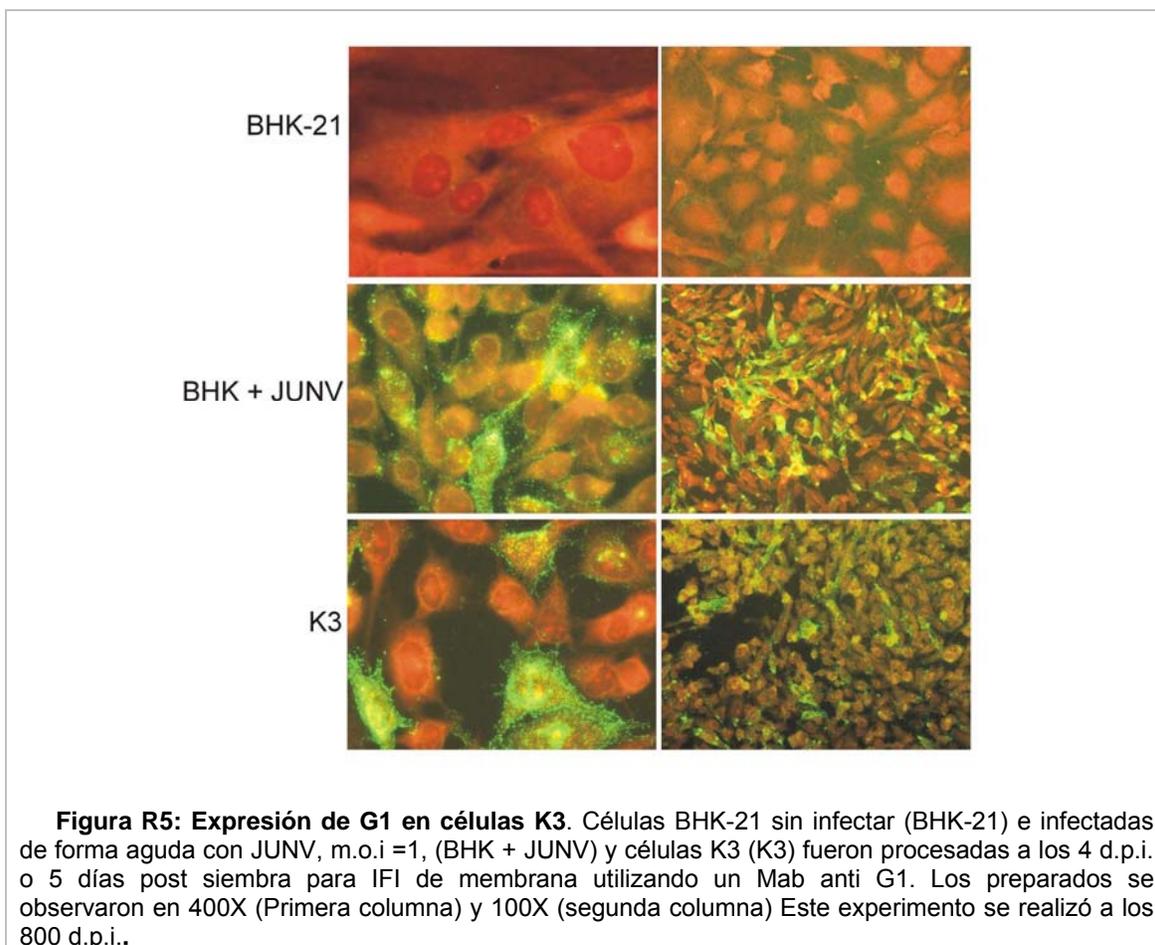
#### R. I. 4. Expresión de antígenos virales

A fin de estudiar la síntesis y expresión de N, G1 y G2 en células K3 se realizaron ensayos de IFI (G1 y N), WB (N) y actividad fusogénica (G2).

##### R. I. 4. a. Glicoproteínas virales

Con el objetivo de estudiar la expresión de G1 en los cultivos de células K3, se empleó la técnica de IFI de membrana. En la Figura R5 se observa que las células K3 presentaron expresión de G1 en su membrana con un patrón de fluorescencia similar al observado para las células BHK-21 infectadas en forma aguda. En el caso de K3, las células fluorescentes se distribuyeron de manera homogénea en toda la monocapa celular, mientras que en las infectadas de forma aguda se observaron focos (grupos) de células fluorescentes (Figura R5). El porcentaje de células (+) para G1 varió a lo largo del período analizado alcanzando valores cercanos al 80% inmediatamente luego de transcurrida la etapa aguda de la infección para oscilar luego entre 15 y 50% a partir del segundo año p.i.. En la Tabla 3, se muestra, a modo de ejemplo, tres momentos distintos del cultivo durante el segundo y tercer año p.i. en los que se analizó el virus producido y el porcentaje de células (+) para G1. Los datos obtenidos

muestran una correlación entre los niveles de infectividad recuperada del sobrenadante de los cultivos y la cantidad de células que expresan G1.



*Tabla R3: Producción viral y expresión de G1 en células K3.*

<i>Días post infección</i>	<i>Virus extracelular (UFP/ml)</i>	<i>Porcentaje de células positivas para G1</i>
7	$5 \cdot 10^6$	$83,2 \pm 10,1$
716	$1,1 \cdot 10^3$	$16,2 \pm 2,1$
1107	$4,3 \cdot 10^3$	$28,2 \pm 3,4$
1147	$5 \cdot 10^3$	$44,3 \pm 6,2$

El estudio de la expresión de la proteína viral responsable de la actividad fusogénica en las células K3, se llevó a cabo utilizando un ensayo de formación de sincicios a bajo pH. La capacidad de fusionarse a bajo pH de las células infectadas con JUNV, estaría indicando la presencia de G2 en la membrana de las mismas ya que esta proteína tiene adjudicado un rol de péptido fusogénico en los arenavirus (Eschli et al., 2006). Como puede observarse en la

Figura R6, tanto las células BHK-21 infectadas de forma aguda como las células persistentemente infectadas con JUNV presentaron actividad fusogénica al ser sometidas a bajo pH. Los sincicios obtenidos en las células K3 no se diferenciaron morfológicamente de aquellos correspondientes a los cultivos analizados durante la etapa aguda de la infección.



Los datos obtenidos durante el estudio temporal de la expresión de G2 se muestran en la Tabla R4. Estos datos indican que la capacidad fusogénica disminuyó con el curso de la infección de manera similar a lo observado con la infectividad. El tamaño de los sincicios no varió significativamente en los distintos tiempos analizados, mostrando un valor promedio de 32 núcleos/sincicio.

*Tabla R4: Actividad fusogénica de las células K3 en función del tiempo post-infección*

<b>Días post infección</b>	<b>Virus extracelular (UFP/ml)</b>	<b>Número de sincicios/cubreobjeto</b>
10	$3 \cdot 10^6$	Sincicios confluentes en la monocapa celular
112	$1,6 \cdot 10^5$	$86 \pm 15$
471	$2,6 \cdot 10^4$	$66 \pm 18$
543	$6,7 \cdot 10^3$	$57 \pm 10$
621	NH	$28 \pm 7$
921	$3,5 \cdot 10^2$	$32 \pm 12$

Analizando los datos de actividad fusogénica de las células K3 en conjunto con la producción de infectividad liberada al sobrenadante, se podría especular que, de manera similar a lo observado para G1, aquellos tiempos en los que el cultivo mostró una capacidad fusogénica elevada, es decir mayor proporción de células (+) para G2, también presentaron mayores títulos virales en el sobrenadante.

**R. I. 4. b. Nucleoproteína viral**

A fin de analizar la expresión de N en las células K3 se empleó la técnica de IFI total Mab. Del mismo modo que se describió para G1, las células positivas para este antígeno se encontraron homogéneamente distribuidas en la monocapa de células K3, a diferencia de lo observado para las células BHK-21 infectadas de forma aguda en las cuales se observó focos de células fluorescentes (Figura R7). Asimismo, se pudo observar que mientras que en las células BHK-21 infectadas de forma aguda con JUNV, N presentó un patrón de fluorescencia puntillado fino y difuso, esta proteína mostró un patrón de fluorescencia citoplasmático granular grueso en el cultivo persistentemente infectado. Este patrón de expresión de N en las células K3 se observó en todos los tiempos analizados.

Los datos de la expresión temporal de N se muestran en la Tabla R5. Se puede observar que los porcentajes de células positivas para la expresión de N presentes en el cultivo de células K3 fueron variables en los diferentes días post-infección, con valores que fluctuaron entre 10 y 65%. A diferencia de lo que ocurrió en el caso de G1 y G2, considerando los datos de expresión de N en conjunto con la producción de infectividad liberada al sobrenadante, se puede concluir que las diferencias en los porcentajes de células que expresan N no se correlacionan con las diferencias observadas en los títulos de infectividad (Tabla R5).

Cabe agregar que en todos los tiempos ensayados, los porcentajes de células (+) para N resultaron similares o mayores a aquellos encontrados para G1. Asimismo, todas las células (+) para G1 fueron (+) para N pero no a la inversa. En la figura R8 se muestra una IFI con doble marcación (N y G1), realizada a los 1401 d.p.i., momento en que el cultivo presentaba  $31,3 \pm 6,5$  y  $25,2 \pm 7,1$  células (+) para N y G1, respectivamente. En dicha Figura puede observarse la expresión conjunta de ambos antígenos de manera similar a lo que ocurre en un cultivo infectado de forma aguda.

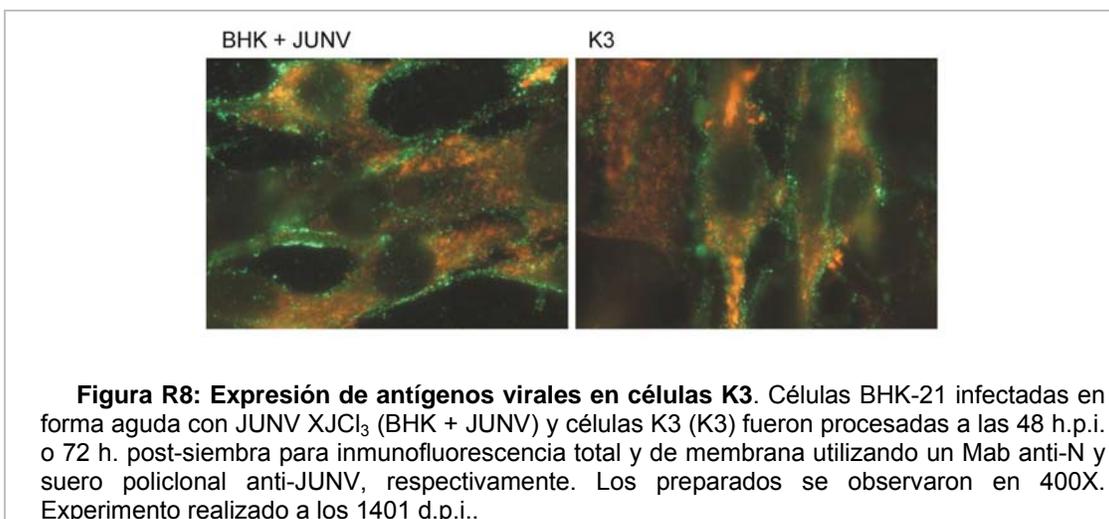
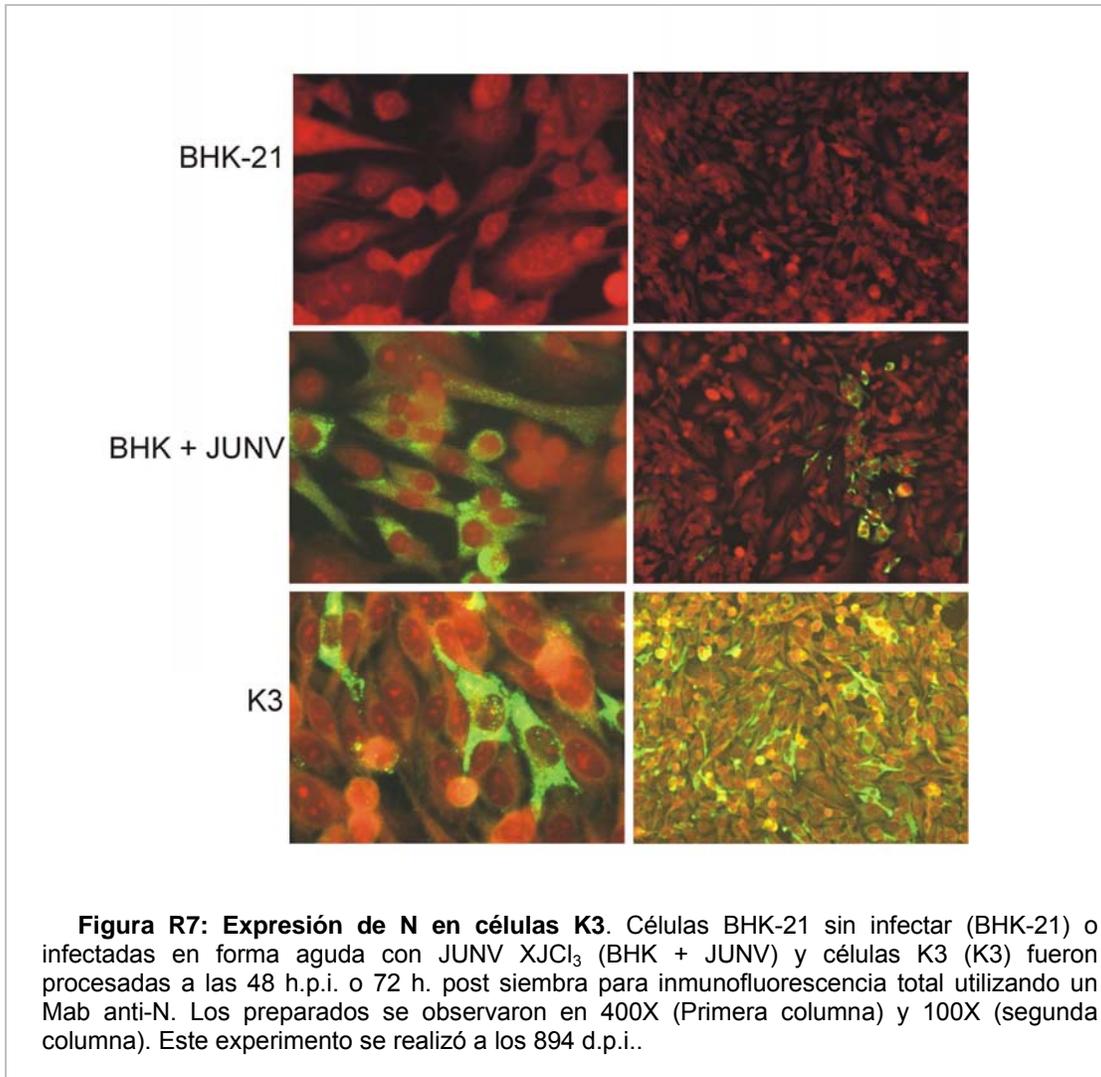
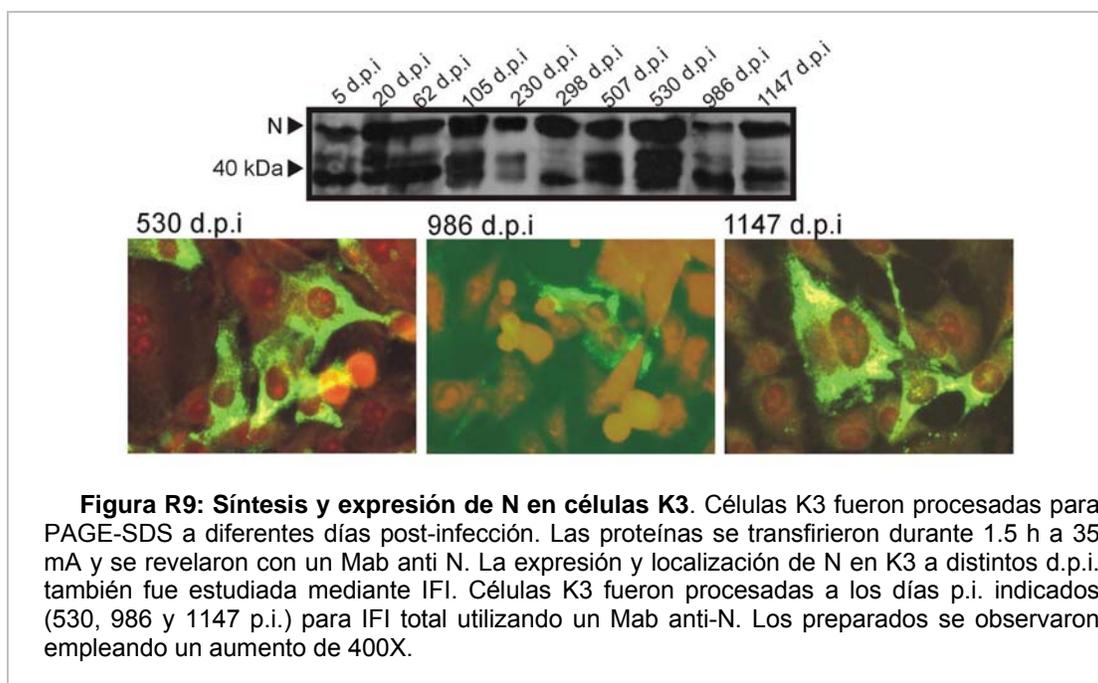


Tabla R5: Producción viral y expresión de N en células K3.

Días post infección	Virus extracelular (UFP/ml)	Porcentaje de células positivas para N
14	$5,1 \cdot 10^5$	$83,2 \pm 9,7$
29	$8,2 \cdot 10^2$	$14,1 \pm 1,4$
77	$1,4 \cdot 10^4$	$40,0 \pm 5,2$
242	$2,6 \cdot 10^3$	$23,5 \pm 3,2$
372	NH	$42,2 \pm 4,2$
507	$1 \cdot 10^4$	$44,2 \pm 5,1$
543	$6,7 \cdot 10^3$	$65,2 \pm 6,5$
894	$5 \cdot 10^2$	$25,1 \pm 3,1$
975	$2 \cdot 10^2$	$31,1 \pm 3,0$
1147	$5 \cdot 10^3$	$34,6 \pm 4,3$

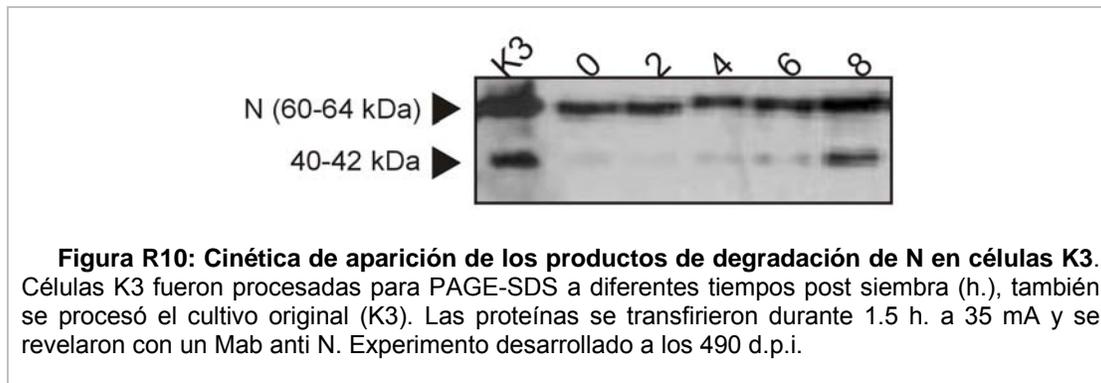
A fin de determinar si en las células persistentemente infectadas existía una síntesis diferencial de N respecto a lo que ocurre en células BHK-21 infectadas de forma aguda, de modo que ello pudiese explicar el patrón de fluorescencia observado en la Figura R7 se empleó la técnica de WB utilizando un Mab capaz de revelar a N (60-64 kDa) y al producto de degradación de la misma de 40-42 kDa.



**Figura R9: Síntesis y expresión de N en células K3.** Células K3 fueron procesadas para PAGE-SDS a diferentes días post-infección. Las proteínas se transfirieron durante 1.5 h a 35 mA y se revelaron con un Mab anti N. La expresión y localización de N en K3 a distintos d.p.i. también fue estudiada mediante IFI. Células K3 fueron procesadas a los días p.i. indicados (530, 986 y 1147 p.i.) para IFI total utilizando un Mab anti-N. Los preparados se observaron empleando un aumento de 400X.

Como puede observarse en la Figura R9, en todos los tiempos analizados, las células K3 se caracterizaron por presentar una banda prominente correspondiente a N, coincidente con lo observado para las células BHK-21 infectadas de forma aguda y una banda de intensidad

variable en la zona de peso molecular correspondiente al producto de degradación de 40-42 kDa. La presencia de este producto de degradación aparece tempranamente en las células K3 luego del subcultivo de las mismas, tal como puede observarse en la Figura R10 en la que la banda de 40-42 kDa se hace detectable a partir de las 8 h. post-siembra. Cabe mencionar que este producto de degradación en los cultivos infectados de manera aguda no aparece sino hasta el tercer d.p.i..



La presencia abundante de este producto de degradación de N en las células K3 podría correlacionarse entonces con el patrón de fluorescencia granular grueso observado en estas células.

### R. I. 5. Clonado biológico de las células K3

A fin de estudiar la heterogeneidad celular presente en el cultivo de células K3, inferida a partir de los patrones de inmunofluorescencia y valores de centros infecciosos, se efectuó un clonado biológico de las mismas. Se realizaron ensayos de caracterización de los clones celulares obtenidos de la misma forma que con el cultivo original. Los resultados de dicha caracterización se muestran en la Tabla R6.

Como puede observarse, se obtuvo una gran proporción de células (70.3%, 19/27) que dieron origen a cultivos no virogénicos y que tampoco expresaron antígenos virales. Mediante reacciones de RT-PCR, específicas para detectar los fragmentos S y L, se determinó que los mismos fueron negativos para la presencia del genoma viral, concluyéndose que se trataba de "células no infectadas", categoría definida según los parámetros mencionados (no virogénicas, no sintetizan antígenos virales y RT-PCR negativas para los genes de N y Z de JUNV).

Por otro lado, el resto de los clones celulares analizados presentaron distintas características. Se obtuvieron clones virogénicos (A2, B2, B5, D10 y G3), los cuales produjeron valores de infectividad, presente en los sobrenadantes de los cultivos, que oscilaron entre  $2 \cdot 10^2$  y  $1 \cdot 10^4$  UFP/ml. También se encontraron clones no virogénicos (D4, D9

y E9), los cuales tampoco expresaron antígenos virales aunque, sin embargo, resultaron positivos para la detección de genoma viral (Tabla R6).

*Tabla R6 Caracterización de clones celulares aislados a partir de células K3*

Clon celular	Producción viral UFP/ml	WB N	IFI N	PCR N	PCR Z
K3	1.10 <sup>5</sup>	+	+	+	+
A2	1.10 <sup>3</sup>	+	-	+	-
A3	-	-	-	-	-
A4	-	-	-	-	NH
A12	-	-	-	-	-
B2	3.10 <sup>2</sup>	+	+	+	+
B5	2.10 <sup>3</sup>	+	+	+	+
B6	-	-	-	-	NH
C5	-	-	-	-	-
C7	-	-	-	-	NH
C8	-	-	-	-	-
C9	-	-	-	-	-
D2	-	-	-	-	-
D4	-	-	-	+	NH
D9	-	-	-	+	+
D10	4 10 <sup>3</sup>	+	+	+	+
E9	-	-	-	+	-
F2	-	-	-	-	-
F5	-	-	-	-	NH
F6	-	-	-	-	NH
F9	-	-	-	-	-
G3	1.10 <sup>4</sup>	+	+	+	+
H1	-	-	-	-	NH
H2	-	-	-	-	-
H3	-	-	-	-	-
H5	-	-	-	-	NH
H7	-	-	-	-	NH
H8	-	-	-	-	-

Los resultados obtenidos sugieren la presencia de distintos tipos celulares constituyentes del cultivo de células K3. No es posible descartar que la elevada proporción de clones celulares “no infectados” pudiera haberse generado durante el período de expansión clonal a través de un proceso de “curación”. Un argumento a favor de este razonamiento podría ser el hecho de haber obtenido clones celulares con PCR (+) pero que no expresaban proteínas virales y, en consecuencia, tampoco producían virus infeccioso. Estos clones podrían encontrarse “a mitad de camino” para “curar” la infección. Asimismo, la existencia de este tipo de clones hace suponer que en las observaciones de las células K3 efectuadas mediante IFI para N o G1, la proporción de células infectadas podría ser mayor que aquella estimada en función del número de células que expresan antígenos virales.

### **R. I. 6. Análisis genómico de las secuencias virales presentes en las células K3**

Los resultados mencionados anteriormente, que demostraron la presencia continua de virus infeccioso en los sobrenadantes de las células K3, indican una replicación activa de JUNV en dichas células a lo largo de todo el período analizado. El hecho de no detectar ADN correspondiente a las secuencias de los principales genes virales que pudiese dar cuenta de un mecanismo novedoso de permanencia del virus en el cultivo sugiere que dicha replicación se estaría produciendo según la estrategia de multiplicación propia de los arnavirus. Debido a que el proceso de replicación y transcripción de un genoma de ARN ocurre en función de la actividad de ARN polimerasa ARN dependiente de la proteína L (integrada en un complejo proteico) y que este tipo de polimerasas carece de un sistema de lectura y copiado a prueba de errores, la multiplicación continua de JUNV en las células K3 podría llevar a la acumulación de cambios nucleotídicos en su genoma. A fin de investigar esta hipótesis, se procedió al aislamiento y secuenciación de los genes de N, GPC y Z amplificados a partir de ARN extraído de células K3 a los 800 d.p.i. previa obtención del cADN. A fines comparativos, se procedió de la misma manera empleando células infectadas de forma aguda con JUNV XJCl<sub>3</sub> (virus que originó las células K3). Asimismo, en el análisis de los resultados se incluyó la secuencia de la cepa de referencia JUNV XJ13 publicada en el GenBank (NC\_005081), dado que la misma fue la que presentó la menor cantidad de cambios frente a la secuencia de JUNV XJCl<sub>3</sub>, cuando esta secuencia fue comparada con las secuencias de las distintas cepas de JUNV disponibles en el GenBank.

#### **R. I. 6. a. Nucleoproteína**

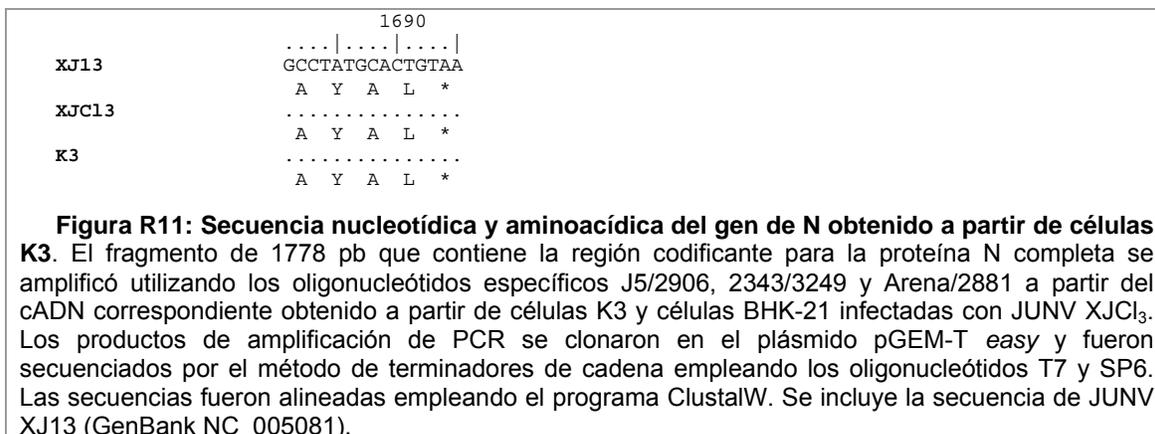
El fragmento de 1778 pb que contiene la región codificante para la proteína N completa se amplificó utilizando los oligonucleótidos específicos J5/ 2906, 2343/ 3249 y Arena/ 2881. Como se observa en la Figura R11, la secuencia obtenida a partir de las células K3 mostró una transición en la posición nucleotídica 172, dando como resultado el cambio del codón AAA por GAA con el concomitante cambio del aminoácido lisina (K, básico) por el aminoácido ácido glutámico (E, ácido), en la posición 58 de la secuencia aminoacídica de la proteína N.

Por otro lado, tanto la secuencia obtenida a partir de la infección aguda de JUNV en células BHK 21, como así también la secuencia obtenida a partir de las células K3 mostró dos cambios en las posiciones 594 y 927 de la secuencia nucleotídica codificante para esta proteína, respecto a la secuencia publicada en el GenBank. El primero de los cambios es una transición de C a A, y el segundo es una transición de C a T, resultando ambos cambios en mutaciones silenciosas (Figura R11).



	570	580	590	600	610	620	630
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	TGAGACAATGAACAGTGTACATACAAGCTTTAACCTCACTTGGGCTTCTATACACTGTGAAGTATCCAAC						
XJC13	E T M N S V I Q A L T S L G L L Y T V K Y P N						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
K3	E T M N S V I Q A L T S L G L L Y T V K Y P N						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	640	650	660	670	680	690	700
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	TTAAGTGACCTTGACAGACTGACTCAGGAACATGACTGCCTTCAGATTGTGACTAAAGATGAAAGCTCCA						
XJC13	L S D L D R L T Q E H D C L Q I V T K D E S S						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
K3	L S D L D R L T Q E H D C L Q I V T K D E S S						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	710	720	730	740	750	760	770
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	TCAATATTTCTGGTTACAACCTCAGTCTTTTCAGCTGCAGTAAAGGCTGGAGCATCTATCTTGATGGTGG						
XJC13	I N I S G Y N F S L S A A V K A G A S I L D G G						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
K3	I N I S G Y N F S L S A A V K A G A S I L D G G						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	780	790	800	810	820	830	840
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	AAACATGTTGGAACAATCAGAGTACACCCAGAAAACCTTCTCTCCCTCATAAAATCAACCATTAGGTT						
XJC13	N M L E T I R V T P E N F S S L I K S T I Q V						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
K3	N M L E T I R V T P E N F S S L I K S T I Q V						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	850	860	870	880	890	900	910
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	AAACGAAGAGAAGGCATGTTTATTGATGAGAAACCCAGGCAATAGAAATCCCTTATGAAAACCTTTTGTACA						
XJC13	K R R E G M F I D E K P G N R N P Y E N L L Y						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
K3	K R R E G M F I D E K P G N R N P Y E N L L Y						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	920	930	940	950	960	970	980
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	AACTTTGTCCTTCTGGCGATGTTGGCCTTATATGGTCTAGATCACAATCAGAGCAGGTCATGGGA						
XJC13	K L C L S G D G W P Y I G S R S Q I T G R S W D						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
K3	K L C L S G D G W P Y I G S R S Q I T G R S W D						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	CAACACAAGTATTGATCTGACAAGAAACCAGTTGCTGGTCTAGACAGCCGAAAAAACGGTCAGAAT						
XJC13	N T S I D L T R K P V A G P R Q P E K N G Q N						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
K3	N T S I D L T R K P V A G P R Q P E K N G Q N						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	TTGAGATTGGCTAACTTGACAGAGATACAAGAAGCTGTTCATCAGAGAGGAGTGGGGAAACTCGACCCCA						
XJC13	L R L A N L T E I Q E A V I R E A V G K L D P						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
K3	L R L A N L T E I Q E A V I R E A V G K L D P						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	TTGAGATTGGCTAACTTGACAGAGATACAAGAAGCTGTTCATCAGAGAGGAGTGGGGAAACTCGACCCCA						
XJC13	L R L A N L T E I Q E A V I R E A V G K L D P						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
K3	L R L A N L T E I Q E A V I R E A V G K L D P						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						

	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	CCAACACCC	TTGGCTCGACAT	TGAAGGACCAGCCACTGACCTGTGAGATGGCATTATTC	CAACCTGC			
XJC13	T N T L W L D I E G P A T D P V E M A L F Q P A						
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	T N T L W L D I E G P A T D P V E M A L F Q P A						
	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	AGGTAAGCAGTACATTC	ACTGCTTCAGAAAACCACATGATGAGAAAGGGTTAAAAATGGTAGCAGACAC					
XJC13	G K Q Y I H C F R K P H D E K G F K N G S R H						
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	G K Q Y I H C F R K P H D E K G F K N G S R H						
	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	TCTCACGGCATCTTAATGAAGGACATAGAAGATGCAATGCCAGGAGTTCTAGTTACGTGATCGGCTTGC						
XJC13	S H G I L M K D I E D A M P G V L S Y V I G L						
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	S H G I L M K D I E D A M P G V L S Y V I G L						
	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	TGCCTCCAGACATGGTTGTGACTACTCAAGGATCCGATGACATCAGGAAAGTTGTTGACCTCCATGGAAG						
XJC13	L P P D M V V T T Q G S D D I R K L F D L H G R						
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	L P P D M V V T T Q G S D D I R K L F D L H G R						
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	AAGAGATCTTAAACTGGTTGATGTTAAGCTCACATCTGAACAAGCCAGGCAGTTTGATCAACAGGTCTGG						
XJC13	R D L K L V D V K L T S E Q A R Q F D Q Q V W						
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	R D L K L V D V K L T S E Q A R Q F D Q Q V W						
	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	GAGAAATATGGTCACTTATGCAAAATATCACAATGGAGTGGTTGTCAATAAGAAAAAGAGGGAAAGGATA						
XJC13	E K Y G H L C K Y H N G V V V N K K K R E K D						
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	E K Y G H L C K Y H N G V V V N K K K R E K D						
	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	CTCCCTCAAGTTGGCCTCAGTGAACCACACTGTGCTCTGCTAGACTGCATAATGTTTCAGTCAGTGCT						
XJC13	T P F K L A S S E P H C A L L D C I M F Q S V L						
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	T P F K L A S S E P H C A L L D C I M F Q S V L						
	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	AGATGGGAAGCTCTATGAGGAGGAACCTACACCTCTATACCACCGAGCTGCTGTTCTCCCGAAGGCA						
XJC13	D G K L Y E E E P T P L L P P S L L F L P K A						
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	D G K L Y E E E P T P L L P P S L L F L P K A						
	D G K L Y E E E P T P L L P P S L L F L P K A						



### R. I. 6. b. Precursor glicoproteico

El fragmento de 1554 pb que contiene la región codificante para GPC completo se amplificó utilizando los oligonucleótidos específicos Arena/900R, 651F/1049R y 889/GPCR a partir del cADN. Como se muestra en la Figura R12, la secuencia obtenida a partir de las células K3 mostró un cambio nucleotídico correspondiente a una transición de A a G (posición 739 en la secuencia nucleotídica), la cual da origen a un cambio del codón AGG a GGG con el concomitante cambio del aminoácido arginina (R, básico) por glicina (G, neutro) en la posición 243 de la secuencia aminoacídica. La mencionada diferencia, se ubicó en la región que contiene la señal de reconocimiento de la proteasa celular subtilasa, la cual es responsable del procesamiento post- traduccional de GPC que da origen a G1 y G2 (Tabla R7 y Figura R12).

La secuencia obtenida a partir de las células K3 también presentó cambios en la secuencia nucleotídica respecto a las secuencias publicadas en el GenBank y la obtenida a partir de la infección aguda en las posiciones 309 (de G a A) ,1248 (de T a C) y 1344 (de A a G) resultando estos cambios en mutaciones silenciosas.

Asimismo, se evidenciaron cambios en la secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de la infección aguda con JUNV y de células K3 respecto a la secuencia publicada en el *GenBank*. El primero de ellos, en la posición nucleotídica 552 (transición de T a C), resultó en una mutación silenciosa, mientras que los cambios en las posiciones nucleotídicas 622 y 623 (transición de C a T) y 503 (de A a G) resultan en el cambio de aminoácido prolina (P) por leucina (L) en la posición 209 y del aminoácido treonina (T) por alanina (A) en la posición 169 en la secuencia aminoacídica de la proteína, respectivamente (Tabla R7 y Figura R12)



	360	370	380	390	400	410	420
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	ATTGTTGCCACAGTATGATGTTATAATACAACATCCAGCAGATATGAGCTGGTGTCCAAAAGTATGAT					
XJC13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	L L P Q Y D V I I Q H P A D M S W C S K S D D					
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	L L P Q Y D V I I Q H P A D M S W C S K S D D					
	430	440	450	460	470	480	490
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	CAAATTTGGTGTCTCAGTGGTTCATGAATGCTGTGGACATGATTGGCATCTAGACCCACCATTTCTGT					
XJC13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	Q I W L S Q W F M N A V G H D W H L D P P F L					
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	Q I W L S Q W F M N A V G H D W H L D P P F L					
	500	510	520	530	540	550	560
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	GTAGGAACCGTACAAAGACAGAGGTTTCATCTTCAAGTCAACACCTCCAAGACTGGTGTAAATGAAAA					
XJC13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	C R N R T K T E G F I F Q V N T S K T G V N E N					
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	C R N R <b>A</b> K T E G F I F Q V N T S K T G V <b>C</b> N E N					
	570	580	590	600	610	620	630
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	TTATGCTAAGAAGTTTAAAGACTGGCATGCATCATTATATAGAGAATATCTGACTCTTGCCCGAATGGC					
XJC13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	Y A K K F K T G M H H L Y R E Y P D S C P N G					
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	Y A K K F K T G M H H L Y R E Y P D S C <b>TT</b> N G					
	640	650	660	670	680	690	700
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	AAACTGTGCTTAATGAAGGCACAACCTACCAGTTGGCCTCTCCAATGTCCACTCGACCAGTTAACACAT					
XJC13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	K L C L M K A Q P T S W P L Q C P L D H V N T					
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	K L C L M K A Q P T S W P L Q C P L D H V N T					
	710	720	730	740	750	760	770
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	TACACTTCCTTACAAGAGGTAAAAACATTCAACTCCAAGAGGTCCTTGAAGATTCTTCTCCTGGTC					
XJC13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	L H F L T R G K N I Q L P R R S L K A F F S W S					
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	L H F L T R G K N I Q L P <b>G</b> R S L K A F F S W S					
	780	790	800	810	820	830	840
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	TTTGACAGACTCATCCGGCAAGGATACCCCTGGAGGCTATTGTCTAGAAGATGGATGCTCGTAGCAGCC					
XJC13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	L T D S S G K D T P G G Y C L E E W M L V A A					
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	L T D S S G K D T P G G Y C L E E W M L V A A					
	850	860	870	880	890	900	910
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	AAAATGAAGTGTTTGGCAACTGCTGTAGCAAATGCAATTTGAATCATGACTCTGAATTCGTGACA					
XJC13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	K M K C F G N T A V A K C N L N H D S E F C D					
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	K M K C F G N T A V A K C N L N H D S E F C D					

	920	930	940	950	960	970	980
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	TGTGAGGCTTTTGGATTACAACAAAATGCTATCAAACCCCTAAATGATGAAACTAAGAAACAAGTAAA						
XJC13	M L R L F D Y N K N A I K T L N D E T K K Q V N						
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	M L R L F D Y N K N A I K T L N D E T K K Q V N						
	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	TCTGATGGGGCAGACAATCAATGCCCTGATATCTGACAATTTATTGATGAAAAACAAAATTAGGGAAGCTG						
XJC13	L M G Q T I N A L I S D N L L M K N K I R E L						
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	L M G Q T I N A L I S D N L L M K N K I R E L						
	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	ATGAGTGTCCCTTACTGCAATTACACAAAATTTGGTATGTCAACCACACACTTTCAGGACAACACTCAT						
XJC13	M S V P Y C N Y T K F W Y V N H T L S G Q H S						
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	M S V P Y C N Y T K F W Y V N H T L S G Q H S						
	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	TACCAAGGTGCTGGTTAATAAAAAACAACAGCTATTTGAACATCTCTGACTTCCGTAATGACTGGATATT						
XJC13	L P R C W L I K N N S Y L N I S D F R N D W I L						
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	L P R C W L I K N N S Y L N I S D F R N D W I L						
	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	AGAAAGTGACTTCTTAATTTCTGAAATGCTAAGCAAAGAGTATTCGGACAGGCAGGGTAAAACCTCTTTG						
XJC13	E S D F L I S E M L S K E Y S D R Q G K T P L						
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	E S D F L I S E M L S K E Y S D R Q G K T P L						
	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	ACTTTAGTTGACATCTGTTTTGGAGCACAGTATCTTCACAGCGTCACTTTCCTTCACTTGGTGGGTA						
XJC13	T L V D I C F W S T V F F T A S L F L H L V G						
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	T L V D I C F W S T V F F T A S L F L H L V G						
	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	TACCCACCCACAGACACATCAGGGGCGAAGCATGCCCTTTGCCACACAGGTTGAACAGCTTGGGTGGTTG						
XJC13	I P T H R H I R G E A C P L P H R L N S L G G C						
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	I P T H R H I R G E A C P L P H R L N S L G G C						
	1410	1420	1430	1440	1450		
XJ13	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	CAGATGTGGTAAGTACCCCAATCTAAGAAACCAACAGTTTGGCGTAGAGGACACTAA						
XJC13	R C G K Y P N L K K P T V W R R G H *						
K3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	R C G K Y P N L K K P T V W R R G H *						
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
	R C G K Y P N L K K P T V W R R G H *						

**Figura R12: Secuencia nucleotídica y aminoacídica del gen de GPC obtenido a partir de células K3. El fragmento de 1554 pb que contiene la región codificante del gen de GPC se amplificó utilizando los oligonucleótidos específicos Arena/900R, 651F/1049R y 889/GPCR a partir del cADN**



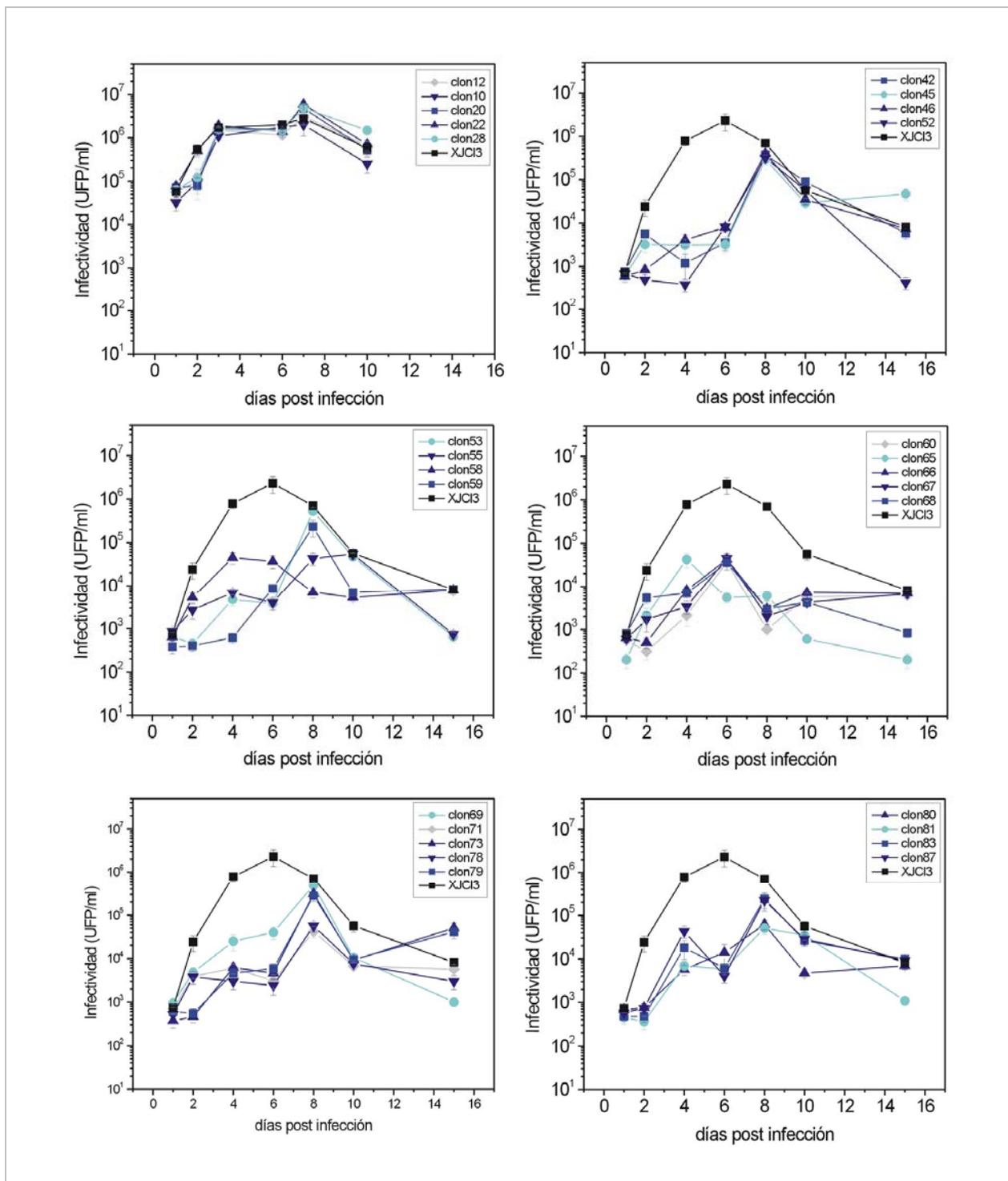
## **R. II. Caracterización de clones virales aislados de cultivos de células K3**

La liberación continua de virus infeccioso en los sobrenadantes de células K3 permitió el aislamiento y caracterización del virus producido por estas células luego de transcurrido el primer (367 d.p.i.) y el segundo (809 d.p.i.) año de la infección, momentos en los cuales el cultivo mostraba niveles de infectividad de  $6 \cdot 10^4$  y  $10^3$  UFP/ml, respectivamente. El aislamiento se llevó a cabo mediante un clonado biológico y la amplificación se realizó en células Vero. La caracterización se llevó a cabo de manera comparativa con la cepa parental, JUNV XJCI<sub>3</sub>, que se utilizó para originar la infección persistente de las células K3.

### **R. II. 1. Crecimiento de los clones virales**

Los clones virales se caracterizaron de acuerdo con sus propiedades de multiplicación *in vitro*. Para ello, se analizó la cinética de crecimiento tanto en células Vero como BHK-21, como así también su capacidad citolítica en células Vero.

En primer lugar, se realizaron infecciones de células Vero con los distintos aislamientos a una m.o.i. = 0,1 UFP/célula y se titularon los sobrenadantes obtenidos a diferentes tiempos p.i. mediante la técnica de UFP. En la Figura R14 se puede observar que todos los clones virales obtenidos del primer aislamiento mostraron una cinética de multiplicación similar a la observada para el virus parental. Por otro lado, al titular sobrenadantes cosechados de las células Vero infectadas con los distintos clones virales provenientes del segundo aislamiento se observa que para los clones virales 42, 45, 46, 52, 53, 55, 59, 69, 71, 73, 78, 79, 80, 81, 83 y 87 los títulos máximos se alcanzaron entre los días 6<sup>to</sup> y 8<sup>vo</sup>, mientras que para el virus parental y los clones 58, 60, 65, 66, 67 y 68 el máximo título se observa de manera más temprana, entre los días 4<sup>to</sup> y 6<sup>to</sup>. Asimismo, los títulos alcanzados para los clones 55, 58, 60, 65, 66, 67, 68, 71, 80 y 81 resultaron ser 2 logaritmos menores respecto del título máximo alcanzado por el virus parental (Figura R14).

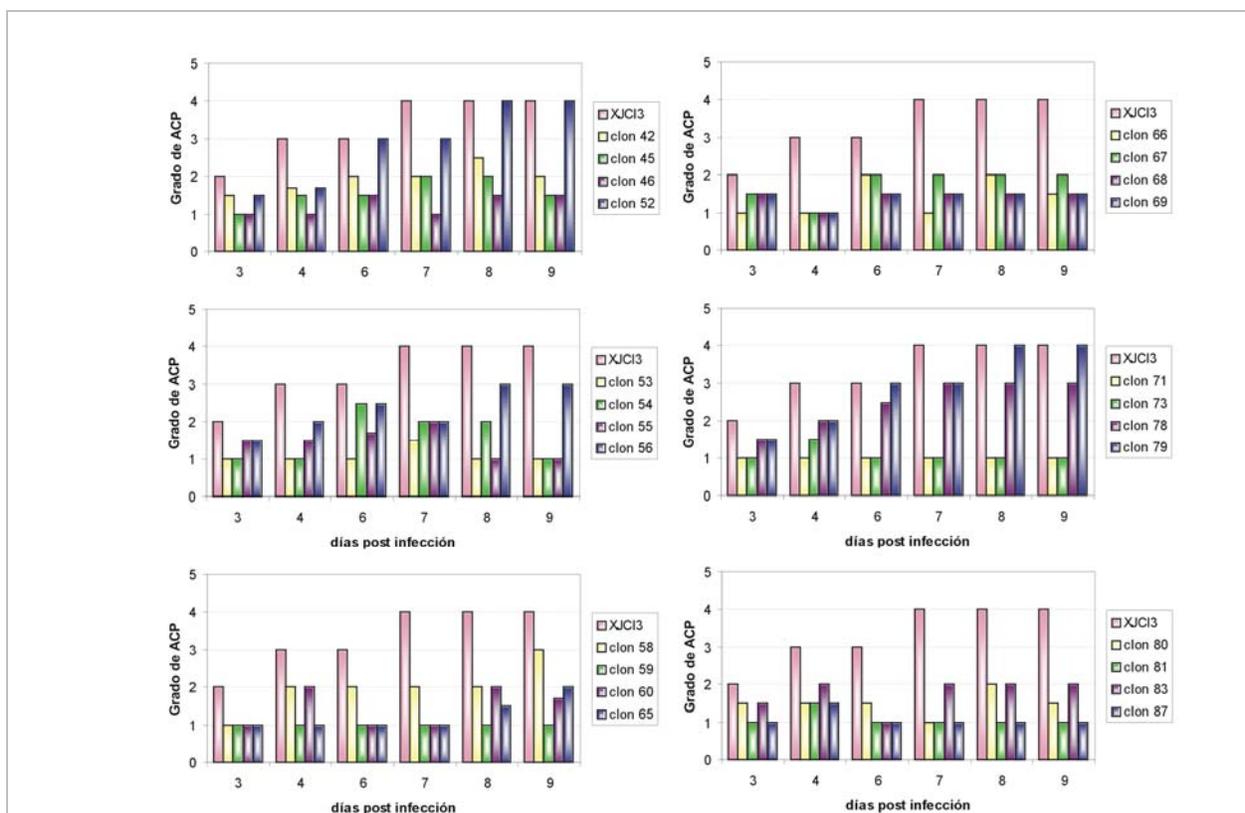


**Figura R14: Curvas de crecimiento en células Vero de los clones virales aislados de células K3.** Células Vero fueron infectadas con JUNV XJCI<sub>3</sub> o con los clones aislados a partir de las células K3 a los 367 d.p.i. (clones 10, 12, 20, 22 y 28) o a los 809 d.p.i. (resto de los clones) a una m.o.i. de 0,1 UFP/cél. Los sobrenadantes de los cultivos fueron cosechados a los días p.i. indicados y titulados mediante la técnica de UFP.

Debido a las diferencias encontradas al comparar las cinéticas de crecimiento de los clones virales obtenidos en el segundo aislamiento, se decidió analizar el efecto citopático producido por dichos clones. Para ello, se realizaron infecciones de células Vero con los

distintos aislamientos a una m.o.i. de 0,1 UFP/célula, observándose los cultivos a fin de determinar el grado de acción citopática (ACP) de acuerdo con el aspecto del cultivo (células redondeadas, refringentes, con núcleos picnóticos formando focos de acción citopática y células en el sobrenadante).

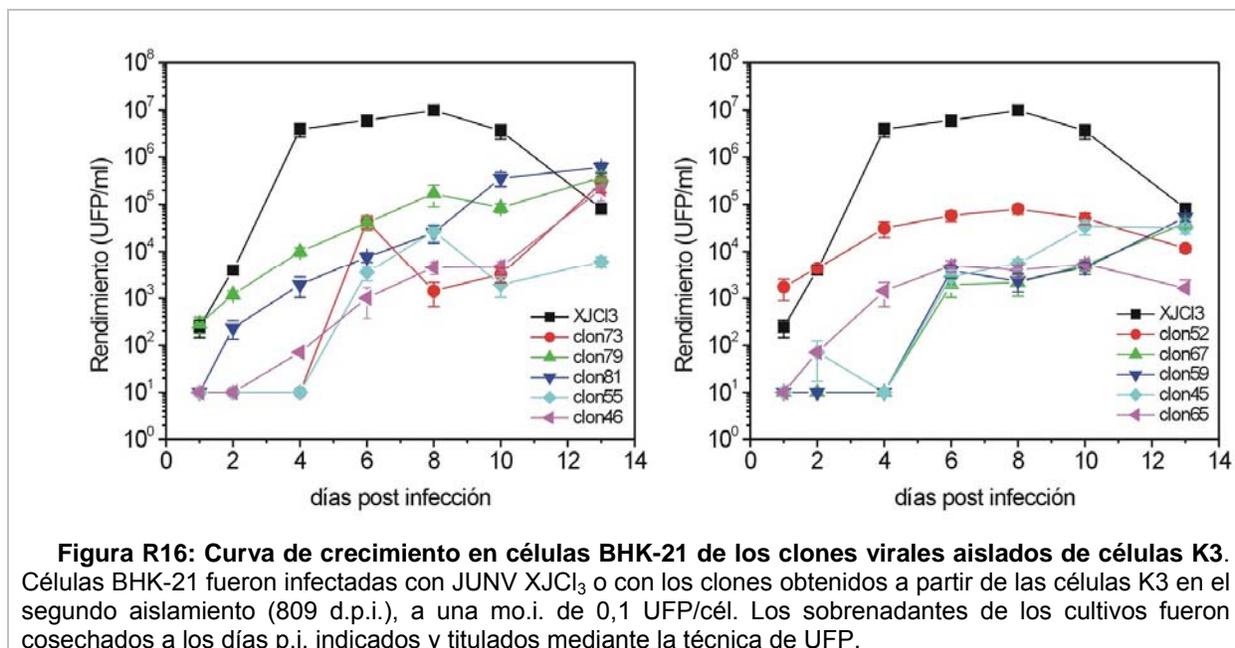
Como se observa en la Figura R15, el momento de aparición de la ACP producida por los clones obtenidos en el segundo aislamiento fue posterior al correspondiente para JUNV XJCl<sub>3</sub> sugiriendo una menor citopatogenicidad del virus aislado de la infección persistente. Asociado a esta observación, el progreso de la destrucción celular fue más lento en el caso de los clones, mientras que para la cepa parental el grado máximo de destrucción se alcanzó al día 7 p.i., los clones virales que alcanzaron dicho estadio lo hicieron entre los días 8 y 9 p.i..



**Figura R15: Acción citopatógena en células Vero infectadas con los clones virales aislados de células K3.** Células Vero fueron infectadas con los clones obtenidos de células K3 a los 809 d.p.i. (clones 42, 45, 46, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 65, 66, 67, 68, 69, 71, 73, 78, 79, 80, 81, 83, 87), a una m.o.i. de 0,1 UFP/cél. Los cultivos así infectados se observaron al microscopio invertido durante 9 d.p.i. registrándose el grado de ACP según la siguiente escala: La intensidad de la acción citopática se graduó de 0 a 4 en forma arbitraria, correspondiendo el grado 4 al máximo ACP.

A fin de analizar si el fenotipo de multiplicación restringida de los clones 55, 65, 67 y 81 y de crecimiento lento de los clones 45, 46, 52, 59, 73 y 79, se debía a una característica particular del cultivo celular utilizado también se realizaron las curvas de crecimiento de dichos clones virales en células BHK-21. Al titular los sobrenadantes cosechados a partir de

las células BHK-21 a diferentes días p.i. se observó que XJCl<sub>3</sub> multiplicó rápidamente, llegando a títulos de 10<sup>6</sup> UFP/ml al 4<sup>to</sup> día p.i., obteniéndose el título máximo (1.10<sup>7</sup> UFP/ml) al día 8 p.i.. Cuando se analizan las curvas de multiplicación de los clones virales, en este tipo celular, se observa que los clones 52, 55 y 65 mostraron un crecimiento menor respecto a la cepa parental, alcanzando títulos máximos de 8.10<sup>4</sup>, 2,7.10<sup>4</sup>, y 3,9.10<sup>3</sup> UFP/ml al día 8 p.i., respectivamente. Los clones virales 45, 46, 59, 67, 73, 79 y 81 también mostraron títulos menores respecto del virus parental al día 8 p.i, indicando un crecimiento restringido respecto de XJCl<sub>3</sub>. Sin embargo, el hecho de obtener para estos clones curvas de crecimiento con cinéticas crecientes aún al día 13 p.i. podría indicar una multiplicación retrasada de los mismos respecto del virus parental más que una restricción en el título alcanzado (Figura R16).



El análisis en conjunto de los resultados obtenidos sugiere que mientras los clones virales recuperados en el primer aislamiento no presentaron diferencias de multiplicación respecto de la cepa viral que originó la infección persistente, aquellos obtenidos en el segundo aislamiento se caracterizaron por exhibir una multiplicación deficiente respecto de dicho virus. La deficiencia observada tanto en células Vero como BHK-21 se puso de manifiesto a través de curvas de crecimiento retrasadas en el tiempo y/o títulos máximos obtenidos significativamente menores que el correspondiente al virus control, como así también por presentar una citopatogenicidad más reducida.

## R. II. 2. Termosensibilidad de los clones virales

Una característica que presentan algunos cultivos persistentemente infectados con distintos virus, es la selección positiva de mutantes termosensibles (*ts*) durante el curso de la infección. Estas mutantes no pueden multiplicar a la temperatura restrictiva (generalmente 39-40°C) pero sí a la permisiva (33 a 37°C). Esta característica puede estar dada por una susceptibilidad de la partícula viral al calor (termoestabilidad) o por una falla de crecimiento del virus a la temperatura restrictiva. Esto nos llevó a analizar el fenotipo *ts* del virus liberado por las células K3.

Con este propósito se investigó en primer lugar la termoestabilidad de los clones virales obtenidos de las células K3. Para ello se prepararon suspensiones de los mismos y de JUNV XJCl<sub>3</sub> diluidas en PBS, incubándolas durante 1 h a 45°C y titulándose la infectividad remanente mediante el método de UFP. Finalmente, se calculó el cociente entre el título obtenido de la muestra tratada y el título del control que se mantuvo en hielo por el mismo tiempo. En la Tabla R8 se muestran los resultados obtenidos.

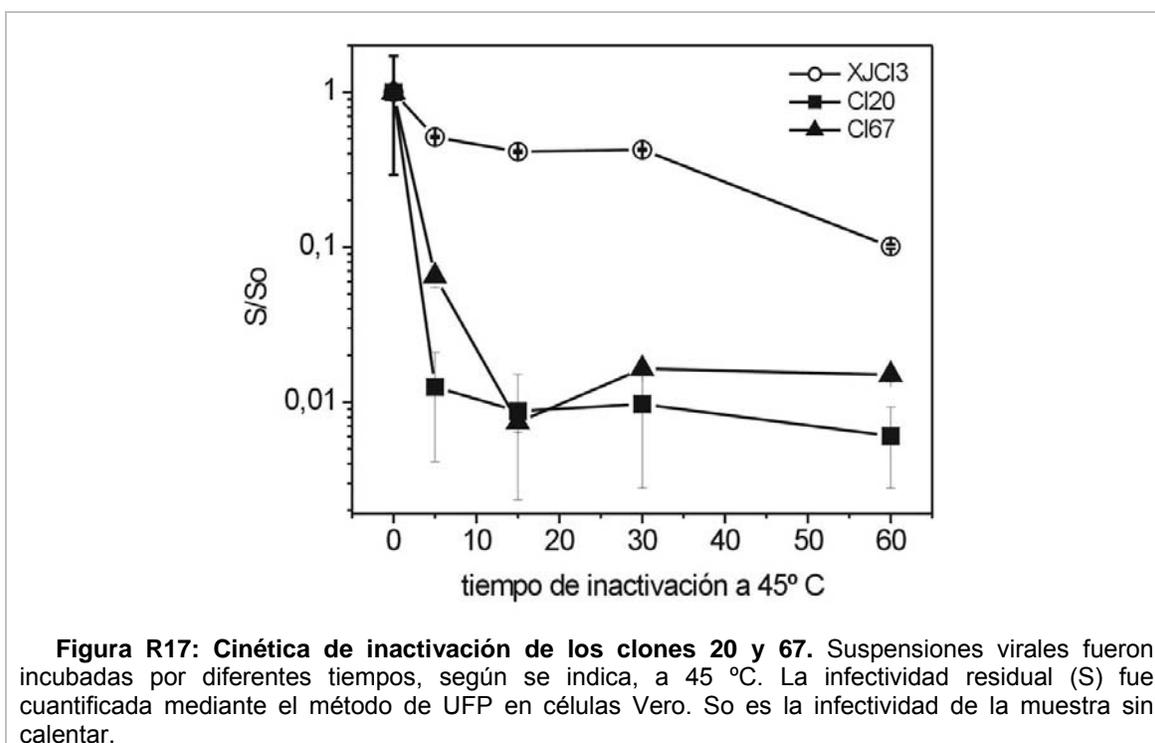
Tabla R8 Termoestabilidad del virus liberado por las células K3

Clon viral	Título s/c UFP/ml	Título 45°C 60 min UFP/ml	Inactivación Título 45°C 60 min/ Título s/c
<b>Controles</b>			
XJCl <sub>3</sub> i	(1,2 ± 0,6) 10 <sup>5</sup>	(1,2 ± 0,2) 10 <sup>4</sup>	0,10 ± 0,061
XJCl <sub>3</sub> ii	(3,3 ± 1,1) 10 <sup>3</sup>	(5,3 ± 1,4) 10 <sup>2</sup>	0,15 ± 0,070
XJCl <sub>3</sub> clon3	(5,2 ± 1,4) 10 <sup>4</sup>	(9,8 ± 1,9) 10 <sup>3</sup>	0,18 ± 0,063
XJCl <sub>3</sub> clon4	(6,2 ± 1,5) 10 <sup>4</sup>	(9,6 ± 1,9) 10 <sup>3</sup>	0,15 ± 0,050
XJCl <sub>3</sub> clon5	(4,6 ± 1,3) 10 <sup>4</sup>	(8,6 ± 1,8) 10 <sup>3</sup>	0,18 ± 0,068
<b>Clones virales</b>			
1			NH
2			NH
3			NH
4			NH
5			NH
6	(1,5 ± 0,7) 10 <sup>5</sup>	(1,0 ± 0,2) 10 <sup>4</sup>	0,066 ± 0,037
8			NH
9	(2,6 ± 1,0) 10 <sup>4</sup>	(6,4 ± 1,6) 10 <sup>3</sup>	0,24 ± 0,114
10	(1,5 ± 0,7) 10 <sup>5</sup>	(9,5 ± 1,9) 10 <sup>3</sup>	0,063 ± 0,035
11			NH
12	(7,8 ± 1,7) 10 <sup>3</sup>	(2,1 ± 0,9) 10 <sup>3</sup>	0,26 ± 0,132
13			NH
15			NH

17			NH
19	$(2,2 \pm 0,9) 10^5$	$(8,3 \pm 1,8) 10^3$	$0,036 \pm 0,017$
20	$(1,6 \pm 0,8) 10^5$	$(9,6 \pm 1,9) 10^2$	$0,006 \pm 0,003$
21	$(3,5 \pm 1,1) 10^3$	$(3,7 \pm 1,2) 10^2$	$0,10 \pm 0,049$
22	$(1,1 \pm 0,6) 10^4$	$(6,8 \pm 1,6) 10^2$	$0,062 \pm 0,040$
23	$(2,3 \pm 0,9) 10^3$	$(9,5 \pm 6,1) 10^1$	$0,041 \pm 0,031$
24	$(2,1 \pm 0,9) 10^4$	$(4,3 \pm 1,3) 10^3$	$0,20 \pm 0,108$
25	$(3,7 \pm 1,2) 10^4$	$(7,5 \pm 1,7) 10^3$	$0,20 \pm 0,081$
26	$(2,6 \pm 1,0) 10^3$	$(6,7 \pm 1,6) 10^2$	$0,25 \pm 0,119$
27	$(1,5 \pm 0,7) 10^5$	$(1,8 \pm 0,2) 10^4$	$0,12 \pm 0,065$
28	$(7,5 \pm 5,4) 10^3$	$(3,1 \pm 1,1) 10^3$	$0,42 \pm 0,340$
29	$(5,4 \pm 1,4) 10^3$	$(2,4 \pm 0,9) 10^2$	$0,044 \pm 0,021$
30	$(8,6 \pm 1,8) 10^4$	$(1,1 \pm 0,2) 10^4$	$0,13 \pm 0,039$
31	$(2,9 \pm 1,0) 10^4$	$(2,8 \pm 1,0) 10^3$	$0,098 \pm 0,051$
33			NH
42	$(1,2 \pm 0,2) 10^4$	$(5,3 \pm 1,4) 10^3$	$0,43 \pm 0,141$
45	$(1,2 \pm 0,2) 10^4$	$(4,3 \pm 1,3) 10^2$	$0,034 \pm 0,012$
46	$(1,3 \pm 0,2) 10^4$	$(6,3 \pm 1,5) 10^2$	$0,045 \pm 0,013$
52	$(8,5 \pm 1,8) 10^4$	$(9,4 \pm 1,9) 10^3$	$0,10 \pm 0,032$
53			NH
54	$(5,1 \pm 0,1) 10^4$	$(5,4 \pm 1,4) 10^2$	$0,10 \pm 0,040$
55			NH
56	$(7,0 \pm 1,6) 10^3$	$(7,5 \pm 1,7) 10^3$	$1,07 \pm 0,357$
58	$(5,3 \pm 1,4) 10^3$	$(7,8 \pm 1,7) 10^2$	$0,14 \pm 0,052$
59			NH
60			NH
65	$(1,0 \pm 0,2) 10^4$	$(5,4 \pm 1,4) 10^2$	$0,053 \pm 0,017$
66	$(4,3 \pm 1,3) 10^3$	$(4,2 \pm 1,3) 10^2$	$0,098 \pm 0,042$
67	$(3,5 \pm 1,1) 10^4$	$(5,3 \pm 1,4) 10^2$	$0,015 \pm 0,006$
68	$(1,4 \pm 0,7) 10^3$	$(2,2 \pm 9,3) 10^2$	$0,15 \pm 0,107$
69	$(2,0 \pm 0,8) 10^3$	$(2,5 \pm 1,0) 10^2$	$0,12 \pm 0,074$
71			NH
73			NH
78	$(4,5 \pm 1,3) 10^3$	$(4,8 \pm 1,3) 10^2$	$0,10 \pm 0,044$
79	$(4,6 \pm 1,3) 10^3$	$(5,0 \pm 1,4) 10^2$	$0,10 \pm 0,044$
80			NH
81	$(1,6 \pm 0,8) 10^3$	$(3,4 \pm 1,1) 10^2$	$0,21 \pm 0,130$
83	$(5,2 \pm 1,4) 10^3$	$(5,2 \pm 1,4) 10^2$	$0,10 \pm 0,039$
85			NH

86	$(3,2 \pm 1,1) 10^3$	$(3,2 \pm 1,1) 10^2$	$0,10 \pm 0,050$
87			NH

Los clones virales 20 y 67 que mostraron cocientes de inactivación de 25 y 10 veces menores respecto a los obtenidos para la cepa parental, respectivamente (Tabla R8), se emplearon para realizar una cinética de inactivación. Los resultados obtenidos permiten confirmar que los clones 20 y 67 resultaron más termolábiles que el virus que el virus parental ya que sufrieron una rápida y pronunciada inactivación frente al calor, con una disminución máxima de la infectividad a los 5 minutos de exposición al agente inactivante (Figura R17).



En segundo lugar se investigó la capacidad de los clones de multiplicar a la temperatura restrictiva de 39 °C en forma comparativa con el virus que originó la infección, JUNV XJCl<sub>3</sub>. A tal fin, células Vero fueron infectadas con los clones en paralelo con el virus parental. Luego de 1h de adsorción a 37°C, los inóculos fueron removidos y las células fueron incubadas con medio semisólido e incubadas a 37°C y 39°C. A los 7 días las mismas fueron fijadas y reveladas según la técnica de UFP a fin de calcular las eficiencias de plaqueo (EOP) respectivas.

Como se muestra en la Tabla R9 la mayor proporción del virus liberado por las células K3 a los días 367 y 809 p.i. mostró títulos superiores luego de la incubación a 37°C respecto de la incubación a la temperatura restrictiva de la misma manera que el virus parental. Sin embargo,

los clones virales 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 42, 45, 52, 55, 59, 60, 69, 71, 73, 78, 80 y 85 mostraron títulos similares para ambas temperaturas. Por otra parte, los clones 81 y 87 fueron los que mostraron las mayores diferencias en los títulos obtenidos a ambas temperaturas. Aún así, no se pueden considerar a dichos clones virales como variantes *ts* ya que la diferencia entre la EOP obtenida respecto al virus estándar no llegó a ser de 1 log.

Tabla R9 Termosensibilidad del virus liberado por las células K3

Clon viral	Título 37°C (UFP/ml)	Título 39°C (UFP/ml)	E.O.P. 39°C/37°C
<b>Control</b>			
XJCl <sub>3</sub>	(8,6 ± 1,8) 10 <sup>5</sup>	(6,5 ± 0,5) 10 <sup>5</sup>	0,75 ± 0,17
<b>Clones virales</b>			
1	(4,6 ± 1,3) 10 <sup>5</sup>	(3,8 ± 1,2) 10 <sup>5</sup>	0,82 ± 0,36
2	(2,4 ± 0,9) 10 <sup>6</sup>	(1,4 ± 0,2) 10 <sup>6</sup>	0,58 ± 0,25
3	(4,0 ± 1,2) 10 <sup>6</sup>	(1,5 ± 0,2) 10 <sup>6</sup>	0,38 ± 0,13
4	(2,7 ± 1,0) 10 <sup>6</sup>	(8,8 ± 1,8) 10 <sup>5</sup>	0,32 ± 0,14
5	(2,1 ± 0,9) 10 <sup>6</sup>	(5,9 ± 1,5) 10 <sup>5</sup>	0,28 ± 0,14
6	(5,3 ± 1,4) 10 <sup>6</sup>	(1,6 ± 0,2) 10 <sup>6</sup>	0,30 ± 0,09
8	Nh	Nh	
9	(2,3 ± 0,9) 10 <sup>6</sup>	(1,4 ± 0,2) 10 <sup>6</sup>	0,60 ± 0,27
10	(3,6 ± 1,2) 10 <sup>6</sup>	(1,8 ± 0,2) 10 <sup>6</sup>	0,50 ± 0,18
11	Nh	Nh	
12	Nh	Nh	
13	Nh	Nh	
15	Nh	Nh	
17	Nh	Nh	
19	(3,1 ± 1,1) 10 <sup>6</sup>	(1,5 ± 0,2) 10 <sup>6</sup>	0,50 ± 0,20
20	(2,3 ± 0,9) 10 <sup>6</sup>	(7,1 ± 1,6) 10 <sup>5</sup>	0,30 ± 0,14
21	(4,1 ± 1,2) 10 <sup>6</sup>	(2,3 ± 0,9) 10 <sup>6</sup>	0,56 ± 0,29
22	(1,8 ± 0,8) 10 <sup>6</sup>	(8,0 ± 1,7) 10 <sup>5</sup>	0,44 ± 0,23
23	(3,4 ± 1,1) 10 <sup>5</sup>	(3,4 ± 1,1) 10 <sup>5</sup>	1,01 ± 0,49
24	(6,6 ± 1,6) 10 <sup>5</sup>	(6,7 ± 1,6) 10 <sup>5</sup>	1,01 ± 0,35
25	(1,5 ± 0,7) 10 <sup>6</sup>	(8,5 ± 1,8) 10 <sup>5</sup>	0,56 ± 0,31
26	(4,3 ± 1,3) 10 <sup>5</sup>	(4,1 ± 1,2) 10 <sup>5</sup>	0,94 ± 0,41
27	(1,7 ± 0,8) 10 <sup>5</sup>	(1,6 ± 0,8) 10 <sup>5</sup>	0,94 ± 0,66
28	(7,5 ± 1,7) 10 <sup>5</sup>	(6,9 ± 1,6) 10 <sup>5</sup>	0,92 ± 0,30
29	(3,4 ± 1,1) 10 <sup>5</sup>	(3,5 ± 1,1) 10 <sup>5</sup>	1,02 ± 0,49
30	(1,8 ± 0,8) 10 <sup>6</sup>	(2,2 ± 0,9) 10 <sup>5</sup>	1,21 ± 0,27
31	(8,8 ± 1,8) 10 <sup>5</sup>	(7,5 ± 1,7) 10 <sup>5</sup>	0,85 ± 0,26
33	Nh	Nh	

42	$(7,3 \pm 1,7) 10^6$	$(1,1 \pm 0,2) 10^7$	$1,52 \pm 0,45$
45	$(7,0 \pm 1,6) 10^6$	$(8,5 \pm 1,8) 10^6$	$1,21 \pm 0,39$
46	$(8,6 \pm 1,8) 10^6$	$(7,7 \pm 1,7) 10^6$	$0,89 \pm 0,28$
52	$(6,8 \pm 1,6) 10^6$	$(8,9 \pm 1,8) 10^6$	$1,30 \pm 0,42$
53	$(6,6 \pm 1,6) 10^6$	$(3,9 \pm 1,2) 10^6$	$0,59 \pm 0,23$
54	Nh	Nh	
55	$(8,8 \pm 1,8) 10^6$	$(8,7 \pm 1,8) 10^6$	$0,98 \pm 0,29$
56	Nh	Nh	
58	$(7,3 \pm 1,7) 10^6$	$(3,8 \pm 1,2) 10^6$	$0,52 \pm 0,20$
59	$(7,3 \pm 1,7) 10^6$	$(1,0 \pm 0,2) 10^7$	$1,47 \pm 0,44$
60	$(7,9 \pm 1,7) 10^6$	$(7,4 \pm 1,7) 10^6$	$0,93 \pm 0,30$
65	Nh	Nh	
66	$(1,0 \pm 0,2) 10^7$	$(7,7 \pm 1,7) 10^6$	$0,74 \pm 0,22$
67	$(9,0 \pm 1,8) 10^6$	$(3,5 \pm 1,1) 10^6$	$0,38 \pm 0,15$
68	$(1,0 \pm 0,2) 10^7$	$(8,7 \pm 1,8) 10^6$	$0,87 \pm 0,25$
69	$(5,6 \pm 1,5) 10^6$	$(7,8 \pm 1,7) 10^6$	$1,39 \pm 0,48$
71	$(6,0 \pm 1,5) 10^6$	$(6,2 \pm 1,5) 10^6$	$1,03 \pm 0,37$
73	$(4,7 \pm 1,3) 10^6$	$(4,9 \pm 1,4) 10^6$	$1,04 \pm 0,42$
78	$(8,2 \pm 1,8) 10^6$	$(1,0 \pm 2,0) 10^7$	$1,29 \pm 0,38$
79	$(5,7 \pm 1,5) 10^6$	$(4,0 \pm 1,2) 10^6$	$0,70 \pm 0,28$
80	$(5,8 \pm 1,5) 10^5$	$(7,5 \pm 1,7) 10^5$	$1,29 \pm 0,45$
81	$(6,4 \pm 1,6) 10^5$	$(9,1 \pm 1,9) 10^4$	$0,14 \pm 0,04$
83	$(7,8 \pm 1,7) 10^4$	$(3,9 \pm 1,2) 10^4$	$0,50 \pm 0,19$
85	$(4,6 \pm 1,3) 10^4$	$(5,9 \pm 1,5) 10^4$	$1,28 \pm 0,50$
86	$(4,7 \pm 1,3) 10^4$	$(2,3 \pm 0,9) 10^4$	$0,48 \pm 0,24$
87	$(4,6 \pm 1,3) 10^5$	$(5,6 \pm 1,5) 10^4$	$0,12 \pm 0,04$

Del análisis en conjunto de estos resultados se concluye que sólo dos de los clones obtenidos durante el primer (Cl20) y segundo aislamiento (Cl67) mostraron un fenotipo de termoestabilidad diferencial respecto del virus control. Asimismo, la proporción de clones con EOP superiores e inferiores respecto a la obtenida para la cepa parental (0,75) resultó similar y no difirió de acuerdo con el aislamiento considerado.

### R. II. 3. Variación antigénica de clones virales

Los clones virales caracterizados en la sección anterior en cuanto a su capacidad de multiplicación *in vitro*, citopatogenicidad y termosensibilidad fueron analizados de acuerdo a su comportamiento frente a un suero hiperinmune anti-JUNV a fin de detectar diferencias antigénicas respecto a la cepa parental.

Para ello se empleó la técnica de neutralización suero variable-virus constante, encontrándose los resultados de la Tabla R10. Como puede observarse, todos los clones, independientemente de pertenecer al primer o segundo aislamiento, fueron neutralizados, aunque con distinta eficiencia, por el suero empleado. Ninguno de los clones, excepto el clon 10 con el que se obtuvo un título significativamente menor (400) que el obtenido para el virus control (2304), mostró un comportamiento diferencial frente al antisuero empleado que lo distinguiera del virus que originó la infección. Por otro lado, se obtuvieron títulos de neutralización mayores para los clones 65 y 69 (6400), lo que indicaría una mayor afinidad del antisuero por estos clones, sin embargo, cuando se analizan los títulos máximos y mínimos estos se solapan con los valores obtenidos para el virus control indicando que las diferencias no son significativas.

Tabla R10 Neutralización de los clones virales aislados de células K3

	Título neutralización 50%	Título máx.	Título mín.
<b>Controles</b>			
XJCl <sub>3</sub>	2304	5500	965
<b>Clones virales</b>			
1	2753	5260	1441
2	1443	4061	512
3	2503	6223	1007
4	1250	2440	641
5	1455	2807	754
6	NH		
8	2687	6042	1195
9	2954	6428	1358
10	400	717	220
11	831	1666	415
12	1768	4377	714
13	2265	4003	1281
15	1282	2903	566
17	2173	4745	995
19	NH		
20	NH		
21	1153	2821	471
22	949	1852	486
23	NH		
24	1930	4410	845
25	2963	6569	1336
26	2097	4865	903

27	NH		
28	1176	2682	515
29	2950	5951	1462
30	NH		
31	NH		
33	2641	4995	1396
42	1104	3269	372
45	1702	4747	610
46	1869	6253	559
52	1926	6471	573
53	NH		
54	NH		
55	NH		
56	1152	4171	318
58	2692	7283	995
59	NH		
60	NH		
65	6400	13409	1637
66	2945	7859	1103
67	2068	7605	562
68	902	2247	362
69	6400	16275	2446
71	NH		
73	NH		
78	4778	18828	1212
79	1600	5290	474
80	NH		
81	1132	1996	642
83	800	2193	287
85	NH		
86	3589	8850	1455
87	NH		

#### R. II. 4. Caracterización genómica de los clones virales

La población de una especie viral cuyo genoma está constituido por ARN consiste en una colección de variantes virales denominadas quasiespecies (Domingo, 1998). La variación genética ha sido corroborada como un evento frecuente en las infecciones por arnavirus, particularmente asociado con la progresión a la infección persistente (Coto et al., 1993). A fin

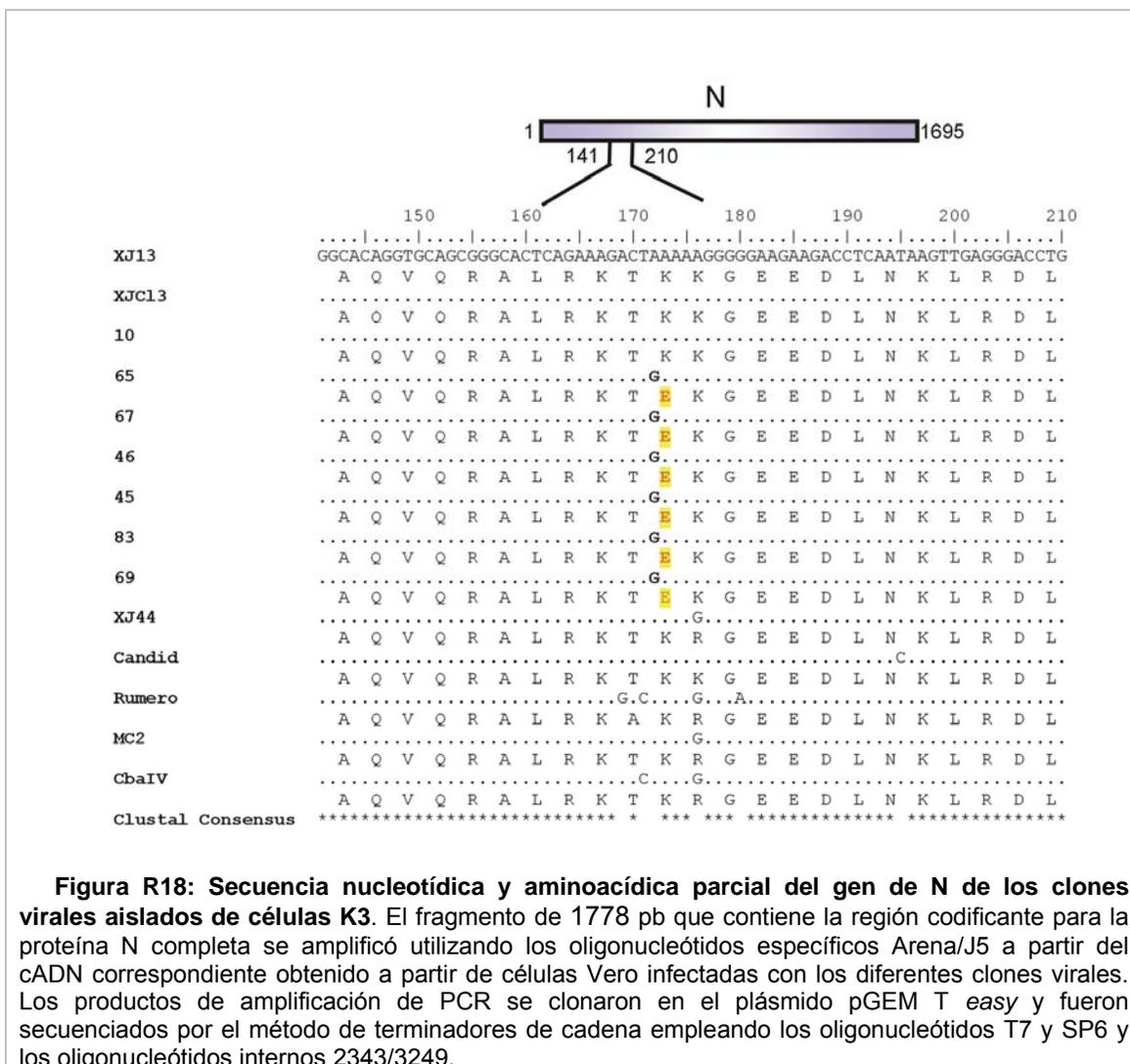
de analizar la variabilidad en las secuencias de la cepa parental y los clones virales obtenidos en los dos aislamientos, se secuenció el gen completo de N y parte del de GPC.

#### **R. II. 4. a. Nucleoproteína**

El fragmento de 1778 pb que contiene la región codificante para la nucleoproteína N completa se amplificó utilizando los oligonucleótidos específicos Arena/J5 a partir del cADN obtenido a partir de células Vero infectadas con los diferentes clones virales. Los productos de amplificación de PCR se clonaron en el plásmido pGEM T *easy* y fueron secuenciados por el método de terminadores de cadena empleando los oligonucleótidos T7 y SP6 y los oligonucleótidos internos 2343/3249.

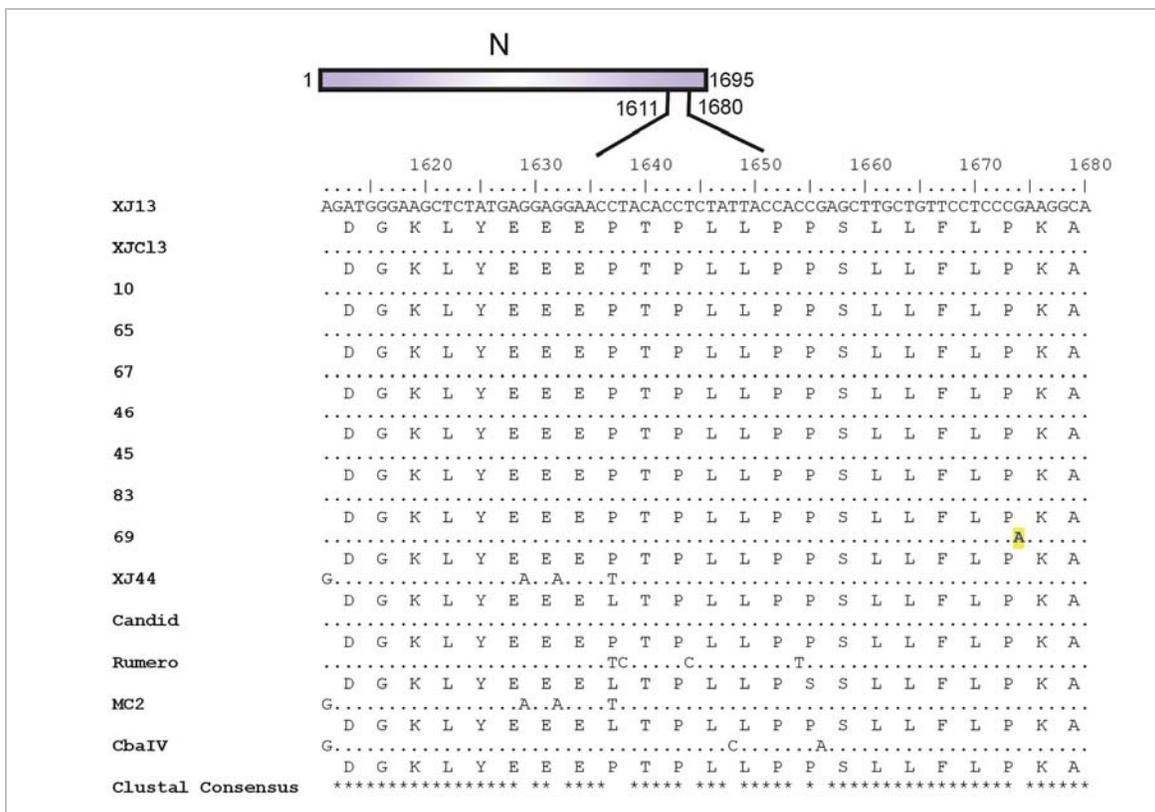
En la Figura R18 se muestra el alineamiento de la secuencia nucleotídica correspondiente a la proteína N de los clones virales 10 (primer aislamiento), 65, 67, 46, 45, 83 y 69 (segundo aislamiento) junto con la secuencia obtenida a partir de la infección aguda del virus parental XJCl<sub>3</sub>. Asimismo, se incluyeron cepas de referencias de JUNV publicadas en el GenBank, JUNV XJ13 (NC\_005081), Cba IV4454 (DQ272266), Candid-1 (AY746353), Rumero (AY619641), MC-2 (D10072) y XJ44 N (U70803).

No se encontraron diferencias aminoacídicas entre el clon 10 (primer aislamiento) respecto de la cepa parental XJCl<sub>3</sub>. Por el contrario, cuando se analizaron las secuencias de los clones provenientes del segundo aislamiento, se encontró 1 cambio nucleotídico en los clones 65, 67, 69, 46, 45 y 83, respecto de XJCl<sub>3</sub>. Como se muestra en la Figura R18, dicho cambio se produjo por una transición en la posición nucleotídica 172, dando como resultado el cambio del codón AAA por GAA, con el concomitante cambio del aminoácido lisina (K, básico) por el aminoácido ácido glutámico (E, ácido) en la posición 58 de la proteína N, el cual fue descrito para la secuencia obtenida a partir de las células persistentemente infectadas con JUNV en la sección R.I.5.a.. Dicho aminoácido básico en la posición 58 se encuentra conservado en todas las cepas de JUNV analizadas, lo cual indicaría una funcionalidad biológica en la secuencia proteica.



El clon 69 presenta, además del cambio mencionado anteriormente, una transición de C a T en la posición nucleotídica 1433, la cual da como resultado el cambio del codón ACA a ATA con el concomitante cambio aminoacídico del aa hidrofílico treonina (T) por isoleucina (I), no polar, en la posición 478 de N (Figura R19). Asimismo, este clon viral presenta otra transición de G a A en la posición nucleotídica 1674 la cual resulta en una mutación silenciosa (Figura R20). Dichos cambios en las posiciones nucleotídicas 1433 y 1674 no fueron encontrados en la secuencia obtenida a partir de células K3 (*sección R.1.6.a.*), ni en ninguna cepa de JUNV analizada.





**Figura R20: Secuencia nucleotídica y aminoacídica parcial del gen de N de los clones virales aislados de células K3.** El fragmento de 1695 pb que contiene la región codificante para la proteína N completa se amplificó utilizando los oligonucleótidos específicos Arena/J5 a partir del cADN correspondiente obtenido a partir de células Vero infectadas con los diferentes clones virales. Los productos de amplificación de PCR se clonaron en el plásmido pGEM T easy y fueron secuenciados por el método de terminadores de cadena empleando los oligonucleótidos T7 y SP6 y los oligonucleótidos internos 2343/3249.

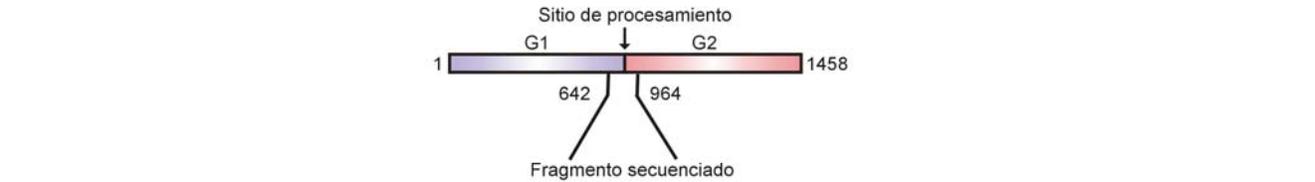
#### R. II. 4. b. Precursor glicoproteico

Dado que la secuencia obtenida a partir de las células K3 de GPC mostró un cambio nucleotídico en el sitio que contiene la señal de reconocimiento de la proteasa celular subtilasa, se analizó si la progenie viral aislada también poseía dicho cambio. El fragmento de 398 pb que contiene la región correspondiente a dicho sitio de reconocimiento, se amplificó utilizando los oligonucleótidos específicos 651F/1049R a partir del cADN obtenido a partir de células Vero infectadas con los diferentes clones virales. Los productos de amplificación de PCR fueron purificados y secuenciados por el método de terminadores de cadena. En la Figura R21 se muestra el alineamiento de secuencias nucleotídicas correspondiente a una parte de la secuencia codificante de GPC junto con las correspondientes secuencias nucleotídicas de las cepas de JUNV, XJ13 (NC\_005081), Cba IV4454 (DQ272266), Candid-1 (AY746353), Rumero (AY619641), MC-2 (D10072) y XJ44 GPC (U70800) publicadas en el GenBank.

Al analizar la secuencia nucleotídica de los clones virales 45, 65, 67, 69, 46 y 83, se encontró en los primeros 3 el cambio nucleotídico descrito para las células K3 en la sección

**R.I.6.b.**, correspondiente a una transición de A a G, la cual da origen a un cambio del codón AGG a GGG con el concomitante cambio del aminoácido arginina (R, básico) por glicina (G, neutro) en la posición 243 en la secuencia aminoacídica. Como ya se mencionó anteriormente, dicho cambio se ubicó en la región que contiene la señal de procesamiento de GPC por la proteasa, que por clivaje post-traducciona da origen a G1 y G2. Asimismo, estos clones también presentaron otra transición, en este caso, C a T en la posición nucleotídica 798, no encontrada en la secuencia obtenida a partir de las células K3, la cual resulta en una mutación silenciosa.

Por otro lado, los clones 46, 69, 83 no presentaron cambios respecto de la cepa parental en el fragmento analizado, hecho que evidencia la presencia de una población viral mixta presente en el sobrenadante de las células K3 a los 809 d.p.i. Ninguno de los cambios observados en el fragmento analizado se compartió con ninguna de las cepas de JUNV consideradas, sin embargo cabe mencionarse que TCRV tiene una glicina en la posición 243 de la secuencia aminoacídica de GPC.



	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750
XJ13	ATGAGGGCACACCTACAGTTGGCCCTCCAAATGCCACTCGACCAGTTAACACATTACAGTTCTTACAAGAGGTAAAAACATCAACTCCCAAGGAGGCTTGG														
XJ13	M K A Q P T S W P L Q C P L D H V N T L H F L T R G K N I Q L P R R S L														
45	M K A Q P T S W P L Q C P L D H V N T L H F L T R G K N I Q L P R R S L														
65	M K A Q P T S W P L Q C P L D H V N T L H F L T R G K N I Q L P R R S L														
67	M K A Q P T S W P L Q C P L D H V N T L H F L T R G K N I Q L P R R S L														
69	M K A Q P T S W P L Q C P L D H V N T L H F L T R G K N I Q L P R R S L														
46	M K A Q P T S W P L Q C P L D H V N T L H F L T R G K N I Q L P R R S L														
83	M K A Q P T S W P L Q C P L D H V N T L H F L T R G K N I Q L P R R S L														
XJ44	M K A Q P T S W P V Q C P L D H V N T L H F L T R G K N I Q L P R R S L														
Candid	M K A Q P T S W P L Q C P L D H V N T L H F L T R G K N I Q L P R R S L														
Rumero	M K A Q P T S W P L Q C P L D H V N T L H F L T R G K N I Q L P R R S L														
MC2	M K A Q P T S W P L Q C P L D H V N T L H F L T R G K N I Q L P R R S L														
ChaIV	M K A Q P T S W P L Q C P L D H V N T L H F L T R G K N I Q L P R R S L														
Clustal Consensus	M K A Q P T S W P L Q C P L D H V N T L H F L T R G K N I Q L P R R S L														
	760	770	780	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
XJ13	AAAGCATCTCTCCGGCTTTGACAGACTCATCGGCAAGGATACCCCTGGAGGCTATTGTCTAGAAGAGTGGATGCTCGTAGCAGCCAAAATGAAGTGTGGCAATCTGCTGTAGCAAAATGCAATTTGAATCATGACTCTGAA														
XJ13	K A F F S W S L T D S S G K D T P G G Y C L E E W M L V A A K M K C F G N T A V A K C N L N H D S E														
XJ13	K A F F S W S L T D S S G K D T P G G Y C L E E W M L V A A K M K C F G N T A V A K C N L N H D S E														
45	K A F F S W S L T D S S G K D T P G G Y C L E E W M L V A A K M K C F G N T A V A K C N L N H D S E														
65	K A F F S W S L T D S S G K D T P G G Y C L E E W M L V A A K M K C F G N T A V A K C N L N H D S E														
67	K A F F S W S L T D S S G K D T P G G Y C L E E W M L V A A K M K C F G N T A V A K C N L N H D S E														
69	K A F F S W S L T D S S G K D T P G G Y C L E E W M L V A A K M K C F G N T A V A K C N L N H D S E														
46	K A F F S W S L T D S S G K D T P G G Y C L E E W M L V A A K M K C F G N T A V A K C N L N H D S E														
83	K A F F S W S L T D S S G K D T P G G Y C L E E W M L V A A K M K C F G N T A V A K C N L N H D S E														
XJ44	K A F F S W S L T D S S G K D T P G G Y C L E E W M L V A A K M K C F G N T A V A K C N L N H D S E														
Candid	K A F F S W S L T D S S G K D T P G G Y C L E E W M L V A A K M K C F G N T A V A K C N L N H D S E														
Rumero	K A F F S W S L T D S S G K D T P G G Y C L E E W M L V A A K M K C F G N T A V A K C N L N H D S E														
MC2	K A F F S W S L T D S S G K D T P G G Y C L E E W M L V A A K M K C F G N T A V A K C N L N H D S E														
ChaIV	K A F F S W S L T D S S G K D T P G G Y C L E E W M L V A A K M K C F G N T A V A K C N L N H D S E														
Clustal Consensus	K A F F S W S L T D S S G K D T P G G Y C L E E W M L V A A K M K C F G N T A V A K C N L N H D S E														
	910	920	930	940	950	960									
XJ13	TTCTGTGACATGTTGAGGCTTTTGGATTACACAAAATGCTATCAAAACCCCTAAATGATGAAA														
XJ13	F C D M L R L F D Y N K N A I K T L N D E														
XJ13	F C D M L R L F D Y N K N A I K T L N D E														
45	F C D M L R L F D Y N K N A I K T L N D E														
65	F C D M L R L F D Y N K N A I K T L N D E														
67	F C D M L R L F D Y N K N A I K T L N D E														
69	F C D M L R L F D Y N K N A I K T L N D E														
46	F C D M L R L F D Y N K N A I K T L N D E														
83	F C D M L R L F D Y N K N A I K T L N D E														
XJ44	F C D M L R L F D Y N K N A I K T L N D E														
Candid	F C D M L R L F D Y N K N A I K T L N D E														
Rumero	F C D M L R L F D Y N K N A I K T L N D E														
MC2	F C D M L R L F D Y N K N A I K T L N D E														
ChaIV	F C D M L R L F D Y N K N A I K T L N D E														
Clustal Consensus	F C D M L R L F D Y N K N A I K T L N D E														

Figura R21: Secuencia nucleotídica y aminoacídica parcial del gen de GPC de los clones virales aislados de células K3. El fragmento de 398 pb que contiene la región codificante para el sitio de procesamiento del precursor GPC, se amplificó utilizando los oligonucleótidos específicos 651F/1049R a partir del cADN obtenido a partir de células Vero infectadas con los diferentes clones virales. Los productos de amplificación de PCR fueron purificados y secuenciados por el método de terminadores de cadena.

### **R. II. 5. Expresión de antígenos virales de los clones virales**

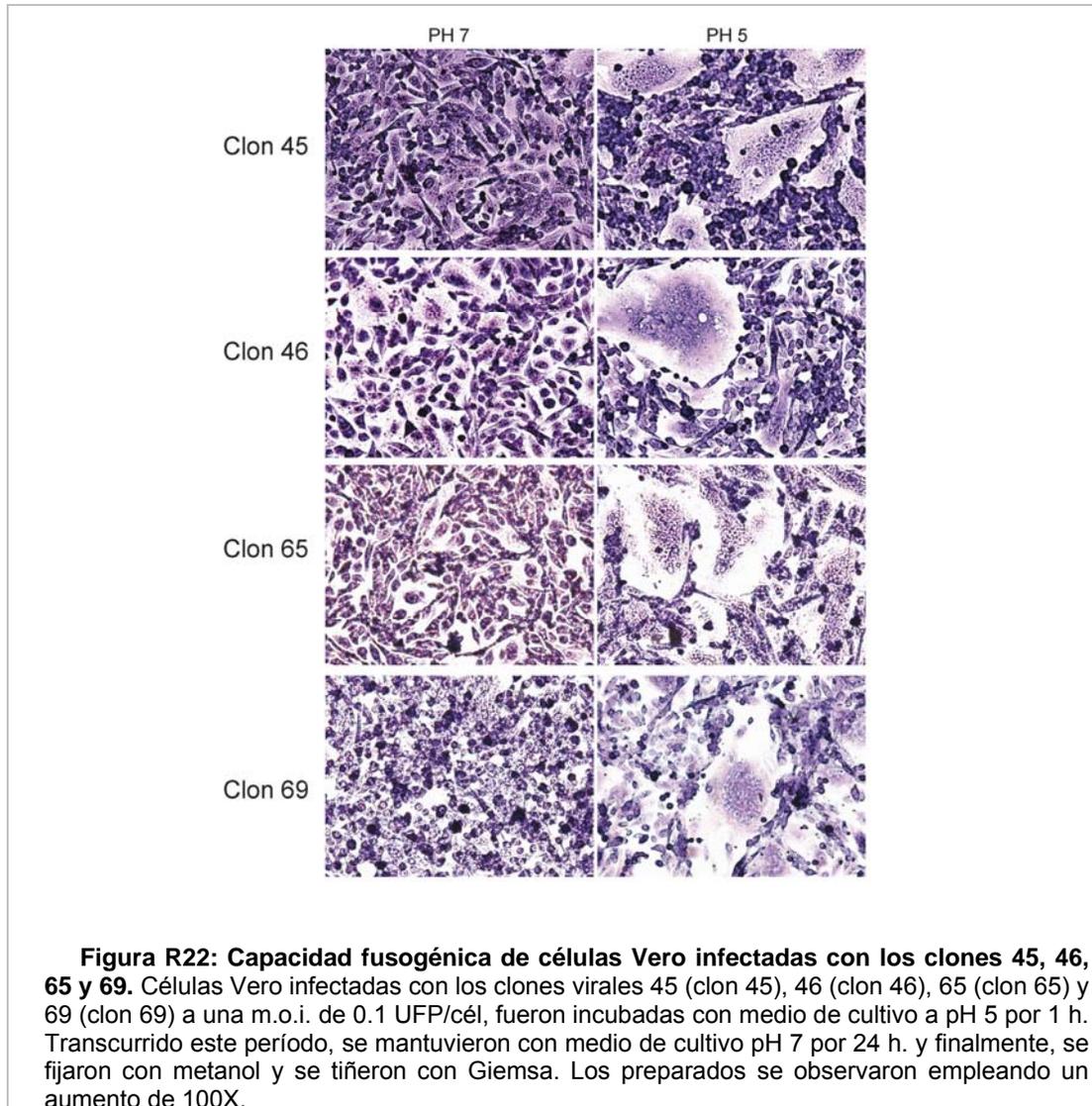
A fin de analizar los posibles efectos biológicos de los cambios aminoacídicos encontrados en las secuencias de las proteínas N, G1 y G2 de los clones virales, se analizó la expresión de dichos antígenos mediante las técnicas de IFI, WB y ensayos de actividad fusogénica. Asimismo, se analizó el procesamiento de GPC mediante la técnica de RIPA.

#### **R. II. 5. a. Glicoproteínas virales**

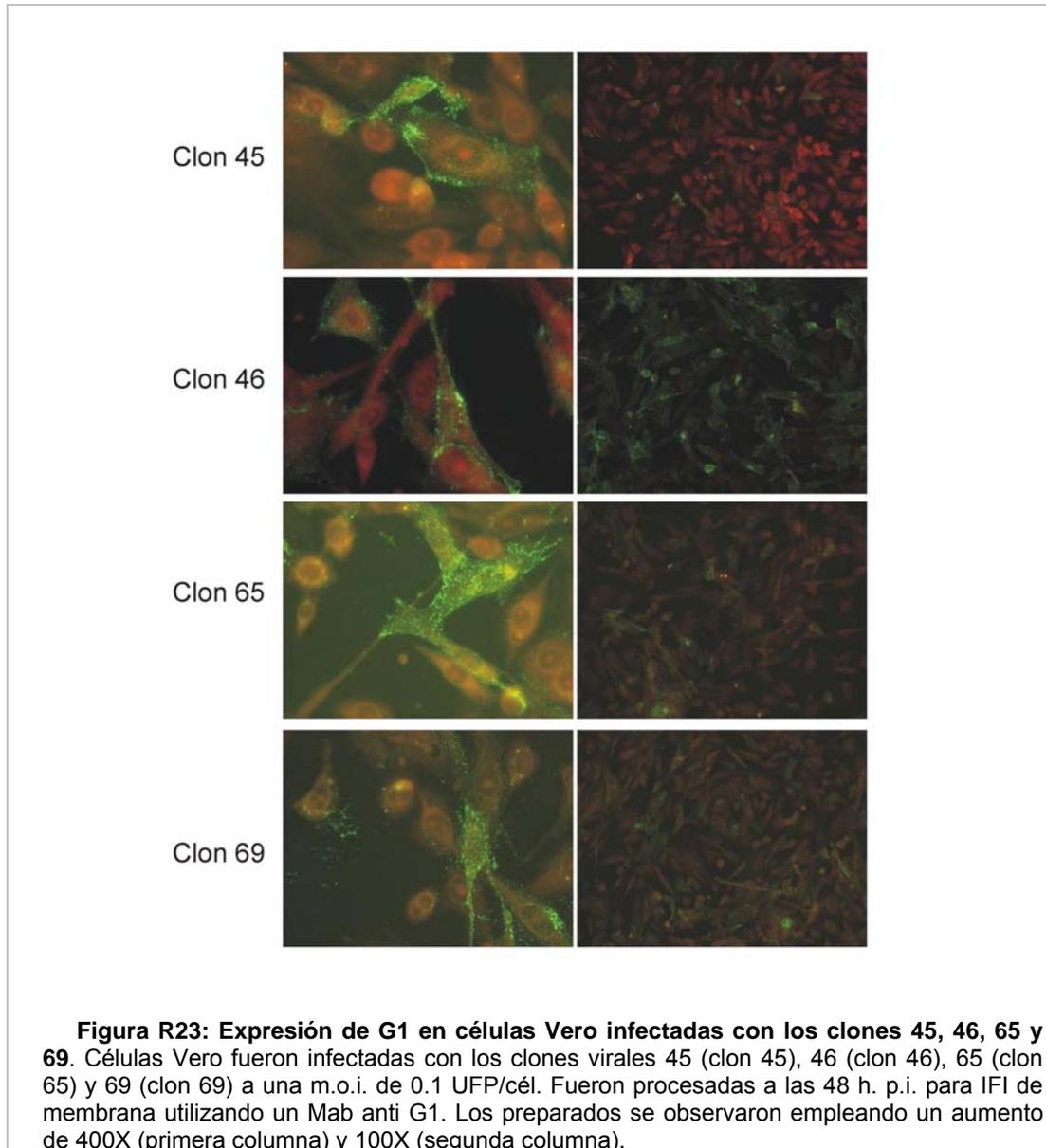
Dados los cambios encontrados en la secuencia del precursor glicoproteico en los clones virales 45 y 65 (conteniendo los aminoácidos GRLS en el sitio de reconocimiento de la proteasa celular), se analizó el transporte y expresión de dicha proteína en la membrana de células infectadas. Para ello, células Vero fueron infectadas con los clones 45 y 65 (secuencia: GRLS) y con los clones virales controles 46 y 69 (secuencia: RRLS), ya que los mismos no presentaron la mutación en el sitio de procesamiento de GPC. Asimismo, se analizó la capacidad de las células infectadas de fusionarse a bajo pH, actividad atribuible a la presencia y funcionalidad de G2 en la membrana de las mismas.

Las células infectadas con los clones virales 45 y 65 fueron capaces de fusionarse cuando fueron sometidas a pH 5, de igual manera a lo observado para las células infectadas con los clones 46 y 69 (Figura R22). Este resultado sugiere que el cambio de G por R en el sitio de reconocimiento no alteró el transporte de G2 a la membrana ni su capacidad fusogénica.

Asimismo, se analizó la presencia de la glicoproteína G1 en la membrana de células infectadas mediante una IFI de membrana, no encontrándose diferencias entre los clones virales 45 y 65 con la mutación GRLS respecto de los clones 46 y 69, con el sitio de reconocimiento salvaje (Figura R23).

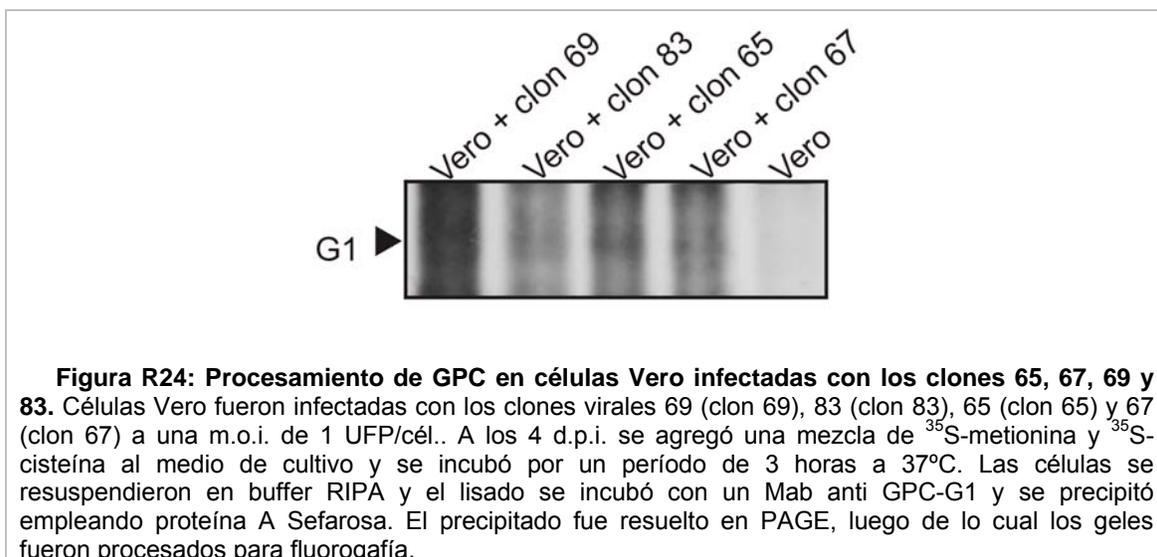


De esta manera, se puede concluir que el cambio en el sitio de reconocimiento (RRLS a GRLS) de la proteasa celular SKI-1/S1P en GPC no afectaría la expresión, localización en membrana ni la actividad fusogénica de las glicoproteínas virales en las células infectadas con los clones virales que poseen dicha mutación.



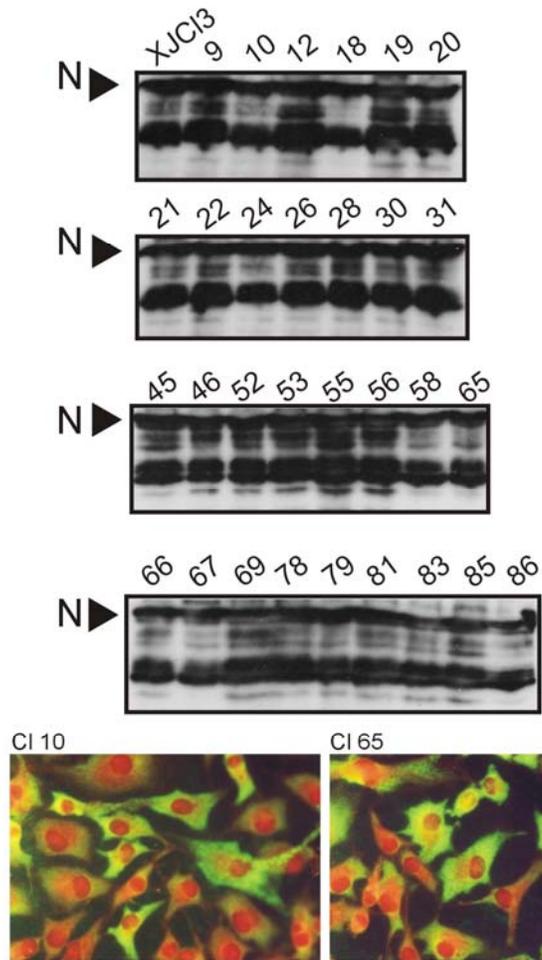
Dado el cambio en la secuencia nucleotídica de GPC en los clones virales 45, 65 y 67, resultando en un cambio aminoacídico en el sitio de reconocimiento (RRLS a GRLS) de la proteasa celular SKI-1/S1P, se decidió investigar su procesamiento para producir G1 y G2. A tal fin, células Vero se infectaron a una m.o.i. de 1 UFP/cél. con los clones 65 y 67, conteniendo la secuencia GRLS o con los clones 69 y 83, conteniendo el sitio de reconocimiento salvaje. Luego de 4 días p.i. las células fueron procesadas para RIPA, empleando un Mab capaz de reconocer tanto a GPC como a G1. En la Figura R24, se muestran los resultados de la RIPA, observándose la presencia de G1 en células Vero infectadas con todos los clones estudiados. Estos resultados, estarían indicando que, aunque los clones 65 y 67 poseen un sitio de reconocimiento diferente para la proteasa celular SKI-

1/S1P, el GPC de dichos clones puede ser procesado durante la infección para dar origen a G1 y G2.



#### R. II. 5. b. Nucleoproteína viral

La secuencia del gen de N obtenida a partir de células Vero infectadas con los clones virales del segundo aislamiento (45, 46, 65, 67, 69 y 83), reveló la presencia de una sustitución nucleotídica la cual resultó en un cambio del aminoácido lisina (K, básico) por el aminoácido ácido glutámico (E, ácido), en la posición 58 de dicha proteína. A fin de evidenciar si este cambio aminoacídico afectaba la síntesis y expresión de N, se realizó un ensayo de WB empleando un Mab dirigido hacia dicha proteína. Para ello, células Vero fueron infectadas con JUNV XJCl<sub>3</sub> o con los clones virales obtenidos del primer (9, 10, 12, 19, 20, 21, 22, 24, 26, 28, 30 y 31) o del segundo aislamiento (45, 46, 52, 53, 55, 56, 58, 60, 65, 66, 67, 69, 78, 79, 81, 83, 85 y 86), a una m.o.i. de 0,1 UFP/cél.. A las 48 h.p.i. las células fueron procesadas para WB e IFI. Como se observa en la Figura R25, no se detectaron diferencias en la síntesis de N, en células infectadas con clones obtenidos a partir del primer o segundo aislamiento (incluyendo los clones cuyas secuencias revelaron la presencia de la mutación en la posición 58 de la proteína), respecto del control de células Vero infectadas con la cepa parental.



**Figura R25: Síntesis de N en células Vero infectadas con clones aislados de células K3.** Células Vero fueron infectadas con los diferentes clones virales (según se indica) a una m.o.i. de 0,1 UFP/cél.. A las 48 h.p.i. las células fueron procesadas para WB o IFI total. Los preparados se observaron empleando un aumento de 400X.

### **R. III Sobreinfección de células K3 con JUNV**

Una de las propiedades biológicas distintiva de las células persistentemente infectadas con JUNV es la resistencia que las mismas presentan a la sobreinfección con virus antigénicamente relacionados. Esta propiedad se analizó en células K3 sobreinfectadas con distintos virus con el objeto de definir los factores involucrados en dicho fenómeno.

#### **R. III.1 Multiplicación de virus homólogo y heterólogo en células K3**

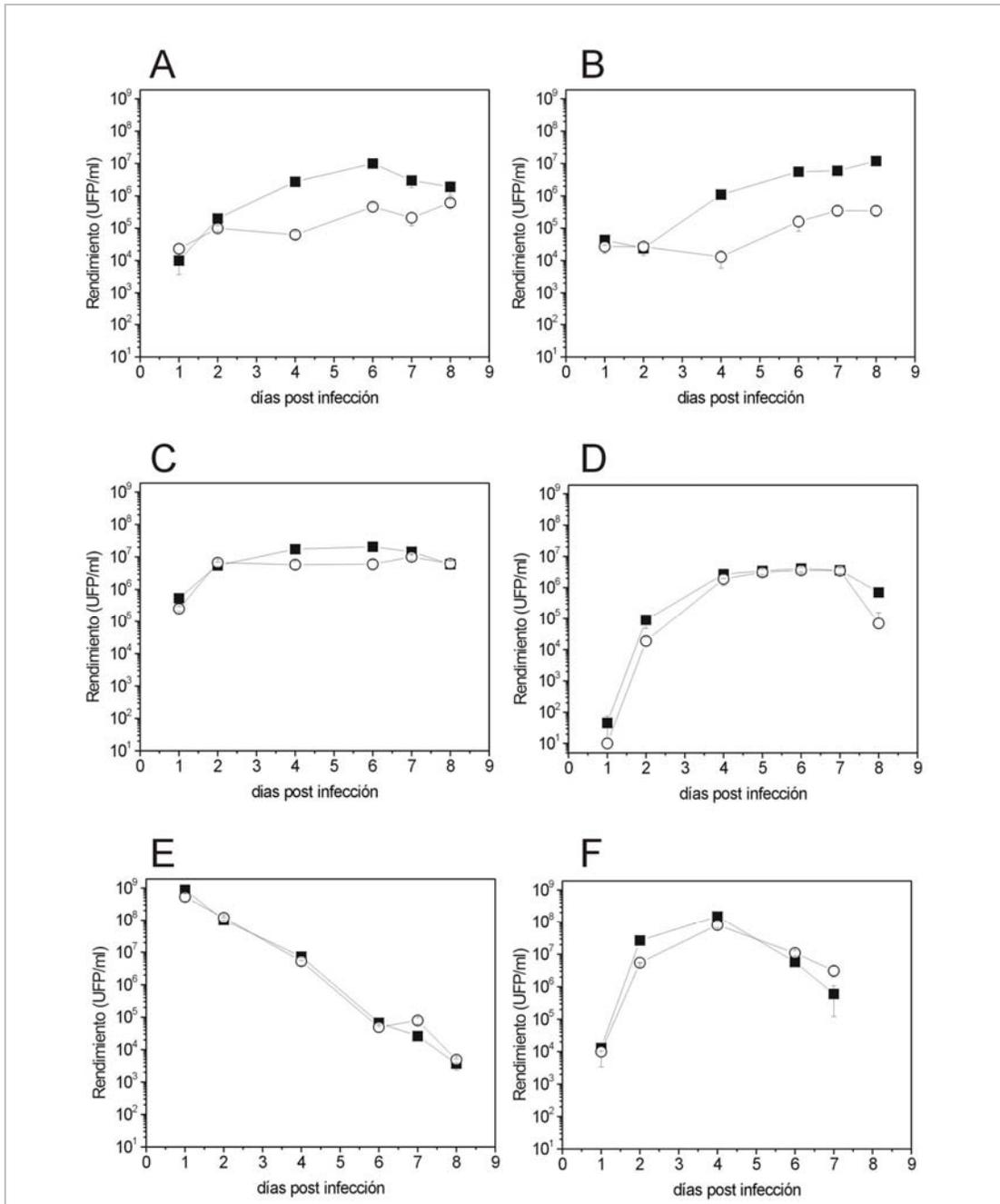
En primer lugar se evaluó la susceptibilidad de las células K3 a la multiplicación de JUNV y de distintos virus relacionados o no con dicho agente. Esta propiedad se estudió a través de ensayos de rendimiento a partir de la sobreinfección de células K3 con virus homólogo (JUNV), heterólogos (VSV y HSV1) y heterólogos antigénicamente relacionados (TCRV, PICV y LCMV). Células BHK-21, empleadas como control y K3 fueron infectadas a una m.o.i. de 0,1 UFP/cél., cuantificándose la infectividad en el sobrenadante de dichos cultivos a distintos d.p.i.. Como puede observarse en la Figura R26, los virus heterólogos VSV y HSV1 se comportaron de manera similar. En el caso de VSV, tanto las células BHK-21 como las células K3 presentaron el mayor título de infectividad a las 24 h.p.i., siendo los mismos de  $8,8 \cdot 10^8$  y  $5,3 \cdot 10^8$  UFP/ml, respectivamente. A partir de ese momento, la infectividad fue disminuyendo siguiendo una cinética similar para ambos tipos celulares. En el caso de HSV1, se observó un incremento de infectividad en el sobrenadante del cultivo a partir del día 2 p.i., obteniéndose un título máximo al día 4 p.i. tanto para las células BHK-21 como para las K3 de  $1,5 \cdot 10^8$  y  $8,1 \cdot 10^7$ , UFP/ml, respectivamente.

En el caso de PICV, virus heterólogo antigénicamente relacionado, se observó un incremento en la infectividad detectada en los sobrenadantes tanto de las células BHK-21 como de las células K3 a partir del 2<sup>do</sup> día p.i., momento a partir del cual la cantidad de infectividad detectada presentó niveles similares, llegando al título máximo de infectividad al día 6 p.i. para las células BHK-21 ( $2 \cdot 10^7$  UFP/ml) y 7 p.i. para las células K3 ( $1 \cdot 10^7$  UFP/ml). Asimismo, cuando se analizó la multiplicación de LCMV en las células BHK-21 y K3 se observó que la infectividad en el sobrenadante de cultivo aumentó a partir del día 2 p.i., con títulos máximos al día 6 p.i., siendo los mismos de  $4,1 \cdot 10^6$  y  $3,6 \cdot 10^6$  UFP/ml para BHK-21 y K3, respectivamente, observándose una cinética de multiplicación del virus similar para ambos tipos celulares (Figura R26).

Por otro lado, cuando se evaluó la multiplicación JUNV en las células BHK-21 y K3, aunque se observaron niveles de infectividad similares durante los dos primeros d.p.i., al 4<sup>to</sup> d.p.i. la infectividad en las células BHK-21 alcanzó  $2,7 \cdot 10^6$  UFP/ml, mientras que el título en las células persistentemente infectadas y sobreinfectadas fue de  $6,3 \cdot 10^4$  UFP/ml. Los máximos títulos de infectividad en el sobrenadante se detectaron al 6<sup>to</sup> día p.i. para ambos cultivos, siendo de

$1.10^7$  y  $4,6.10^5$  UFP/ml para BHK-21 y K3, respectivamente. Asimismo, cuando se analizó la multiplicación de TCRV, virus heterólogo, antigénicamente relacionado con JUNV, se observaron resultados similares a los descriptos para JUNV. Aunque no se observaron diferencias significativas en los niveles de infectividad en los dos primeros d.p.i., al 4<sup>to</sup> d.p.i. se detectaron diferencias en la infectividad, obteniéndose títulos de  $1,1.10^6$  y  $1,3.10^4$  UFP/ml, para BHK-21 y K3, respectivamente. Durante los días posteriores, en el caso de las células BHK-21, se observaron niveles elevados de infectividad, alcanzando un título máximo de  $1.10^7$  UFP/ml al día 8 p.i., mientras que en el sobrenadante de cultivo de las células K3 se obtuvo un título máximo de  $1,1.10^5$  UFP/ml, al mismo día p.i. (Figura R26).

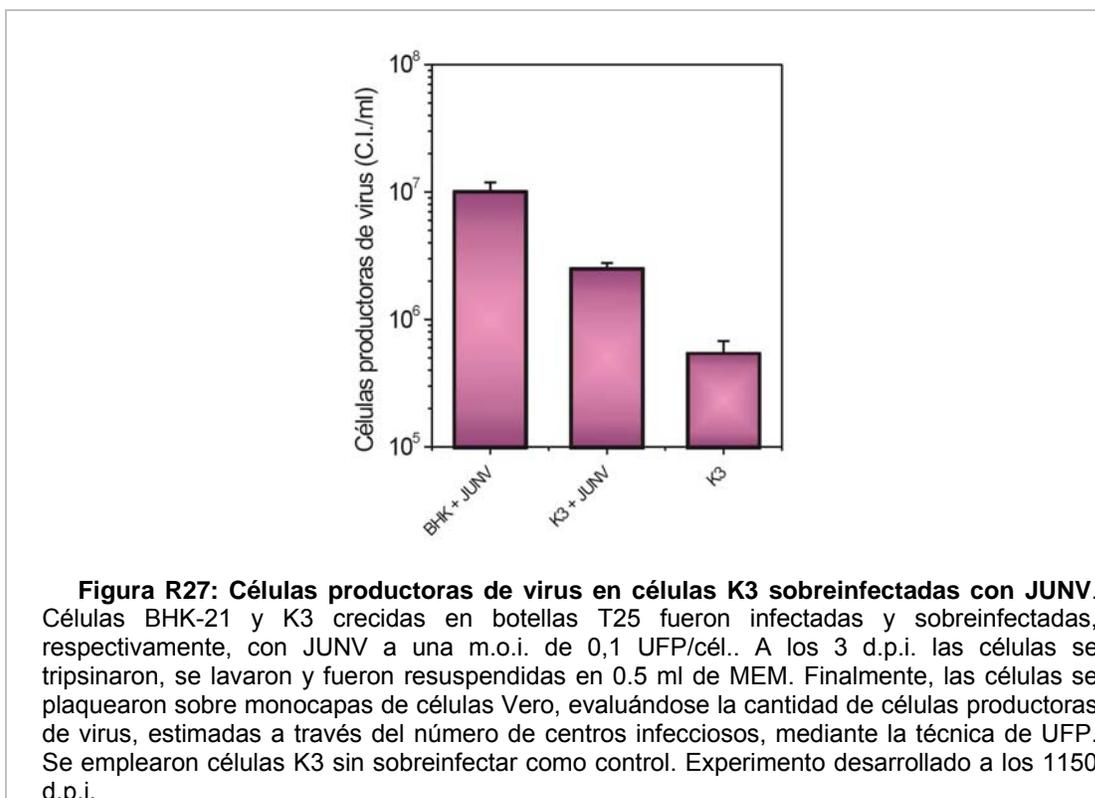
Los títulos obtenidos a partir de células K3 sobreinfectadas con los virus JUNV y TCRV fueron 2 log. menores respecto a los que se obtuvieron a partir de células BHK-21. Por el contrario, no se observaron diferencias en los títulos obtenidos a partir de células K3 respecto de los obtenidos a partir de las células BHK-21 para los virus PICV, LCMV y los heterólogos no relacionados VSV y HSV1. Este hecho estaría indicando que la resistencia a la sobreinfección observada en las células K3 se restringe al caso de utilizar virus homólogo (JUNV) y virus antigénicamente relacionados al mismo.



**Figura R26: Multiplicación de distintos virus en células K3.** Células BHK-21 (■) y K3 (○) fueron infectadas con JUNV (A), TCRV (B), PICV (C), LCMV (D), VSV (E) Y HSV1 (F) a una m.o.i. de 0,1 UFP/cél.. Los sobrenadantes de los cultivos fueron cosechados a diferentes días p.i. y fueron titulados mediante la técnica de UFP. Los cultivos de K3 sin sobreinfectar produjeron  $1,1 \cdot 10^3$  UFP/ml. Experimento desarrollado a los 737 d.p.i..

Una causa probable que daría cuenta de los niveles reducidos de infectividad recuperada en los sobrenadantes de los cultivos de células K3 sobreinfectadas con JUNV, sería un número reducido de células productoras de virus en dichos cultivos. A fin de analizar esta especulación, se realizó un ensayo de C.I. a partir de cultivos de células K3 sobreinfectados

con JUNV. La proporción de células productoras de virus en los cultivos de células K3 y K3 sobreinfectadas con JUNV, se determinó por plaqueo de suspensiones de las mismas sobre monocapas de células Vero.



En la Figura R27, se muestra el número de centros infecciosos (C.I) para las células BHK-21 y K3, infectadas y sobreinfectadas, respectivamente, con JUNV. El número de centros infecciosos detectados en las células K3 y K3 sobreinfectadas resultó entre 1 y 0.5 logaritmos menor que el correspondiente a células BHK-21 infectadas con JUNV, respectivamente. Este resultado indica que en las células K3 sin sobreinfectar el número de células productoras es 10 veces menor al hallado en la infección aguda. Luego de la sobreinfección de estas células, se observó un aumento en el número de C.I., indicativo de la presencia de células susceptibles a la infección con el virus parental. Esto sugiere que la resistencia homóloga no es debida a factores solubles que interferirían con la infección del virus sobreinfectante sino más bien denotaría una contribución intracelular al bloqueo de la multiplicación del virus.

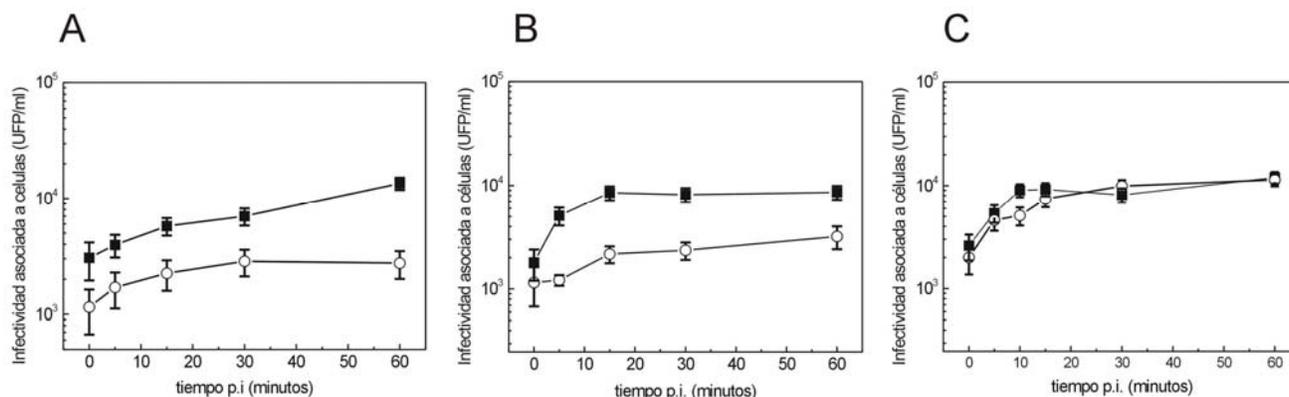
### R. III. 2. Estudio del ciclo de multiplicación del virus sobreinfectante

Habiendo comprobado la restricción en la multiplicación de JUNV y TCRV en células K3 se procedió a analizar las distintas etapas del ciclo de multiplicación del virus sobreinfectante a fin de identificar el paso bloqueado.

### R. III. 2. a. Adsorción del virus sobreinfectante a las células K3

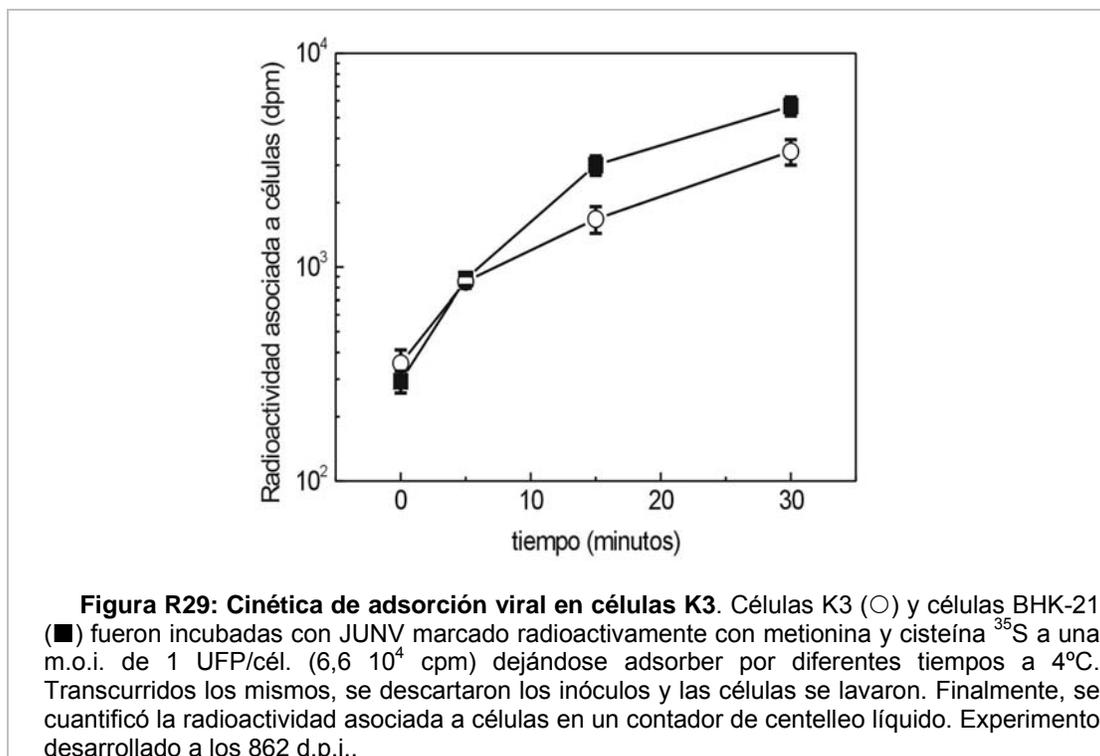
El proceso de adsorción viral se investigó infectando células a una alta m.o.i. (m.o.i. = 5 UFP/cél), y manteniendo el cultivo a 4°C de modo de impedir el proceso de internalización, determinándose a distintos tiempos p.i. la infectividad asociada a células.

Como puede observarse en la Figura R28, los niveles de infectividad asociada a células siguieron una cinética similar en el caso de las células BHK-21 y K3 para los tres virus utilizados: JUNV, TCRV y LCMV. Sin embargo, los niveles de infectividad adsorbida en el caso de JUNV y TCRV (multiplicación restringida, Figura R26) resultaron inferiores en las células K3, respecto a los observados para las células BHK-21. Por el contrario, no se observaron diferencias en cuanto a la infectividad asociada a ambos tipos celulares luego de la incubación con LCMV (multiplicación normal, Figura 26). Este hecho indicaría que el proceso de adsorción de LCMV a las células K3 ocurre con igual eficiencia respecto a lo que se observó para las células control BHK-21, mientras que JUNV y TCRV se adsorberían menos eficientemente a las células persistentemente infectadas.

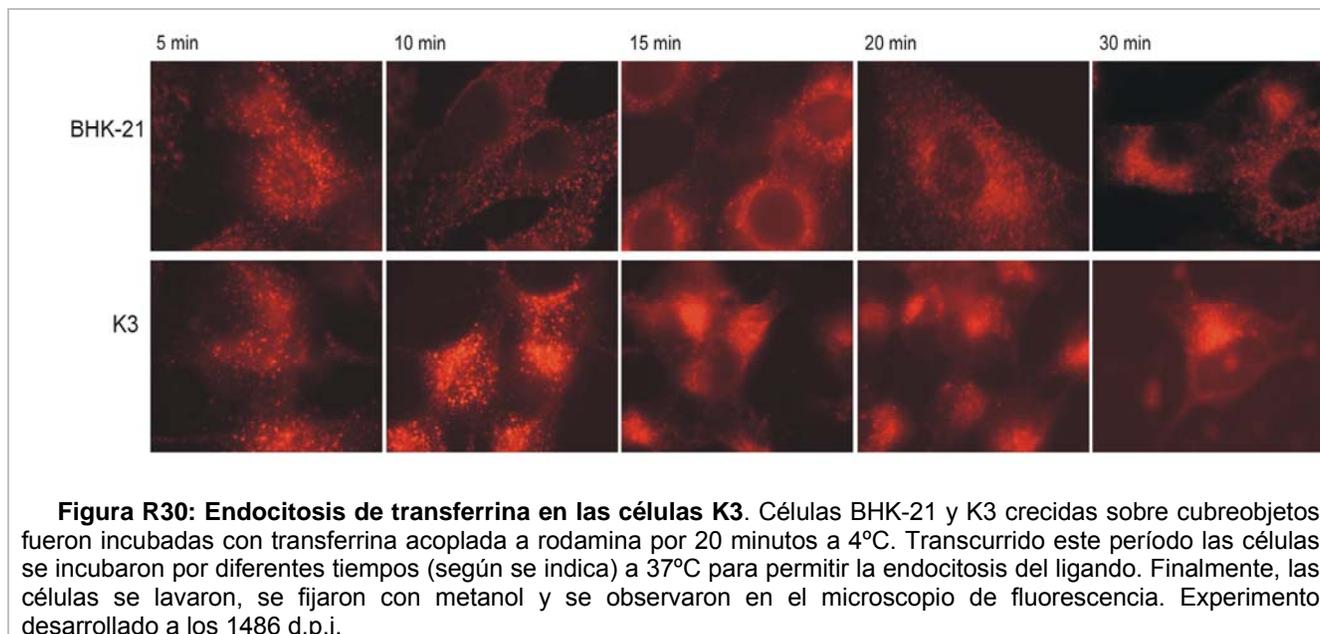


**Figura R28: Cinética de adsorción viral en células K3.** Células K3 (K3 ○) y células BHK-21 (BHK-21 ■) fueron infectadas con JUNV (A), TCRV (B) y LCMV (C) a una m.o.i. de 5 UFP/cél.. Luego de diferentes tiempos de adsorción a 4°C, se descartaron los inóculos y las células se lavaron con PBS frío. Finalmente, se evaluó la infectividad asociada a células mediante la técnica de UFP. Experimento desarrollado a los 905 d.p.i.

Las diferencias en la adsorción de JUNV a células K3 y BHK-21 fueron confirmadas cuando se realizó este ensayo empleando JUNV marcado radioactivamente. A tal fin, se incubaron células BHK-21 y K3 con JUNV marcado metabólicamente con metionina y cisteína S<sup>35</sup> (m.o.i. = 1 UFP/cél, 6,6 × 10<sup>4</sup> cpm) durante distintos tiempos a 4°C, midiéndose la radioactividad asociada a células. Como se observa en la Figura R29, la adsorción de JUNV marcado muestra una cinética similar en ambos cultivos celulares. Asimismo se observa que los niveles de radioactividad asociada a células son ligeramente menores para las células K3 respecto de las BHK-21, confirmando los resultados mencionados anteriormente, obtenidos al cuantificar infectividad asociada a dichos cultivos (Figura R28).



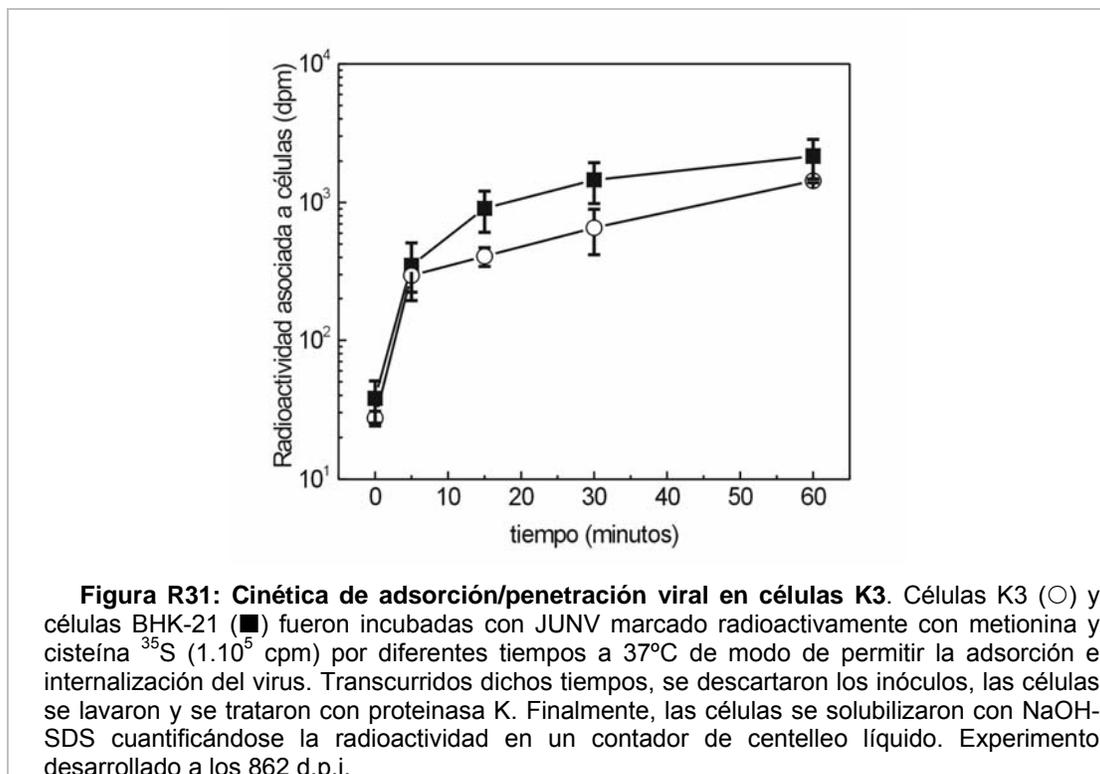
Las diferencia a nivel de la adsorción de JUNV a los dos tipos celulares podría deberse a una expresión diferencial del receptor utilizado por el virus en el proceso de adsorción. Recientemente, se ha descrito al receptor de transferrina como el responsable de la entrada de JUNV a las células blanco (Radoshitzky et al., 2007). A fin de estudiar la presencia y endocitosis del receptor de JUNV, células BHK-21 sin infectar y células K3 se incubaron con transferrina acoplada a rodamina por diferentes tiempos, al cabo de los cuales las células se procesaron para su observación al microscopio. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura R30. A tiempos cortos (5 y 10 min.) puede observarse que la endocitosis de la transferrina en las células K3 no fue significativamente diferente respecto de las células control. Sin embargo, a tiempos mas largos (15-30 min.) se observó una acumulación del ligando en un compartimiento citoplasmático de las células K3, lo que indicaría un reciclado defectivo del receptor de transferrina respecto a lo observado para las células BHK-21, hecho que justificaría la adsorción diferencial de JUNV en ambos tipos de cultivos.



**Figura R30: Endocitosis de transferrina en las células K3.** Células BHK-21 y K3 crecidas sobre cubreobjetos fueron incubadas con transferrina acoplada a rodamina por 20 minutos a 4°C. Transcurrido este período las células se incubaron por diferentes tiempos (según se indica) a 37°C para permitir la endocitosis del ligando. Finalmente, las células se lavaron, se fijaron con metanol y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Experimento desarrollado a los 1486 d.p.i.

### R. III. 2. b. Adsorción y penetración del virus sobreinfectante a las células K3

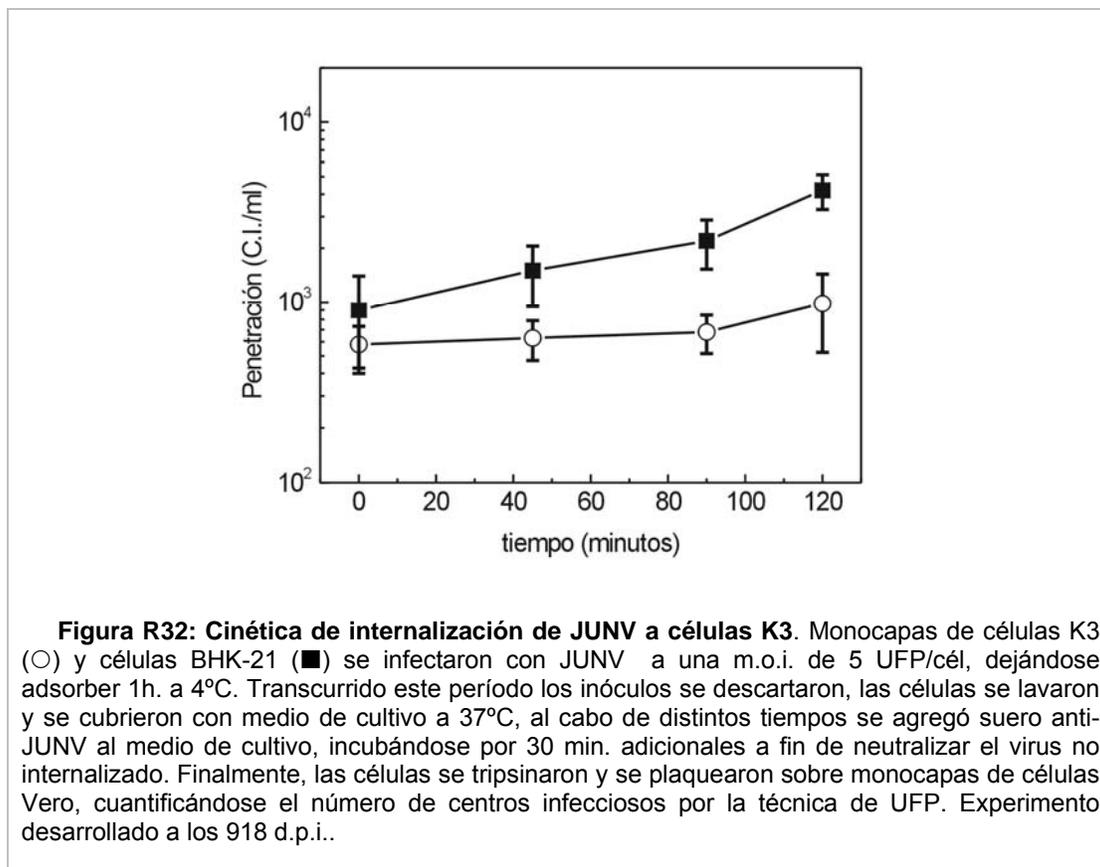
A fin de estudiar las etapas de adsorción y penetración combinadas, células BHK-21 y K3 se infectaron con JUNV marcado ( $1 \cdot 10^7$  UFP/ml,  $10^5$  cpm), se incubaron a 37°C por diferentes tiempos y se midió la radioactividad asociada a células para cada tiempo. En la Figura 31 se puede observar que los valores de radioactividad asociada a células, a partir de los 15 min. de contacto virus-célula, son, en promedio, 1.5 veces mayores en las células BHK-21 que en las células K3. Este resultado indicaría que una proporción menor de virus es capaz de adsorberse y penetrar a las células K3 respecto de lo que ocurre en la infección aguda.



Las diferencias menores obtenidas mediante esta técnica, en cuanto a la cantidad de JUNV adsorbido y penetrado a cada tipo celular, respecto de la empleada en la Figura R29, podrían deberse a que a  $37^\circ\text{C}$  el virus que se adsorbe es endocitado (Figura R31) superándose así la reversibilidad de la adsorción que se verifica a  $4^\circ\text{C}$  (Figura R 29).

### R. III. 2. c. Internalización del virus sobreinfectante a las células K3

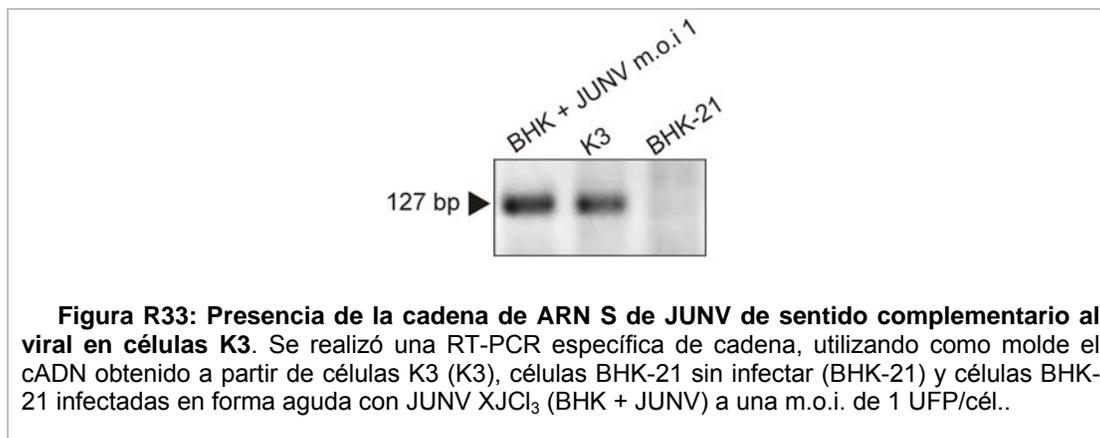
Con el objeto de analizar la internalización del virus sobreinfectante en células K3, se realizó un ensayo de cinética de formación de centros infecciosos. A tal fin, células BHK-21 y K3 fueron infectadas a alta m.o.i. (m.o.i. = 5 UFP/cél.). Transcurrida la adsorción a  $4^\circ\text{C}$  y luego de diferentes tiempos de internalización a  $37^\circ\text{C}$ , las células se tripsinaron y se sembraron sobre células Vero. Como se puede observar en la Figura R32 los valores de células productoras de virus fueron menores para las células K3 respecto de las células BHK-21 en todos los tiempos analizados, indicando que una menor cantidad de virus sobreinfectante fue capaz de penetrar en las células K3 respecto de la cantidad de virus internalizado en las células BHK-21.



### R. III. 2. d. Síntesis de la cadena viral complementaria

A fin de estudiar la síntesis de la cadena viral complementaria del virus sobreinfectante se diseñó una estrategia que permitiera diferenciar la cadena complementaria del virus sobreinfectante respecto de la cadena complementaria del virus endógeno. En primer lugar se comprobó la presencia de la cadena complementaria de JUNV en las células mediante una RT-PCR específica de cadena, para lo cual, se sintetizó cADN utilizando un cebador específico (GPC F) de la cadena viral complementaria correspondiente a secuencias del gen de GPC de JUNV. Posteriormente, se realizó una reacción de PCR utilizando cebadores específicos (GPCF/ JDG2SQ).

En la Figura R33 se observa la presencia del producto de amplificación en las calles correspondientes a las células BHK-21 infectadas de forma aguda con JUNV y las células K3, indicando la existencia de secuencias del segmento S de sentido antígenómico del virus endógeno y demostrando la presencia de una polimerasa viral funcional para JUNV en las células K3.



Se analizó entonces la síntesis de la cadena viral complementaria en las células K3 como siguiente etapa del ciclo de multiplicación luego del estudio de la adsorción y de la penetración viral. A fin de discriminar entre el ARN endógeno de JUNV y el ARN del virus sobreinfectante, las células K3 se sobreinfectaron con TCRV (m.o.i. =1 UFP/cél.). Esto resulta posible ya que, como se mostró en la Figura R28, ambos virus se adsorben de igual manera a las células K3.

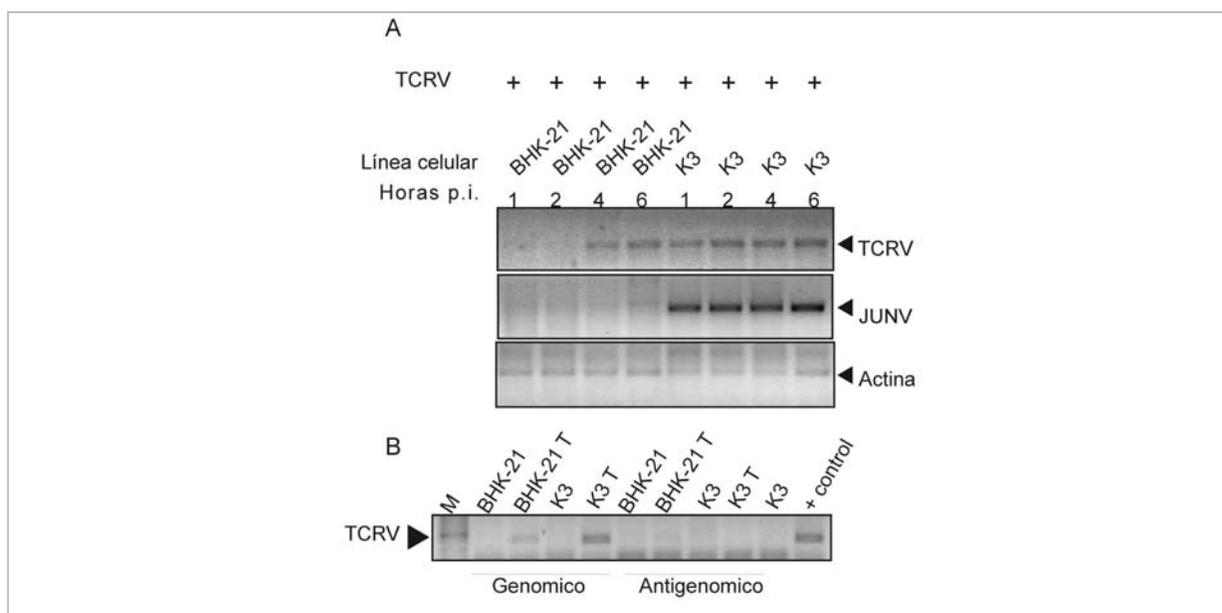
Se realizó la extracción de ARN a partir de células K3 y BHK-21 luego de diferentes tiempos p.i. con el objetivo de determinar la cinética de síntesis de la cadena viral complementaria del virus sobreinfectante. Posteriormente, se sintetizó cADN empleando el cebador TCRV7F que es específico de la cadena viral complementaria de TCRV y finalmente se realizó una reacción de PCR empleando los cebadores TCRV7F/ TCRV476R específicos del virus sobreinfectante.

En la Figura R34 A se observa que el ARN viral complementario de TCRV fue detectado a las 4 y 6 h.p.i. en las células BHK 21. Como era de esperarse, las células BHK-21, al ser células no infectadas con JUNV, no presentaron el fragmento de 186 pb correspondiente a secuencias específicas de dicho virus. Asimismo, en el cultivo de células BHK-21 se determinó la presencia del fragmento de amplificación de ARNm de actina, el cual se utilizó como control del experimento. Por otro lado, las secuencias correspondientes al ARN viral complementario fueron detectadas en las células K3 a partir de la primera hora p.i., detectándose también luego de 2, 4 y 6 h.p.i.. Estas células presentaron el fragmento de amplificación de 186 pb correspondiente a secuencias de JUNV, ya que se trataba de células persistentemente infectadas con dicho virus. Asimismo, en el cultivo de células K3 se determinó la presencia del fragmento de amplificación de ARNm de actina, el cual se utilizó como control del experimento (Figura R34 A).

Como se puede observar en la Figura R34 A, la cadena viral complementaria de TCRV fue detectado de manera temprana en las células K3 (1 h.p.i.), respecto de las células control BHK-21 (4 h.p.i.). Este resultado sugiere una ventaja inicial para la biosíntesis de la cadena

viral complementaria del virus sobreinfectante en las células persistentemente infectadas con JUNV.

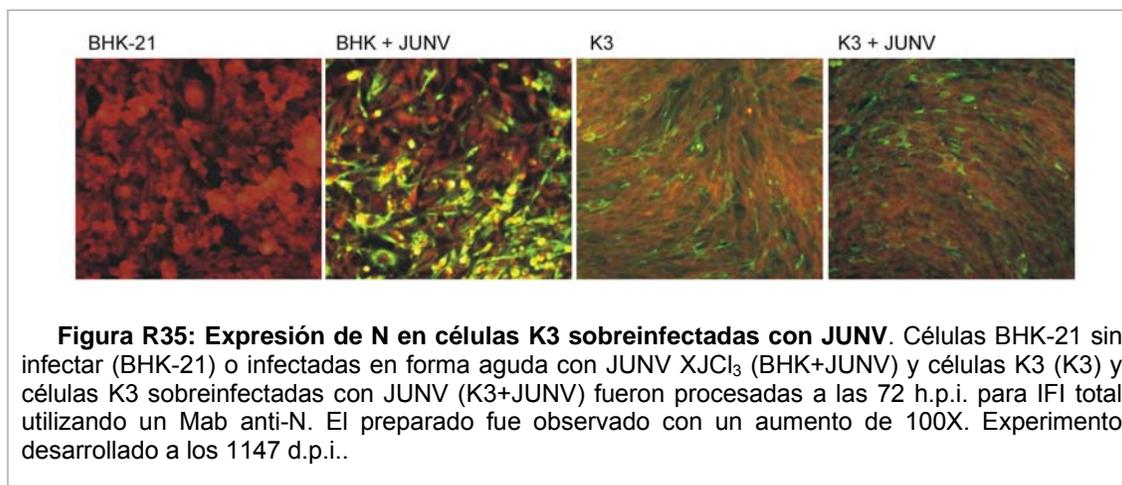
Los resultados obtenidos en el caso de las células K3 sobreinfectadas indicarían que la presencia de las proteínas de JUNV en dichas células, favorecerían la síntesis temprana de la cadena viral complementaria de TCRV, dada la condición de virus antigénicamente relacionados (Figura R34 A). A fin de analizar esta posibilidad, células BHK-21 y K3 fueron transfectadas con el ARN purificado a partir de viriones de TCRV. Como puede observarse en la Figura R34 B, las células BHK-21 y K3 fueron transfectadas eficientemente ya que se detectó la presencia de ARN de sentido viral en ambos cultivos. Por el contrario no se detectó la presencia de la cadena viral complementaria de TCRV ni en células K3 ni en las células control BHK-21, lo que sugiere que la presencia de la maquinaria biosintética de JUNV en las células K3 no es suficiente para que se produzca la síntesis de la cadena viral complementaria de TCRV (Figura R34 B).



**Figura R34: Síntesis de la cadena de ARN S de TCRV de sentido complementario al viral en células K3.** Células BHK-21 y K3 crecidas en botellas T25 fueron infectadas o sobreinfectadas con TCRV (m.o.i. =1 UFP/cél.). A diferentes tiempos p.i. (según se indica), las células fueron procesadas para la extracción de ARN. Posteriormente se sintetizó el cADN empleando el cebador TCRV 7F que hibridiza a la cadena viral complementaria de TCRV. Finalmente, se realizó una reacción de PCR empleando el par de cebadores específicos de TCRV TCRV7F/TCRV476R para la amplificación de un fragmento de 469 pb. La amplificación de secuencias de JUNV (cebadores Arena/186) y actina (cebadores acti1/acti2) se realizaron a modo de control (A). Células BHK-21 (BHK-21 T) y K3 (K3 T) fueron transfectadas con ARN obtenido a partir de TCRV purificado. Transcurridas las 48 h. post-transfección las células fueron procesadas para la extracción de ARN. Posteriormente, el ARN fue empleado como molde para la síntesis del cADN empleando cebadores para la detección de ARN de sentido genómico (TCRV476R) o ARN de sentido antigenómico (TCRV7F). Finalmente se realizó una reacción de PCR empleando el par de cebadores TCRV7F/TCRV476R para la amplificación de un fragmento de 469 pb. Se emplearon las células K3 y BHK-21 sin infectar como controles (B). Experimento desarrollado a los 884 d.p.i.

### R. III. 2. e. Síntesis de antígenos virales en células K3 sobreinfectadas

El siguiente paso a analizar fue la síntesis de proteínas virales. Para ello se estudió la expresión de N empleando la técnica de IFI. A tal fin, células K3 y BHK-21 fueron sobreinfectadas o infectadas con JUNV, respectivamente (m.o.i. = 0,1 UFP/cél). Luego de 3 d.p.i. las células fueron fijadas y procesadas para IFI total empleando un Mab anti-N. Se puede observar en la Figura R35 que la sobreinfección de células K3 con JUNV no modificó la expresión de N respecto de las mismas células sin sobreinfectar. Asimismo, el patrón de expresión de esta proteína fue similar tanto para las células K3 como para las K3 sobreinfectadas con JUNV. El porcentaje de células N (+) en el caso del control de la infección alcanzó el  $73,1 \pm 5,2$  %, mientras que para las células K3 y K3 sobreinfectadas los mismos fueron de  $34,6 \pm 4,3$  % y  $43,3 \pm 5,2$  %, respectivamente. Estos resultados indicarían que la sobreinfección de células K3 con JUNV no aumenta la expresión de las proteínas virales ya expresadas por el cultivo persistentemente infectado.

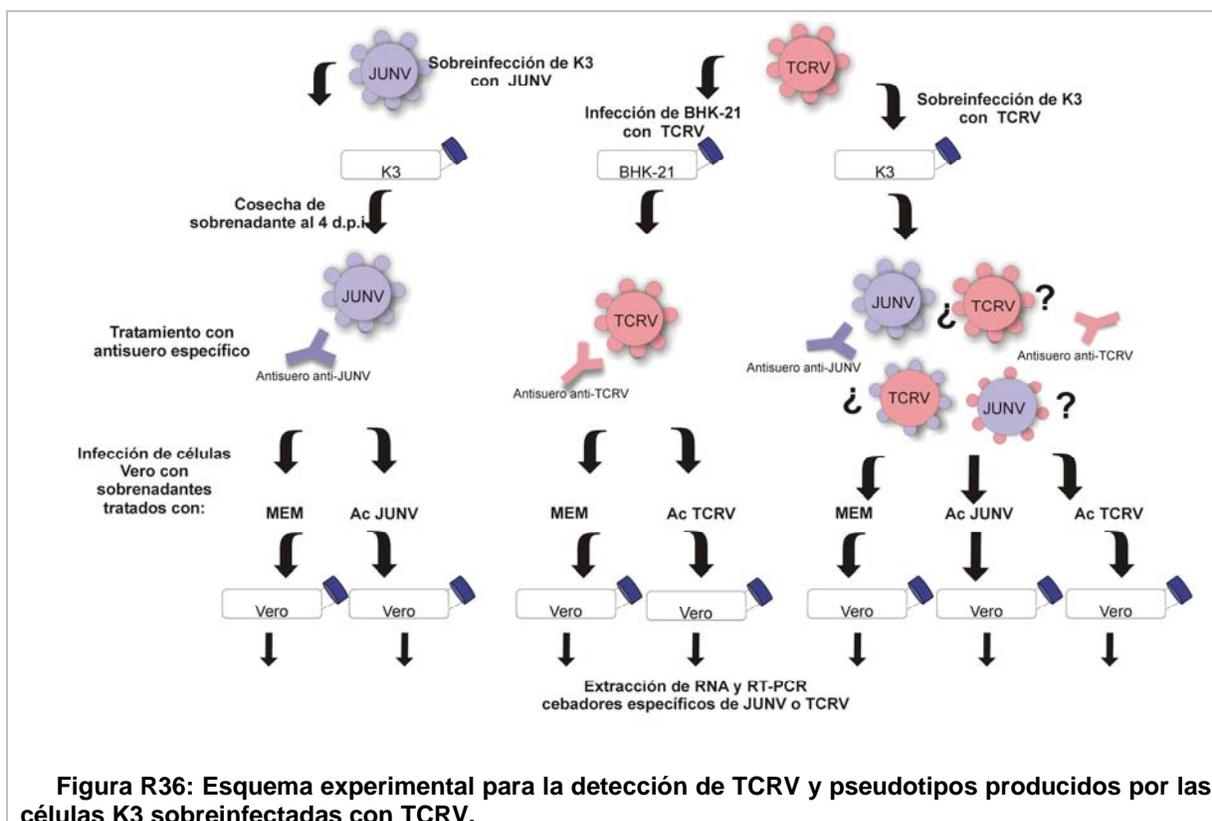


Dado que la técnica de IFI no permite discriminar entre la síntesis de antígenos del virus endógeno y del virus sobreinfectante, se diseñó una estrategia experimental para poner de manifiesto la síntesis de virus sobreinfectante aunque la misma ocurra de manera muy reducida.

En infecciones mixtas con dos virus distintos, se ha descrito la formación de progenie viral compuesta por mezclas fenotípicas que ocurren durante el proceso de maduración viral. Estos viriones, llamados “pseudotipos”, están formados por los antígenos de envoltura de un virus y el genoma del otro.

Con el objetivo de analizar la producción de antígenos del virus sobreinfectante y analizar la posibilidad de la formación mezclas fenotípicas cuando el virus TCRV multiplica en las células persistentemente infectadas con JUNV, se realizó un ensayo de formación de pseudotipos, a partir de la progenie viral obtenida luego de la sobreinfección de las células K3 con TCRV.

A fin de detectar la presencia de TCRV o de JUNV producido a partir de las células K3 sobreinfectadas, se hicieron tratamientos de los sobrenadantes de estas células con sueros neutralizantes anti-JUNV o anti-TCRV. Posteriormente se utilizaron estos sobrenadantes para infectar células Vero, las cuales fueron luego procesadas para la extracción de ARN y posterior RT-PCR para la detección del genoma de JUNV o TCRV, como se esquematiza en la Figura R36.



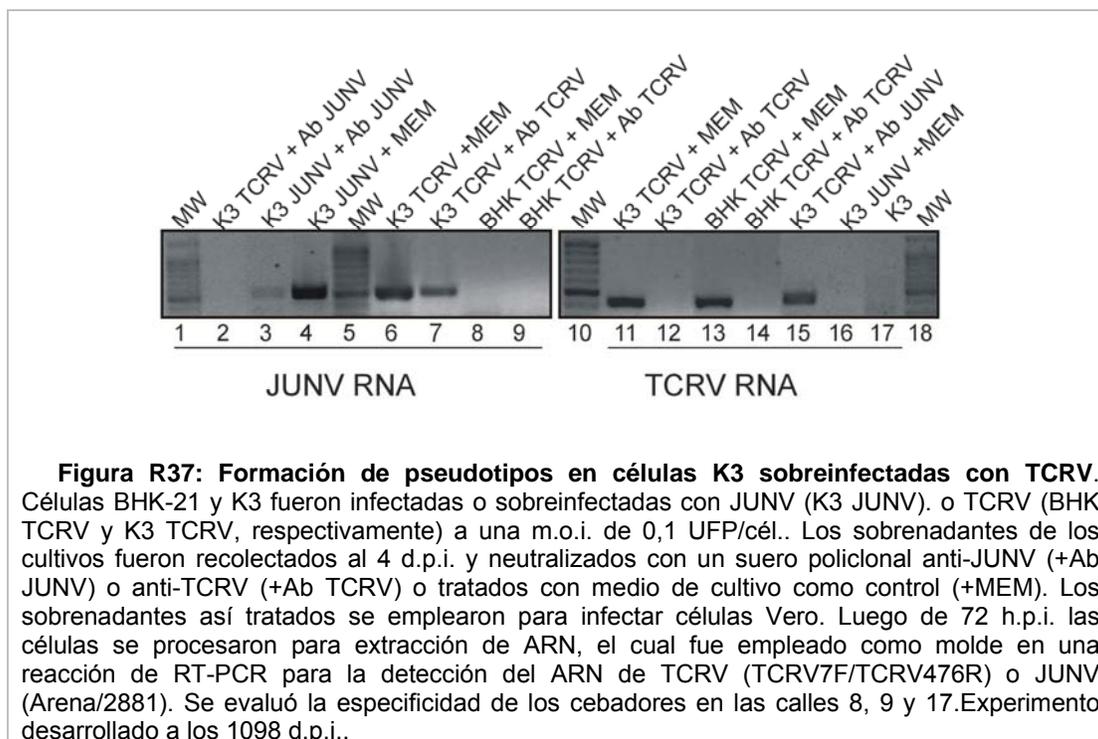
**Figura R36: Esquema experimental para la detección de TCRV y pseudotipos producidos por las células K3 sobreinfectadas con TCRV.**

En la Figura R37 se puede observar la presencia del ARN de JUNV obtenido a partir de células Vero infectadas con los sobrenadantes de células K3 sobreinfectadas con JUNV o TCRV los cuales se trataron con MEM o suero policlonal anti-TCRV (calles 4, 6 y 7). Por el contrario, en las calles 2 y 3, correspondientes a sobrenadantes tratados con anti-JUNV, no se observó producto de amplificación, por lo que se descartó la presencia de viriones con genoma de JUNV y envoltura de TCRV.

Asimismo, células infectadas con sobrenadantes obtenidos de células BHK-21 infectadas con TCRV, tratados con el antisuero anti-TCRV no mostraron producto de amplificación correspondiente al ARN de ese virus (calle 14), mientras que se sí se observó amplificación cuando ese mismo sobrenadante fue tratado con MEM (calle 13), comprobándose así la eficiencia de neutralización del antisuero anti-TCRV.

Se detectó la presencia de viriones con genoma de TCRV en sobrenadantes de células K3 sobreinfectadas con este virus (calle 11), como así también cuando este sobrenadante fue neutralizado con antisuero anti-JUNV, lo que permitió inferir la presencia de viriones con genoma de TCRV y envoltura del mismo virus (calle 15). Por el contrario, el ARN de TCRV no fue detectado cuando el sobrenadante fue tratado con antisuero anti-TCRV, indicando la ausencia de viriones con genoma de TCRV y envoltura de JUNV (calle 12).

Estos resultados analizados en conjunto demuestran que si bien las células K3 sobreinfectadas presentaron un impedimento a nivel de la producción de proteínas del virus sobreinfectante, esta etapa no se encontró bloqueada completamente ya que las células K3 sobreinfectadas con TCRV fueron capaces de sintetizar las proteínas del virus sobreinfectante con la subsiguiente formación de viriones de TCRV. Por otro lado sería posible descartar la formación de pseudotipos en células K3 sobreinfectadas con TCRV debido a la imposibilidad de detectar viriones con envoltura de JUNV y genoma de TCRV y viceversa.



**Figura R37: Formación de pseudotipos en células K3 sobreinfectadas con TCRV.**

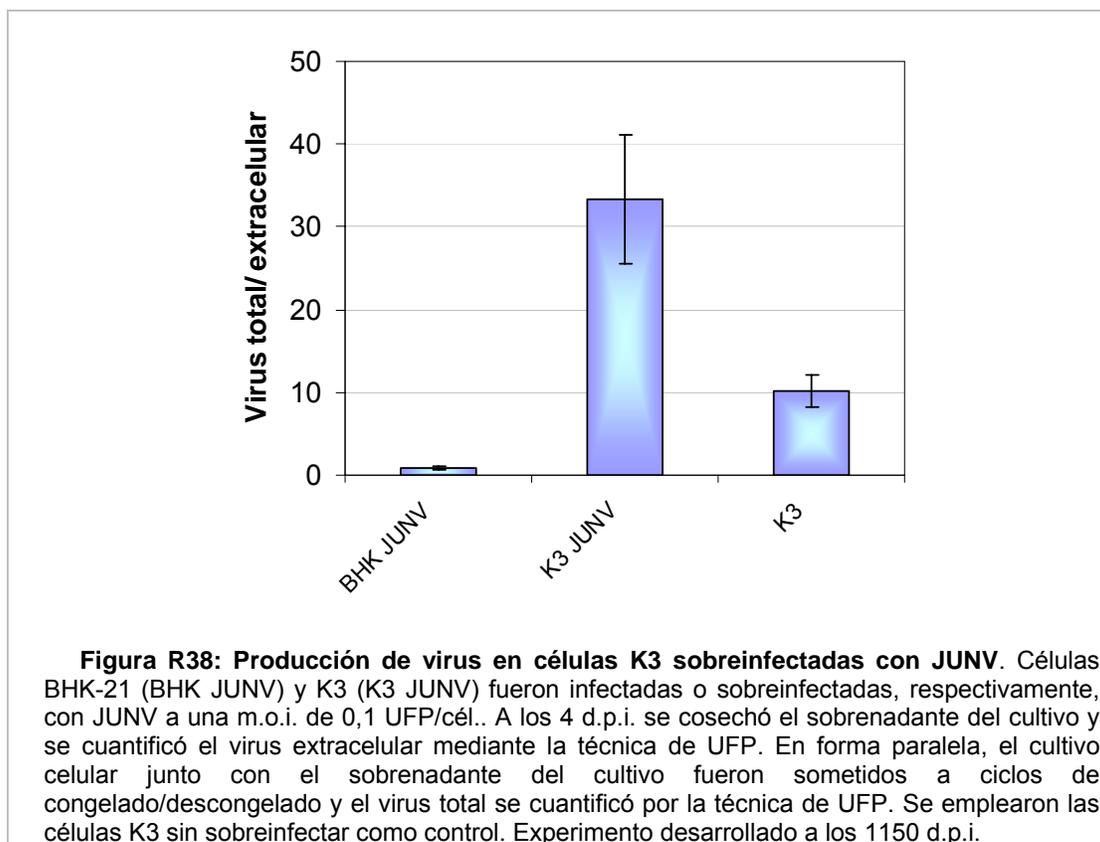
Células BHK-21 y K3 fueron infectadas o sobreinfectadas con JUNV (K3 JUNV) o TCRV (BHK TCRV y K3 TCRV, respectivamente) a una m.o.i. de 0,1 UFP/cél.. Los sobrenadantes de los cultivos fueron recolectados al 4 d.p.i. y neutralizados con un suero policlonal anti-JUNV (+Ab JUNV) o anti-TCRV (+Ab TCRV) o tratados con medio de cultivo como control (+MEM). Los sobrenadantes así tratados se emplearon para infectar células Vero. Luego de 72 h.p.i. las células se procesaron para extracción de ARN, el cual fue empleado como molde en una reacción de RT-PCR para la detección del ARN de TCRV (TCRV7F/TCRV476R) o JUNV (Arena/2881). Se evaluó la especificidad de los cebadores en las calles 8, 9 y 17. Experimento desarrollado a los 1098 d.p.i..

### R. III. 2. f. Brotación de virus a partir de células K3

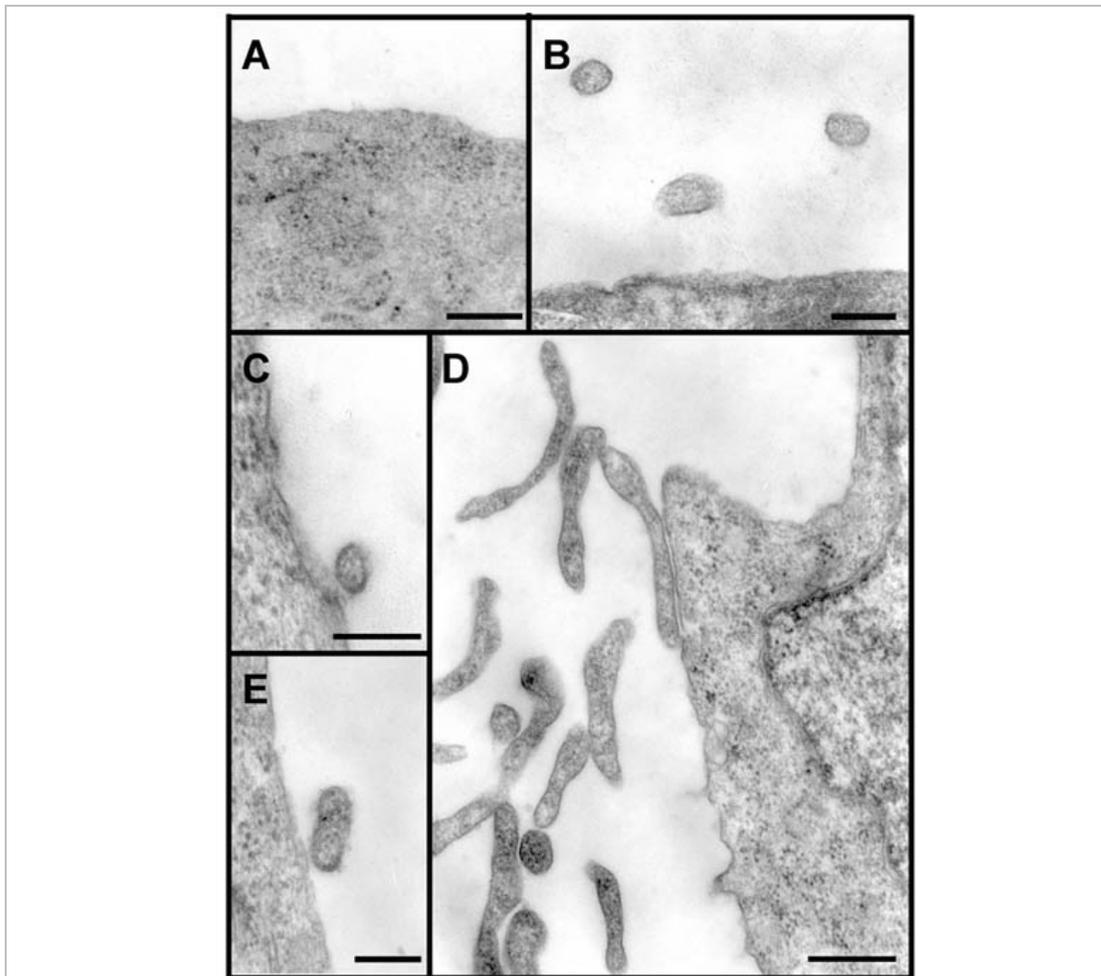
Los niveles de producción de virus infeccioso en el sobrenadante de células K3 resultaron significativamente menores respecto del virus total presente en dichos cultivos, tal como lo muestran los resultados de la Tabla R2, hecho que indicaría un impedimento a nivel de la etapa de brotación del virus en los mismos.

A fin de evaluar las etapas tardías en el ciclo de multiplicación del virus sobreinfectante en las células K3, las mismas fueron sobreinfectadas con JUNV (m.o.i.= 0,1 UFP/cél)

analizándose el título obtenido en el sobrenadante del cultivo (virus extracelular), como así también el obtenido a partir del sobrenadante y las células en conjunto, sometiendo el cultivo a ciclos de congelado y descongelado (virus total). En la Figura R38 se grafica el cociente entre el título del virus total y el título del virus extracelular correspondiente a los distintos tipos celulares, pudiendo observarse que gran parte del virus producido por las células K3 sobreinfectadas quedó asociado a células, de manera similar a lo que ocurrió con las células K3 sin sobreinfectar (Tabla R2), siendo unas 30 veces mayor al cociente obtenido para las células control BHK-21 (Figura R38).



Estos resultados se confirmaron cuando las células K3, K3 sobreinfectadas con JUNV y los controles de células BHK-21 no infectadas e infectadas en forma aguda con JUNV fueron procesadas para microscopía electrónica. En la Figura R39 B se observa que las células BHK-21 presentaron numerosos viriones liberados al espacio extracelular, mientras que en el caso de las células K3 se observaron partículas virales asociadas a la membrana plasmática. Asimismo, se encontraron estructuras aberrantes que se asemejan a viriones interconectados y pocos viriones en el espacio extracelular en los cultivos persistentemente infectados con JUNV, demostrando una alteración a nivel de la liberación del virus a partir de células K3 (Figura R39 C, D y E).



**Figura R39. Brotación de JUNV en células K3.** Células BHK-21 sin infectar (A), células K3 (C), células BHK-21(B) y K3 (E y D) infectadas o sobreinfectadas con JUNV a una m.o.i. de 5 UFP/cél. fueron procesadas a las 48 h.p.i. para microscopía electrónica. Experimento desarrollado a los 1220 d.p.i. La barra corresponde a 100nm.

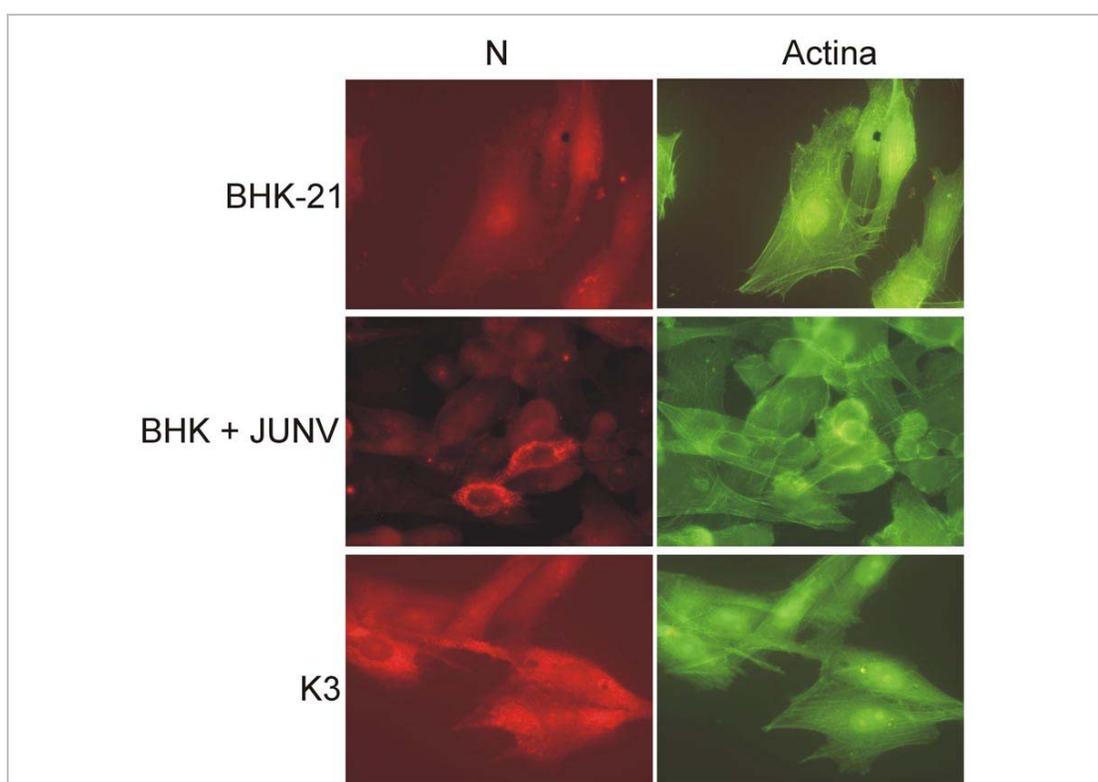
### R. III. 3. Participación de proteínas celulares y virales en la brotación viral a partir de K3

Teniendo en cuenta los resultados mencionados anteriormente en donde se muestra que el virus producido por las células K3, a diferencia de lo que ocurre en una infección aguda de JUNV en células BHK-21, queda en gran medida asociado a las mismas, se estudiaron algunas proteínas celulares involucradas en el proceso de brotación del virus con el objetivo de identificar alguna alteración que contribuiría, junto a la restricción en la síntesis de proteínas virales, en la reducida infectividad producida y liberada al sobrenadante por parte de las células persistentemente infectadas.

### R. III. 3. a. Nucleoproteína y citoesqueleto

El citoesqueleto es una red citoplasmática constituida por tres clases de filamentos (microfilamentos, filamentos intermedios y microtubúlos) y proteínas accesorias. Estos componentes se ensamblan en una estructura tridimensional que define la forma y la organización estructural de la célula. La incorporación de proteínas específicas del citoesqueleto, tales como la actina, en los viriones ha sido comprobada para diversos virus envueltos, entre ellos retrovirus y rhabdovirus (Chen et al., 2004, Han & Harty, 2005). Asimismo, se ha demostrado la importancia del citoesqueleto en la multiplicación de JUNV como participante del transporte de macromoléculas virales, del ensamblado y brotación (Candurra et al., 1999, Cordo & Candurra, 2003).

A fin de analizar la interacción entre N y el citoesqueleto se realizó una doble marcación de N y actina, observándose en la Figura R40, que tanto las células BHK-21, no infectadas e infectadas de forma aguda con JUNV y las células K3 mostraron el patrón de expresión típico para actina de fibras orientadas según el eje longitudinal de la célula. Asimismo, las células positivas para N, mostraron la organización de actina comparable a las células sin infectar.

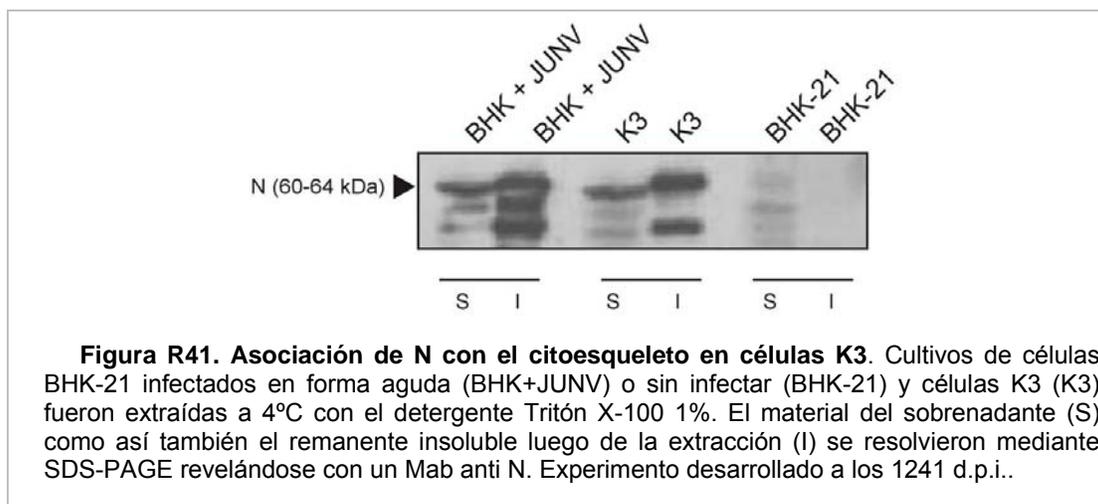


**Figura R40: Expresión de N y actina en células K3.** Células BHK-21, K3 y células BHK-21 infectadas con JUNV (m.o.i.= 5 UFP/cél.) fueron fijadas y procesadas para IFI a las 48 h.p.i. y 72 h. post siembra. Para la detección de N se utilizó un Mab dirigido hacia dicha proteína, posteriormente se incubaron los preparados con el compuesto faloidina-FITC (verde) y el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con TRITC (rojo). Los preparados fueron observados con un aumento de 400X. Experimento desarrollado a los 1172 d.p.i..

También se ha descrito la asociación de distintas proteínas virales a fracciones subcelulares resultantes de la extracción de cultivos de células infectadas con detergentes en diferentes condiciones de salinidad y/o temperatura. La presencia de N en la fracción insoluble luego de la extracción de células Vero infectadas con JUNV con el detergente Tritón X-100 ha sido indicativo de la asociación de esta proteína viral con el citoesqueleto (Candurra et al., 1999).

Con el objetivo de estudiar la asociación de N al citoesqueleto de las células K3, se realizó una extracción de las mismas con este detergente a 4°C. Asimismo, se emplearon células BHK-21 infectadas en forma aguda con JUNV y células BHK-21 sin infectar como controles.

En la Figura R41 se pueden observar los resultados obtenidos luego de someter las muestras extraídas con el detergente a un SDS-PAGE seguido del revelado de N mediante la técnica de WB empleando un Mab. dirigido hacia dicha proteína.



En las condiciones del ensayo se puede observar que la nucleoproteína viral se encontró asociada en mayor medida a la fracción insoluble. Los productos de degradación de esta proteína se encontraron también mayoritariamente en la fracción insoluble al detergente, resistente a la extracción, sugiriendo la asociación de N y sus productos de degradación al citoesqueleto.

Analizando en conjunto los resultados obtenidos, se puede concluir que con los experimentos realizados no se pudieron encontrar alteraciones en el citoesqueleto en su interacción con N que justifiquen la brotación ineficiente de JUNV observada en las células K3.

### R. III. 3. b. Co-localización de N y Z

La proteína Z de los arenavirus contiene diversas secuencias conservadas, las cuales están involucradas en las interacciones proteína-proteína entre dicha proteína y proteínas celulares y/o virales, durante los procesos de transcripción, replicación y brotación. Asimismo,

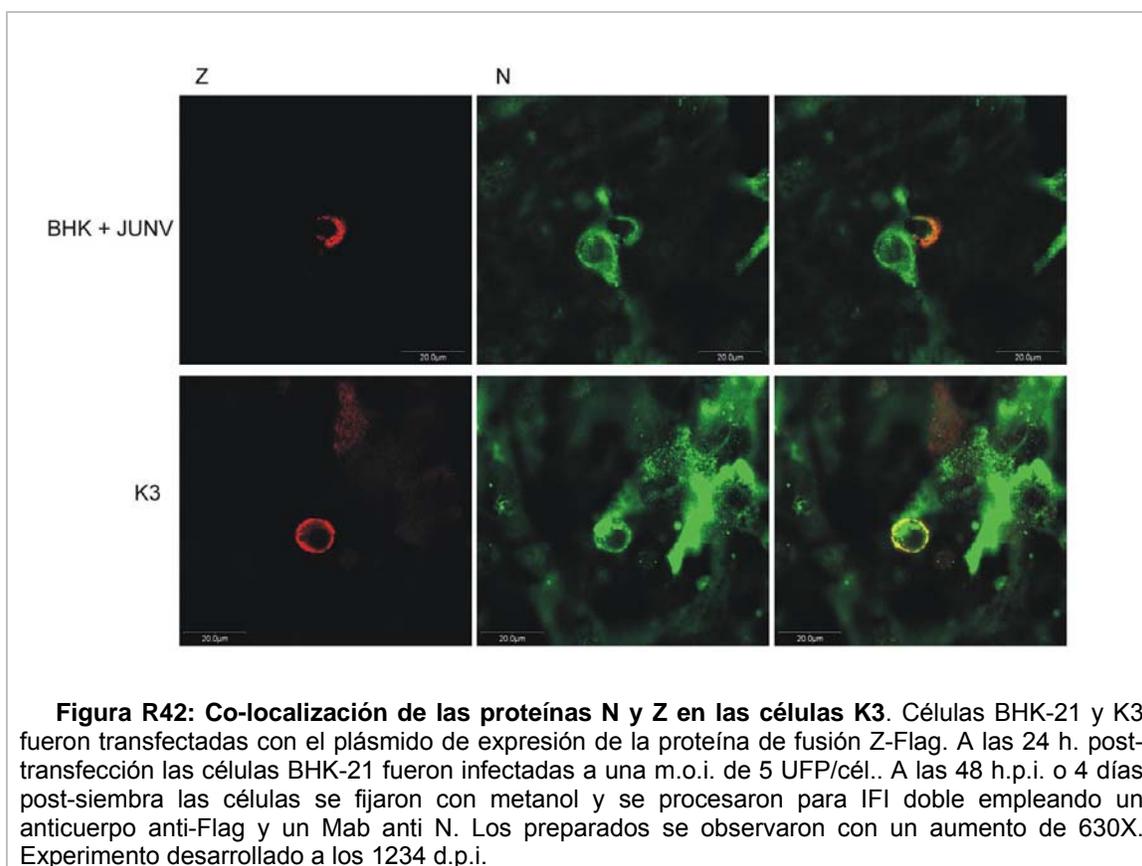
esta proteína ha sido propuesta como proteína de matriz en los arenavirus (Eichler et al., 2004, Perez et al., 2003, Strecker et al., 2003). Las proteínas de matriz están usualmente implicadas en la interacción de la nucleocápside y la envoltura viral durante el ensamblado. Se ha descrito para algunas proteínas de matriz la unión en forma directa a la nucleocápside, mientras otras lo hacen de manera indirecta a través del ARN u otra proteína (Eichler et al., 2004). En el caso de los arenavirus, se ha estudiado la interacción entre Z y L mediante ensayos de co-inmunoprecipitación, describiéndose también la co-precipitación de N junto a estas dos proteínas gracias a la interacción N-L (Jacamo et al., 2003), aunque también hay trabajos que describen una interacción directa entre dichas proteínas (Eichler et al., 2004).

Dado el patrón de fluorescencia diferencial de N observado durante la infección persistente de JUNV, se decidió determinar si existían diferencias en la co-localización de N y Z en las células K3, asociadas a la brotación deficiente de JUNV.

Con este objetivo, se empleó el plásmido pcDNA-ZFLAG conteniendo la secuencia codificante de la proteína Z fusionada a la secuencia codificante del péptido FLAG en su extremo carboxi-terminal a fin de facilitar su detección.

Como se puede observar en la Figura R42, la expresión de Z mostró un patrón de fluorescencia puntillado que se distribuyó de una manera uniforme en el citoplasma y más marcadamente en la región perinuclear tanto en las células BHK-21 infectadas de forma aguda como en las células K3.

Por otro lado, el modelo de expresión de N resultó de tipo granular citoplasmático como se describió anteriormente. Como se puede observar en la Figura R42 existen extensas zonas de co-localización de N y Z en la región perinuclear tanto en la infección aguda con JUNV como así también en las células K3, similar a lo descrito para las proteínas N y Z de LASV (Eichler et al., 2004). Se concluye entonces, que el patrón de expresión diferencial observado para N en las células K3 no se correlacionó con una alteración en su interacción con Z.



**Figura R42: Co-localización de las proteínas N y Z en las células K3.** Células BHK-21 y K3 fueron transfectadas con el plásmido de expresión de la proteína de fusión Z-Flag. A las 24 h. post-transfección las células BHK-21 fueron infectadas a una m.o.i. de 5 UFP/cél.. A las 48 h.p.i. o 4 días post-siembra las células se fijaron con metanol y se procesaron para IFI doble empleando un anticuerpo anti-Flag y un Mab anti N. Los preparados se observaron con un aumento de 630X. Experimento desarrollado a los 1234 d.p.i.

### R. III. 3. c. Expresión de TSG101 y brotación viral a partir de células K3

#### R. III. 3. c. 1. Expresión de TSG101 en células K3

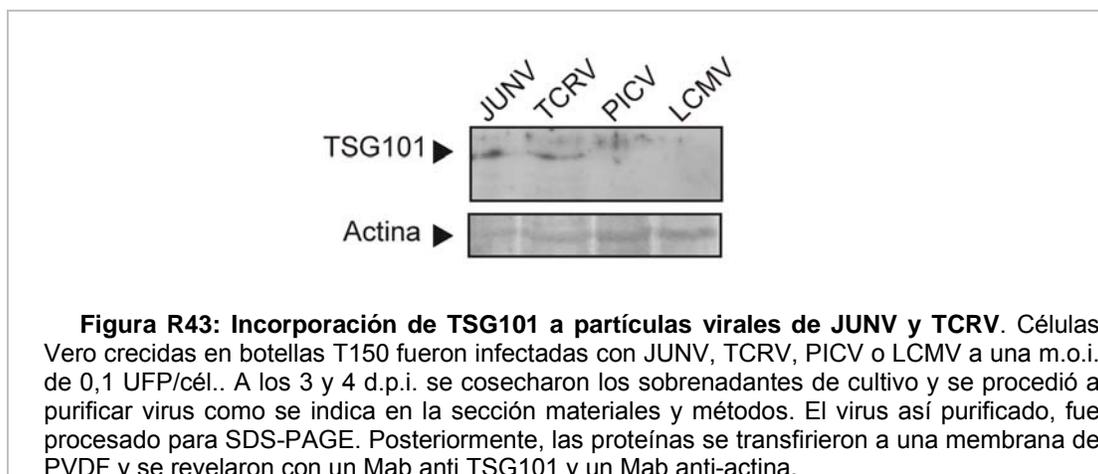
El proceso de brotación viral utiliza numerosas proteínas celulares implicadas en el sistema de translocación vacuolar (Welsch et al., 2007). A fin de analizar la participación de este tipo de proteínas en la restricción en la liberación de virus infeccioso al sobrenadante de las células K3 se eligió a TSG101 como objeto de estudio, ya que se ha demostrado su participación en el egreso de LASV y LCMV (Perez et al., 2003, Urata et al., 2006).

Como indicador de la interacción TSG101-JUNV se analizó en primer lugar la presencia de esta proteína en viriones purificados del virus, ya que se ha descrito la interacción de TSG101 con los dominios PTAP de la proteína GAG, y su incorporación a los viriones de HIV-2 (Myers & Allen, 2002). Dado que se ha postulado a la proteína Z de los arenavirus como proteína responsable del ensamblado de los viriones y que dicha proteína en los virus LASV, JUNV, PICV y TCRV (ASAP), contiene al igual que GAG dominios P(T/S)AP, se decidió investigar la incorporación de TSG101 a las partículas virales de diferentes arenavirus.

A tal fin, se realizó un WB empleando un Mab anti TSG101 a partir de partículas virales purificadas de JUNV, TCRV, PICV y LCMV.

En la Figura R43, se observa la presencia de una banda correspondiente a la proteína TSG101 sólo en viriones purificados de JUNV y TCRV, pero no en PICV y LCMV, sugiriendo

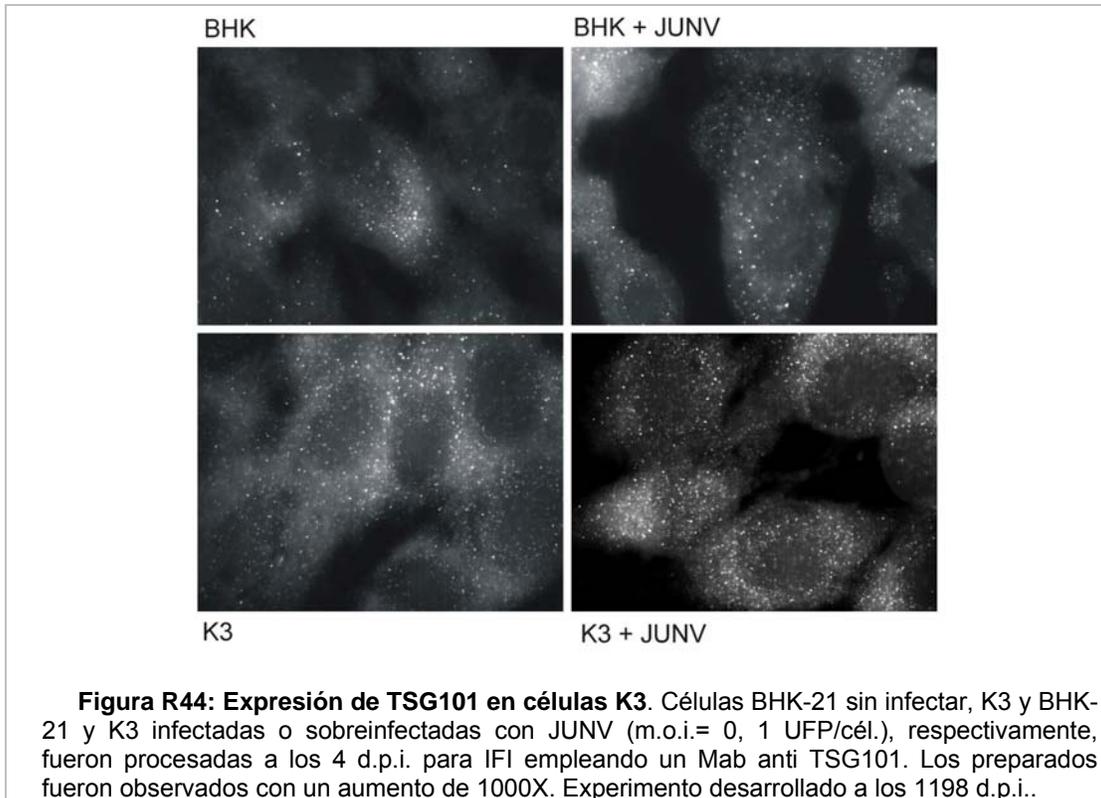
una interacción específica de esta proteína celular con estos dos arnavirus. A modo de control del experimento se detectó la presencia de la proteína celular actina, la cual se ha reportado co-purifica con las partículas virales y es incorporada a los viriones (Pasian et al., 1983).



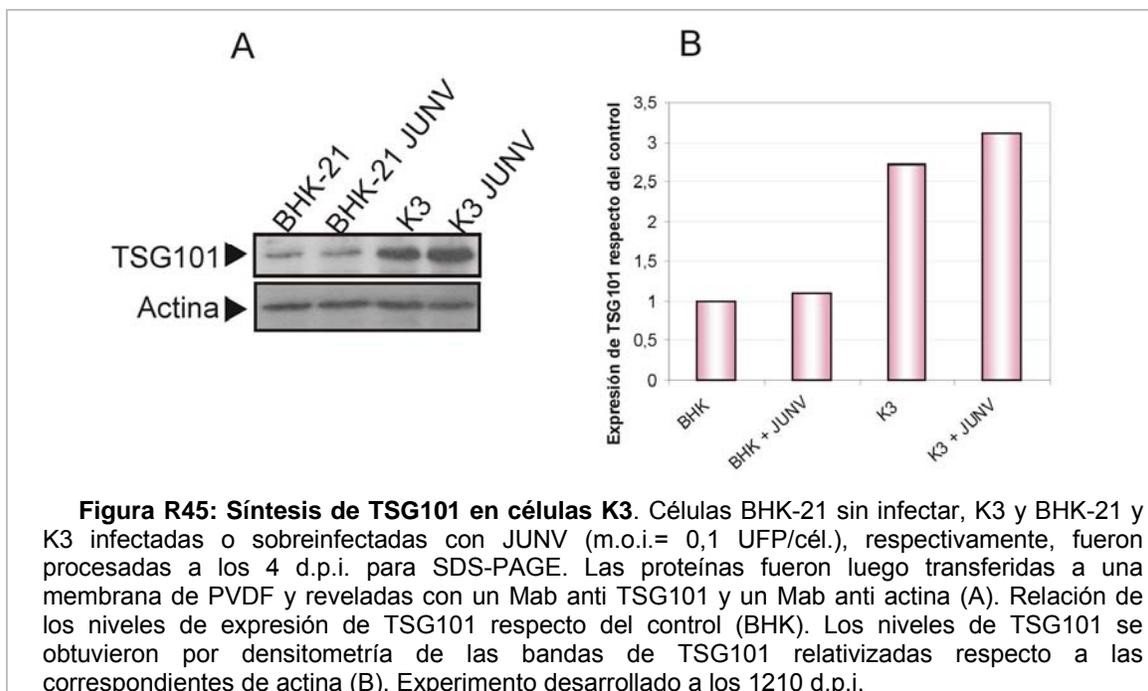
A fin de determinar la influencia de TSG101 en la brotación de JUNV, se evaluó la expresión de esta proteína mediante la técnica de IFI y WB en las células BHK-21 sin infectar e infectadas de forma aguda con JUNV y en células K3 y K3 sobreinfectadas (Figura R44).

Todos los tipos celulares analizados presentaron un patrón de IFI caracterizado por fluorescencia citoplasmática de aspecto puntillado, debido probablemente a la localización endosomal de TSG101. Sin embargo, la expresión de esta proteína fue mayor en las células K3 y K3 sobreinfectadas con JUNV, respecto a las células BHK-21 y BHK-21 infectadas de forma aguda con el mismo virus.

Estos resultados se confirmaron cuando se analizó la expresión de TSG101 mediante WB empleando el mismo Mab, ya que se comprobó un aumento en la expresión de TSG101 en los cultivos persistentemente infectados respecto a los cultivos de células BHK-21. Asimismo, y de manera similar a los resultados observados por IFI, la infección aguda de células BHK-21 no modificó el nivel de expresión de TSG101 respecto del control sin infectar, sin embargo se puede observar que las células K3 sobreinfectadas mostraron niveles de expresión levemente superiores a los observados para las células K3 (Figura R45).



**Figura R44: Expresión de TSG101 en células K3.** Células BHK-21 sin infectar, K3 y BHK-21 y K3 infectadas o sobreinfectadas con JUNV (m.o.i.= 0, 1 UFP/cél.), respectivamente, fueron procesadas a los 4 d.p.i. para IFI empleando un Mab anti TSG101. Los preparados fueron observados con un aumento de 1000X. Experimento desarrollado a los 1198 d.p.i..

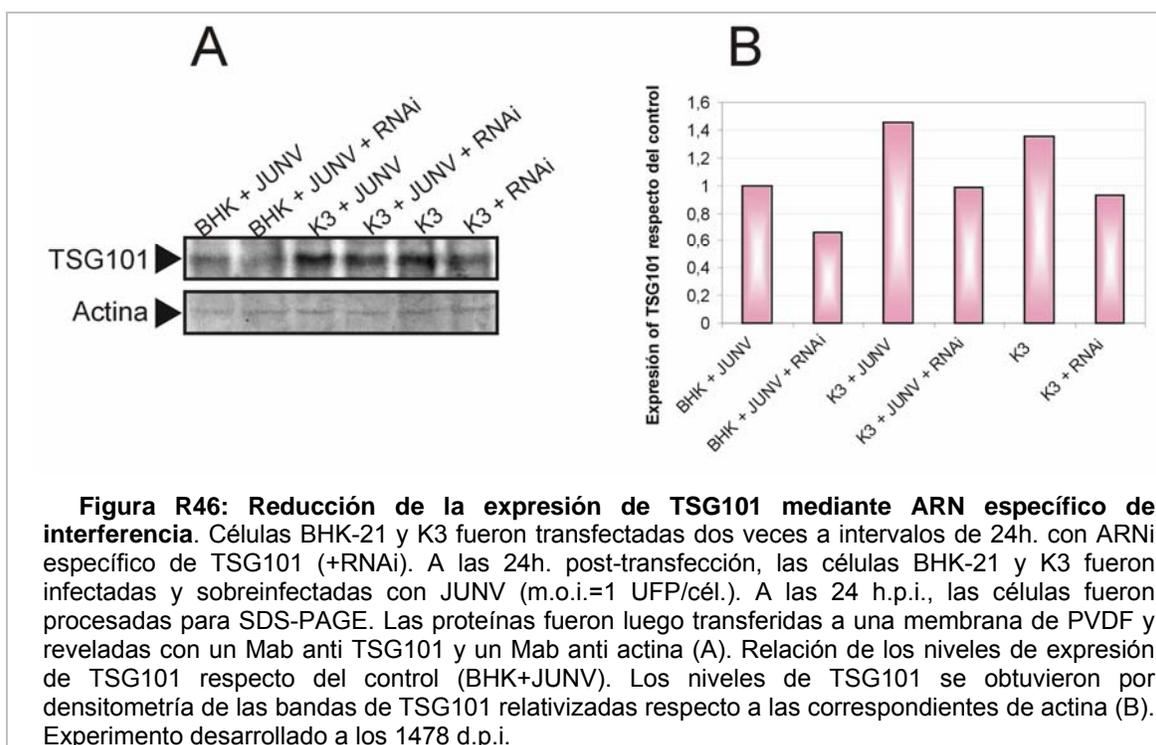


**Figura R45: Síntesis de TSG101 en células K3.** Células BHK-21 sin infectar, K3 y BHK-21 y K3 infectadas o sobreinfectadas con JUNV (m.o.i.= 0,1 UFP/cél.), respectivamente, fueron procesadas a los 4 d.p.i. para SDS-PAGE. Las proteínas fueron luego transferidas a una membrana de PVDF y reveladas con un Mab anti TSG101 y un Mab anti actina (A). Relación de los niveles de expresión de TSG101 respecto del control (BHK). Los niveles de TSG101 se obtuvieron por densitometría de las bandas de TSG101 relativizadas respecto a las correspondientes de actina (B). Experimento desarrollado a los 1210 d.p.i.

### R. III. 3. c. 2. Expresión de TSG101 y la liberación de virus al sobrenadante.

La relación entre el aumento de la expresión de TSG101 y la restricción en la multiplicación de JUNV en las células K3 se confirmó mediante ensayos de reducción de la expresión de dicha proteína utilizando la técnica de ARN de interferencia específico (ARNi).

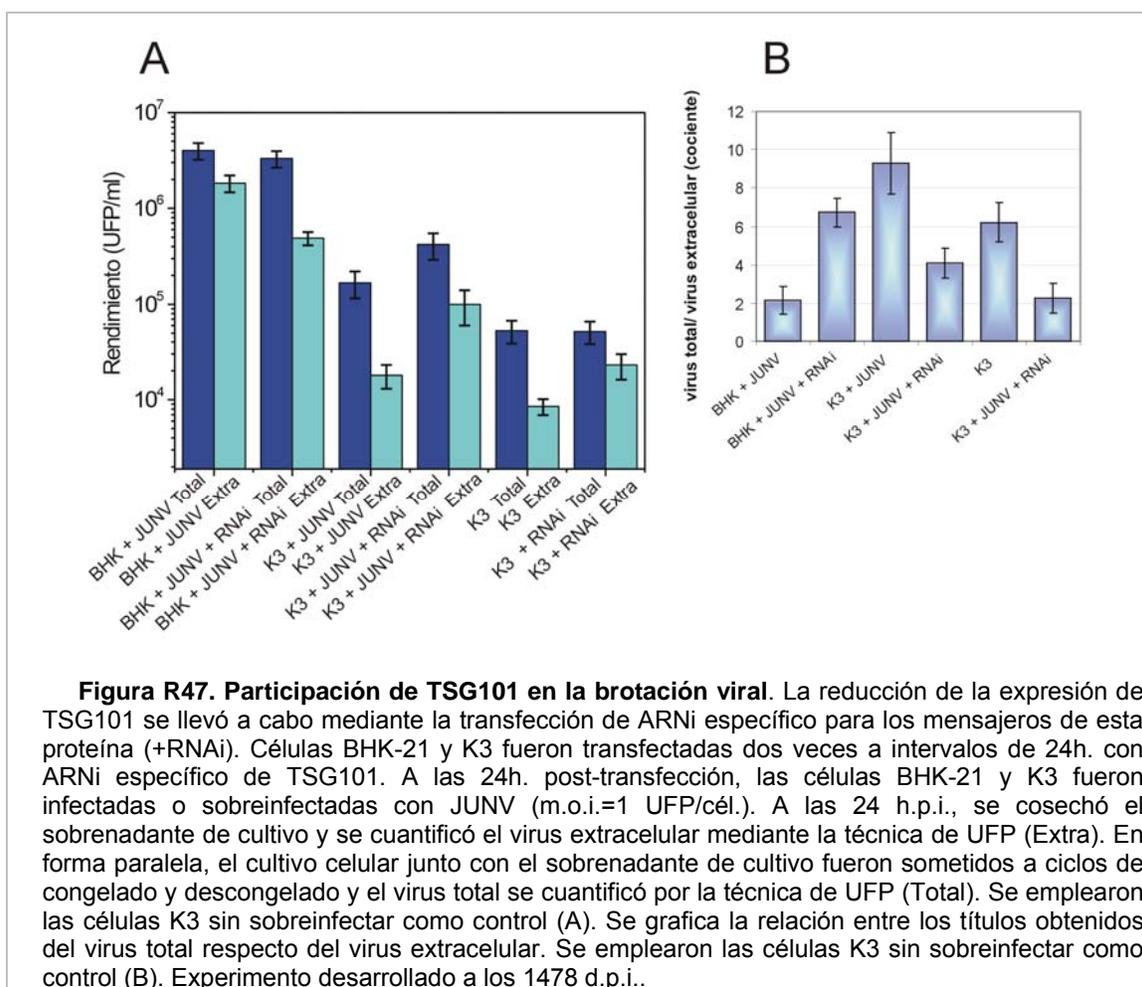
Los resultados mostrados en la Figura R46 indican que la expresión de TSG101 fue reducida en las células K3 y K3 sobreinfectadas y también en las células BHK-21 infectadas con JUNV, luego de la transfección con el ARNi específico de TSG101 respecto de las células transfectadas con el ARNi control.



Por otro lado, se analizó la infectividad producida por las células K3, como así también por las BHK-21 y K3 infectadas o sobreinfectadas, respectivamente, con JUNV en presencia de los ARNi específicos para TSG101, respecto a las células transfectadas con el ARNi control. En la Figura R47A se observa que para las células BHK-21 infectadas de manera aguda con JUNV, la disminución de la expresión de TSG101 si bien no afectó los niveles de infectividad total producida por estas células, se asoció con una disminución en los niveles de infectividad liberada al sobrenadante.

Cuando se analizaron los niveles de infectividad producida por las células K3 sobreinfectadas, se obtuvieron resultados concordantes a los mostrados en la Figura R38, aunque en menor proporción, debido probablemente a la diferencia en la m.o.i. utilizada y en el día de cosecha de los sobrenadantes para realizar la cuantificación. Cuando el cultivo de células K3 sobreinfectadas fueron transfectadas con el ARNi específico para TSG101, si bien

se pudo observar un leve aumento en el nivel de virus total, el mismo no fue significativamente diferente respecto de las transfectadas con el ARNi control. Sin embargo el valor correspondiente al virus extracelular producido por dichas células fue mayor respecto al observado para K3 sobreinfectadas transfectadas con en ARNi control. Las células K3 sin sobreinfectar muestran resultados similares a los mencionados anteriormente para los cultivos sobreinfectados con JUNV y transfectados con el ARNi específico para TSG101, mostrando un aumento significativo en la producción de virus extracelular cuando la expresión de TSG101 se reduce mediante el tratamiento con el ARNi (Figura R47 A).



Como se observa en la Figura R47B, los niveles de infectividad producida por las células K3 y K3 sobreinfectadas mostraron que el virus producido por estos cultivos se encontró en mayor medida asociado a células. Por el contrario, los valores de infectividad en las células BHK-21 infectadas de forma aguda con JUNV mostraron que el virus producido se encontró en cantidades equivalentes asociado a células y en el sobrenadante de estos cultivos. Las diferencias encontradas en las células BHK-21 en la Figura R47 respecto de la Figura R38, se

pueden deber a que en esta última el experimento se realizó a una m.o.i. de 0,1 UFP/ cél y el material fue cosechado a los 4 d.p.i.. Cuando se investigó la infectividad producida por los cultivos de células K3, K3 sobreinfectadas con JUNV que fueron previamente transfectados con ARNi específicos para TSG101, los cocientes obtenidos fueron significativamente menores que aquellos obtenidos a partir de células transfectadas con los ARNi control. Por el contrario, la reducción en los niveles de expresión de TSG101 en células BHK-21 infectadas de forma aguda, resultaron en un incremento de la infectividad asociada a células (Figuras R47A y B).

Estos resultados demuestran la participación de TSG101 en la brotación de JUNV. Asimismo, la sobreexpresión de esta proteína sería responsable en la brotación ineficiente del virus JUNV en los cultivos de células K3.

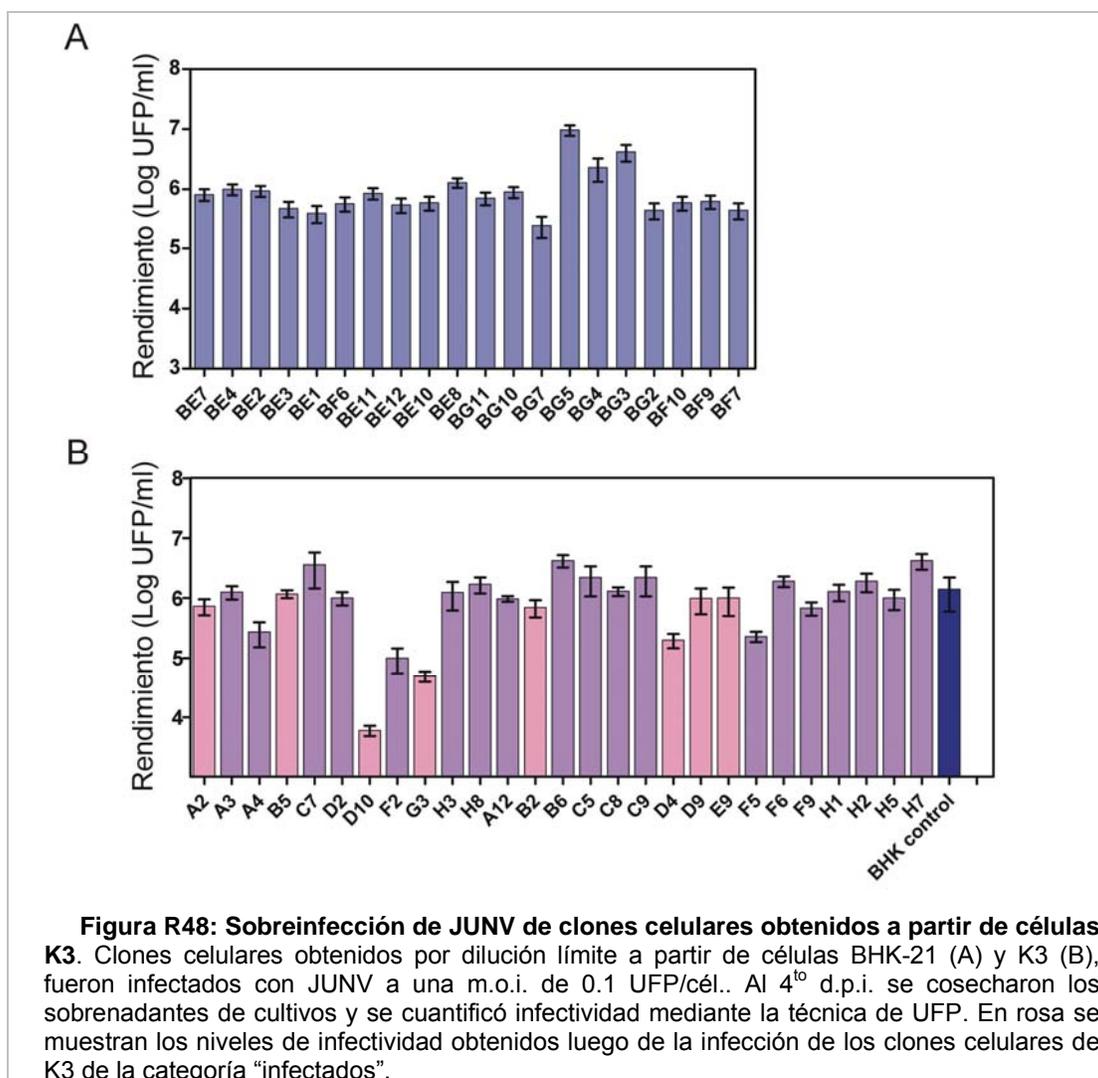
El desbalance en los niveles de TSG101 en células K3 sería además responsable de las diferencias entre estas células y las células BHK-21 en cuanto al proceso de internalización de la transferrina (Doyotte et al., 2005) debido a una redistribución significativa de su receptor, caracterizada por una disminución del mismo en la membrana celular y por su aumento en endosomas agrandados.

#### **R. III. 4. Susceptibilidad a la infección con JUNV de clones celulares aislados de células K3**

Con el objetivo de continuar el análisis de la participación de TSG101 en la restricción a la multiplicación de JUNV en células K3 se utilizaron como herramienta de estudio los clones celulares aislados a partir de dichas células, descritos en el ítem **R.I.5**. En primer lugar se evaluó la susceptibilidad de dichos clones a la infección o sobreinfección con JUNV, comparándolos con clones obtenidos de igual manera a partir de un cultivo de células BHK-21 sin infectar (Figura R48). Los clones de células K3 “no infectados” fueron susceptibles a la multiplicación de JUNV a niveles comparables a aquellos obtenidos para los de clones de células BHK-21. Esta situación también se dió con los clones A2, B2 y B5 que, luego de ser sobreinfectados mostraron niveles de producción de infectividad cercanos a  $10^6$  UFP/ml, valor 3 log superior a la infectividad producida por los mismos sin sobreinfectar.

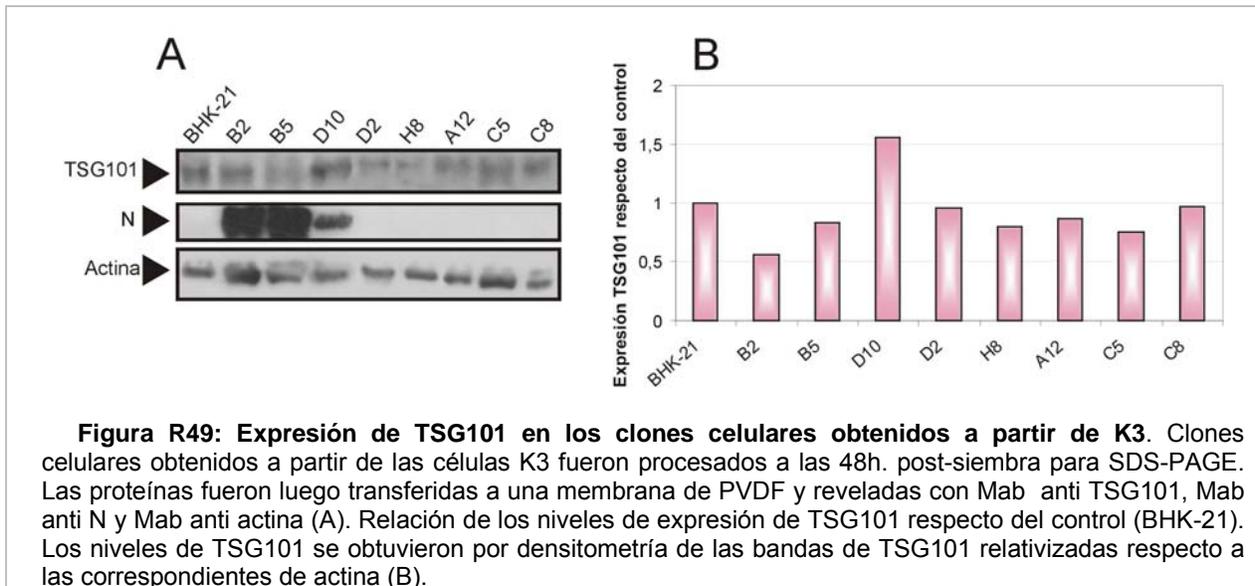
Del mismo modo, los clones D4, D9 y E9 (no virogénicos, no productores de antígenos virales y RT-PCR positivos) al ser sobreinfectados produjeron virus infeccioso con valores que oscilaron entre  $2 \cdot 10^5$  y  $10^6$  UFP/ml.

Por otro lado, los clones celulares infectados D10 y G3, resultaron resistentes a la sobreinfección de JUNV, mostrando niveles de multiplicación de 1.5 a 2 logaritmos menores a los observados para los clones de células BHK-21 controles. Estos clones celulares (D10 y G3) se comportaron de manera análoga a las células K3 (Figura R26 y R48).



La resistencia a la sobreinfección de las células K3, también comprobada en los clones celulares derivados de dichas células D10 y G3 podrían compartir la/s misma/s causa/s. En función de esta especulación se analizó la expresión de TSG101 en los clones celulares aislados a partir de las células K3. Para ello, se realizó un WB empleando un Mab anti TSG101. Se evaluaron aquellos clones celulares representativos de la heterogeneidad celular encontrada (Tabla R10), se analizaron los clones B2 y B5 representativos de clones celulares virogénicos y susceptibles a la sobreinfección de JUNV, D2, H8, A12, C5 y C8 clones celulares no infectados y el clon D10 productor de virus y resistente a la sobreinfección de JUNV, análogo al comportamiento observado para el cultivo de células K3. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura R49. Se observó que el nivel de expresión de TSG101 para los clones D2, H8, A12, C5, C8, B2 y B5 resultó similar al observado en las células BHK-21. Por el contrario, se observó que el nivel de expresión de esta proteína resultó mayor en el caso del clon celular D10 (Figura

R49), confirmándose así la correlación entre la resistencia a la sobreinfección y la sobreexpresión de la proteína celular TSG101.



En el presente trabajo de investigación se caracterizó una línea de células BHK-21 persistentemente infectada con virus Junín (JUNV). Esta línea, denominada K3, fue obtenida por infección experimental de células BHK-21 con la cepa atenuada de JUNV, XJCl<sub>3</sub>. La caracterización se realizó por un período aprox. de 3 años, durante los cuales se investigaron distintos parámetros biológicos y bioquímicos de las células K3, de manera comparativa, con aquellos propios de la etapa aguda de la infección.

Dentro de los parámetros biológicos, la estrategia de la investigación se basó en el seguimiento temporal del comportamiento del virus en cuanto a la síntesis y expresión de sus proteínas, producción de infectividad, presencia de partículas D.I. y aparición de variantes virales. En este sentido pudo observarse que los niveles de infectividad producidos por el cultivo luego de transcurrida la primera semana p.i. comenzaron a decaer al mismo tiempo que aumentaba la proporción de partículas D.I.. A partir de ese momento y durante el primer año p.i. los niveles de producción de virus por parte de las células K3 se correlacionaron inversamente con la capacidad interferente detectada en los sobrenadantes de las mismas, patrón característico de la infección persistente de JUNV en distintos cultivos celulares. Esta regulación de la replicación del virus salvaje por parte de las partículas D.I. ha sido descrita como un mecanismo para el mantenimiento de la infección persistente por arnavirus y podría explicar tanto el establecimiento como el mantenimiento de la persistencia durante el primer año p.i. de las células K3 (Help et al., 1976, Iapalucci et al., 1994, Welsh et al., 1972). Sin embargo, los resultados muestran que, luego del primer año p.i., los niveles de infectividad extracelular decayeron de manera constante, mientras los porcentajes de actividad interferente en los sobrenadantes fluctuaron independientemente respecto de los niveles de virus infeccioso. Esta falta de correspondencia entre la producción de infectividad y la actividad interferente presente en los sobrenadantes del cultivo indicaría la participación de otro/s factor/es que controlen la producción de virus infeccioso en dichas células transcurrido el primer año de persistencia. Se han descrito sistemas de infecciones persistentes *in vitro* en los cuales las partículas D.I. no intervendrían en el mantenimiento de la infección persistente, sino que serían importantes en el establecimiento de este tipo de infección, tal como se ha observado para un cultivo de células Vero persistentemente infectado con TCRV (D'Aiutolo & Coto, 1986) y para la infección persistente de VSV en células BHK-21 (Holland & Villarreal, 1974). Asimismo, también se han descrito, para JUNV y el virus respiratorio sincicial, cultivos celulares persistentemente infectados en los cuales no fue posible detectar ciclos en la producción de virus ni partículas D.I. en los sobrenadantes de los mismos, indicando la existencia de un mecanismo diferente en el mantenimiento de la persistencia (Ellenberg et al., 2002, Valdovinos & Gomez, 2003). Por otro lado, se ha comprobado que cambios en el estado metabólico del cultivo pueden afectar la evolución de la infección persistente de JUNV en parte por la modulación en la producción

de partículas DI (Candurra & Damonte, 1985). Asimismo, se ha reportado una producción disminuida de virus en células 3T3 persistentemente infectadas con el virus Sendai en estado estacionario respecto a la producción de infectividad por parte del cultivo en crecimiento exponencial (Ogura et al., 1984). En el caso de las células K3, se observó una disminución en la producción de virus extracelular aún cuando las mismas crecieron de manera similar a las células BHK-21 sin infectar y fueron subcultivadas siguiendo un esquema que favoreció el establecimiento de un metabolismo activo.

En cuanto a la producción de virus infeccioso, las células K3 presentaron dos fases diferenciadas según los niveles de virus producido: la primera fue una etapa productiva, virogénica, caracterizada por la liberación cíclica de virus al medio extracelular con títulos altos, aunque siempre inferiores al obtenido durante la infección aguda, mientras que la segunda etapa se caracterizó por una reducción marcada de la producción viral. Estas etapas a su vez podrían haberse correlacionado con la cantidad de células productoras de virus presentes en el cultivo en ambos momentos. Sin embargo, esta cantidad no disminuyó durante el curso de la infección, sino que el parámetro que se redujo en función del tiempo p.i. fue la cantidad de virus producido por célula productora, fenómeno debido a una brotación deficiente de la progenie viral. Esta situación se ha descrito para una línea de células Vero persistentemente infectada con JUNV, en la cual no fue posible recuperar virus en el sobrenadante y solo pudo ser aislado a partir de extractos celulares (Boxaca & Giovannello, 1977).

Durante el transcurso de la infección, la expresión de la nucleoproteína viral (N) y las glicoproteínas G1 y G2 fue continua, aunque con valores variables. Los niveles de expresión de las glicoproteínas, estimados de acuerdo al número de células (+) por IFI, se correlacionaron con los niveles de infectividad recuperada a partir de los sobrenadantes de las células K3. Por el contrario, en el caso de N, los porcentajes de células (+) para este antígeno no mostraron correlación con los niveles de virus producido. En este sentido, la reducción en la expresión de las glicoproteínas virales en la membrana de las células persistentemente infectadas ha sido descrita como una característica de este tipo de infecciones con arnavirus (Ellenberg et al., 2002, Oldstone & Buchmeier, 1982, van der Zeijst et al., 1983). Por otro lado, la expresión conjunta y simultánea de N y G1 en el citoplasma y la membrana de una misma célula, permite descartar la expresión alternativa de las mismas como mecanismo probable de restricción. Cabe destacar que en el caso de la expresión de N en las células K3, se detectó un patrón de fluorescencia citoplasmático granular similar al descrito para células Vero y BHK-21 persistentemente infectadas con JUNV y LCMV, respectivamente (Carballal et al., 1980, Ellenberg et al., 2002, van der Zeijst et al., 1983). Este patrón de expresión se correspondió con una acumulación de los

productos de degradación de N, tal como se describió en el caso de la proteína NS1 del virus de la encefalitis Japonesa (Chen et al., 1996).

Cuando se secuenciaron los genes de N y GPC a partir del ARN extraído de las células K3 se encontraron varios cambios nucleotídicos y aminoacídicos respecto del virus que originó la infección. La secuencia codificante de N mostró un cambio nucleotídico que resultó en el cambio del aminoácido básico K (lisina) por el aminoácido ácido E (ac. glutámico) en la posición 58 (K58E) de la secuencia aminoacídica de dicha proteína. El hecho de que la secuencia obtenida no presentara deleciones y la presencia de una banda de 64 kDa en los extractos celulares correspondiente la proteína entera, permite descartar la expresión de una proteína truncada como en el caso de la proteína NS1 del virus de la Encefalitis de Murray Valley durante la infección persistente del virus en células Vero o de la proteína P en la misma clase de infección del virus Sendai en células BHK-21, disminuyéndose así la expresión génica viral y favoreciendo el mantenimiento de la persistencia (Garcin et al., 1994, Lancaster et al., 1998). Por otro lado, la función antiterminadora de N (Tortorici et al., 2001) y su papel promotor de la replicación del genoma viral (Pinschewer et al., 2003) dependen de su interacción con el ARN viral, hecho que se encuentra favorecido debido a la carga (+) de esta proteína. El cambio de un aminoácido básico por uno ácido, como el aquí descrito, causaría una alteración en la carga neta de N, lo que podría afectar su interacción con el ARN viral y de esta manera alterar su función. También es posible que dicho cambio ocasionase una alteración conformacional en la proteína modificando su localización citoplasmática y cambiando su patrón de IFI, tal como se observa en el caso de las células K3. De manera similar a lo encontrado en este estudio, se ha descrito la alteración en la carga de la nucleoproteína durante la infección persistente *in vitro* del virus del sarampión (Boriskin Yu et al., 1986). También se ha estudiado la importancia de las cargas electroestáticas en las diferentes funciones de las proteínas virales, como en el caso de la pérdida de la función de unión al ARN y la homodimerización por la alteración de los aminoácidos básicos de la proteína NS1 del virus influenza (Wang et al., 1999). Asimismo, se ha encontrado que mutaciones en los residuos básicos de la proteína de la nucleocápside del virus de la leucemia de Moloney (MLV), que contiene motivos *zinc finger*, al igual que la proteína N de los arenavirus, reducen drásticamente la liberación de virus por parte de células infectadas (Muriaux et al., 2004). La nucleoproteína de los arenavirus contiene en su región amino terminal un segmento de cargas mixtas similar al de otras proteínas con capacidad de interacción con ácidos nucleicos. Es en esta región, que se identificó la mutación 58 (K58E) y probablemente dicha actividad se vea alterada durante la infección persistente de JUNV (Parisi et al., 1996). Es también posible que dicha alteración tenga un efecto en la disminución de la infectividad producida por las células K3. Cabe destacar que el aminoácido K en dicha posición en la secuencia aminoacídica de la proteína N de los

diferentes arenavirus se encuentra conservado o se hallan cambios por aminoácidos con propiedades similares, posiblemente indicando su importancia en la función biológica de la proteína (Albarino et al., 1997, Ghiringhelli et al., 1991).

En este estudio también se analizó la secuencia nucleotídica codificante de GPC encontrándose 3 mutaciones silenciosas. Asimismo, se encontró un cambio nucleotídico que resultó en el cambio del aminoácido R (arginina) por G (glicina) en la posición 243 (R243G) de la secuencia aminoacídica del precursor. Dicha posición es de relevancia biológica ya que ha sido descrita como perteneciente a la secuencia de reconocimiento de la proteasa celular SKI-1/S1P, responsable del procesamiento del precursor para dar origen a las dos glicoproteínas virales. Se ha descrito para GPC de JUNV, que el procesamiento inicial que da origen al péptido señal es llevado a cabo por una peptidasa celular y que las subunidades maduras de G1 y G2 son subsecuentemente generadas por la proteasa celular SKI-1/S1P. Ambos eventos de procesamiento, conjuntamente con la presencia del péptido señal miristoilado, son requeridos para que se observe fusión mediada por la glicoproteína viral (York et al., 2004). Empleando una línea celular deficiente en la proteasa SKI-1/S1P y mutantes del sitio de reconocimiento RRLA, se ha descrito para el virus LCMV, que el procesamiento no es requerido para la expresión de GPC en la membrana de las células infectadas pero es esencial en 3 pasos de la replicación del virus, la incorporación de las glicoproteínas a los viriones, la producción de partículas infecciosas y la propagación del virus célula-célula (Kunz et al., 2003). En el caso de LASV, mediante análisis mutacionales del tetra péptido RRLA, se reveló que el sitio consenso de reconocimiento es R-X-L donde X fue reemplazado por los aminoácidos con características similares L, I o V (Lenz et al., 2000). En el cultivo de células persistentemente infectadas, la secuencia aminoacídica de GPC presentó el tetrapéptido GRSL, similar al descrito como la secuencia consenso requerida para el procesamiento de GPC en LASV. En concordancia con esto, en las células K3 se observó la presencia de G1 en la membrana celular además de actividad fusogénica, por lo cual dicho cambio no afectaría la localización, transporte y funcionalidad de las glicoproteínas. Asimismo, la producción de progenie viral permite descartar que dicho cambio afecte la incorporación de las glicoproteínas a la partícula viral. Además, dichas partículas virales resultaron infectivas ya que infectaron células Vero susceptibles en el ensayo que permitió su cuantificación. Teniendo en cuenta estos resultados y además que la secuencia del tetrapeptido en el GPC del TCRV es GRTL, es probable que GPC sea procesado en las células K3 originando G1 y G2. En lo que respecta a la caracterización biológica del virus aislado a partir de células K3 se encontraron variantes virales de menor velocidad de multiplicación y acción citopatogénica reducida respecto de la cepa parental. A diferencia de lo observado para otros cultivos persistentemente infectados con arenavirus, no se detectaron mutantes *ts* (termosensibles) en cuanto a su replicación, pero sí se

podieron detectar variantes que se inactivaron de manera diferencial en respuesta a la temperatura. Durante la caracterización de diversos sistemas de células persistentemente infectadas con arenavirus, se ha observado la liberación de distintas clases de variantes virales incluyendo variantes termolábiles en concordancia a lo encontrado en este estudio. Se ha descrito además, una selección rápida y espontánea de variantes *ts* las cuales además fueron inactivadas más rápidamente que el virus salvaje (Damonte & Coto, 1979). También fue posible obtener mutantes *ts* a partir de células Vero persistentemente infectadas con TCRV, siendo dichas mutantes más virulentas en ratones y más citopatógenicas en células Vero que el virus salvaje (Coto et al., 1982). Asimismo, se ha observado que células MRC-5 infectadas persistentemente con JUNV, liberaron virus cuya virulencia resultó semejante al virus original aunque mostraron diferente morfología de placa y termosensibilidad (Weber et al., 1985).

Por otra parte, a partir de las células K3 se pudieron aislar 3 clones virales con comportamientos diferenciales respecto a su neutralización por un suero policlonal anti-JUNV. Dos de ellos fueron reconocidos con mayor afinidad por los anticuerpos, mientras que el restante fue resistente a ser neutralizado. En concordancia con estos resultados, se ha descrito la emergencia de poblaciones virales resistentes a ser neutralizadas a partir de cultivos celulares persistentemente infectados con JUNV, ya sean fibroblastos de embrión de *C. musculus* o células Vero, siendo necesario, en este último caso, el empleo de una presión selectiva de anticuerpos (Alche & Coto, 1993). En el caso de las células K3, el mecanismo de variación antigénica resultó independiente de la presencia de anticuerpos.

A fin de correlacionar las características diferenciales mostradas por los diferentes clones virales aislados, con cambios en el genoma de los mismos, se eligieron diferentes clones a fin de determinar la presencia de cambios a nivel nucleotídico tanto en la secuencia completa de N como así también en parte de la secuencia codificante de GPC. Es interesante notar, que se encontró un número bajo de mutaciones en las secuencias de virus obtenidos a partir de las células K3, respecto de XJCl<sub>3</sub>, hecho similar a lo encontrado para otro virus con genoma de ARN, el virus de la Hepatitis murina obtenido a partir de células DBT persistentemente infectadas (Chen & Baric, 1995). Todos los clones correspondientes al segundo aislamiento presentaron la mutación (K58E) en la secuencia aminoacídica de N, mientras que dicha secuencia en el clon perteneciente al primer aislamiento resultó idéntica a la del virus parental, lo que podría indicar, que el cambio ocurrió a tiempos tardíos del cultivo de células K3. La mutación K58E se correlacionaría entonces con el comportamiento de multiplicación restringida o crecimiento retrasado de los clones del segundo aislamiento. Se ha sugerido que la carga positiva total de N muestra una tendencia a disminuir de acuerdo a la atenuación de la cepa viral (Albarino et al., 1997, Enria & Barrera Oro, 2002). También se ha encontrado que mutaciones en la proteína de la nucleocápside del

coronavirus A59, que alteraron la carga de dicha proteína, redujeron la velocidad de crecimiento y el título alcanzado por el virus (Verma et al., 2006). En este trabajo de investigación también se analizó la secuencia de la región del GPC correspondiente a la región de reconocimiento por parte de la proteasa celular SKI-1/S1P en los clones del segundo aislamiento. El virus obtenido a partir de las células K3 presentó una población mixta de acuerdo a lo observado para la secuencia de GPC. Dado que se aislaron clones conteniendo la mutación R243G, se estudió la expresión en membrana de G1, la actividad fusogénica a bajo pH y el procesamiento de GPC en células Vero infectadas con dichos clones virales. No se encontraron diferencias en ninguno de los tres aspectos mencionados durante la infección de dichos clones respecto a los clones con la secuencia parental.

La resistencia parcial o total de los cultivos infectados a la sobreinfección con virus homólogos ha sido una característica distintiva de la infección persistente por arnavirus y fue observada en todos los cultivos persistentemente infectados estudiados hasta el momento. Asimismo, la falta de resistencia a la sobreinfección con virus heterólogos es también una característica común a dichos sistemas (Boxaca, 1970, D'Aiutolo & Coto, 1986, Damonte et al., 1979, Damonte et al., 1978, Damonte et al., 1983, Ellenberg et al., 2004, Gimenez & Compans, 1980, Help et al., 1976, Jacobson et al., 1979, Welsh & Buchmeier, 1979, Coto 1979, Coto 1977). Las células K3 mostraron resistencia parcial, no mediada por interferón, ni partículas D.I. a la sobreinfección con virus homólogo (JUNV) y antigénicamente relacionados (TCRV). Si bien una causa posible de esta resistencia podría ser la ausencia de células susceptibles a la multiplicación viral en el cultivo persistentemente infectado, dicha posibilidad podría descartarse en virtud de que luego de la sobreinfección ocurrió un aumento de la cantidad de células productoras por lo que la resistencia observada no sería debida a la presencia de un factor soluble que interfiera con la infección de nuevas células o la falta de células susceptibles en el cultivo.

A diferencia de lo descrito en otros sistemas de infección persistente, en los que se observó una regulación negativa de los receptores virales (Hirano et al., 1996, Michel et al., 2005, Yamate et al., 2005), JUNV y TCRV fueron capaces de adsorberse a las células K3 con una eficiencia levemente menor respecto de células BHK-21, hecho que podría deberse a un reciclado alterado del receptor viral de acuerdo con los resultados obtenidos al estudiar la internalización de la molécula de transferrina a las células K3.

La replicación del genoma del virus sobreinfectante se llevó a cabo más rápidamente en las células K3 que en las BHK-21, debido probablemente a la elevada cantidad de proteínas virales presentes en dichas células al momento de sobreinfectar, en particular de N, necesaria para dicho proceso (Lopez et al., 2001, Pinschewer et al., 2003). Se ha descrito que los efectos de una infección previa con JUNV sobre la replicación de TCRV son dependientes del tiempo transcurrido entre las dos infecciones. Mientras que la infección

simultánea de células RK13 con JUNV y TCRV no altera la eficiencia de plaqueo de TCRV, se observó un aumento en la replicación de TCRV si la sobreinfección con este virus se produce luego de 1-24 h. de una pre infección con JUNV (Damonte & Coto, 1985). Puede ser que este efecto sea el observado cuando se detecta más tempranamente la aparición de la cadena viral complementaria de TCRV en las células K3 respecto de células BHK-21, aunque las células persistentemente infectadas con JUNV posean luego alguna alteración en los pasos posteriores del ciclo de multiplicación del virus. Esta especulación se correlacionó con el hecho de que el porcentaje de células (+) para N no aumentó luego de la sobreinfección evidenciando un bloqueo marcado a nivel de la síntesis de antígenos virales. De todas maneras, el bloqueo a nivel de la síntesis proteica del virus sobreinfectante no explicaría el hecho de la mayor proporción de virus asociado a células observado para las células K3 comparativamente con las células BHK-21 infectadas de forma aguda. A este respecto se observó que los viriones producidos por las células K3 quedaban asociados a la membrana celular formando, en muchos casos, estructuras aberrantes, siendo, en consecuencia, la brotación otro de los pasos alterados que participan de la restricción en la multiplicación del virus sobreinfectante.

Se analizó entonces el rol de la proteína celular TSG101 (*Tumor susceptibility gene 101*) ya que la misma interviene en el transporte de proteínas desde la membrana plasmática y el aparato de Golgi. Cuando los endosomas maduran hacia los cuerpos multivesiculares (MVBs), las proteínas trans-membrana son incorporadas a vesículas que brotan hacia dentro de dichos cuerpos. Este proceso de biogénesis de vesículas depende de un conjunto de proteínas citoplasmáticas conocidas como proteínas de translocación vacuolar (Vps), siendo TSG101 una de ellas. Varias de estas proteínas se ensamblan en complejos requeridos para el transporte (ESCRTs), los cuales se asocian transitoriamente a la membrana endosomal. TSG101 forma parte del complejo ESCRT1 e interacciona con dominios P(T/S)AP, presentes en la proteína celular HRS (*Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*) (ESCRT0) o en diversas proteínas de matriz virales. Se ha observado que la brotación a partir de la membrana plasmática de algunos virus con genoma de ARN es un proceso topológicamente equivalente a la brotación de vesículas hacia el lumen de los MVBs. Recientemente, se han descripto las bases moleculares de los procesos que involucran a la célula hospedadora y los procesos tardíos del ciclo de multiplicación de HIV-1 que culminan con la liberación de la progenie viral a partir de la célula infectada (Fisher et al., 2007, von Schwedler et al., 2003). A este respecto, la alteración en el balance de la proteína TSG101 impide la brotación de HIV-1, alterando el “*pinching off*” del virus durante la brotación a partir de la célula infectada (Demirov et al., 2002, Goila-Gaur et al., 2003). De la misma manera, se ha comenzado a identificar proteínas componentes del sistema de

sorteado vacuolar, TSG101 y VPS4 como necesarias para el proceso de brotación de los arenavirus (Perez et al., 2003, Urata et al., 2006).

Los resultados obtenidos demostraron un aumento en la expresión de TSG101 en las células K3, como así también en clones celulares aislados a partir de las mismas que fueron resistentes a la sobreinfección. Los niveles de TSG101 pudieron reducirse utilizando un siARN favoreciéndose así la liberación de virus infeccioso al sobrenadante, tanto de las células K3 como de las K3 sobreinfectadas con JUNV. Este tratamiento con siARN no alteró significativamente la cantidad de virus total producida por el cultivo de células persistentemente infectadas, sobreinfectadas o no, indicando su participación en el paso de brotación del virus en las células K3. En lo que respecta a la interacción TSG101-proteína viral, se ha descrito que la sobre-expresión de su región N-terminal inhibe la brotación de HIV-1 bloqueando la función del dominio tardío PTAP presente en la región P6 de la proteína Gag, provocando una acumulación de viriones adyacentes a la membrana plasmática tal como se observó en las células K3. Este no fue el caso para el virus de la leucemia murina (MLV) el cual presenta el dominio tardío PPxY en la región p12 de su proteína Gag (Demirov et al., 2002). Asimismo, la sobre-expresión de TSG101 *full length* o como una proteína de fusión también inhibió la función del dominio tardío del péptido p6 de HIV-1 presumiblemente alterando la estequiometría del ESCRT1 (Carlton & Martin-Serrano, 2007, Goila-Gaur et al., 2003).

Dado que TSG101 interactúa con los dominios ricos en prolinas P(T/S)AP y también con una variación de los mismos, el dominio ASAP (Garrus et al., 2001) y que las proteínas Z de JUNV y TCRV poseen dominios PTAP y ASAP, respectivamente, podría ser que la alteración a nivel de brotación a causa de la expresión anormal de TSG101 afecte a estos virus y no a los virus LCMV y PICV los cuales en sus proteínas Z tienen dominios tardíos PPxY, similares al encontrado en la proteína M de VSV. Las proteínas de matriz con dominios PPxY interactuarían con otro factor celular a fin de llevar a cabo el proceso de brotación del virus a partir de la membrana de la célula infectada (Bouamr et al., 2003, Harty et al., 2000, Irie et al., 2004). En el caso específico de PICV, que en su proteína Z contiene los dominios tardíos PPxY y PTAP solapados de forma similar a los encontrados en la proteína VP40 del virus Ebola, y en el del virus linfotrópico humano 1 (HTLV1), una alteración en el motivo PTAP de estos virus produjo efectos poco marcados sobre la eficiencia de brotación, mientras que dicha eficiencia fue muy reducida cuando el dominio alterado fue PPxY, indicando que el dominio tardío PPxY resulta crítico en la producción de partículas virales (Bouamr et al., 2003, Neumann et al., 2005). Asimismo, se ha observado que la sobre-expresión de TSG101 provoca alteraciones en el reciclado para el receptor de transferrina que utilizaría JUNV para adsorberse al cultivo, por lo que resulta posible que los efectos observados en cuanto a la disminución en la eficiencia de adsorción de JUNV y

TCRV, como así también la acumulación del ligando marcado en un compartimento citoplasmático, se deban a la sobre-expresión de TSG101 en las células K3 (Babst et al., 2000, Doyotte et al., 2005, Razi & Futter, 2006).

Como puede observarse por lo aquí presentado, el mantenimiento de la persistencia de JUNV en células BHK-21 es un proceso complejo donde son varios los factores que interrelacionados permiten que el virus permanezca a través del tiempo en el cultivo celular. El control de la infección parece variar en función del tiempo, siendo durante el primer año p.i. responsables las partículas D.I. de la producción viral disminuida por parte del cultivo celular. Durante tiempos tardíos de la infección persistente de las células K3, proponemos que la infección persistente se mantendría por un estado refractario que adoptarían algunas células en el cultivo frente a la sobreinfección del virus. Este estado, sería, en parte, responsable por la sobre-expresión de la proteína celular TSG101, la cual interviene en el paso de brotación viral y también podría estar involucrada en el reciclado alterado del receptor viral, afectando la eficiencia de la adsorción del virus a las células K3.

Por otro lado, existiría otro mecanismo desconocido por el cual se limita la expresión de antígenos virales luego de la sobreinfección de virus homólogo.

Acompañando la evolución de las células del cultivo a un estado de semi permisividad, el virus adquiere cambios en su genoma, los cuales limitan su crecimiento y citopatogenicidad frente a diferentes cultivos celulares. En nuestro sistema, la participación de variantes *ts*, no parece ser el mecanismo responsable del mantenimiento de la infección persistente de JUNV en células BHK-21, pero es posible que virus con menor capacidad citolítica juegue un papel preponderante en el equilibrio dinámico que se establece entre el virus y la célula hospedadora en esta clase de infección. De acuerdo a las características de neutralización, crecimiento y termolabilidad, las células persistentemente infectadas podrían generar una población con mezclas fenotípicas durante la infección persistente de JUNV en células BHK-21. Aunque estos estudios deben ser completados, se puede evidenciar que la población viral y el fenotipo de las células ejercen diferentes presiones selectivas sobre el genoma de JUNV, resultando en la evolución y la acumulación de diferentes mutaciones que pueden tener un rol en la iniciación o el mantenimiento de la persistencia en las células K3.

La infección se mantendría por la infección o re infección de las células susceptibles en el cultivo por el virus con capacidad de crecimiento lento producido por las células infectadas, sumado a que posiblemente habría una partición del ARN viral durante la división celular al citoplasma de las células hijas, lo cual requeriría la funcionalidad de la proteína L del virus en el cultivo de células K3.

Los virus son parásitos obligados y como tales deben pagar el precio de perder su autonomía. ¿Quién tiene el control, la célula hospedadora o el virus? La respuesta depende

del patógeno y el hospedador pero el proceso de adaptación conlleva a un poco de ambos. En el modelo aquí presentado, se tiene en cuenta el papel preponderante que tienen los factores presentes en la célula hospedadora en asociación a factores intrínsecos del virus (Figura D1).

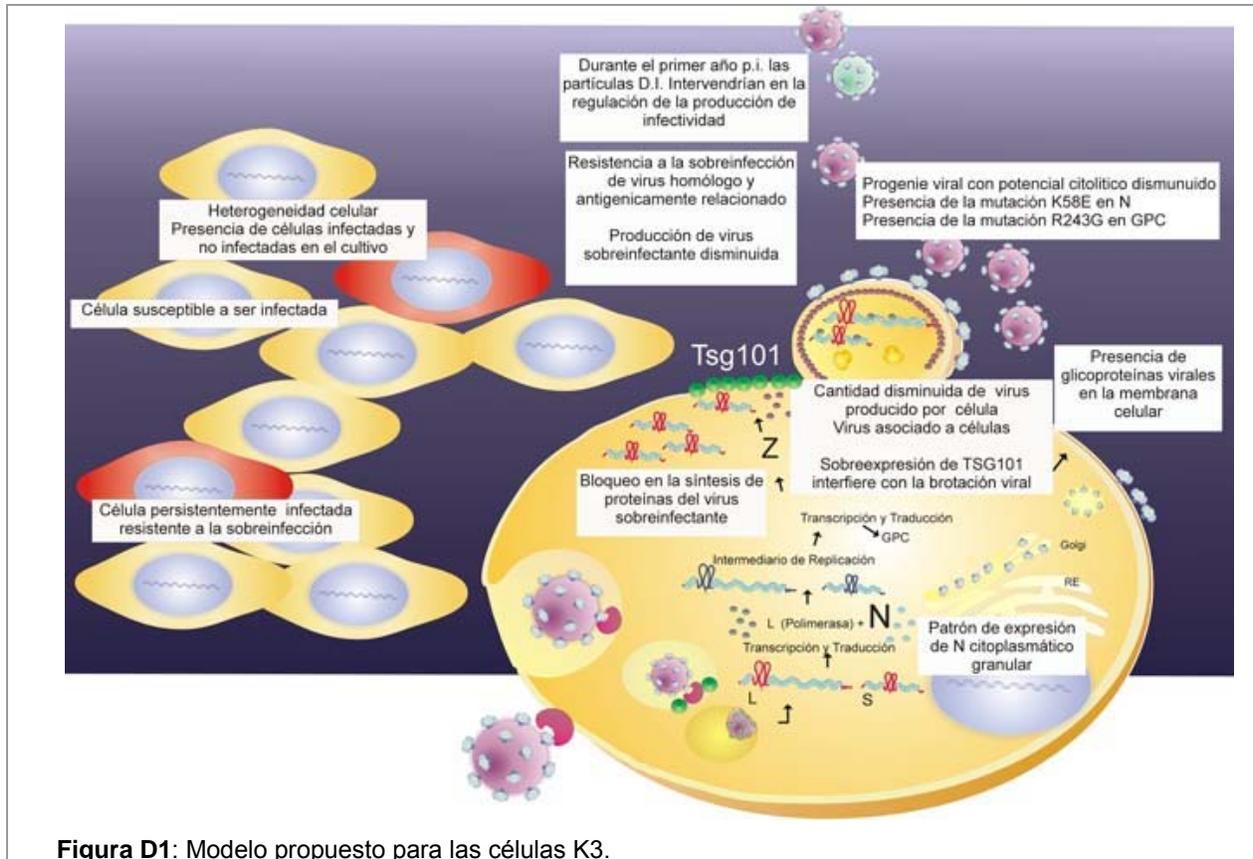


Figura D1: Modelo propuesto para las células K3.

*Paula C. Ellenberg*

Lic. Paula C. Ellenberg

Dr. Luis A. Scolaro

Adams, R. H. & Brown, D. T. (1985). BHK cells expressing Sindbis virus-induced homologous interference allow the translation of nonstructural genes of superinfecting virus. *J Virol* 54, 351-7.

Ahmed, R., Hahn, C. S., Somasundaram, T., Villarete, L., Matloubian, M. & Strauss, J. H. (1991). Molecular basis of organ-specific selection of viral variants during chronic infection. *J Virol* 65, 4242-7.

Ahmed, R., King, C. C. & Oldstone, M. B. (1987). Virus-lymphocyte interaction: T cells of the helper subset are infected with lymphocytic choriomeningitis virus during persistent infection in vivo. *J Virol* 61, 1571-6.

Ahmed, R., Salmi, A., Butler, L. D., Chiller, J. M. & Oldstone, M. B. (1984). Selection of genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistently infected mice. Role in suppression of cytotoxic T lymphocyte response and viral persistence. *J Exp Med* 160, 521-40.

Albarino, C. G., Ghiringhelli, P. D., Posik, D. M., Lozano, M. E., Ambrosio, A. M., Sanchez, A. & Romanowski, V. (1997). Molecular characterization of attenuated Junin virus strains. *J Gen Virol* 78 ( Pt 7), 1605-10.

Alche, L. E. & Coto, C. E. (1986). Antigenic variants of Junin virus isolated from infected *Calomys musculinus*. Brief report. *Arch Virol* 90, 343-8.

Alche, L. E. & Coto, C. E. (1988). Differentiation of Junin virus and antigenic variants isolated in vivo by kinetic neutralization assays. *J Gen Virol* 69 ( Pt 8), 2123-7.

Alche, L. E. & Coto, C. E. (1993). In vitro selection of Junin virus antigenic variants. *Arch Virol* 128, 389-94.

Auperin, D. D., Galinski, M. & Bishop, D. H. (1984). The sequences of the N protein gene and intergenic region of the S RNA of pichinde arenavirus. *Virology* 134, 208-19.

Avila, M. M., Frigerio, M. J., Weber, E. L., Rondinone, S., Samoilovich, S. R., Laguens, R. P., de Guerrero, L. B. & Weissenbacher, M. C. (1985). Attenuated Junin virus infection in *Callithrix jacchus*. *J Med Virol* 15, 93-100.

Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D. (2000). Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. *Traffic* 1, 248-58.

Beyer, W. R., Popplau, D., Garten, W., von Laer, D. & Lenz, O. (2003). Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J Virol* 77, 2866-72.

Borden, K. L., Campbell Dwyer, E. J. & Salvato, M. S. (1998). An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm. *J Virol* 72, 758-66.

Boriskin Yu, S., Bogomolova, N. N., Koptyaeva, I. B., Giraudon, P. & Wild, T. F. (1986). Measles virus persistent infection: modification of the virus nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 67 (Pt 9), 1979-85.

Borrow, P. & Oldstone, M. B. (1994). Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells. *Virology* 198, 1-9.

Borzakian, S., Pelletier, I., Calvez, V. & Colbere-Garapin, F. (1993). Precise missense and silent point mutations are fixed in the genomes of poliovirus mutants from persistently infected cells. *J Virol* 67, 2914-7.

Bouamr, F., Melillo, J. A., Wang, M. Q., Nagashima, K., de Los Santos, M., Rein, A. & Goff, S. P. (2003). PPPYVEPTAP motif is the late domain of human T-cell leukemia virus type 1 Gag and mediates its functional interaction with cellular proteins Nedd4 and Tsg101 [corrected]. *J Virol* 77, 11882-95.

Bowen, M. D., Peters, C. J. & Nichol, S. T. (1996). The phylogeny of New World (Tacaribe complex) arenaviruses. *Virology* 219, 285-90.

Bowen, M. D., Peters, C. J. & Nichol, S. T. (1997). Phylogenetic analysis of the Arenaviridae: patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent hosts. *Mol Phylogenet Evol* 8, 301-16.

Boxaca, M. C. & Giovanniello, O. A. (1977). [Vero cells persistently infected with Junin virus. II. Isolation of the virus]. *Medicina (B Aires)* 37, 112-21.

Boxaca, M. C. (1970). [Establishment and characteristics of a subline of Vero cells persistently infected with Junin virus]. *Medicina (B Aires)* 30, Suppl 1:50-61.

Boxaca, M. C., Savy, V. L. & Giovanniello, O. A. (1972). [Vero cells persistently infected with Junin virus. I. Behavior of the Vero IR 58 cell line after superinfection with 2 strains of Junin virus]. *Medicina (B Aires)* 32, 269-80.

Breiner, K. M., Urban, S., Glass, B. & Schaller, H. (2001). Envelope protein-mediated down-regulation of hepatitis B virus receptor in infected hepatocytes. *J Virol* 75, 143-50.

Buchmeier, M. J. (2002). Arenaviruses: protein structure and function. *Curr Top Microbiol Immunol* 262, 159-73.

Buchmeier, M. J., Welsh, R. M., Dutko, F. J. & Oldstone, M. B. (1980). The virology and immunobiology of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Adv Immunol* 30, 275-331.

Burnet, F.M. & Fenner, F. The production of Antibodies (ed. Burnet, F.M.) 1-142 (MacMillan, New York, 1949).

Burns, J. & Buchmeier, M. (1993). Glycoproteins of the Arenaviruses. *The Viruses*. Wagner, R. & Frankel Conrat, H. Eds.. Plenum Press, New York. pp. 17-31

Candurra, N. A. & Damonte, E. B. (1985). Influence of cellular functions on the evolution of persistent infections with Junin virus. *Arch Virol* 86, 275-82.

Candurra, N. A., Lago, M. J., Maskin, L. & Damonte, E. B. (1999). Involvement of the cytoskeleton in Junin virus multiplication. *J Gen Virol* 80 ( Pt 1), 147-56.

Cao, W., Oldstone, M. B. & De La Torre, J. C. (1997). Viral persistent infection affects both transcriptional and posttranscriptional regulation of neuron-specific molecule GAP43. *Virology* 230, 147-54.

Carballal, G. & Oubiña, J. (1991). Familia Arenaviridae y otras productoras de fiebres hemorrágicas. *Virología Medica*. Cap 11:167-185, ed. Ateneo, Buenos Aires.

Carballal, G., Cossio, P. M., Oubina, J. R., de la Vega, M. T., Nagle, C., Casanova, M. B., Gonzalez, P. H. & Arana, R. M. (1983). [Experimental infection of a South American primate, the *Cebus* sp, with XJ strain of Junin virus]. *Medicina (B Aires)* 43, 639-46.

Carballal, G., Cossio, P. M., Rabinovich, A., Oubina, J. & Arana, R. M. (1980). Description of a BHK/21 cell line persistently infected with Junin virus: its use in diagnostic procedures. *Intervirology* 14, 173-9.

Carlton, J. G. & Martin-Serrano, J. (2007). Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* 316, 1908-12.

Carter, C. A. (2002). Tsg101: HIV-1's ticket to ride. *Trends Microbiol* 10, 203-5.

Castilla, V. & Enria, D. (2006). Arenaviridae. *Microbiología biomedical*. Basualdo, A.; Coto, C.; De Torres, R. Eds. Editorial Atlante, Buenos Aires. Pp. 998-1013.

Castilla, V., Mersich, S. E., Candurra, N. A. & Damonte, E. B. (1994). The entry of Junin virus into Vero cells. *Arch Virol* 136, 363-74.

Cave, D. R., Hendrickson, F. M. & Huang, A. S. (1985). Defective interfering virus particles modulate virulence. *J Virol* 55, 366-73.

Charrel, R. N. & de Lamballerie, X. (2003). Arenaviruses other than Lassa virus. *Antiviral Res* 57, 89-100.

Charrel, R. N., Lemasson, J. J., Garbutt, M., Khelifa, R., De Micco, P., Feldmann, H. & de Lamballerie, X. (2003). New insights into the evolutionary relationships between arenaviruses provided by comparative analysis of small and large segment sequences. *Virology* 317, 191-6.

Chen, C., Weisz, O. A., Stolz, D. B., Watkins, S. C. & Montelaro, R. C. (2004). Differential effects of actin cytoskeleton dynamics on equine infectious anemia virus particle production. *J Virol* 78, 882-91.

Chen, L. K., Liao, C. L., Lin, C. G., Lai, S. C., Liu, C. I., Ma, S. H., Huang, Y. Y. & Lin, Y. L. (1996). Persistence of Japanese encephalitis virus is associated with abnormal expression of the nonstructural protein NS1 in host cells. *Virology* 217, 220-9.

Chen, W. & Baric, R. S. (1995). Function of a 5'-end genomic RNA mutation that evolves during persistent mouse hepatitis virus infection in vitro. *J Virol* 69, 7529-40.

Chen, W. J., Chen, S. L. & Fang, A. H. (1994). Phenotypic characteristics of dengue 2 virus persistently infected in a C6/36 clone of *Aedes albopictus* cells. *Intervirology* 37, 25-30.

Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-9.

Chuang, H. C., Lay, J. D., Chuang, S. E., Hsieh, W. C., Chang, Y. & Su, I. J. (2007). Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 down-regulates tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptor-1 and confers resistance to TNF-alpha-induced apoptosis in T cells: implication for the progression to T-cell lymphoma in EBV-associated hemophagocytic syndrome. *Am J Pathol* 170, 1607-17.

Clegg, J. C. (2002). Molecular phylogeny of the arenaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 262, 1-24.

Compans, R. (1993). Arenavirus ultrastructure and morphogenesis. *The Viruses*. Wagner, R. & Frankel Conrat, H. Eds.. Plenum Press, New York. pp. 3-14

Conti, C., De Marco, A., Mastromarino, P., Tomao, P. & Santoro, M. G. (1999). Antiviral effect of hyperthermic treatment in rhinovirus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 822-9.

Cordo, S. M. & Candurra, N. A. (2003). Intermediate filament integrity is required for Junin virus replication. *Virus Res* 97, 47-55.

Cornu, T. I. & de la Torre, J. C. (2001). RING finger Z protein of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) inhibits transcription and RNA replication of an LCMV S-segment minigenome. *J Virol* 75, 9415-26.

Cornu, T. I. & de la Torre, J. C. (2002). Characterization of the arenavirus RING finger Z protein regions required for Z-mediated inhibition of viral RNA synthesis. *J Virol* 76, 6678-88.

Coto, C. E., De Vombergar, M. D. & De Tkaczewski, L. Z. (1970). [Interaction of Junin virus with monkey kidney cells]. *Medicina (B Aires)* 30, Suppl 1:38-44.

Coto, C., Damonte, E., Alche, L., Scolaro, L. (1993). Genetic variation in Junin virus. *The Viruses*. Wagner, R. & Frankel Conrat, H. Eds.. Plenum Press, New York. pp. 17-31

Coto, C., Damonte, E., Help, G., Leon, M. (1977). Infección crónica con virus Junin. *Medicina* 37; Supl. 3, 39-45.

Coto, C., Leon, M., Peralta, L., Help, G., Laguens, R. (1979). Induction of infectious virus and viral surface antigen in Vero cells persistently infected with Junin virus. *Humoral Immunity in Neurological Diseases*. Karcher, D., Lowenthal, A., and Strosberg, A. Eds. Plenum Publishing Corporation.

Coto, C., Vidal, M.C., D'Aiutolo, M.C., Damonte, E. (1982). Selection of Spontaneous ts Mutants of Junin and Tacaribe viruses in persistent infections. *The Replication of Negative strand viruses*. Bishop, D. & Compans, E., Eds.

Coulombie, F. C., Laguens, R. M. & Coto, C. E. (1986). Administration of antithymocyte serum modifies the response of *Calomys musculinus* to junin virus infection. *Intervirology* 25, 56-60.

D'Aiutolo, A. C. & Coto, C. E. (1986). Vero cells persistently infected with Tacaribe virus: role of interfering particles in the establishment of the infection. *Virus Res* 6, 235-44.

Damonte, E. B. & Coto, C. E. (1979). Temperature sensitivity of the arenavirus junin isolated from persistently infected Vero cells. *Intervirology* 11, 282-7.

Damonte, E. B. & Coto, C. E. (1985). Interactions of Junin and Tacaribe viruses during mixed infections. *Intervirology* 23, 1-7.

Damonte, E. B., D'Aiutolo, A. C. & Coto, C. E. (1981). Persistent infection of Vero cells with Tacaribe virus. *J Gen Virol* 56, 41-8.

Damonte, E. B., de Salum, S. B., Larripa, I. & Coto, C. E. (1979). [Virological and cytogenetic characteristics of Vero cells persistently infected with Tacaribe virus]. *Medicina (B Aires)* 39, 589-96.

Damonte, E. B., Mersich, S. E. & Coto, C. E. (1978). [Viral susceptibility of Vero cells persistently infected with Arenavirus: apparent formation of pseudotypes]. *Rev Asoc Argent Microbiol* 10, 78-81.

Damonte, E. B., Mersich, S. E. & Coto, C. E. (1983). Response of cells persistently infected with arenaviruses to superinfection with homotypic and heterotypic viruses. *Virology* 129, 474-8.

De Guerrero, L. B., Boxaca, M., Weissenbacher, M. & Frigerio, M. J. (1977). [Experimental infection of the guinea pig with Junin virus. Clinical picture, dissemination, and elimination of the virus]. *Medicina (B Aires)* 37, 271-8.

De Guerrero, L. B., Weissenbacher, M. C. & Parodi, A. S. (1969). [Immunization against Argentinian hemorrhagic fever using an attenuated strain of Junin virus. I. Modified strain of Junin virus. Immunization of guinea pigs]. *Medicina (B Aires)* 29, 1-5.

De la Torre, J. C. & Oldstone, M. B. (1992). Selective disruption of growth hormone transcription machinery by viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9939-43.

De la Torre, J. C. (2005). Arenavirus extinction through lethal mutagenesis. *Virus Res* 107, 207-14.

De la Torre, J. C., Mallory, M., Brot, M., Gold, L., Koob, G., Oldstone, M. B. & Masliah, E. (1996). Viral persistence in neurons alters synaptic plasticity and cognitive functions without destruction of brain cells. *Virology* 220, 508-15.

Demirov, D. G., Ono, A., Orenstein, J. M. & Freed, E. O. (2002). Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 955-60.

Di Simone, C. & Buchmeier, M. J. (1995). Kinetics and pH dependence of acid-induced structural changes in the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein complex. *Virology* 209, 3-9.

Di Simone, C., Zandonatti, M. A. & Buchmeier, M. J. (1994). Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike. *Virology* 198, 455-65.

Djavani, M., Lukashevich, I. S., Sanchez, A., Nichol, S. T. & Salvato, M. S. (1997). Completion of the Lassa fever virus sequence and identification of a RING finger open reading frame at the L RNA 5' End. *Virology* 235, 414-8.

Doyle, M. V. & Oldstone, M. B. (1978). Interactions between viruses and lymphocytes. I. In vivo replication of lymphocytic choriomeningitis virus in mononuclear cells during both chronic and acute viral infections. *J Immunol* 121, 1262-9.

Doyotte, A., Russell, M. R., Hopkins, C. R. & Woodman, P. G. (2005). Depletion of TSG101 forms a mammalian "Class E" compartment: a multicisternal early endosome with multiple sorting defects. *J Cell Sci* 118, 3003-17.

Dutko, F. J. & Pfau, C. J. (1978). Arenavirus defective interfering particles mask the cell-killing potential of standard virus. *J Gen Virol* 38, 195-208.

Eichler, R., Strecker, T., Kolesnikova, L., ter Meulen, J., Weissenhorn, W., Becker, S., Klenk, H. D., Garten, W. & Lenz, O. (2004). Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP). *Virus Res* 100, 249-55.

Ellenberg, P., Edreira, M. & Scolaro, L. (2004). Resistance to superinfection of Vero cells persistently infected with Junin virus. *Arch Virol* 149, 507-22.

Ellenberg, P., Edreira, M., Lozano, M. & Scolaro, L. (2002). Synthesis and expression of viral antigens in Vero cells persistently infected with Junin virus. *Arch Virol* 147, 1543-57.

Enria, D. A. & Barrera Oro, J. G. (2002). Junin virus vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* 263, 239-61.

Eschli, B., Quirin, K., Wepf, A., Weber, J., Zinkernagel, R. & Hengartner, H. (2006). Identification of an N-terminal trimeric coiled-coil core within arenavirus glycoprotein 2 permits assignment to class I viral fusion proteins. *J Virol* 80, 5897-907.

Evans, C. F., Redwine, J. M., Patterson, C. E., Askovic, S. & Rall, G. F. (2002). LCMV and the central nervous system: uncovering basic principles of CNS physiology and virus-induced disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 263, 177-95.

Fields, B., Knipe, D., Howley, P. (1996) *Fundamental Virology*. Third edition. Lippcot-Raven.

Fisher, R. D., Chung, H. Y., Zhai, Q., Robinson, H., Sundquist, W. I. & Hill, C. P. (2007). Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell* 128, 841-52.

Flint, S., Enquist, L., Krug, R., Racaniello, V., Skalka, A. (2000). *Principles of Virology and Molecular Biology, Pathogenesis and Control*. ASM Press, USA.

Francis, S. J. & Southern, P. J. (1988). Deleted viral RNAs and lymphocytic choriomeningitis virus persistence in vitro. *J Gen Virol* 69 ( Pt 8), 1893-902.

Frigerio, M. J., Rondinone, S. N., Laguens, R. P., Calello, M. A., Meckert, P. M., Colillas, O. & Weissenbacher, M. C. (1982). [Infection of New World primates with Junin virus: III. *Saimiri sciureus*]. *Medicina (B Aires)* 42, 519-25.

Gallaher, W. R., DiSimone, C. & Buchmeier, M. J. (2001). The viral transmembrane superfamily: possible divergence of Arenavirus and Filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor. *BMC Microbiol* 1, 1.

Garcin, D., De Melo, M., Roux, L., Kolakofsky, D. & Curran, J. (1994). Presence of a truncated form of the Sendai virus P protein in a long-term persistent infection: implications for the maintenance of the persistent state. *Virology* 201, 19-25.

Garcin, D., Rochat, S. & Kolakofsky, D. (1993). The Tacaribe arenavirus small zinc finger protein is required for both mRNA synthesis and genome replication. *J Virol* 67, 807-12.

Garrus, J. E., von Schwedler, U. K., Pornillos, O. W., Morham, S. G., Zavitz, K. H., Wang, H. E., Wettstein, D. A., Stray, K. M., Cote, M., Rich, R. L., Myszka, D. G. & Sundquist, W. I. (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107, 55-65.

Ghazal, P., Gonzalez Armas, J. C., Garcia-Ramirez, J. J., Kurz, S. & Angulo, A. (2000). Viruses: hostages to the cell. *Virology* 275, 233-7.

Ghiringhelli, P. D., Rivera-Pomar, R. V., Lozano, M. E., Grau, O. & Romanowski, V. (1991). Molecular organization of Junin virus S RNA: complete nucleotide sequence, relationship with other members of the Arenaviridae and unusual secondary structures. *J Gen Virol* 72 ( Pt 9), 2129-41.

Gimenez, H. B. & Compans, R. W. (1980). Defective interfering Tacaribe virus and persistently infected cells. *Virology* 107, 229-39.

Goila-Gaur, R., Demirov, D. G., Orenstein, J. M., Ono, A. & Freed, E. O. (2003). Defects in human immunodeficiency virus budding and endosomal sorting induced by TSG101 overexpression. *J Virol* 77, 6507-19.

Gonzalez, P. H., Lampuri, J. S., Coto, C. E. & Laguens, R. P. (1982). In vitro infection of murine macrophages with Junin virus. *Infect Immun* 35, 356-8.

Hahm, B., Trifilo, M. J., Zuniga, E. I. & Oldstone, M. B. (2005). Viruses evade the immune system through type I interferon-mediated STAT2-dependent, but STAT1-independent, signaling. *Immunity* 22, 247-57.

Han, Z. & Harty, R. N. (2005). Packaging of actin into Ebola virus VLPs. *Virol J* 2, 92.

Hans, A., Syan, S., Crosio, C., Sassone-Corsi, P., Brahic, M. & Gonzalez-Dunia, D. (2001). Borna disease virus persistent infection activates mitogen-activated protein kinase and blocks neuronal differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem* 276, 7258-65.

Harty, R. N., Brown, M. E., Wang, G., Huibregtse, J. & Hayes, F. P. (2000). A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13871-6.

Hass, M., Westerkofsky, M., Muller, S., Becker-Ziaja, B., Busch, C. & Gunther, S. (2006). Mutational Analysis of the Lassa Virus Promoter. *J Virol*.

Help, G. I., Leon, M. E. & Coto, C. E. (1976). [Interference associated with cell cultures chronical by infected with the Junin virus]. *Rev Asoc Argent Microbiol* 8, 45-53.

Hirano, A., Yant, S., Iwata, K., Korte-Sarfaty, J., Seya, T., Nagasawa, S. & Wong, T. C. (1996). Human cell receptor CD46 is down regulated through recognition of a membrane-proximal region of the cytoplasmic domain in persistent measles virus infection. *J Virol* 70, 6929-36.

Holland, J. J. & Villarreal, L. P. (1974). Persistent noncytotoxic vesicular stomatitis virus infections mediated by defective T particles that suppress virion transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 2956-60.

Hotchin, J. (1974). Cyclical phenomena in persistent virus infection. *J Reticuloendothel Soc* 15, 304-11.

Howard, C. (1993). Antigenic Diversity among Arenavirus. *The Viruses*. Wagner, R. & Frankel Conrat, H. Eds.. Plenum Press, New York. pp. 37-46

Howard, C. R., Lewicki, H., Allison, L., Salter, M. & Buchmeier, M. J. (1985). Properties and characterization of monoclonal antibodies to Tacaribe virus. *J Gen Virol* 66 ( Pt 7), 1383-95.

Huang, A. S. (1973). Defective interfering viruses. *Annu Rev Microbiol* 27, 101-17.

Huang, A. S., Rao, D. D. & Lanman, G. (1980). Defective interfering particles of vesicular stomatitis virus: structure-function relationships. *Ann N Y Acad Sci* 354, 238-50.

Iapalucci, S., Chernavsky, A., Rossi, C., Burgin, M. J. & Franze-Fernandez, M. T. (1994). Tacaribe virus gene expression in cytopathic and non-cytopathic infections. *Virology* 200, 613-22.

Irie, T., Licata, J. M., McGettigan, J. P., Schnell, M. J. & Harty, R. N. (2004). Budding of PPxY-containing rhabdoviruses is not dependent on host proteins TGS101 and VPS4A. *J Virol* 78, 2657-65.

Ishida, Y., Hiraki, A., Hirayama, E., Koga, Y. & Kim, J. (2002). Temperature-sensitive viral infection: inhibition of hemagglutinating virus of Japan (Sendai virus) infection at 41 degrees. *Intervirology* 45, 125-35.

Jacamo, R., Lopez, N., Wilda, M. & Franze-Fernandez, M. T. (2003). Tacaribe virus Z protein interacts with the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis. *J Virol* 77, 10383-93.

Jacobson, S., Dutko, F. J. & Pfau, C. J. (1979). Determinants of spontaneous recovery and persistence in MDCK cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Gen Virol* 44, 113-22.

Khvalevsky, E., Rivkin, L., Rachmilewitz, J., Galun, E. & Giladi, H. (2007). TLR3 signaling in a hepatoma cell line is skewed towards apoptosis. *J Cell Biochem* 100, 1301-12.

Klenerman, P., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (1997). A non-retroviral RNA virus persists in DNA form. *Nature* 390, 298-301.

Kunz, S., Edelmann, K. H., de la Torre, J. C., Gorney, R. & Oldstone, M. B. (2003). Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions. *Virology* 314, 168-78.

Lancaster, M. U., Hodgetts, S. I., Mackenzie, J. S. & Urosevic, N. (1998). Characterization of defective viral RNA produced during persistent infection of Vero cells with Murray Valley encephalitis virus. *J Virol* 72, 2474-82.

Lascano, E. F., Berria, M. I., Avila, M. M. & Weissenbacher, M. C. (1989). Astrocytic reaction predominance in chronic encephalitis of Junin virus-infected rats. *J Med Virol* 29, 327-33.

Lee, K. J., Novella, I. S., Teng, M. N., Oldstone, M. B. & de La Torre, J. C. (2000). NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *J Virol* 74, 3470-7.

Lehmann-Grube, F., Slenczka, W. & Tees, R. (1969). A persistent and inapparent infection of L cells with the virus of lymphocytic choriomeningitis. *J Gen Virol* 5, 63-81.

Lenz, O., ter Meulen, J., Feldmann, H., Klenk, H. D. & Garten, W. (2000). Identification of a novel consensus sequence at the cleavage site of the Lassa virus glycoprotein. *J Virol* 74, 11418-21.

Lenz, O., ter Meulen, J., Klenk, H. D., Seidah, N. G. & Garten, W. (2001). The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12701-5.

Lin, W., Kim, S. S., Yeung, E., Kamegaya, Y., Blackard, J. T., Kim, K. A., Holtzman, M. J. & Chung, R. T. (2006). Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *J Virol* 80, 9226-35.

Lopez, N. & Franze-Fernandez, M. T. (2007). A single stem-loop structure in Tacaribe arenavirus intergenic region is essential for transcription termination but is not required for a correct initiation of transcription and replication. *Virus Res* 124, 237-44.

Lopez, N., Jacamo, R. & Franze-Fernandez, M. T. (2001). Transcription and RNA replication of tacaribe virus genome and antigenome analogs require N and L proteins: Z protein is an inhibitor of these processes. *J Virol* 75, 12241-51.

Lukashevich, I. S. (1992). Generation of reassortants between African arenaviruses. *Virology* 188, 600-5.

Luquin, E., Larrea, E., Civeira, M. P., Prieto, J. & Aldabe, R. (2007). HCV structural proteins interfere with interferon-alpha Jak/STAT signalling pathway. *Antiviral Res* 76, 194-7.

Lusso, P. (2006). HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape. *J Clin Virol* 37 Suppl 1, S4-10.

Maiztegui, J. & Sabattini, M. (1977). Extensión progresiva del área endémica de la fiebre hemorrágica argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 37, 162-166.

Maiztegui, J. I., McKee, K. T., Jr., Barrera Oro, J. G., Harrison, L. H., Gibbs, P. H., Feuillade, M. R., Enria, D. A., Briggiler, A. M., Levis, S. C., Ambrosio, A. M., Halsey, N. A. & Peters, C. J.

(1998). Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine hemorrhagic fever. AHF Study Group. *J Infect Dis* 177, 277-83.

Malumbres, E., Boxaca, M. C., de Guerrero, L. B., Berria, M. I. & Lascano, E. F. (1984). Persistence of attenuated Junin virus strains in guinea pigs infected by IM or IC routes. *J Infect Dis* 149, 1022.

Matloubian, M., Kolhekar, S. R., Somasundaram, T. & Ahmed, R. (1993). Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 67, 7340-9.

Meyer, B. J. & Southern, P. J. (1997). A novel type of defective viral genome suggests a unique strategy to establish and maintain persistent lymphocytic choriomeningitis virus infections. *J Virol* 71, 6757-64.

Meyer, B. J., de la Torre, J. C. & Southern, P. J. (2002). Arenaviruses: genomic RNAs, transcription, and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 262, 139-57.

Michel, N., Allespach, I., Venzke, S., Fackler, O. T. & Keppler, O. T. (2005). The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. *Curr Biol* 15, 714-23.

Mizutani, T., Fukushi, S., Saijo, M., Kurane, I. & Morikawa, S. (2005). JNK and PI3k/Akt signaling pathways are required for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *Biochim Biophys Acta* 1741, 4-10.

Moffat, K., Howell, G., Knox, C., Belsham, G. J., Monaghan, P., Ryan, M. D. & Wileman, T. (2005). Effects of foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins on the structure and function of the early secretory pathway: 2BC but not 3A blocks endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *J Virol* 79, 4382-95.

Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H. & Zinkernagel, R. M. (1993). Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 362, 758-61.

Muriaux, D., Costes, S., Nagashima, K., Mirro, J., Cho, E., Lockett, S. & Rein, A. (2004). Role of murine leukemia virus nucleocapsid protein in virus assembly. *J Virol* 78, 12378-85.

Neuman, B. W., Adair, B. D., Burns, J. W., Milligan, R. A., Buchmeier, M. J. & Yeager, M. (2005). Complementarity in the supramolecular design of arenaviruses and retroviruses revealed by electron cryomicroscopy and image analysis. *J Virol* 79, 3822-30.

Neumann, G., Ebihara, H., Takada, A., Noda, T., Kobasa, D., Jasenosky, L. D., Watanabe, S., Kim, J. H., Feldmann, H. & Kawaoka, Y. (2005). Ebola virus VP40 late domains are not essential for viral replication in cell culture. *J Virol* 79, 10300-7.

Ogura, H., Sato, H. & Hatano, M. (1984). Relation of HVJ (Sendai virus) production to cell growth phase in persistently infected mouse 3T3 cells. *Arch Virol* 80, 47-57.

Oldstone, M. B. & Buchmeier, M. J. (1982). Restricted expression of viral glycoprotein in cells of persistently infected mice. *Nature* 300, 360-2.

Oldstone, M. B. (1989). Viral persistence. *Cell* 56, 517-20.

Oldstone, M. B. (2002). Biology and pathogenesis of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 263, 83-117.

Oldstone, M. B. (2006). Viral persistence: parameters, mechanisms and future predictions. *Virology* 344, 111-8.

Oubina, J. R., Videla, C. M. & Carballal, G. (1984). [Lack of viral persistence in 2 *Cebus* sp]. *Rev Argent Microbiol* 16, 107-10.

Parisi, G., Echave, J., Ghiringhelli, D. & Romanowski, V. (1996). Computational characterisation of potential RNA-binding sites in arenavirus nucleocapsid proteins. *Virus Genes* 13, 247-54.

Parodi, A. S., Greenway, D. J., Rugiero, H. R., Frigerio, M., De La Barrera, J. M., Mettler, N., Garzon, F., Boxaca, M., Guerrero, L. & Nota, N. (1958). [Concerning the epidemic outbreak in Junin.]. *Dia Med* 30, 2300-1.

Pasian, E. L., Fernandez Cobo, M., Padula, P. J., De Mitri, M. I. & Martinez Segovia, Z. M. (1983). Presence of actin in Junin virus. *Comunicaciones Biológicas* 2, 25-30.

Pauza, C. D., Galindo, J. & Richman, D. D. (1988). Human immunodeficiency virus infection of monoblastoid cells: cellular differentiation determines the pattern of virus replication. *J Virol* 62, 3558-64.

Perez, M., Craven, R. C. & de la Torre, J. C. (2003). The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12978-83.

Perez, M., Greenwald, D. L. & de la Torre, J. C. (2004). Myristoylation of the RING finger Z protein is essential for arenavirus budding. *J Virol* 78, 11443-8.

Peters C.J., Buchmeier M., Rollin P.E., Ksiazek T.G. 1996a. Arenaviruses. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Melnick, J.L., Monath, T.P., Roizman, R., Straus, S.E. (Eds.), *Fields Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, pp. 1521–1551.

Pinschewer, D. D., Perez, M. & de la Torre, J. C. (2003). Role of the virus nucleoprotein in the regulation of lymphocytic choriomeningitis virus transcription and RNA replication. *J Virol* 77, 3882-7.

Pinschewer, D. D., Perez, M. & de la Torre, J. C. (2005). Dual role of the lymphocytic choriomeningitis virus intergenic region in transcription termination and virus propagation. *J Virol* 79, 4519-26.

Pirosky, I. (1959). Virosis hemorrágica del noroeste bonaerense (Endemoepidémica, febril, enantemática y leucopénica). *Orient.Med.* 8: 171.

Rabinovich, R. D., Lascano, E. F. & Boxaca, M. C. (1987). Junin virus persistence in mice. *Acta Virol* 31, 86-90.

Radoshitzky, S. R., Abraham, J., Spiropoulou, C. F., Kuhn, J. H., Nguyen, D., Li, W., Nagel, J., Schmidt, P. J., Nunberg, J. H., Andrews, N. C., Farzan, M. & Choe, H. (2007). Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature*.

Rao, D. D. & Huang, A. S. (1980). RNA synthesis of vesicular stomatitis virus. X. Transcription and replication by defective interfering particles. *J Virol* 36, 756-65.

Rao, D. D. & Huang, A. S. (1982). Interference among defective interfering particles of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 41, 210-21.

Razi, M. & Futter, C. E. (2006). Distinct roles for Tsg101 and Hrs in multivesicular body formation and inward vesiculation. *Mol Biol Cell* 17, 3469-83.

Rice, J. M. & Wolff, D. A. (1978). Establishment of a persistent measles virus infection in HEp-2 cells. *Microbios* 18, 179-88.

Rima, B. K. & Duprex, W. P. (2005). Molecular mechanisms of measles virus persistence. *Virus Res* 111, 132-47.

Riviere, Y., Ahmed, R. & Oldstone, M. B. (1986). The use of lymphocytic choriomeningitis virus reassortants to map viral genes causing virulence. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 175, 191-2.

Rodas, J., Salvato, M. (2006). Tales of mice and men: Natural History of Arenaviruses. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* Vol. 19:4.

Romanowski, V. & Bishop, D. H. (1983). The formation of arenaviruses that are genetically diploid. *Virology* 126, 87-95.

Romanowski, V. (1993). Genetic Organization of Junin virus, the Etiological Agent of Argentine Hemorrhagic Fever. *The Viruses*. Wagner, R. & Frankel Conrat, H. Eds.. Plenum Press, New York. pp. 51-78.

Rowe, W. P., Murphy, F. A., Bergold, G. H., Casals, J., Hotchin, J., Johnson, K. M., Lehmann-Grube, F., Mims, C. A., Traub, E. & Webb, P. A. (1970a). Arenaviruses: proposed name for a newly defined virus group. *J Virol* 5, 651-2.

Rowe, W. P., Pugh, W. E., Webb, P. A. & Peters, C. J. (1970b). Serological relationship of the Tacaribe complex of viruses to lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 5, 289-92.

Rugiero, H. R., Astarloa, L., Gonzalez Cambaceres, C., Maglio, F. & Squassi, G. (1969). [Immunization against Argentina hemorrhagic fever using a strain attenuated Junin virus. II. Immunization of volunteers, clinical and laboratory analysis]. *Medicina (B Aires)* 29, 81-7.

Sabattini, MS., Gonzalez del Rio, L., Diaz, G., Vega, VR. (1977). Infección natural y experimental de roedores con virus Junín. *Medicina (Buenos Aires)* 37, Supl. 3: 149.

Salvato, M. S. & Shimomaye, E. M. (1989). The completed sequence of lymphocytic choriomeningitis virus reveals a unique RNA structure and a gene for a zinc finger protein. *Virology* 173, 1-10.

Salvato, M. S., Schweighofer, K. J., Burns, J. & Shimomaye, E. M. (1992). Biochemical and immunological evidence that the 11 kDa zinc-binding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus. *Virus Res* 22, 185-98.

Sanchez, A. B. & de la Torre, J. C. (2005). Genetic and biochemical evidence for an oligomeric structure of the functional L polymerase of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 79, 7262-8.

Sanchez, A., Pifat, D. Y., Kenyon, R. H., Peters, C. J., McCormick, J. B. & Kiley, M. P. (1989). Junin virus monoclonal antibodies: characterization and cross-reactivity with other arenaviruses. *J Gen Virol* 70 ( Pt 5), 1125-32.

Sevilla, N., Kunz, S., Holz, A., Lewicki, H., Homann, D., Yamada, H., Campbell, K. P., de La Torre, J. C. & Oldstone, M. B. (2000). Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells. *J Exp Med* 192, 1249-60.

Sevilla, N., McGavern, D. B., Teng, C., Kunz, S. & Oldstone, M. B. (2004). Viral targeting of hematopoietic progenitors and inhibition of DC maturation as a dual strategy for immune subversion. *J Clin Invest* 113, 737-45.

Slifka, M. K. (2002). Mechanisms of humoral immunity explored through studies of LCMV infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 263, 67-81.

Southern, P. J., Singh, M. K., Riviere, Y., Jacoby, D. R., Buchmeier, M. J. & Oldstone, M. B. (1987). Molecular characterization of the genomic S RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 157, 145-55.

Steyerthal, N. L., Lampuri, J. S. & Coto, C. E. (1990). [Blood parameters variation in *Calomys musculinus* infected with Junin virus, strain XJCl3]. *Medicina (B Aires)* 50, 335-42.

Strecker, T., Eichler, R., Meulen, J., Weissenhorn, W., Dieter Klenk, H., Garten, W. & Lenz, O. (2003). Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]. *J Virol* 77, 10700-5.

Thomsen, A. R., Nansen, A., Andreasen, S. O., Wodarz, D. & Christensen, J. P. (2000). Host factors influencing viral persistence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, 1031-41.

Tortorici, M. A., Albarino, C. G., Posik, D. M., Ghiringhelli, P. D., Lozano, M. E., Rivera Pomar, R. & Romanowski, V. (2001a). Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity in vivo. *Virus Res* 73, 41-55.

Tortorici, M. A., Ghiringhelli, P. D., Lozano, M. E., Albarino, C. G. & Romanowski, V. (2001b). Zinc-binding properties of Junin virus nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 82, 121-8.

Traub E. (1936). Persistence of lymphocytic choriomeningitis virus in immune animals and its relation to immunity. *J Exp Med* 63: 847-861.

Tsai, K. N., Tsang, S. F., Huang, C. H. & Chang, R. Y. (2007). Defective interfering RNAs of Japanese encephalitis virus found in mosquito cells and correlation with persistent infection. *Virus Res* 124, 139-50.

Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Yokosawa, H. & Yasuda, J. (2006). Cellular factors required for Lassa virus budding. *J Virol* 80, 4191-5.

Valdovinos, M. R. & Gomez, B. (2003). Establishment of respiratory syncytial virus persistence in cell lines: association with defective interfering particles. *Intervirology* 46, 190-8.

van der Zeijst, B. A., Bleumink, N., Crawford, L. V., Swyryd, E. A. & Stark, G. R. (1983a). Viral proteins and RNAs in BHK cells persistently infected by lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 48, 262-70.

van der Zeijst, B. A., Noyes, B. E., Mirault, M. E., Parker, B., Osterhaus, A. D., Swyryd, E. A., Bleumink, N., Horzinek, M. C. & Stark, G. R. (1983b). Persistent infection of some standard cell lines by lymphocytic choriomeningitis virus: transmission of infection by an intracellular agent. *J Virol* 48, 249-61.

Velu, V., Kannanganat, S., Ibegbu, C., Chennareddi, L., Villinger, F., Freeman, G. J., Ahmed, R. & Amara, R. R. (2007). Elevated expression levels of inhibitory receptor programmed death 1 on simian immunodeficiency virus-specific CD8 T cells during chronic infection but not after vaccination. *J Virol* 81, 5819-28.

Verma, S., Bednar, V., Blount, A. & Hogue, B. G. (2006). Identification of functionally important negatively charged residues in the carboxy end of mouse hepatitis coronavirus A59 nucleocapsid protein. *J Virol* 80, 4344-55.

Villarreal, L. P., Defilippis, V. R. & Gottlieb, K. A. (2000). Acute and persistent viral life strategies and their relationship to emerging diseases. *Virology* 272, 1-6.

Vitullo, A. D., Hodara, V. L. & Merani, M. S. (1987). Effect of persistent infection with Junin virus on growth and reproduction of its natural reservoir, *Calomys musculinus*. *Am J Trop Med Hyg* 37, 663-9.

von Schwedler, U. K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D. M., Chung, H. Y., Morita, E., Wang, H. E., Davis, T., He, G. P., Cimbara, D. M., Scott, A., Krausslich, H. G., Kaplan, J., Morham, S. G. & Sundquist, W. I. (2003). The protein network of HIV budding. *Cell* 114, 701-13.

Walker, D. L. (1964). The Viral Carrier State in Animal Cell Cultures. *Prog Med Virol* 10, 111-48.

Wang, W., Riedel, K., Lynch, P., Chien, C. Y., Montelione, G. T. & Krug, R. M. (1999). RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. *Rna* 5, 195-205.

Weber, C., Martinez Peralta, L. & Lehmann-Grube, F. (1983). Persistent infection of cultivated cells with lymphocytic choriomeningitis virus: regulation of virus replication. Brief report. *Arch Virol* 77, 271-6.

Weber, E. L., de Guerrero, L. B. & Boxaca, M. C. (1985). MRC-5 cells, a model for Junin virus persistent infection. *J Gen Virol* 66 ( Pt 5), 1179-83.

Weissenbacher, M. & Damonte, E. (1983). Fiebre Hemorrágica Argentina. *Adel. Microbiol. Enf. Infec.* 2: 119.

Weissenbacher, M. C., Calello, M. A., Colillas, O. J., Golfera, H., Rondinone, S. N. & Frigerio, M. J. (1978). [Infection of New World primates with Junin virus. I. *Alouatta caraya*]. *Medicina (B Aires)* 38, 529-36.

Weissenbacher, M. C., Calello, M. A., Colillas, O. J., Rondinone, S. N. & Frigerio, M. J. (1979). Argentine hemorrhagic fever: a primate model. *Intervirology* 11, 363-5.

Weissenbacher, M. C., Calello, M. A., Merani, S., Oubina, J. R., Laguens, R. P., Montoro, L. & Carballal, G. (1986). Induction of Junin virus persistence in adult athymic mice. *Intervirology* 25, 210-5.

Weissenbacher, M. C., Laguens, R. P. & Coto, C. E. (1987). Argentine hemorrhagic fever. *Curr Top Microbiol Immunol* 134, 79-116.

Welsh, R. M. & Pfau, C. J. (1972). Determinants of lymphocytic choriomeningitis interference. *J Gen Virol* 14, 177-87.

Welsh, R. M., Jr. & Buchmeier, M. J. (1979). Protein analysis of defective interfering lymphocytic choriomeningitis virus and persistently infected cells. *Virology* 96, 503-15.

Welsh, R. M., O'Connell, C. M. & Pfau, C. J. (1972). Properties of defective lymphocytic choriomeningitis virus. *J Gen Virol* 17, 355-9.

Wensing, B. & Farrell, P. J. (2000). Regulation of cell growth and death by Epstein-Barr virus. *Microbes Infect* 2, 77-84.

Yamate, M., Yamashita, M., Goto, T., Tsuji, S., Li, Y. G., Warachit, J., Yunoki, M. & Ikuta, K. (2005). Establishment of Vero E6 cell clones persistently infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbes Infect* 7, 1530-40.

York, J., Agnihothram, S. S., Romanowski, V. & Nunberg, J. H. (2005). Genetic analysis of heptad-repeat regions in the G2 fusion subunit of the Junin arenavirus envelope glycoprotein. *Virology* 343, 267-74.

York, J., Romanowski, V., Lu, M. & Nunberg, J. H. (2004). The signal peptide of the Junin arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex. *J Virol* 78, 10783-92.

Young, P. R. & Howard, C. R. (1983). Fine structure analysis of Pichinde virus nucleocapsids. *J Gen Virol* 64 (Pt 4), 833-42.

Zajac, A. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D. J., Suresh, M., Altman, J. D. & Ahmed, R. (1998). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 188, 2205-13.

