

Tesis Doctoral

# Estudio de las etapas tempranas del ciclo de replicación del Virus Junín

Martínez, María Guadalupe

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Martínez, María Guadalupe. (2010). Estudio de las etapas tempranas del ciclo de replicación del Virus Junín. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Martínez, María Guadalupe. "Estudio de las etapas tempranas del ciclo de replicación del Virus Junín". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA**

***“ESTUDIO DE LAS ETAPAS TEMPRANAS DEL  
CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIRUS JUNÍN”***

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE  
DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
EN EL AREA QUÍMICA BIOLÓGICA**

**Lic. MARIA GUADALUPE MARTINEZ**

**DIRECTOR:**

**Dra. NÉLIDA A. CANDURRA**

**CONSEJERO DE ESTUDIOS:**

**Dra. ELSA B. DAMONTE**

**Buenos Aires, Marzo 2010**

INDICE	PAG
<b>RESUMEN</b>	2
<b>ABSTRACT</b>	5
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
I. La familia: los Arenavirus	8
II. Fiebre Hemorrágica Argentina	13
III. Tratamiento y prevención de la Fiebre Hemorrágica Argentina	15
IV. El virus Junín	18
IV.1. Morfología del virión	19
IV.2. Estructura molecular	19
IV.3. Proteínas virales	21
V. Ciclo de replicación	23
VI. Interacción virus-célula huésped	27
VII. Vías de entrada	29
VII.1. Rutas de entrada	30
VII.2. Endocitosis mediada por vesículas recubiertas con clatrina	31
VIII. Organización endosomal	36
IX. Citoesqueleto celular	39
IX.1. Microtúbulos	40
IX.2. Microfilamentos	41
IX.3. Filamentos intermedios	42
X. Intervención del citoesqueleto durante la replicación viral	42
XI. Lectinas de tipo C	43
<b>OBJETIVOS</b>	46
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	48
1. Virus	49
2. Cultivos celulares	49
2.1. Línea celular Vero (ATCC CCL81)	49
2.2. Línea celular CHO (ATCC CCL 9618)	49
2.3. Líneas celulares TRVb y TRVb-1	50
2.4. Cultivo primario de embrión de ratón	50
2.5. Línea NIH 3T3 (ATCC CCL 1658)	51
2.6. Línea NIH 3T3 DC- o L- sign	51

2.7. Línea BHK-21 (ATCC CCL-10)	51
3. Compuestos utilizados	52
4. Reactivos, marcadores y anticuerpos utilizados	52
5. Obtención de virus purificado y marcado radiactivamente	53
6. Curvas de crecimiento	53
7. Ensayo de viabilidad celular: Método de MTT	53
8. Titulación de la infectividad viral	54
9. Ensayo de inhibición del rendimiento viral	54
10. Acción de los compuestos a distintos tiempos	55
10.1. Adición post-infección	55
10.2. Adición pre-tratamiento	55
11. Estudio de la expresión de proteínas	55
11.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	55
11.2. Fluorescencia directa	56
12. Ensayo de adsorción e internalización del virus	57
13. Efecto de los compuestos en la síntesis de ARN viral	58
14. Construcción de los pseudotipos retrovirales	60
15. Transfección de las construcciones de mutantes dominante negativas	60
16. Análisis de datos	61
<hr/> <b>RESULTADOS</b>	<hr/> 62
<i>Capítulo I</i>	63
1. Estudio de la vía de entrada utilizada por el JUNV en células Vero	64
1.1. Rol de la endocitosis mediada por clatrina en la entrada del JUNV	64
1.2. Rol de la vía de entrada dependiente de caveolas	67
2. Análisis de las proteínas celulares involucradas en la entrada del JUNV en células Vero	69
2.1. Rol de la proteína celular Eps-15 en la entrada del JUNV	69
2.2. Rol de la proteína celular Dinamina II en la entrada del JUNV	71
2.3. El JUNV viaja a través de endosomas tempranos y alcanza a los tardíos	73
<i>Capítulo II</i>	76
3. Estudio de la interacción del JUNV con los filamentos de actina	77
3.1. Caracterización del sistema celular utilizado	77

3.1.1 Determinación la de viabilidad celular en presencia de compuestos que alteran los microfilamentos.	77
3.1.2. Efecto de los compuestos sobre el citoesqueleto	78
3.2. Caracterización de la acción de los compuestos que desorganizan el citoesqueleto de actina sobre cultivos infectados	81
3.2.1. Efecto de la desorganización de los filamentos de actina sobre la producción de partículas infecciosas	81
3.2.2 Expresión de los antígenos virales en células tratadas con los compuestos	82
3.2.3 Efecto de los compuestos en los niveles de ARN	84
4. Estudio de la interacción del JUNV con los microtúbulos	86
4.1. Caracterización del sistema celular utilizado	86
4.1.1. Determinación de viabilidad celular en presencia de compuestos que alteran los microtúbulos	86
4.1.2. Efecto de los compuestos sobre el citoesqueleto	87
4.2. Caracterización de la acción de los compuestos que desorganizan los microtúbulos sobre cultivos infectados	89
4.2.1. Efecto de la desorganización de los filamentos de tubulina sobre la producción de partículas infecciosas	89
4.2.2 Expresión de los antígenos virales en células tratadas con los compuestos	90
4.2.3 Efecto de los compuestos en los niveles de ARN	92
<i>Capítulo III</i>	94
5. Estudio de la interacción de proteínas de membrana con los pseudotipos retrovirales de JUNV	95
5.1 Construcción de los pseudotipos	95
5.2 Estudio de las características de adsorción de los pseudotipos retrovirales que expresan la glicoproteína del JUNV	99
5.3 Estudio de la entrada del pseudotipo de JUNV en presencia de DC- o L- sign	101
5.4 Estudio de la interacción de distintos receptores de Tfn y/o lectinas de tipo C en la entrada del JUNV	105
6. Estudio de la interacción de proteínas de membrana con la internalización del JUNV	107
6.1 Estudio de la entrada del JUNV en presencia de DC- o L-sign	107

6.2 Estudio de la interacción de distintos receptores de Tfn y/o lectinas de tipo C en la entrada del JUNV	112
7. Estudio de la interacción de proteínas de membrana con la internalización del TCRV	116
7.1. Estudio de la internalización del TCRV en distintos cultivos celulares	116
7.2 Estudio de la interacción del receptor de Tfn en la entrada del TCRV	117
7.3 Estudio de la entrada del TCRV en presencia de DC- o L-sign	121
<hr/> <b>CONCLUSIONES</b>	<hr/> 123
<hr/> <b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<hr/> 139
<hr/>	<hr/>

## Abreviaturas:

<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ácido desoxirribonucleico copia
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ácido ribonucleico mensajero
<b>DC-sign</b>	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
<b>Eps-15</b>	Epidermal growth factor receptor substrate 15
<b>FHA</b>	Fiebre Hemorrágica Argentina
<b>GP1 y GP2</b>	glicoproteína de envoltura 1 y 2
<b>GPC</b>	precursor glicoproteico
<b>g/ml</b>	gramos/mililitro
<b>hTfR1</b>	Receptor de transferrina 1 humano
<b>hs</b>	Horas
<b>IFI</b>	inmunofluorescencia indirecta
<b>JUNV</b>	virus Junín
<b>Kb</b>	kilo bases
<b>kDa</b>	kilo Dalton/s
<b>LCMV</b>	virus de la coriomeningitis linfocitaria
<b>L-sign</b>	Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin
<b>MEM</b>	medio esencial mínimo
<b>MF</b>	Microfilamentos
<b>m.i.</b>	multiplicidad de infección
<b>MT</b>	Microtúbulos
<b>µCi</b>	micro Curie/s
<b>µl</b>	micro litro/s
<b>µM</b>	micro Molar
<b>NaCl</b>	cloruro de sodio
<b>NP</b>	Nucleoproteína
<b>nm</b>	nano metros
<b>p.i.</b>	post infección
<b>PBS</b>	buffer fosfato salino
<b>SDS</b>	sodio dodecil sulfato
<b>Tfn</b>	Transferrina
<b>TX-100</b>	Tritón X -100
<b>UFP</b>	unidades formadoras de placas
<b>VSV</b>	virus de la estomatitis vesicular
<b>WB</b>	western blot
<b>x g</b>	multiplicado por fuerza de gravedad

# **RESUMEN**

---

---

## Estudio de las etapas tempranas del ciclo de replicación del virus Junín

El virus Junín (JUNV), agente etiológico de la fiebre hemorrágica argentina, es un miembro de la familia Arenaviridae. Es un virus envuelto de genoma ARN segmentado cuyo ciclo de replicación ha sido caracterizado en varios aspectos. La entrada a las células blanco se realiza vía endocitosis mediada por receptor y posterior fusión dependiente de pH. Una vez que la nucleocápside se encuentra dentro del citoplasma se expresan 5 proteínas estructurales, mediante una estrategia de codificación ambisentido. La proteína mayoritaria asociada a la nucleocápside es denominada NP. A partir de un único precursor glicoproteico (GPC), se obtienen dos glicoproteínas virales denominadas GP1 y GP2 y el péptido señal (SP). Estos conforman las estructuras claviformes encontradas en la envoltura viral. Se desconocen hasta el momento los mecanismos detallados y las estructuras celulares involucradas en los eventos tempranos del ciclo de replicación viral.

En este trabajo se estudiaron aspectos de la interacción virus-célula huésped, caracterizando el rol de distintas proteínas celulares en los eventos tempranos del ciclo de multiplicación del JUNV. En primer lugar se analizó la vía de entrada utilizada por el JUNV para ser endocitado en las células, así como también se estudiaron las proteínas celulares esenciales para este proceso. Con este fin se utilizaron plásmidos que expresan proteínas dominantes negativas, encontrándose que es esencial la Eps-15 y dinamina en el proceso de endocitosis, mientras que las proteínas Rab5 y Rab7 juegan un rol esencial en el paso posterior a la internalización y previo a la fusión. Luego se estudio la interacción del virus con las principales redes del citoesqueleto: los microfilamentos y los microtúbulos. Se utilizaron compuestos capaces de despolimerizar o estabilizar específicamente cada una de estas redes. La internalización del virus disminuyó de manera dosis-dependiente en presencia de compuestos que alteraban la integridad de los microfilamentos o estabilizaban los microtúbulos.

El tropismo de los virus está regulado por la interacción entre factores celulares y virales durante la transmisión, disseminación y replicación en el huésped. La unión del virus a receptores de superficie específicos determina la

susceptibilidad de las células a ser infectadas. La entrada y diseminación de diferentes familias virales puede ser mediada por lectinas de tipo C, como DC-sign o L-sign. Por este motivo se estudió si estas actúan en la infección con el JUNV. Para esto se utilizaron células relativamente no permisivas a la infección por JUNV como las células CHO, las cuales al expresar transientemente las lectinas DC-sign o L-sign fueron infectadas por el JUNV de forma altamente eficiente. Fue demostrado que las células 3T3, que en su forma salvaje no permiten la infección del JUNV, se vuelven permisivas al mismo al expresar de forma estable estas lectinas, y esta interacción es específica lo cual fue demostrado al bloquear la infección con anticuerpos específicos contra las lectinas o el compuesto mannan. Actualmente no hay tratamiento para las fiebres hemorrágicas, por lo que existe una necesidad crítica de desarrollar terapias efectivas para tratar los brotes anuales y contrarrestar su potencial uso como armas biológicas. Todos los virus causantes de fiebres hemorrágicas infectan preferencialmente monocitos, macrófagos y células dendríticas durante las etapas tempranas de la enfermedad. Es por este motivo que estas células representan un blanco potencial en el tratamiento de las fiebres hemorrágicas.

Palabras claves

Virus Junín, endocitosis, clatrina, citoesqueleto, lectinas.

# **ABSTRACT**

---

---

## Characterization of early steps of Junin virus replication cycle

Junín virus (JUNV), the etiological agent of Argentine hemorrhagic fever, is a member of the Arenaviridae family. The viral cycle multiplication of this RNA virus has been characterized in different aspects. The entrance in the target cells is performed by receptor-mediated endocytosis following a pH-dependent fusion step. Once the nucleocapsids are within the cytoplasm, the ambisense strategy allows expression of five structural proteins. The major nucleocapsid-associated protein is named NP. As a result of the glycoprotein precursor synthesis and after its maturation, two glycoproteins and a signal peptide are obtained. These components, named GP1, GP2 and SP, form the claviform structures found in the viral envelope. At this moment, the detailed mechanisms and cellular structures involved in the early steps of the virus replication cycle are not known although.

In this work, the interaction between virus and host cells was studied, characterizing the role of cellular proteins in early events of the virus replication cycle. It was first evaluated the way of entry used by JUNV to enter host cells and the proteins involved in this process. With this end, plasmids that express dominant negative mutants were used, demonstrating that EPS-15 and dynamin were key proteins in this step, while Rab5 and Rab7 were essential in a step after entry prior to fusion. Then the interaction between JUNV and the main components of the cytoskeleton was evaluated. Compounds that specifically disrupt or stabilize microfilaments or microtubules were used. Virus entry was extremely reduced in a dose-dependent way in the presence of compounds that depolymerized microfilaments or stabilized microtubules.

Target cell tropism of enveloped viruses is regulated by interactions between viral and cellular factors during transmission, dissemination, and replication within the host. Binding of viral envelope glycoproteins to specific cell-surface receptors determines susceptibility to viral entry. The entry and dissemination of viruses in several families can be mediated by C-type lectins such as DC-sign and L-sign. Results from transduction with JUNV pseudovirus show that infection of relatively non-permissive CHO cells was markedly enhanced when we overexpressed DC-sign or L-sign. Experiments using non-permissive mouse 3T3 cells

showed that they become permissive to JUNV pseudovirus transduction when they stable express DC-sign, or its homologue L-sign, and that transduction of 3T3 stable expressing DC-sign or L-sign is blocked by anti-DC-sign and/or L-sign antibodies and mannan. Therefore hDC- and hL-sign can act as a novel attachment factors that mediate entry of JUNV. To the date there is no treatment for hemorrhagic fevers, so there is an important requirement to develop specific therapies against annual outbreaks and reduce its potential use as a bioterrorism agent. All hemorrhagic fever viruses infect preferentially monocytes, macrophages and dendritic cells during early stages of the disease. For this reason these cells represent a potential target in the treatment of hemorrhagic fevers.

Palabras claves

Junin virus, endocytosis, clathrin, cytoskeleton, lectins.

# **INTRODUCCIÓN**

---

---

## **I- LA FAMILIA: LOS ARENAVIRUS**

La habilidad de los virus para insertar su genoma y proteínas dentro de la célula huésped, así como el subsecuente uso de la maquinaria metabólica de la misma, es esencial para su ciclo de replicación. A pesar de esta característica en común, son diversos en estructura, genética y estrategias de replicación, lo que da origen a distintos tipos de interacciones virus-huésped. Es por esto que son herramientas muy útiles para investigar fenómenos biológicos, bioquímicos y celulares en general, además de ser ampliamente estudiados por causar enfermedades graves, tanto en humanos como en animales y plantas. Actualmente, los arenavirus son de particular interés dado el uso potencial de los miembros causantes de fiebres hemorrágicas de la familia, como agentes de bioterrorismo, categorizados como patógenos prioritarios A por el CDC (Centro de Control de Enfermedades, Atlanta, USA).

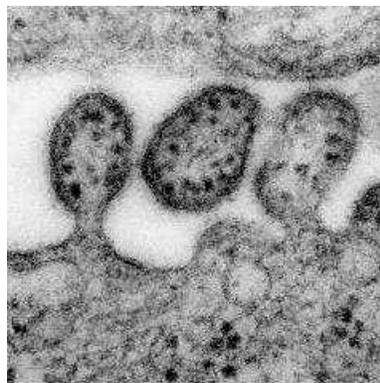
La familia *Arenaviridae* fue establecida en el año 1970 y está constituida por un grupo de virus envueltos con genoma de ARN segmentado. Hasta el momento la familia consta de 23 especies reconocidas por el "International Committee on Taxonomy of Virus" (tabla I) y 8 nuevas especies tentativas aún no incluidas en la familia (tabla II). El primer miembro de la familia fue descrito en el año 1925, aunque en ese momento se desconocía cuál era el causante de la infección humana, definida clínicamente como meningitis aséptica aguda. La sintomatología de la enfermedad está caracterizada por un aumento de linfocitos en el fluido cerebroespinal libre de bacterias. Recién 10 años después se denominó a la enfermedad coriomeningitis linfocitaria y a su agente etiológico: virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV) (Amstrong y col., 1934; Traub y col., 1935).

	<b>Especie</b>	<b>Reservorio Natural</b>	<b>Región</b>
<b>Viejo Mundo</b>	Ippy virus	<i>Arvicanthis sp.</i>	Africa Central
	Lassa virus	<i>Mástomys sp.</i>	Africa Oriental
	LCM virus	<i>Mus musculus</i>	Europa y América
	Mobala virus	<i>Praomys sp.</i>	Africa Central
	Mopeia virus	<i>Mástomys natalensis</i>	Mozambique, Zimbabwe
<b>Nuevo Mundo</b>	Amapari virus	<i>Oryzomys capito</i> <i>Neacomys guianae</i>	Brasil
	Flexal virus	<i>Oryzomys sp.</i>	Brasil
	Guanarito virus	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	Venezuela
	Junín virus	<i>Calomys musculinus</i>	Argentina
	Latino virus	<i>Calomys callosus</i>	Bolivia
	Machupo virus	<i>Calomys callosus</i>	Bolivia
	Paraná virus	<i>Oryzomys buccinatus</i>	Paraguay
	Pichinde virus	<i>Oryzomys albigularis</i>	Colombia
	Pirital virus	<i>Sigmodon alstoni</i>	Venezuela
	Oliveros virus	<i>Bolomis obscurus</i>	Argentina
	Sabiá virus	Desconocido	Brasil
	Tacaribe virus	<i>Artibeus sp.</i>	Trinidad
	Tamiami virus	<i>Sigmodon hispidus</i>	Florida, EEUU
	Whitewater Arroyo virus	<i>Neotoma albigula</i>	Nuevo Mexico, EEUU
	Pampa virus	<i>Bolomis obscurus</i>	Argentina
	Allpahuayo virus	<i>Oecomys bicolor</i> , <i>Oecomys paricola</i>	Perú
	Bear Canyon virus	<i>Peromyscus californicus</i>	EEUU
	Cupixi virus	<i>Oryzomys megacephalus</i>	Brasil

Tabla I. Arenavirus del Viejo y Nuevo Mundo, su respectivo huésped y área de incidencia

En 1956 en Trinidad y en 1958 en Argentina, se aislaron de 2 nuevos agentes infecciosos. El primero de ellos fue llamado virus Tacaribe (Downs y col., 1963), mientras que el patógeno encontrado en Argentina fue llamado virus Junín (Parodi y col., 1958). LCMV, descubierto en 1933, aún no había sido incluido en ninguna familia, y fue incluido en 1963 en la misma familia que estos dos nuevos patógenos. Inicialmente parecía no haber motivo para que estos estuvieran relacionados, pero al realizar estudios serológicos ambos virus mostraron características comunes (Mettler y col., 1963). Es así que rápidamente comenzaron a incluirse en este grupo otros virus de similares características, surgiendo así el grupo llamado *Complejo Tacaribe* (Johnson y col., 1973). Los estudios morfológicos junto con los serológicos entre estos virus y el inicialmente descrito LCMV llevaron al establecimiento de una nueva familia: *Arenaviridae* y en esta familia fue incluido en el 1970 el virus Lassa, causante de fiebre hemorrágica en África (Speir y col., 1970).

En el año 1969 Bergold y col. mostraron por primera vez un arenavirus en el microscopio electrónico: observaron partículas pleomórficas con espículas proyectadas hacia el exterior que poseían gránulos electro-densos en su interior (Figura 1). Es por esta última característica, debida a la incorporación de ribosomas en los viriones, que se los nombró "arenavirus".



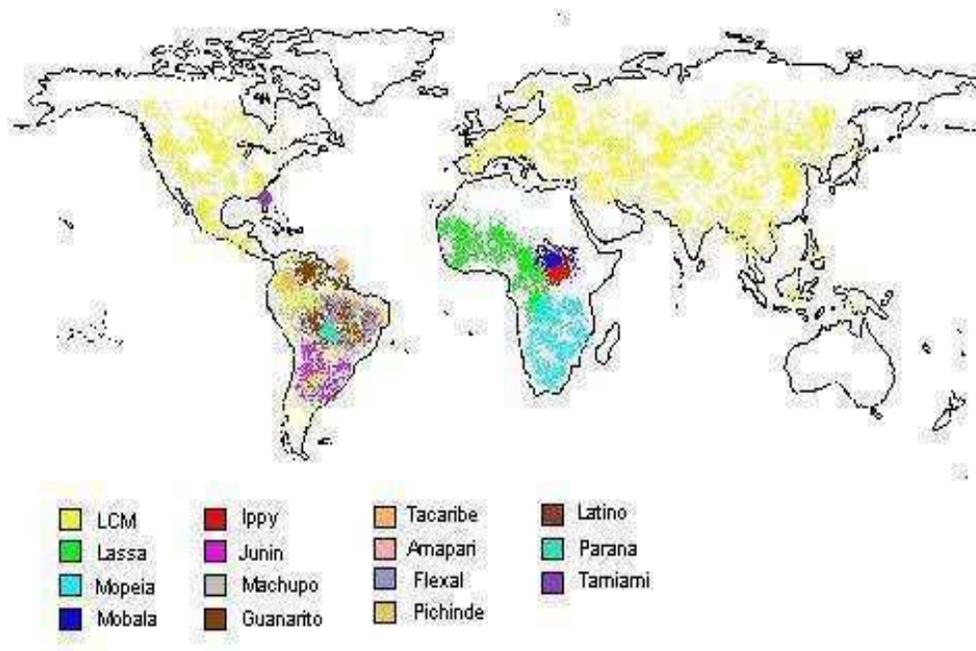
**Figura 1.** Microfotografía electrónica de partículas virales perteneciente a la familia *Arenaviridae*

Todos los virus de esta familia se encuentran antigénicamente relacionados (Wulff y col., 1977; Buchmeier y col., 1981) y geográficamente clasificados. Según su origen se dividen en dos grandes grupos: los del Viejo Mundo y los del Nuevo Mundo (Tabla I).

Especie	Región	Posible huésped	Especie más cercana
Kodoko	Guinea	Nannomys minutoides	LCMV
Morogoro	Tanzania	Mastomys sp.	MOPV
Dandenong	Australia	Desconocido	LCMV
Pinhal	Brasil	Calomys tener	OLVV
Catarina	USA	Neotoma micropus	WWAV
Skinner Tank	USA	Neotoma Mexicana	WWAV
Chapare	Bolivia	Desconocido	SABV
Merino Walk	South Africa	Myotomys unisulcatus	LASV

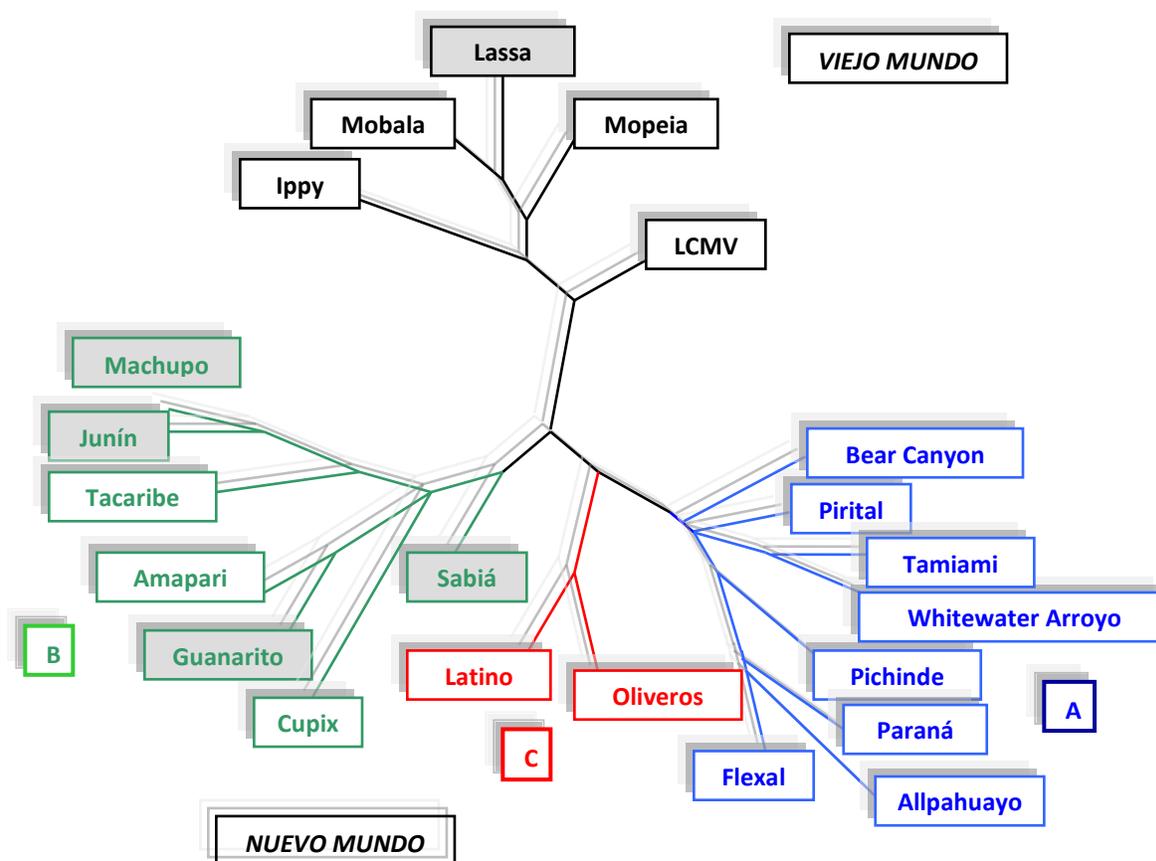
**Tabla II.** Nuevos Arenavirus aun no incluidos en la familia Arenaviridae

Su distribución mundial se muestra en la Figura 2 (Clegg y col., 2000).



**Figura 2.** Distribución geográfica de los principales miembros de la familia Arenaviridae.

Todos sus miembros con excepción del virus Tacaribe utilizan a los roedores como reservorios naturales, infectándolos crónicamente. Al analizar estos patógenos se determinaron dos grupos por fijación de complemento e inmunofluorescencia y fueron denominados Complejos del Viejo Mundo o Complejo del Nuevo Mundo (Howard y col., 1993). Como se muestra en la Tabla I dentro del primer grupo se encuentra el LCMV, especie prototipo de la familia y de distribución universal, junto con otros virus aislados de África. Dentro del Complejo del Nuevo Mundo, anteriormente llamado Complejo Tacaribe, se encuentran todos los virus americanos descriptos hasta el momento.



**Figura 3.** Relación filogenética entre los arenavirus. Los cuadros sombreados indican las especies causantes de fiebres hemorrágicas en humanos.

El análisis exhaustivo del segmento S del ARN genómico permitió establecer relaciones filogenéticas entre los arenavirus (Bowen y col., 1996). Estudios comparativos de secuencias parciales de la nucleoproteína de distintos arenavirus confirmó la clasificación en los dos grupos anteriormente mencionados. Por otro lado permitió establecer tres linajes distintos dentro del Complejo Nuevo Mundo. El árbol filogenético resultante y los linajes A, B y C se muestran en la figura 3.

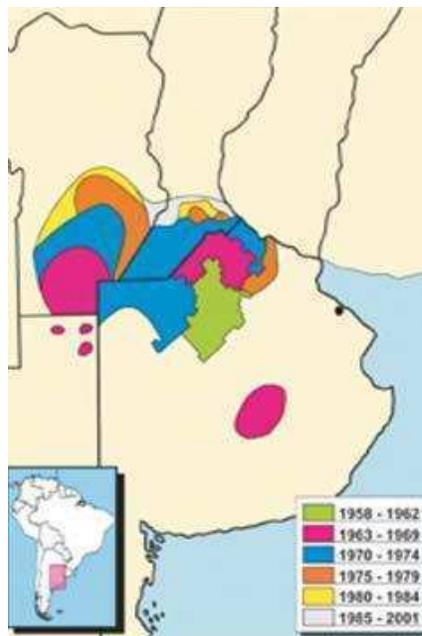
Varios miembros de la familia *arenaviridae* son causantes de fiebres hemorrágicas en humanos. En el grupo del Viejo Mundo solo el virus Lassa es responsable de este tipo de enfermedad, mientras que en el Nuevo Mundo cuatro especies dentro de las reconocidas por el "International Committee on Taxonomy of Virus" producen fiebre hemorrágica en humanos y todas se encuentran dentro del linaje B. Evolutivamente este hecho podría indicar que el fenotipo hemorrágico surgió al menos por dos vías independientes en esta familia. Sin embargo, y debido a que aún se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales estos virus producen una patología hemorrágica en humanos, no puede descartarse completamente el hecho de que algún otro miembro de la familia posea esta capacidad aún no elucidada.

## **II. FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA**

El estudio de las fiebres hemorrágicas ha sido de gran interés en las últimas décadas, sin embargo se sabe muy poco acerca de la patogenia producida por los arenavirus. El virus ingresa al organismo por inhalación y en la mayoría de los casos se deposita en los bronquiolos. Al alcanzar el sistema linfático se esparce sistémicamente sin dejar un foco neumónico aparente (Kenyon y col., 1992). Estudios realizados en cobayos infectados con una variante de Pichinde mostraron la activación de moléculas mediadoras de *shock* tales como leucotrienos y endorfinas (Peters y col., 1997). Estas sustancias aumentaron en respuesta a los altos valores de TNF- $\alpha$  encontrados en dichos cobayos (Aronson y col., 1995).

El sangrado profuso, visto a menudo en la patología hemorrágica, es presumiblemente consecuencia del daño vascular ocasionado por el aumento de citoquinas y virus combinado con una marcada trombocitopenia (Molinas y col., 1989; Heller y col., 1995). La severidad del cuadro, por otro lado, varía de paciente en paciente involucrando factores del huésped aún no conocidos en la recuperación de la enfermedad.

La fiebre hemorrágica argentina (FHA), localmente denominada mal de los rastrojos o mal de O'Higgins, es una fiebre hemorrágica viral zoonótica, que afecta el área central de la Pampa húmeda. La zona endémica de la FHA cubre aproximadamente 150.000 km<sup>2</sup>, comprometiendo las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y de La Pampa (Figura 4), con una población estimada en riesgo de 5 millones, compuesta principalmente por trabajadores rurales.



**Figura 4.** Localización del área endémica para el virus Junín en la República Argentina (Ambrosio y col., 2006).

Existen alrededor de un total de 30.000 casos notificados (Ambrosio y col., 2006). El pequeño roedor conocido localmente como ratón maicero, sufre infección crónica asintomática, y disemina el virus a través de su saliva, orina y

sangre. La infección al humano se produce a través de contacto con la piel (con excoriaciones), en mucosas (ojos) o inhalación de partículas portando el virus. Es principalmente propensa a la infección la población que reside, visita, o trabaja en el medio rural: el 80 % de los infectados son hombres entre 15 y 60 años.

La FHA es una gravísima enfermedad aguda que comienza como una gripe vulgar y termina progresando hasta el deceso en 1 a 2 semanas en el 30% de los casos de pacientes infectados y sin tratar, o su recuperación si es tratada a tiempo con plasma sanguíneo de convaleciente. El tiempo de incubación del virus es entre 10 a 12 días, apareciendo luego los primeros síntomas inespecíficos: fiebre, dolor de cabeza, debilidad, desgano, dolores articulares y oculares y/o pérdida de apetito. Al contrario de una gripe donde el paciente mejora al quinto día, en la FHA se intensifican los síntomas en menos de una semana, forzando al paciente a acostarse, produciéndose síntomas cada vez más fuertes de alteraciones vasculares, renales, hematológicas y neurológicas. Este estadio no dura más de 20 días. Los estudios patológicos de casos fatales muestran que la mayoría de las lesiones consisten en una vasocongestión generalizada con múltiples hemorragias en diferentes órganos. La ruptura de capilares es la responsable de las hemorragias observadas, produciendo el colapso del sistema vascular y el consiguiente shock hipotenso. Aunque la replicación viral en el tejido vascular no ha sido demostrada hasta el momento, se ha encontrado que principalmente linfocitos y monocitos de sangre periférica constituyen el sitio primario de replicación del virus (Ambrosio y col., 1986). Alternativamente en algunos pacientes la respuesta inmune resulta muy efectiva en la eliminación del virus, cursando la enfermedad con los síntomas más leves.

### **III- TRATAMIENTO Y PREVENCION DE LA FHA**

Las zoonosis, enfermedades transmitidas entre animales y hombres, son de gran importancia en la salud pública, debido a que algunas de ellas han sido responsables de importantes epidemias. En el caso de la FHA, la epidemia más importante ha ocurrido en el año 1964, cuando se registraron aproximadamente 3.500 casos.

Ensayos realizados en modelos animales han demostrado que la administración de anticuerpos de origen humano es suficiente para proteger monos contra el MACV (Eddy, 1975). El resultado de esta investigación sugirió el posible uso de esta terapia en pacientes humanos con FHA. La eficacia de este tratamiento se relaciona directamente con el título de anticuerpos neutralizantes en el plasma suministrado al paciente. La aplicación de este tratamiento durante los primeros 8 días de la infección neutraliza la viremia, disminuye las alteraciones fisiológicas y reduce la incidencia de las enfermedades oportunistas, disminuyendo la tasa de mortalidad al 1-2% de los pacientes afectados (Maiztegui y col., 1998).

Con respecto a la prevención de la FHA, se ha desarrollado una vacuna a virus vivo llamada Candid #1 (candidate 1) la cual presenta un alto grado de atenuación de la virulencia (Barrera-Oro y Eddy, 1982;). A fines de la década del 70 un programa de colaboración entre el gobierno argentino, la Organización Panamericana de la Salud y organismos de los Estados Unidos condujo a la elaboración de dicha vacuna, que fue aprobada por la *Federal Drug Administration*. La cepa Candid #1, derivada de la cepa XJ #44, mostró una virulencia significativamente menor sobre cobayos que otras cepas atenuadas de JUNV (Barrera Oro y col., 1991). En el año 1988 comenzaron las fases de estudios clínicos en humanos con voluntarios tanto en Argentina como en los Estados Unidos. La vacuna mostró una eficacia del 95% en la protección contra la FHA. Además en el 90% de los voluntarios se registraron anticuerpos neutralizantes hasta 10 años luego de su vacunación (Maiztegui y col., 1998).

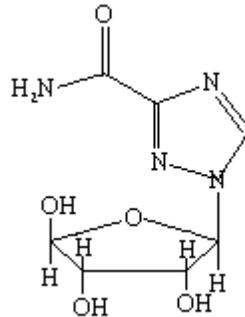
A pesar de las contraindicaciones para la administración de vacunas a virus vivo, especialmente las relacionadas con el alto riesgo que representa la replicación del virus dentro del huésped, Candid #1 mostró ser segura, altamente inmunogénica y efectiva para la prevención de FHA aplicada en pacientes en zonas geográficamente limitadas y de alto riesgo para esta enfermedad. Por otro lado, estudios realizados en cobayos y monos *rhesus* sugieren su utilización para la prevención de la fiebre hemorrágica boliviana producida por el virus Machupo (Barrera Oro y col., 1982 y 1988; Lupton y col., 1988, Jarhling y col., 1988).

La caracterización molecular de Candid #1 se realizó secuenciando el segmento S del ARN genómico. Estudios comparativos de la secuencia del precursor glicoproteico de esta cepa y sus cepas parentales muestran dos cambios aminoacídicos localizados en el extremo amino terminal. Estos estudios sugieren una participación de la glicoproteína en el desarrollo del fenotipo atenuado de virulencia. Otros estudios sugieren que una disminución en la expresión de la NP podría relacionarse con la atenuación (Albariño y col., 1997; Ghiringhelli y col., 1997).

La única droga antiviral conocida actualmente en uso para los arenavirus es la ribavirina. La ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida) es un análogo de guanosina (Figura 5) que mostró inhibición contra los arenavirus, tanto *in vitro* como en modelos animales (Weissenbacher y col., 1986). Este es un compuesto de amplio espectro de acción con otros virus a través de 3 mecanismos diferentes. Luego de la fosforilación, como monofosfato, actúa como inhibidor competitivo de la inosín-monofosfato deshidrogenasa (IMPH), bloqueando la conversión del IMP a monofosfato de xantosina (XMP), precursor de la síntesis de guanósín-trifosfato (GTP) y dGTP, por lo que disminuye el GTP intracelular (Streeter y col., 1974). Además la ribavirina puede fosforilarse a la forma 5-trifosfato, afectando la iniciación y elongación del RNAm viral por inhibición competitiva con las enzimas que agregan el CAP en el extremo 5' del RNAm y polimerasas virales (Goswami y col., 1979). Por último, un mecanismo propuesto es su acción mutagénica. Todos los virus con genoma RNA poseen una alta tasa de mutación durante sus replications debido a la pobre fidelidad de las RNA polimerasas. Este mecanismo sería de gran ventaja evolutiva para así poder escapar a presiones selectivas. Sin embargo la acción de la ribavirina aumenta notablemente estos errores llegando a producir un mayor número de mutaciones letales (Crotty y col., 2000, 2001).

La administración de la ribavirina es el método seleccionado para el tratamiento de la fiebre de Lassa (Mc Cormick y col., 1986), aunque se han registrado efectos colaterales como trombocitopenia y anemia (Weissenbacher y col., 1986; McKee y col., 1988). Para el JUNV se ha demostrado que la ribavirina inhibe *in vitro* la replicación del mismo pero no reduce la mortalidad en casos

avanzados de FHA (Enria y col., 1994). Por lo tanto, aunque es la única terapia utilizada actualmente para el tratamiento de fiebres hemorrágicas, su acción en humanos no es específica y presenta grandes desventajas en el uso terapéutico.



**Figura 5. Estructura química de la ribavirina.** Único compuesto terapéutico en uso contra las fiebres hemorrágicas.

#### IV- EL VIRUS JUNIN

El virus Junín fue aislado e identificado en el año 1958 por el Dr. Parodi en el hospital regional de la ciudad de Junín, provincia de Buenos Aires. Los primeros aislamientos de este virus se realizaron a partir de muestras de sangre y órganos provenientes de pacientes. El principal reservorio natural del virus Junín es el roedor de hábitos rurales *Calomys musculinus* en el cual causa infecciones crónicas que le permiten la persistencia en la naturaleza. También se ha aislado de *Calomys laucha*, *Akodon azarae* y *Oryzomys flavescens* (Maiztegui y col., 1975) y en roedores urbanos como *Mus musculus* (Sabattini y col., 1977). La enfermedad presenta una incidencia estacional que coincide con las cosechas agrícolas mostrando un incremento de la población de roedores, aumentando así el contacto entre el trabajador rural y el reservorio infectado. Si bien la patogénesis de JUNV se ha estudiado en ratones lactantes y cobayos mediante infecciones experimentales (Buchmeier y col., 1980), es en primates *rhesus macaques* donde mejor se reproducen las características patológicas de la enfermedad en humanos (McKee y col., 1985). Debido a los inconvenientes en el trabajo con primates, se han realizado y se realizan la mayoría de los estudios en ratones utilizando diferentes vías de inoculación y edad del animal.

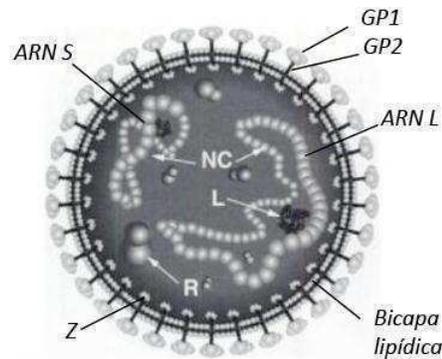
Por su significancia económica el estudio de esta enfermedad y del agente que la produce fue considerado de suma importancia en nuestro país (Mills y col., 1991 y 1992; Garcia y col., 1996). El control del reservorio animal de JUNV ha sido impracticable debido a las grandes zonas geográficas implicadas. Por otro lado es evidente el progresivo aumento de áreas afectadas. En este sentido todos los estudios sobre el virus y su multiplicación en el huésped han sido dirigidos al desarrollo de una vacuna eficaz. Asimismo, los estudios conducentes a la caracterización biológica y molecular del ciclo de replicación viral representan un aporte valioso para el conocimiento de la familia *Arenaviridae* en su totalidad y la posible elaboración de estrategias preventivas para los virus de esta familia.

#### **IV.1- Morfología del virión**

Los arenavirus son virus envueltos, pleomórficos y con un diámetro aproximado entre 50 y 300 nm (Compans, 1993). En el caso del virus Junín se ha descrito una morfología redonda u oval con diámetros entre 110 y 130 nm (Lascano y col., 1971 y 1974). Microfotografías electrónicas muestran a los viriones recubiertos por una membrana electrodensa desde la cual emergen proyecciones de estructura claviforme correspondientes a las glicoproteínas. En su interior se observan gránulos electrodensos identificados como ribosomas. (Fig. 1)

#### **IV.2- Estructura molecular**

Las partículas virales están compuestas por una envoltura lipídica, en su interior se encuentra el genoma el cual consta de dos moléculas de cadena simple de ARN. La figura 6 muestra el esquema de una partícula viral y sus principales componentes.



**Figura 6.** Esquema de una partícula viral y sus principales componentes (A. Featherstone y C. Clegg). NC: nucleocápside, L: RNA polimerasa, R: ribosoma, Z: proteína Z, GP1 y 2: glicoproteína 1 y 2 respectivamente.

Cada una de las moléculas de ARN difieren en tamaño y poseen dos marcos de lectura abiertos, no superpuestos y de polaridad opuesta. Esto representa una de las características más sobresalientes de la familia, determinando además su estrategia tan particular de replicación “ambisentido” (ver sección V).

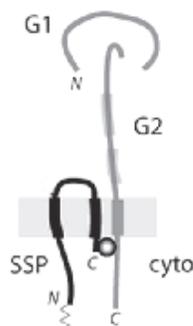
El fragmento L (*large*) de ARN tiene una longitud de 7 kb y codifica los genes para la síntesis de la ARN polimerasa viral dependiente de ARN (L) y una proteína pequeña denominada Z por su capacidad de asociarse a moléculas de Zinc, con función de proteína de matriz. La molécula S (*small*) de ARN es de aproximadamente 3.5 kb y posee los marcos de lectura para la expresión de las principales proteínas estructurales: el precursor de las glicoproteínas de membrana GPC, que es procesado proteolíticamente para producir las dos glicoproteínas de superficie: GP1 y GP2, y la nucleoproteína (NP). Los fragmentos L y S no se encuentran presentes en cantidades equimolares, ni en el virión, ni en la célula infectada. El fragmento S siempre se ha encontrado como el mayoritario (Romanowski y Bishop, 1983; Southern y col., 1987), no excediendo la relación L:S la proporción 2:5. Las moléculas de ARN se encuentran conformando un complejo ribonucleoproteico o nucleocápside en el interior del virión, constituido principalmente por el ARN correspondiente y la nucleoproteína NP. En menor medida L se encuentra asociada a las nucleocápsides.

### **IV.3- Proteínas virales**

Con respecto a la familia Arenaviridae son todavía escasos los conocimientos sobre la completa participación de sus proteínas durante el proceso de infección *in vivo*. Todas las proteínas de JUNV son estructurales, aunque solo algunas son mayoritarias en la partícula viral madura. La nucleoproteína NP, codificada en el extremo 3' del segmento ARN S, representa el constituyente principal de la nucleocápside y fue asociada al ARN genómico (Martínez Segovia y DeMitre, 1977). Estudios serológicos entre distintos arenavirus demuestran un alto grado de antigenicidad cruzada para NP entre los miembros del Nuevo Mundo, no así entre estos y los pertenecientes al Viejo Mundo (Rowe y col., 1970).

Estudios realizados con LCMV indican que la NP de este virus es requerida *in trans* para la síntesis de ARN (Lee y col., 2000), y ha sido descrita una función como antiterminadora de la replicación *in vivo* (Tortorici y col., 2001). Cuando se procesan cultivos de células Vero infectados con JUNV, esta proteína puede visualizarse por radioinmunoprecipitación o WB con anticuerpos monoclonales específicos (Sánchez y col., 1989) como una banda de aproximadamente 60 kDa. En las mismas preparaciones es frecuente encontrar dos productos de 45 y 25 kDa respectivamente. Recientes estudios postulan más funciones regulatorias para NP y sus subproductos en el mantenimiento de cultivos persistentemente infectados (Ellenberg y col., 2002).

El precursor glicoproteico GPC del JUNV es clivado post-traduccionalmente en la célula infectada para dar origen a las glicoproteínas de envoltura GP1 y GP2. El GPC de los arenavirus es único entre las glicoproteínas de envoltura de los demás virus envueltos. El complejo maduro incluye además de GP1 y GP2 al péptido señal (PS) como una tercera subunidad (Buchmeier, 2002; Eichler y col., 2003; York y col., 2004) (Figura 7).



**Figura 7.** Diagrama de la organización tripartita propuesta para el complejo glicoproteico de JUNV.

El PS es una secuencia de 58 aminoácidos con dos dominios hidrofóbicos, lo cual permite que atraviese la membrana dos veces quedando tanto el dominio N- como el C-terminal hacia el citosol, y se ha propuesto que quedaría anclado al complejo formando un motivo *ring finger* con el dominio citoplasmático de GP2 (York & Nunberg, 2007). Además ha sido demostrado que el "loop" no citoplasmático del PS juega un rol central en la respuesta del complejo glicoproteico maduro al pH ácido para la fusión de membrana (York y col., 2008).

Los estudios de la secuencia de bases del ARN S predicen para GPC un peso aproximado de 52 kDa, sin embargo, debido al variado grado de glicosilación, este precursor muestra una movilidad de 66-72 kDa aproximadamente en SDS-PAGE. Ocho sitios potenciales de glicosilación hallados en la secuencia de GPC de JUNV avalan lo antes dicho (Buchmeier y col., 1987). La misma secuencia muestra el sitio de clivaje para GPC en la posición 306-307 de la cadena polipeptídica. La proteína GP1 (38 kDa) demostró estar expuesta en la superficie de los viriones de JUNV (Mersich y col., 1988) y es la responsable de la producción de anticuerpos neutralizantes, indicando su participación directa en el reconocimiento virus-célula. Por otro lado GP2, una glicoproteína integral de membrana, posee la capacidad fusogénica requerida para el ingreso de las nucleocápsides al citoplasma. Debido a la falta de anticuerpos específicos contra esta proteína solo es evidenciable su presencia mediante ensayos de fusión a pH ácido (Castilla y Mersich., 1996). Dado que las glicoproteínas se encuentran en cantidades equimolares en el virión, Burns y col. (1991) proponen un modelo para los arenavirus donde GP1 y GP2 formarían trímeros mediante interacciones iónicas (Agnihothram y col., 2007). En conjunto formarían la

estructura glicoproteica observada en preparaciones al microscopio electrónico como imágenes claviformes de 5 -10 nm de longitud.

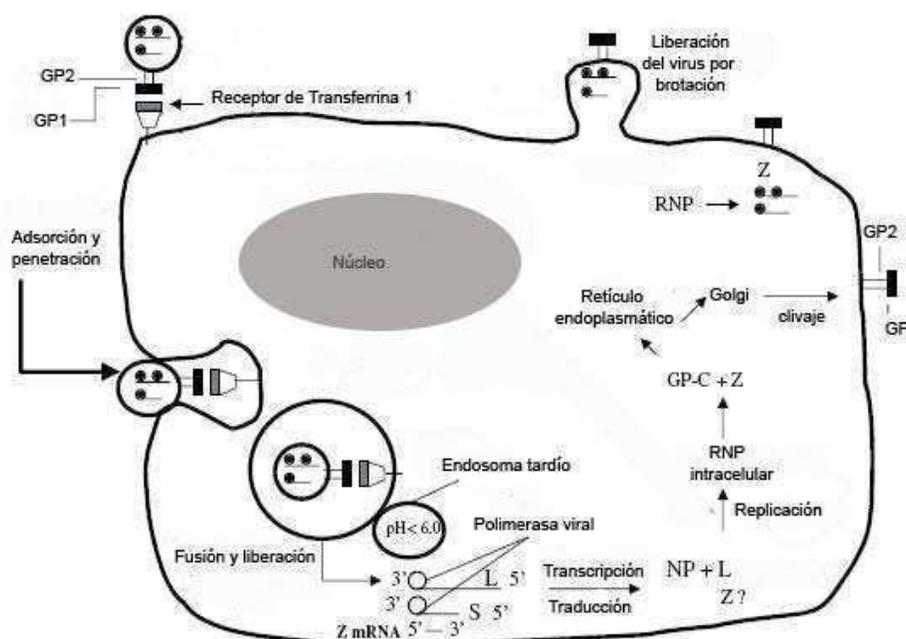
Por analogía con otros virus de cadena negativa se ha asumido que L es la ARN polimerasa ARN dependiente viral aunque hay pocos datos al respecto. Esta proteína codificada en el extremo 3' del segmento de ARN L es un polipéptido no glicosilado con un peso aproximado de 250 kDa. La concentración intracelular de L aumenta dramáticamente durante el curso de una infección aguda con LCMV sin embargo, la actividad polimerasa disminuye con el tiempo de infección (Fuller-Pace y col., 1989). Estos hallazgos proponen una función regulatoria de L en tiempos tardíos de infección que podría afectar el balance entre transcripción y replicación (Southern y col., 1987). Lee y col. (2000) demuestran en su trabajo que L, junto con NP, son los factores mínimos necesarios para la replicación del ARN.

La proteína Z se encuentra codificada en el extremo 5' del segmento L de ARN. Este polipéptido de un peso aproximado de 11 kDa se ha caracterizado por su dominio *ring finger* de unión al metal zinc (Salvato y col., 1989). Garcin y col. (1993) proponen que Z es necesaria tanto para la replicación como para la síntesis de los ARNm virales *in vitro*. Por otro lado para LCMV se observó un efecto inhibitorio de Z sobre los procesos antes mencionados (Lee y col., 2000). Estudios con compuestos que alteran específicamente la estructura *ring finger* demuestran el posible rol de Z en las etapas finales del ciclo de replicación de JUNV (García y col., 2003). Las interacciones estructurales descritas entre Z y NP son, al presente, motivo del estudio del posible rol de Z como proteína de matriz en los arenavirus.

## **V. CICLO DE REPLICACION**

La figura 8 muestra un esquema del ciclo de replicación de un arenavirus. La entrada del virus a la célula se produce por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor y dependiente de vesículas recubiertas con clatrina (Borrow y col., 1994, Martinez y col., 2007). En el año 1998, la proteína de membrana  $\alpha$ -dystroglycano fue identificada como receptor celular de LCMV (Cao y col., 1998). Esta proteína, mediadora de interacciones con la matriz extracelular y presente en gran variedad de tejidos, parece también tener

afinidad por otros arenavirus tales como Lassa, Oliveros y Mobala y otros miembros de la familia del Viejo Mundo, además del clado C del Nuevo Mundo (Cao y col., 1998; Spiropoulou y col., 2002). Sin embargo, se ha demostrado que no se relaciona con el proceso endocítico del JUNV u otros miembros del clado A y B del Nuevo Mundo. Más aún, se ha identificado al receptor de transferrina 1 humano (hTfR1) como un receptor celular de los virus del Nuevo Mundo causantes de FH: JUNV, MACV, GTOV y SABV (Radoshitzky y col., 2007), pero todavía se desconoce el receptor celular utilizado por el resto de los miembros de la familia.



**Figura 8.** Ciclo de multiplicación del JUNV.

El complejo glicoproteico presente en los viriones es el responsable de las interacciones iniciales con el receptor celular. Anticuerpos dirigidos contra GP1 pueden neutralizar la adsorción del virus a la célula indicando su papel en la infección de las células susceptibles.

La entrada de JUNV es inhibida por agentes lisosomotrópicos y representó uno de los elementos de prueba del ingreso dependiente de pH de los viriones al interior de la célula (Castilla y col., 1991). Estudios con otros arenavirus han demostrado además el efecto irreversible del pH sobre la estructura

conformacional de GP1 y su estabilidad en la envoltura viral (Di Simone y col., 1994).

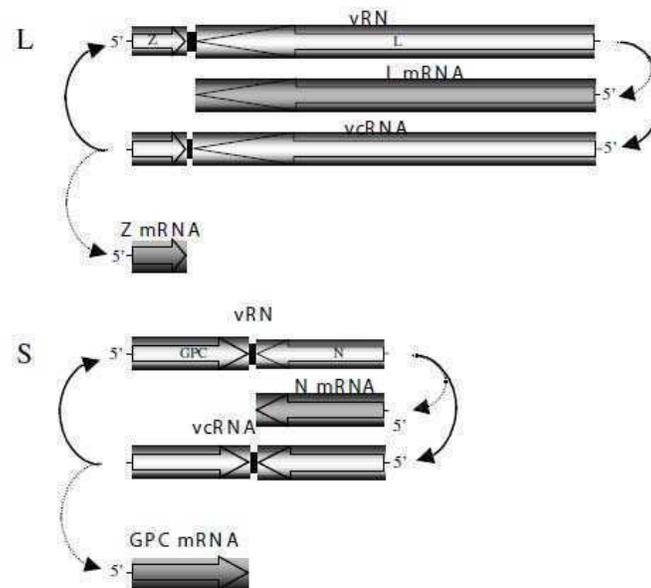
La transcripción y la replicación del genoma viral ocurren en el citoplasma aunque aún no se ha esclarecido la necesidad de algún componente celular para la adición de estructuras CAP al extremo 5' de los ARNs. Un inhibidor de la ARN polimerasa II como la actinomicina D no impide completamente la replicación de LCMV pero disminuye notablemente los niveles de producción viral por razones aún no elucidadas.

Aún cuando se desconocen los detalles para el inicio y los requisitos exactos de la misma, la estrategia de replicación ambisentido (Figura 9) ha sido profundamente estudiada y descrita por Auperin y col. (1984). Este término alude al hecho de que cada ARN tiene una región positiva y otra negativa. Como se mencionó anteriormente cada molécula de ARN codifica para 2 proteínas, uno de los genes se encuentra hacia el extremo 5' y el otro hacia el 3' separados por una región no codificante intergénica de secuencias autocomplementarias. De acuerdo a esta última característica los ARN pueden formar estructuras secundarias muy estables conocidas como *horquillas*.

Aunque el extremo 5' del ARN S contiene la secuencia codificante para GPC este precursor glicoproteico solo es traducido luego de una ronda de replicación genómica y a partir del transcripto subgenómico sintetizado en la célula. En el caso de la molécula de ARN L, la proteína Z ubicada en su extremo 5' es sintetizada por igual mecanismo que GPC. De esta manera los genes ubicados en la región 5' del ARN genómico tiene en realidad una polaridad pseudo-positiva.

La replicación viral comienza entonces en los extremos 3' con la transcripción de los genes NP y L del ARN S y ARN L respectivamente. Estos mensajeros son traducidos por la maquinaria celular conduciendo a la síntesis de las proteínas NP y L. La síntesis de los intermediarios antígenómicos completos permite la replicación del genoma para la nueva progenie así como también para la síntesis de los ya mencionados ARNm correspondientes a GPC y Z. Varias evidencias sugieren que los niveles de NP serían los determinantes en el equilibrio

entre transcripción y replicación viral dentro de la célula infectada (Franze-Fernandez y col., 1987).



**Figura 9.** Organización, transcripción y estrategia de replicación ambisentido de los ARN L y S de los arenavirus.

No existe mucha información respecto de las etapas finales del ciclo de replicación. A partir del procesamiento de las glicoproteínas en el retículo y aparato de Golgi, el ensamblado y brotación de los viriones se produce en la membrana celular pero se desconocen los eventos que determinan la salida del virus. En general se asume que el ensamblado de las partículas virales es iniciado por interacciones entre el dominio citoplasmático de una proteína viral de membrana y los componentes internos de la partícula. En consecuencia el proceso comienza tan pronto como las proteínas virales de membrana y citoplasmáticas se encuentran en concentración suficiente dentro de la célula infectada. Estudios realizados en viriones de LCMV sugirieron la capacidad de GP2 de interactuar con NP a través de su extremo citoplasmático (Burns y col., 1991). Mientras que otros estudios muestran a la proteína Z como posible responsable del reclutamiento en la membrana, funcionando como una proteína matriz en este proceso (Strecker y col., 2003).

Por último, la salida del virus de la célula infectada está íntimamente acoplada al proceso de brotación por el cual el virus adquiere la envoltura lipídica. Al alcanzar el medio extracelular la progenie posee la capacidad necesaria para la infección de una célula blanco y el inicio de un nuevo ciclo de replicación.

## **VI- INTERACCIÓN VIRUS-CÉLULA HUÉSPED**

Dado que un virus es incapaz de replicarse por sí mismo, la entrada a una célula y el uso de la maquinaria y energía celular, en mayor o menor medida, resulta indispensable para su subsistencia y persistencia en la naturaleza. De este modo el estudio de la multiplicación viral es de muchas maneras el estudio de la interacción entre las distintas estructuras y proteínas virales con la célula huésped. Los mecanismos por los cuales un virus puede infectar una célula determinada, multiplicarse eficazmente y producir su progenie son objeto de estudio de la virología y biología celular básica, conduciendo al conocimiento detallado de cada uno de los pasos del ciclo de multiplicación viral. Este conocimiento representa el punto de partida para todos los estudios conducentes al diseño de estrategias antivirales que permitan combatir la replicación viral. El diseño de vacunas es también, en este sentido, dependiente del conocimiento de la funcionalidad de las distintas proteínas virales, su expresión y su interacción con el sistema inmunológico. Por otro lado, la caracterización de las distintas interacciones entre el virus y la célula huésped permite la mejor comprensión de los daños citopáticos siendo una herramienta para la explicación de las patologías producidas por los virus en los distintos órganos infectados y su manifestación como una enfermedad con características definidas y propias.

Asimismo hay que señalar la importancia que ha cobrado la utilización de los sistemas virales como herramienta para el estudio y caracterización de los procesos básicos desarrollados en una célula eucariota. Los sistemas de cultivos de células son la principal herramienta para el estudio de las interacciones virus-célula. Su desarrollo y caracterización resultan indispensables para el uso de los mismos como un sistema experimental altamente controlable y reproducible.

El virus Junín es capaz de crecer *in vitro* en una amplia variedad de líneas celulares de distintos orígenes. En general la replicación es poco eficiente y no se observa citopatogenicidad, sin embargo en sistemas celulares como Vero y MRC-5 se observa un efecto citopático característico (Weissenbacher y col., 1983). La infección de monocapas con JUNV presenta dos etapas diferentes. La etapa aguda o inicial es aquella en la cual los niveles de producción viral son máximos y la destrucción celular marcada. Entre el tercer y quinto día se observa el efecto citopático acentuándose los focos de células redondeadas que con su posterior desprendimiento originarán placas en presencia de medio semisólido (Tkaczewski y Boxaca, 1970). En la segunda etapa, a partir de los 8-10 días p.i., las células sobrevivientes comienzan a repoblar el cultivo estableciéndose una acción moderada del virus sobre éstas. Esta etapa es también llamada de persistencia y su establecimiento es una de las características de los arenavirus que los ha hecho objeto de estudio en este aspecto.

El reconocimiento de la célula huésped es el primer paso en la interacción virus-célula. Esta etapa, que requiere la especificidad de interacción entre la membrana del virus envuelto y la membrana celular, conducirá al inicio de la infección determinando además el tropismo del virus. Un virus puede utilizar una amplia variedad de moléculas de superficie para su ingreso a la célula. Proteínas receptoras así como carbohidratos o glicolípidos son en general los que permiten la adsorción inicial a la membrana celular. Usualmente otras moléculas co-receptoras así como proteínas virales específicas pueden desencadenar y facilitar el evento de fusión. Una vez dentro de la célula los eventos de replicación y síntesis de proteínas son llevados a cabo en su mayoría por la maquinaria celular.

La maduración y transporte de las proteínas virales en las etapas tardías del ciclo viral son determinantes en la producción de las nuevas partículas infectivas. Las glicoproteínas virales, especialmente la hemaglutinina (HA) del virus Influenza así como la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) han sido utilizadas para el estudio de la biogénesis, transporte y localización de proteínas de membrana. De esta forma ambas glicoproteínas están ampliamente caracterizadas y estudiadas en este aspecto siendo referentes para el estudio de muchas otras proteínas virales. Sin embargo, cabe destacar que la elección de

Influenza y VSV como modelo para el estudio de estos procesos ha sido favorecida en parte por su alta capacidad replicativa que facilita el abordaje experimental.

Los virus con la propiedad de producir infecciones persistentes en sus hospedadores son de particular interés debido a la capacidad de replicarse en una célula sin producir su muerte o un efecto muy dañino sobre sus estructuras. Esta es la base para la explicación del establecimiento de infecciones crónicas en la naturaleza por los arenavirus y otros virus con esta misma propiedad (Howard, 1986; Lehmann-Grube y col., 1972 y 1984; Rawls y col., 1981).

El hecho de que un virus pueda establecer infecciones muy poco dañinas para la célula es una muestra también de un alto grado de co-evolución donde la relación entre el virus y la célula es aún más estrecha, demostrando la íntima dependencia del primero por el segundo. Este aspecto representa, sin embargo, un desafío experimental debido a las obvias implicancias de estudiar procesos virales que producen una pobre manifestación celular. En estos casos es frecuente recurrir a la alteración de algún mecanismo o estructura celular para observar sus efectos sobre la normal multiplicación del virus. Los resultados observados permiten el estudio de dichas interacciones virus-célula aunque frecuentemente es necesario un abordaje molecular para determinar asociaciones más específicas. Por otro lado la utilización de técnicas moleculares, como la expresión individual de proteínas virales en sistemas transfectados, presentan también dificultades a la hora de las conclusiones debido a la ausencia total de las interacciones con el resto de las proteínas virales que se dan naturalmente en una infección con virus entero.

## **VII- VIAS DE ENTRADA**

Como todos los parásitos intracelulares, los virus necesitan de una vía de entrada a sus células blanco para iniciar su infección. En las células animales los virus envueltos pueden fusionar su membrana con la membrana citoplasmática de la célula blanco o entrar por endocitosis. En éste último caso, la internalización no es suficiente para la infección productiva, ya que los virus siguen estando

rodeados del espacio extracelular dentro del endosoma. Por lo tanto los virus endocitados deben penetrar, si son desnudos, o fusionar su membrana con la endosomal, si son envueltos, para liberar su nucleocápside al citoplasma de la célula.

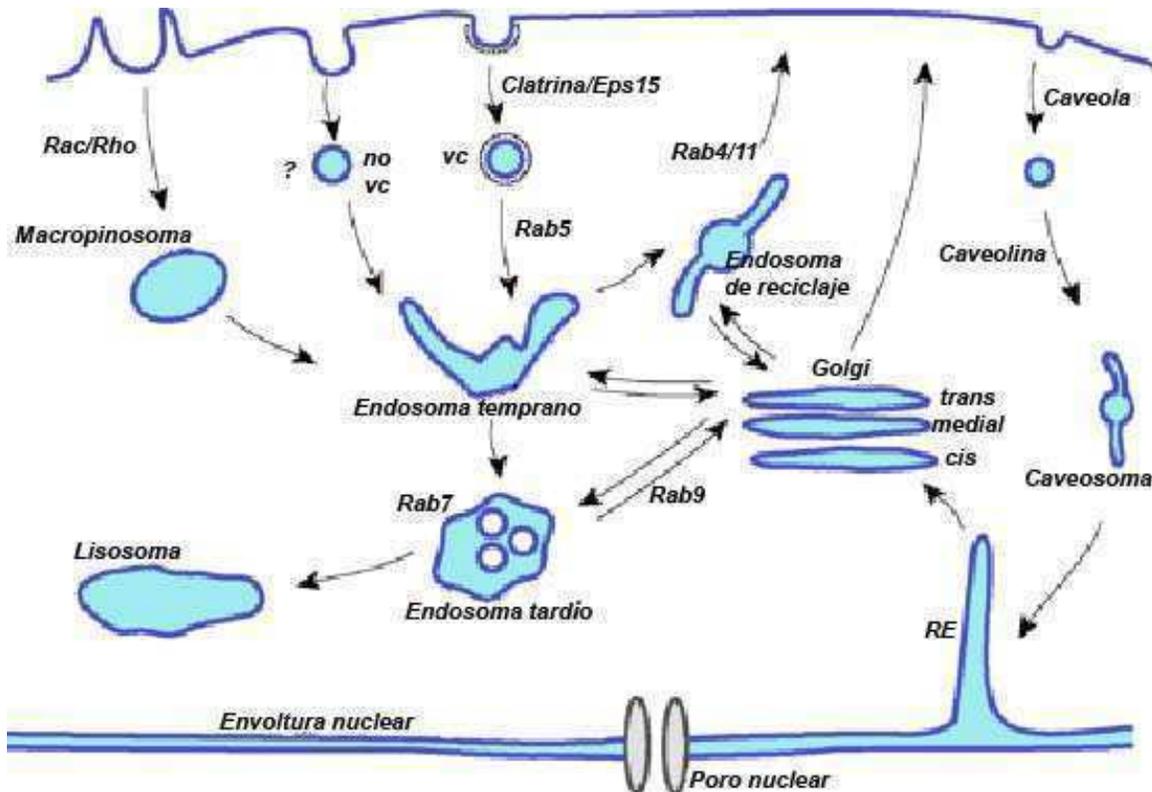
La mayoría de los virus utilizan la endocitosis como forma de entrar a la célula, ya que les ofrece grandes beneficios: muchos virus a pH ácido sufren un cambio conformacional que induce la fusión, penetración y desnudamiento. En estos casos la endocitosis es crucial debido a que por esta vía se acidifican las vesículas. Otra ventaja de este desnudamiento es que no dejan glicoproteínas expuestas en superficie, por lo cual están más protegidos frente a la respuesta inmune. Incluso muchos virus que no requieren estrictamente la disminución del pH utilizan esta vía de entrada ya que los endosomas le ofrecen una forma facilitada y rápida de atravesar la membrana plasmática y moverse en el citoplasma hacia el compartimento celular que le garantice una infección exitosa. Además, el endosoma puede transportar la carga viral cercana al poro nuclear, propiedad que es especialmente utilizada por los virus que necesitan del núcleo de la célula para replicar (Whittaker y Helenius, 1998).

Por lo tanto, los virus no solo dependen de la maquinaria de la célula para su internalización, sino también para su tráfico dentro del citoplasma y la habilidad de encontrar el sitio de replicación correcto. Por ejemplo, la fusión del virus Semliki Forest (SFV) a la membrana plasmática en condiciones de bajo pH resulta en la internalización del virus, pero no necesariamente resulta en una infección exitosa (Marsh y Bron, 1997). Esta infección depende del tráfico post-internalización y, en algunos casos de la interacción de las partículas virales directamente con el citoesqueleto de la célula (Sodeik, 2000).

### **VII.1- Rutas de entrada**

En la figura 10 se muestran las rutas de entrada más utilizadas por los virus y por lo tanto ampliamente caracterizadas. Los estudios realizados para la entrada del JUNV en las células Vero durante el desarrollo de mi tesina de licenciatura llevaron a la conclusión que el JUNV es internalizado por endocitosis mediada por

vesículas recubiertas con clatrina. Dado que los estudios que llevaron a esta caracterización fueron principalmente bioquímicos utilizando compuestos que alteran las distintas vías de entrada específicamente, se continuó analizando la necesidad de las distintas proteínas celulares involucradas en la entrada del JUNV durante este proceso. Es por eso que se ampliarán a continuación los detalles sobre esta vía de entrada particular.

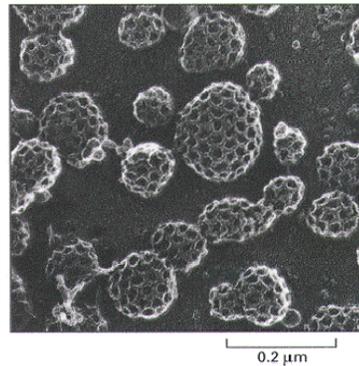


**Figura 10.** Vías de entrada caracterizadas hasta el momento

### VII.2- Endocitosis mediada por vesículas recubiertas con clatrina

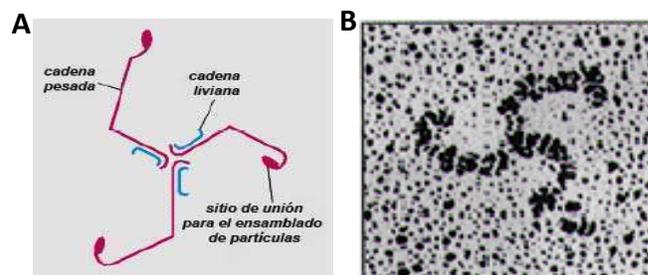
La primer molécula que se encontró necesaria para la endocitosis fue la molécula de clatrina, que media la principal ruta de internalización endocítica en las células (Brodsky y col., 2001). En respuesta a una señal de internalización presente en el receptor, que generalmente involucra una secuencia YXX o di

leucina en su cola citoplasmática, que son reconocidas por las proteínas adaptadoras AP2, las moléculas de clatrina se ensamblan en la cara interna de la membrana plasmática para formar las invaginaciones característica que van a dar lugar a las vesículas recubiertas con clatrina (Fig. 11).



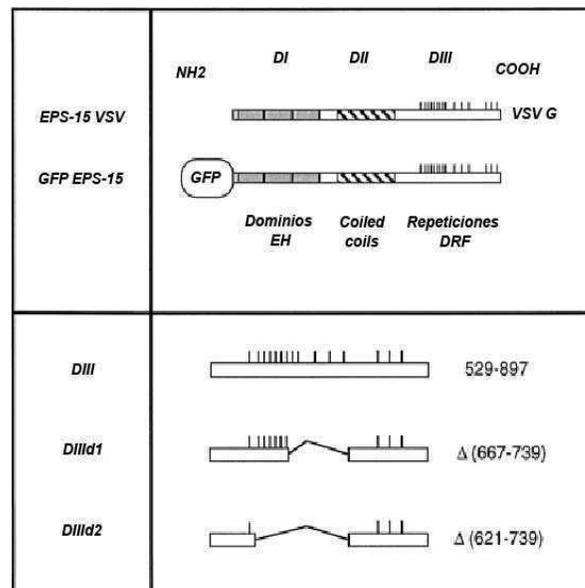
**Figura 11.** Vesículas de clatrina visualizadas con microscopía electrónica de barrido.

Las vesículas recubiertas con clatrina se forman por reclutamiento de moléculas de clatrina, cuyo monómero está formado por tres cadenas pesadas y tres cadenas livianas dispuestas en una estructura llamada "triskelion" (Figura 12), sobre regiones de membrana en las que se concentran proteínas adaptadoras y proteínas accesorias. Sobre estas superficies polimerizan formando estructuras planas con una disposición hexagonal. De esta forma, la composición de las vesículas de clatrina es mayoritariamente clatrina y proteínas adaptadoras y accesorias.



**Figura 12.** A-Estructura del "triskelion" de clatrina. B- Microscopía electrónica del triskelion de clatrina.

La proteína clatrina también interactúa con muchas proteínas esenciales, incluyendo Eps15 y las proteínas adaptadoras AP-2, que son esenciales para el ensamblaje de la canasta de clatrina y para la selección de las proteínas de membrana que van a ser internalizadas. Finalmente interactúa con la GTPasa dinamina que se ensambla alrededor del cuello de la vesícula con clatrina y produce su fisión, proceso que requiere de la hidrólisis del GTP (Figura 13) (Marsh y McMahon, 1999). El complejo AP-2, uno de los componentes identificados junto con la clatrina, juega un rol esencial tanto en la organización como en la función de las membranas recubiertas con clatrina. AP-2 es un heterotetrámero compuesto por dos largas cadenas de  $\alpha$ - y  $\beta$ 2 adaptinas (100 Kd), una cadena mediana  $\mu$ 2 (50 Kd) y una cadena pequeña  $\sigma$ 2 (17 Kd). Ha sido demostrado que AP-2 está constitutivamente asociado a Eps-15 (Benmerah y col., 1995, 1996). Eps-15 es una proteína altamente conservada, organizada en tres dominios estructurales (figura 13). Su dominio N-terminal (DI) está compuesto por tres repeticiones imperfectas de 70 aa homólogos entre ellos y a un dominio que se encuentra en las proteínas de mamíferos, levaduras y nematodos. Estos dominios son llamados EH por "Eps-15 Homology" (Wong y col., 1995). El dominio central de Eps-15 (DII) está involucrado en la homodimerización de Eps-15. El dominio C-terminal (DIII) se caracteriza por la presencia de repeticiones de la secuencia DPF que contiene el sitio de unión a AP-2 (Benmerah y col., 1996). El hecho de que Eps-15 se asocie a AP-2 sugirió un rol de Eps-15 en la endocitosis mediada por vesículas recubiertas por clatrina, hipótesis que fue apoyada por ensayos de colocalización de Eps-15 con clatrina y con AP-2, y por la presencia de Eps-15 en vesículas recubiertas con clatrina (Tebar y col., 1996; van Delft y col., 1997).



**Figura 13.** Organización estructural de Eps-15 y las construcciones de Eps-15

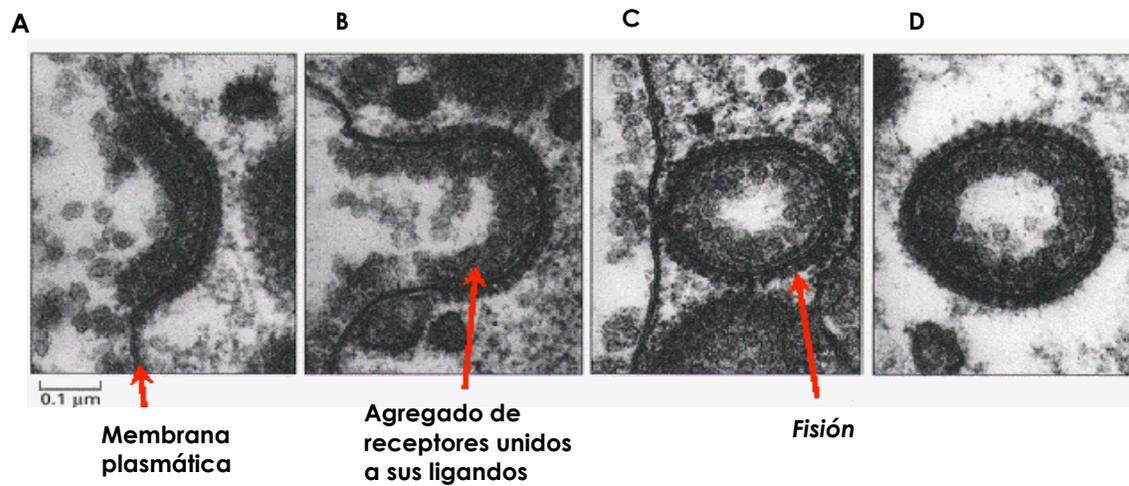
Las GTPasas dinaminas son las responsables de la endocitosis en células eucariotas. Son las encargadas del proceso de fisión de las vesículas formadas en la membrana plasmática, tanto de vesículas recubiertas con clatrina como de caveolas, o vías alternas independientes de estas dos proteínas. Pertenecen a una gran familia, que incluyen las dinaminas clásicas, las proteínas tipo dinaminas y otras proteínas similares. Las dinaminas son enzimas de 96 kDa, cuya función principal es formar un espiral alrededor del cuello de la vesícula. Una vez que se formó este espiral correctamente, se extiende y oprime el cuello utilizando la energía de la hidrólisis de GTP, lo que causa que la vesícula se desprenda de la membrana parental. Hasta el momento se han encontrado tres tipos de dinaminas en mamíferos:

Dinamina I: expresada en neuronas y células neuroendocrinas

Dinamina II: expresada ubicuamente

Dinamina III: expresada fuertemente en testis, pero también se la encuentra en el corazón, cerebro y pulmones

Al jugar un rol tan importante en la endocitosis muchos virus utilizan esta vía de entrada para su internalización, incluyendo influenza y el virus de la estomatitis vesicular (VSV), los cuales se observaron por microscopía electrónica, dentro de vesículas electrodensas (Marsh y Helenius, 1980; Matlin y col., 1981, 1982). En estas observaciones también se vieron vesículas no electrodensas que se atribuyeron a vesículas de clatrina que la habían liberado o a otros caminos alternativos no dependientes de clatrina.



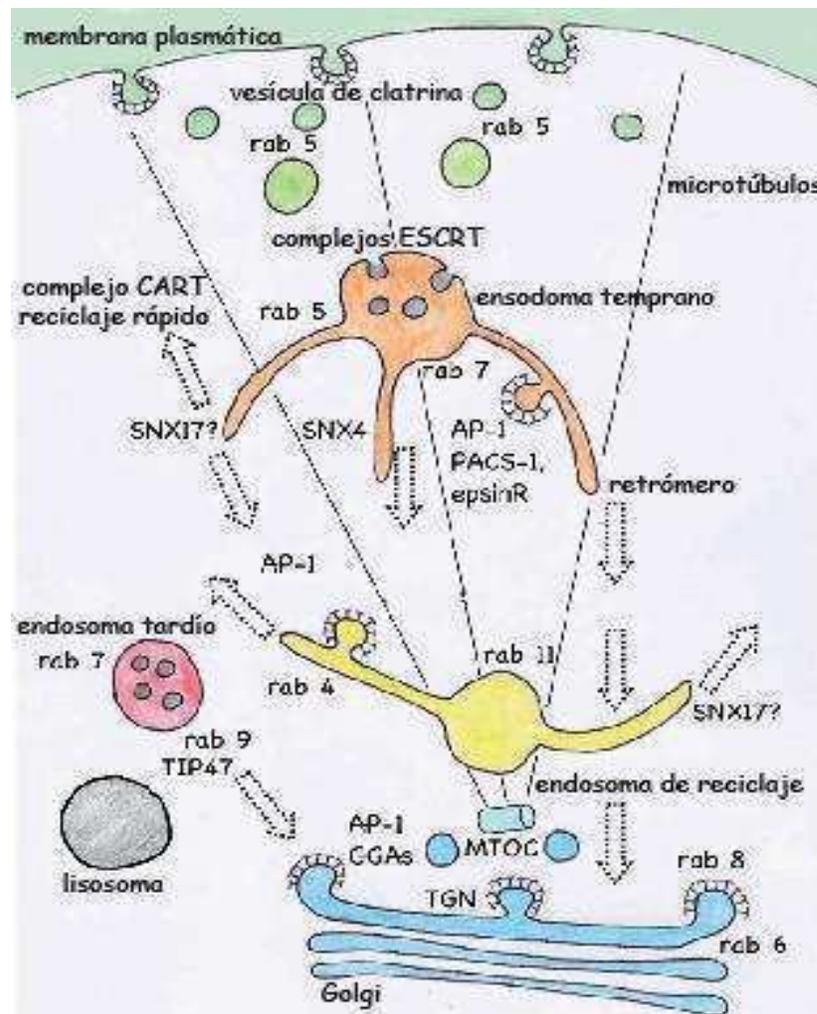
**Figura 14. Visualización de una secuencia de endocitosis mediada por receptor y la formación de vesículas cubiertas con clatrina por microscopía electrónica de transmisión. A-** Segregado de receptores y ensamble de la clatrina. **B-** Invaginación de la membrana producida por el ensamble de clatrina. **C-** Fisión. **D-** Vesícula cubierta liberada gracias a la dinamina.

La inhibición de las funciones de la clatrina tradicionalmente se basa en cuatro tipos de tratamientos: shock hipotónico (Madhus y col., 1987), depleción de potasio (Bayer y col., 2001), tratamiento de las células con brefeldina A (BFA) (Brodsky y col., 2001) y el uso de la droga clorpromacina (Wang y col., 1993). Ninguno de ellos es totalmente específico en inhibir la endocitosis mediada por vesículas recubiertas por clatrina: la BFA actúa sobre el factor de ADP ribosilación (ARF) y la clorpromacina ejerce su efecto sobre muchas enzimas intracelulares como la Calcio-Calmodulina (CaM). Por lo tanto tiene múltiples efectos en la función celular y su uso para inhibir la infección viral debe tomarse con cuidado, tratando de disminuir sus efectos pleiotrópicos durante los tratamientos realizados.

## **VIII- ORGANIZACIÓN ENDOSOMAL**

Los compartimentos que forman el sistema de endosomas juegan un papel esencial en el transporte y organización de las moléculas endocitadas en la membrana plasmática. Este transporte ocurre a través de una interacción compleja entre secuencias en las proteínas de la membrana plasmática y la maquinaria endosomal que reconoce estos motivos intrínsecos de las proteínas de membrana para dirigir las a sus respectivos destinos. Estos eventos juegan un rol esencial en la internalización de nutrientes, la regulación de la señalización desde los receptores, la biogénesis de los lisosomas, la respuesta a infecciones, y es por este motivo que esta maquinaria y mecanismos endosomales son aprovechados por los patógenos para ser internalizados con éxito en su célula blanco. Una vez que la molécula ha sido endocitada en la membrana plasmática, será enviada a un endosoma que la dirigirá nuevamente a la membrana, a la red trans-golgi (TG) o será enviada a un lisosoma para su degradación. Por lo tanto, el sistema endosomal comprende un gran número de compartimentos distintos y el tráfico que los une permite que el sistema endocítico sea un continuo, en el cual la localización de las moléculas es transiente en un compartimento particular, antes de ser dirigida a su destino final. Por todo lo expuesto y su carácter dinámico es muy difícil asignar una función específica a cualquiera de estos compartimentos endosomales. Sin embargo se los ha logrado nombrar según su relación espacio/temporal con la membrana plasmática. Por ejemplo los endosomas tempranos (ET) son los que se generan por fusión de las vesículas endocíticas, mientras que los endosomas tardíos (LE por "late endosomes") son los que pasaron ya por varios eventos de tráfico y se removieron las moléculas que estaban destinadas al TG o a ser recicladas a la membrana plasmática. Estos LE terminarán fusionándose con los lisosomas, que son el eslabón final de la cadena de endosomas. En los últimos años, se han utilizado distinciones adicionales que denotan la función de los endosomas, como el endosoma de reciclaje. Se puede observar un diagrama simplificado de estos distintos endosomas y algunos de sus componentes claves en la figura 15. Los endosomas tempranos se encuentran usualmente dispersos en el citoplasma mientras que los endosomas tardíos se

encuentran concentrados en la región perinuclear. Los endosomas se mueven desde la membrana plasmática hacia la región perinuclear, las moléculas endocitadas son dirigidas a sus respectivos destinos. El movimiento hacia el interior de la célula se ve acompañado por una acidificación creciente, producida por la acción bombreadora de protones de la ATPasa vacuolar.



**Figura 15.** Diagrama simplificado del camino endocítico en una célula de mamífero (Seaman 2008).

Trabajos previos implicaron a las pequeñas GTPasas de la familia Rab como proteínas reguladores clave del tráfico intracelular (Pfeffer y col., 1992; Novick & Brennwald, 1993). Su localización en distintos compartimentos intracelulares,

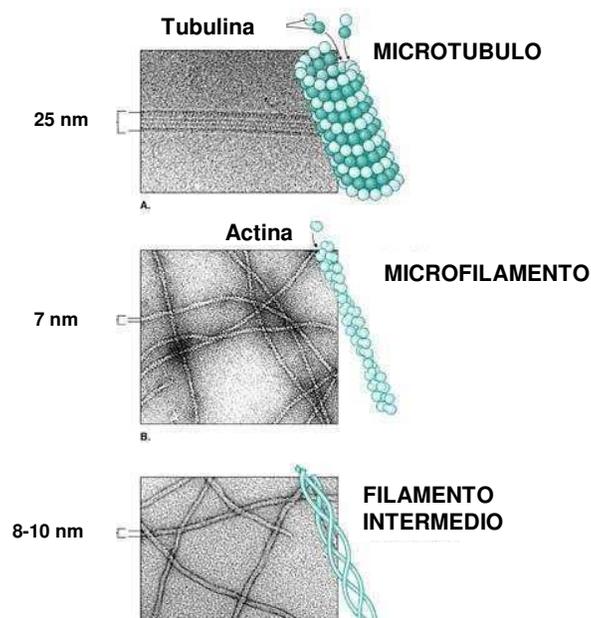
enfaticó su rol en el mantenimiento de la especificidad del transporte vesicular. Como otras pequeñas GTPasas, las proteínas Rab actúan como moléculas regulatorias que reconocen a las proteínas blancas a través de un cambio conformacional dependiente de la unión al nucleótido GTP (Bourne y col., 1991). La asociación de las proteínas Rab con la membrana plasmática depende de una isoprenilación c-terminal que resulta esencial para su función (Magee & Newman, 1992). Esta asociación es regulada por el inhibidor de la disociación de GDP (Rab GDI) (Ullrich y col., 1993) y está acompañada por el intercambio de GDP unido a GTP (Ullrich y col., 1994). Este cambio de GTP a GDP ocurre a través de la hidrólisis de GTP, catalizada por las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) (Strom y col., 1993). Análisis mutacionales demostraron que el cambio entre la forma unida a GTP o GDP es crítico para la función de las proteínas Rab (Walworth y col., 1992). Sin embargo, no está del todo claro el rol exacto de esta hidrólisis. Las membranas intracelulares contienen un gran número de GTPasas distintas que regulan el transporte vesicular (Pfeffer, 1992), y parecería que las proteínas Rab usan esta hidrólisis de GTP como para cambiar de su conformación activa a inactiva (Novick y Brennwald, 1993). Las proteínas Rab activas son reclutadas a compartimentos unidos a la membrana donde regulan el tráfico vesicular, incluyendo la formación, liberación y fusión de las vesículas (Novick y Zerial, 1997; Zerial y McBride, 2001).

Cada proteína Rab es reclutada a un compartimento específico y funciona a través de interacciones con efectores específicos que median las funciones asociadas a las Rab (Pfeffer, 2005). En las células de mamífero existen por lo menos 12 proteínas Rab que regulan el tráfico a través del camino endosomal (Jordens y col., 2005). Dentro de este grupo las proteínas Rab4, Rab5, Rab7 y Rab11 juegan un papel esencial en el tráfico de vesículas endocíticas. La proteína Rab5 está presente en ET y regula el transporte de vesículas endocíticas desde la membrana plasmática (MP) hacia los ET y la fusión entre los ET (Barbieri y col., 1996). Tanto la Rab4 como la Rab11 son reguladoras del reciclaje de receptores desde los ET hacia la MP (Fig. 15). La proteína Rab4 se encuentra principalmente en los ET y regula el reciclaje rápido de vuelta directamente hacia la MP (Roberts y col., 2001) y la Rab11 se encuentra principalmente en los

endosomas de reciclaje perinucleares (ERP) y regula el reciclaje más lento a través de estos compartimentos (Ren y col., 1998; Wilcke y col., 2000). Además, la Rab 11 regula el tráfico de membranas desde compartimentos endocíticos de reciclaje hacia la red del trans-golgi (Urbe y col., 1993). La proteína Rab7 se encuentra principalmente en endosomas tardíos (LE) y regula el tráfico entre los ET y los LE y entre los LE y los lisosomas (Bucci y col., 2000). Esta organización única de las proteínas Rab en distintos compartimentos celulares y su especificidad como reguladores del tráfico vesicular las ha convertido en importantes herramientas para el estudio de la endocitosis. Por ejemplo, la expresión de formas mutantes dominantes negativas (DN) o constitutivamente activas (CA) de las proteínas Rab que regulan el tráfico endosomal ha sido utilizada para identificar los pasos del transporte intracelular requeridos para la infección de distintos virus (Quirin y col., 2008; Rauma y col., 1999).

## **IX-CITOESQUELETO CELULAR**

Muchas de las vías endocíticas ampliamente caracterizadas se realizan con la participación activa del citoesqueleto. Por este motivo se resumen a continuación sus características y funciones. Las células eucariotas poseen tres tipos de redes proteicas filamentosas distribuidas en el interior del citoplasma, que le permiten adoptar una gran cantidad de formas y hacer que sus movimientos sean coordinados y direccionales. Estas redes están conformadas por microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios que se extienden a través del citoplasma. El citoesqueleto es el principal responsable de movimientos tales como la contracción muscular y la división mitótica. También proporciona la maquinaria para el desplazamiento activo de orgánulos desde un lugar a otro del citoplasma y permiten el transporte activo de macromoléculas.



**Figura 16.** Esquema de los componentes principales del citoesqueleto

### **IX.1- Microtúbulos (MT)**

Son filamentos del citoesqueleto que se caracterizan por estar contruidos a partir de tubulina, proteína dimérica (subunidades alfa y beta) que se autoensambla para formar los microtúbulos en un proceso dependiente de GTP. Los microtúbulos tienen un diámetro de 25 nm y se originan en los centros organizadores de microtúbulos (principalmente centrosomas), adoptando una organización radial en las células interfásicas.

Una de las principales funciones que cumplen los MT es la localización intracelular específica de las organelas. Tanto el retículo endoplasmático como el aparato de Golgi cambian su patrón de localización celular al tratar las células con agentes depolimerizantes o estabilizantes de MT. Los MT son responsables del sostén interno y funcionamiento de cilios y flagelos. Por último otra función de gran importancia es la participación de los MT en la división celular: forman parte del huso mitótico y participan activamente en la segregación de los cromosomas duplicados.

Se ha estudiado el rol de los microtúbulos en el transporte vesicular. Su disrupción con agentes como el Nocodazol y la Colchicina o su estabilización con Paclitaxel inhiben específicamente el transporte de las proteínas desde el TGN al dominio apical, en células polarizadas, ya que el tránsito hacia el dominio basolateral no es afectado.

### **IX.2- Microfilamentos (MF)**

Estos filamentos están formados a partir de una proteína globular denominada actina, que forma polímeros de alrededor de 5 a 6 nm de diámetro. Están presentes en las células animales mostrando una organización de haces paralelos en dominios subcorticales y citoplasmáticos de la célula. Los filamentos de actina poseen gran importancia en todos los procesos de desplazamiento y adhesión celular (emisión de pseudópodos). También juegan un rol importantísimo en la división celular, pues forman el anillo de contracción que permite el estrangulamiento celular durante la citocinesis. Otra función importante es en el tejido muscular, donde filamentos de actina asociados a proteínas motoras denominadas "miosinas", provocan la contracción del músculo en un proceso mediado por calcio.

Los microfilamentos son sensibles a la despolimerización causada por las Citochalacinas, la Nifeldipina y a las Latrunculinas, así como también a la estabilización causada por la Jasplakinolida, produciéndose alteraciones de diversas actividades celulares como endocitosis, migración celular, y otras funciones. Se ha propuesto que la red de actina juega un papel importante en el destino de las vesículas que salen del TNG a la membrana apical en células polarizadas. Una disrupción extensiva de la actina resulta en la inhibición del movimiento de las vesículas que se dirigen a la cara apical o en la acumulación de estas en la región subapical (Tilney, 1983).

### **IX.3- Filamentos intermedios (FI)**

Los filamentos intermedios tienen un diámetro de 8 a 10 nm y son abundantes en el citoplasma de células que deben soportar un alto estrés mecánico dado que su función principal es aportar resistencia. Los FI están constituidos por una gran variedad de proteínas relacionadas tales como vimentina, laminina o queratina, a diferencia de los MT y MF que están altamente conservados en la evolución de los eucariontes. Distintos tipos celulares difieren en el tipo particular de FI expresado. Su estructura básica consta de una cadena polipeptídica con un dominio central helicoidal presentando dominios globulares en los extremos amino y carboxilo terminal. Aparentemente sin gasto de energía estos monómeros se asocian en dímeros y luego en tetrámeros para conformar la subunidad estructural que compone los filamentos. Las funciones de los filamentos intermedios son menos conocidas.

### **X- INTERVENCION DEL CITOESQUELETO DURANTE LA REPLICACION VIRAL**

Cada etapa del ciclo viral se lleva a cabo en un compartimiento específico, mostrando una interacción localizada dentro de la estructura del huésped. El citoesqueleto determina la forma, el transporte celular y el movimiento de organelas dentro de las células, por lo tanto sería posible la interacción entre las macromoléculas virales y el citoesqueleto. Principalmente sería importante el rol del citoesqueleto en la entrada y movimiento del virion dentro de la célula.

Se observaron procesos en los cuales el citoesqueleto favorece la transmisión viral célula a célula como en la infección por HIV utilizando los filamentos de actina (Rey y col., 1996). Asimismo se determinó tanto en VSV como en el virus Sendai que la tubulina está implicada directamente con la síntesis de RNA viral ya que se encontró una asociación a nivel de una proteína viral que interactúa con la tubulina de la célula infectada (Hill y col., 1986, Moyer y col., 1986).

Para el caso de los Arenavirus, existen pocos datos de intervención del citoesqueleto durante las etapas de multiplicación viral. La primera evidencia que hizo suponer que ésta existe, es la presencia de actina en virus purificado (Pasian y col., 1983). Estudios realizados con compuestos que alteran la estructura de los microfilamentos, entre ellos el DMSO y la nifeldipina, y microtúbulos, como el Nocodazol y la Colchicina, mostraron un marcado efecto inhibitorio en la producción de JUNV y de la expresión de las glicoproteínas en membrana. Asimismo, alterando la estructura de los filamentos de vimentina con acrilamida, se demostró la necesidad de la integridad de estos FI en un paso posterior a la internalización, pero antes de la expresión de la NP (Candurra y col., 1999, Cordo y col., 2003). Hasta el momento no se encontraron datos de la participación del citoesqueleto celular en la entrada de JUNV a la célula huésped.

### **XI- LECTINAS DE TIPO C**

Las lectinas de tipo C (calcio dependiente) constituyen una amplia familia de receptores que reconocen estructuras específicas de carbohidratos presentes en patógenos. Su función principal es mediar la endocitosis de antígenos y su presentación posterior a través de moléculas de clase I o II del complejo mayor de histocompatibilidad. Estas lectinas son expresadas en su mayoría por células dendríticas (CD) inmaduras, macrófagos y células endoteliales. Más allá de su función en la endocitosis de antígenos, algunas de estas proteínas son empleadas por ciertos virus como receptores para infectar células y favorecer su diseminación. Algunos virus como citomegalovirus y el virus dengue las utilizan para infectar células dendríticas. Otros virus como hepatitis C, HIV-1, HIV-2 y el virus de la inmunodeficiencia simiana (SIV) utilizan estos receptores para favorecer su diseminación. Son proteínas integrales de membrana tipo II, con un dominio citoplasmático N-terminal, y un dominio extracelular con siete repeticiones en tándem completas y una parcial y un dominio C-terminal de reconocimiento de carbohidratos (DRC). Dentro del DRC existen secuencias altamente conservadas EPN o QPD esenciales en el reconocimiento de estructuras conteniendo manosa o galactosa respectivamente. La mayoría de las lectinas de tipo C expresadas

por las CD tienen especificidad por los carbohidratos que contienen manosa; sin embargo cada lectina de tipo C puede reconocer un patrón único de residuos manosa en un determinado patógeno o superficie celular. El DC-sign (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin) pertenece a la familia de las lectinas de tipo C y juega un rol esencial en los pasos iniciales de la respuesta inmune y la migración de las CD ya que media la interacción de las CD con los linfocitos T y células endoteliales a través de su interacción con ICAM-2 e ICAM-3 (Geijtenbeek y col., 2000). Esta molécula fue clonada originalmente como una proteína de unión a la GP120 de HIV (Curtis y col., 1992), otorgándole a las CD la habilidad de facilitar la infección en *trans* de células susceptibles (Geijtenbeek y col., 2000). En el caso de HIV, DC-sign no actúa como un receptor de entrada sino que permite la endocitosis del virus por CDs para su transmisión posterior a linfocitos T susceptibles. Por mecanismos aún desconocidos, el HIV escapa a la degradación y procesamiento luego de ser internalizado y permanece infeccioso por más de cinco días en el interior de la CD. Las CDs DC-sign positivas se encuentran en la sangre y las mucosas, donde se produce el primer contacto con el HIV luego de su transmisión por vía sanguínea o sexual. Se piensa que en estos tejidos las CDs podrían endocitar el HIV y transportarlo hasta órganos linfoides secundarios, donde el virus sería transferido desde las células dendríticas a los linfocitos T que contactan con ellas. Este mecanismo parecería tener un papel importante en la promoción de la infección de los linfocitos T CD4+, sobre todo cuando los títulos del virus son extremadamente bajos, situación usual en la infección a través de mucosas. Se ha demostrado que tanto DC-sign como su homólogo L-sign (DC-signr; liver and lymph node-specific; CD209L) se unen a la mayoría de los lentivirus de primates: HIV-1 (cepas R5 y X4), HIV-2 y el virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV) (Pöhlmann y col., 2001). L-sign no es expresada por CD, sino por células endoteliales del hígado, nodos linfáticos y villi de placenta (Bashirova y col., 2001). La afinidad de estos receptores de membrana por las glicoproteína retrovirales y su patrón de distribución en los tejidos llevaron al estudio de su rol como factor de unión e internalización para el JUNV.

Actualmente no hay tratamiento para las fiebres hemorrágicas, por lo que existe una necesidad crítica de desarrollar terapias efectivas para tratar los brotes

anuales y contrarrestar su potencial uso como armas biológicas. El mecanismo de infección de los virus causantes de fiebres hemorrágicas involucra atributos específicos de los virus pero mantienen cierta analogía que podrían utilizarse como blanco de compuestos antivirales. Todos los virus causantes de fiebres hemorrágicas infectan preferencialmente monocitos, macrófagos y células dendríticas durante las etapas tempranas de la enfermedad (Geisbert y col., 2004). Es por este motivo que estas células representan un blanco potencial en el tratamiento de las fiebres hemorrágicas.

# OBJETIVOS

Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo han demostrado que la internalización del JUNV es dependiente de un mecanismo de endocitosis mediada por vesículas recubiertas con clatrina. Otros estudios demostraron la participación del citoesqueleto en el transporte de las glicoproteínas de JUNV a la superficie celular. Tanto la integridad de microtúbulos como microfilamentos es necesaria para la replicación viral. La expresión de las glicoproteínas virales en la membrana celular fue disminuida cuando se alteró la red de MT o MF (Candurra y col., 1999).

La participación de los distintos componentes celulares involucrados en las etapas tempranas del ciclo de replicación del virus aún no había sido explorada. Con este objetivo se estudió la participación de las proteínas celulares involucradas en los procesos endocíticos así como también de los componentes principales del citoesqueleto: los MF y los MT.

El trabajo de tesis que a continuación se presenta se llevó a cabo con el objetivo de determinar

- I. La participación de las proteínas celulares propias de mecanismos celulares endocíticos en la internalización del JUNV.
- II. La participación del citoesqueleto, particularmente la red de microfilamentos y microtúbulos en las etapas tempranas del ciclo de replicación de JUNV.
- III. Ampliar el conocimiento del mecanismo de infección del JUNV analizando el rol de las lectinas de tipo C en la infección por JUNV.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

---

## **1. VIRUS**

Se utilizó la cepa atenuada IV4454 del virus Junín (JUNV) aislada a partir de un caso leve de FHA (Contigiani y Sabatini, 1977). El stock de trabajo se preparó infectando células Vero con una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,1 UFP/célula. Se recogieron los sobrenadantes a partir del tercer día post infección (p.i.). Los stocks fueron titulados por el método de unidades formadoras de placas (UFP) en células Vero y se almacenaron en alícuotas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los títulos obtenidos en los stocks fueron para todos los casos del orden de  $10^7$  UFP/ml.

Se utilizó el virus Tacaribe (TCRV) cepa 11573 cedida por el Dr. de la Torre. La semilla se amplificó en células BHK-21, infectando con una m.i. de 0,1 UFP/célula. Luego de 1 hora de infección a  $37^{\circ}\text{C}$ , se incubó con medio de mantenimiento MEM 1X suplementado con 1,5% suero de ternera (ST) inactivado (MM). Los sobrenadantes se cosecharon a partir del quinto día p.i. y se titularon por el método de UFP en la línea celular Vero.

## **2. CULTIVOS CELULARES**

### **2.1. Línea celular Vero (ATCC CCL 81)**

Provenientes de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Los cultivos se crecieron en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado con 5% de ST inactivado y 50  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente y luego de alcanzada la confluencia se mantuvieron en MM. Cuando estos cultivos se utilizaron para titular virus Junín se mantuvieron en medio semisólido (MEM 2X, 4% de ST inactivado, 100  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina) en partes iguales con metilcelulosa 1,4%. En los casos en los que los cultivos se incubaron en estufa con 4% de  $\text{CO}_2$  los medios se suplementaron con 20  $\mu\text{M}$  de buffer HEPES.

### **2.2 Línea celular CHO (ATCC CCL 9618)**

Proveniente de ovario de hámster chino (*Cricetulus griceus*). Los cultivos se crecieron MEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado y 50  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente y

se incubaron en estufa con 4% de CO<sub>2</sub> por lo que los medios se suplementaron con 20 μM de buffer HEPES.

### **2.3. Líneas celulares TRVb y TRVb-1**

Cedida por el Dr. Collin Parrish, (Baker's Institute, Cornell University, Ithaca, New York). Estos cultivos derivados de células CHO son deficientes en la producción del receptor de transferrina endógeno, mientras que las TRVb-1 expresan establemente el receptor de transferrina humano debida a la transfección de las mismas con un plásmido que se mantiene por la presencia de geneticina (G418, Sigma Aldrich). Ambos cultivos se crecieron y propagaron en medio Ham's F12 suplementado con 10% de SFB inactivado y 50 μg/ml de gentamicina. En el caso de las TRVb-1 el medio también se suplementó con 200 μg/ml de geneticina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente y se incubaron en estufa con 4% de CO<sub>2</sub> por lo que los medios se suplementaron con 20 μM de buffer HEPES.

### **2.4. Cultivo primario de embrión de ratón**

Los cultivos se obtuvieron a partir de embriones de ratón (BalbC) de 2 semanas de gestación. Se extrajeron los cuernos uterinos y se los colocó en cajas de Petri con PBS, eliminando la sangre y las membranas que lo rodean. Se eliminaron las cabezas, miembros y tejido hepático de los fetos, el material fue lavado con PBS y pasado a otra caja de Petri con PBS. Los tejidos fueron diseccionados con tijera hasta obtener trozos de alrededor de 1mm, siempre en esterilidad y humedecidos en PBS. Estos fragmentos se disgregaron en forma enzimática con tripsina 0,02% durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Se descartó el sobrenadante y se agregó tripsina fresca, dejándose incubar ahora por 30 min a 37°C. Se dejó sedimentar el material y se filtro a través de una gasa doble estéril, recogiendo el sobrenadante en un tubo de centrifuga. Los sobrenadantes fueron centrifugados a 1000 x g y resuspendidos en MEM 10% SFB y sembrados en botellas T<sub>25</sub> a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células/ml. Luego de formada la monocapa las células se subcultivaron y se incubaron a 37°C hasta el momento de la infección.

### **2.5. Línea NIH 3T3 (ATCC CCL 1658)**

Cedidas gentilmente por el NIH (National Insitute of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos). Estos cultivos provienen de embrión de ratón (*Mus musculus*). Los cultivos se crecieron en MEM suplementado con 10% de SFB inactivado y 50 µg/ml de gentamicina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente y luego de alcanzada la confluencia se mantuvieron en MM. Los cultivos se mantuvieron en estufa con 4% de CO<sub>2</sub> por lo que los medios se suplementaron con 20 µM de buffer HEPES.

### **2.6. Línea NIH 3T3 DC-sign o L- sign**

Cedidas gentilmente por el NIH (National Insitute of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos), son cultivos derivados de las NIH 3T3 que expresan establemente las lectinas DC-sign o L-sign respectivamente. Los plásmidos que expresan estas lectinas no cuentan con ningún tipo de selección por antibióticos sino que fueron seleccionados por citometría de flujo. Una vez descongeladas estas células no se utilizaron por más de 10 pasajes. Los cultivos se crecieron en MEM suplementado con 10% de SFB inactivado y 50 µg/ml de gentamicina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente. Los cultivos se mantuvieron en estufa con 4% de CO<sub>2</sub> por lo que los medios se suplementaron con 20 µM de buffer HEPES.

### **2.7. Línea BHK-21 (ATCC CCL-10)**

Provenientes de riñón de hámster (*Mesocricetus auratus*). Los cultivos se crecieron en MEM suplementado con 10% de ST inactivado y 50 µg/ml de gentamicina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente y luego de alcanzada la confluencia se mantuvieron en MM. Los cultivos se mantuvieron en estufa con 4% de CO<sub>2</sub> por lo que los medios se suplementaron con 20 µM de buffer HEPES.

### 3. COMPUESTOS UTILIZADOS

Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Las soluciones madres preparadas a partir de los compuestos se fraccionaron y almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  según las siguientes concentraciones:

- Nocodazol: 10 mM en DMSO.
- Latrunculina A: 1mM en DMSO.
- Metil- $\beta$ -ciclodextrina: 500 mM en agua.
- Nistatina: 50 mM en DMSO.
- Clorpromacina: 10 mM en etanol.
- Paclitaxel: 100mM en metanol.
- Citochalasina D: 5mM en etanol.
- Mannan: 50 mg/ml en agua.
- Jasplaquinolida: 1mM en DMSO.

Todas las soluciones fueron esterilizadas por filtración a través de una membrana Millipore con un tamaño de poro de  $0,2\ \mu\text{m}$ .

### 4. REACTIVOS, MARCADORES Y ANTICUERPOS UTILIZADOS

Anticuerpos monoclonales reactivos contra NP: IC06-BE10 para IFI.

Anticuerpos reactivos contra NP: NA05-AG12 para western-blot.

Anticuerpos reactivos contra la GPC: GB03-BE08 y GD01-AG12 para IFI.

Cedidos por el Dr. A. Sánchez (C.D.C., Atlanta, U.S.A.) (Sánchez y col., 1989).

Suero policlonal anti-Junín realizado en conejo (Damonte y col., 1986).

Anticuerpos monoclonales contra DC y L-sign humanos: Clon 120526, 9E9A8, 14EG7 (NIH, Atlanta, U.S.A.)

Anticuerpos policlonales reactivos contra TRCV (ATCC VR-1272 AF)

Anticuerpos monoclonales reactivos contra el receptor de transferrina: CD 71 (BD-Pharmigen) y anti-TfR desarrollados en ratón (Zymed)

Anticuerpos monoclonales anti- $\alpha$ -tubulina clon B512, suero anti-IgG de ratón desarrollados en cabra, conjugados con fluoresceína, faloidina-FICT, transferrina-TRITC, toxina colérica subunidad A-FICT, MTT: (3-4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio, obtenidos de Sigma-Aldrich, USA.

## **5. OBTENCION DE VIRUS PURIFICADO Y MARCADO RADIOACTIVAMENTE**

Monocapas de células Vero crecidas a confluencia en botellas T75 se infectaron con JUNV (m.i.=0,1) y se incubaron a 37°C durante 1 hora para permitir la adsorción del virus. Luego se agregó MM y se incubó durante 72 horas p.i. Al concluir este período se colocó medio de ayuno (MEM sin los aminoácidos metionina y cisteína) durante 1,5 horas. Luego se incorporó directamente en el medio de ayuno una solución radioactiva conteniendo  $S^{35}$ -metionina y  $S^{35}$ -cisteína (Express  $S^{35}$ , 100 $\mu$ Ci/ml, NEN, USA) y se incubó por un período de 24 horas a 37°C. Por último se cosechó el sobrenadante y se clarificó a 10.000 x g durante 15 minutos.

Para la concentración se ultracentrifugó durante 3 horas a 120.000 x g y se resuspendió el pellet por sonicación. Se determinó la radioactividad asociada en un contador de centelleo y el título infectivo para el virus purificado siendo  $5,7 \times 10^7$  dpm/ml y  $4,3 \times 10^7$  UFP/ml respectivamente.

## **6. CURVAS DE CRECIMIENTO**

Cultivos de células Vero crecidos en monocapa se infectaron con JUNV (m.i.= 0,1) al alcanzar confluencia. A distintos días p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por el método de UFP en células Vero.

## **7. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR: METODO MTT**

Para determinar el rango de concentraciones no tóxicas para las células se utilizó el método colorimétrico descrito por Mosmann y col. (1983). Se crecieron monocapas de células Vero en microplacas de 96 cavidades y se trataron con distintas concentraciones del compuesto a ensayar. Luego del tiempo necesario de tratamiento se agregan 10  $\mu$ l de una solución 5 mg/ml de MTT en cada cavidad.

El MTT es clivado en presencia de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa originando un subproducto coloreado (cristales azules de formazán). Transcurridas 2 horas a 37°C se retiran los sobrenadantes, se colocan 200  $\mu$ l de etanol 95%, se resuspende el precipitado y se mide la

absorbancia en un lector de ELISA a una longitud de onda de 495 nm y una longitud de referencia de 690 nm.

Se determina la viabilidad de las monocapas teniendo en cuenta que la absorbancia de la solución en las muestras es proporcional al número de células viables presentes al momento del ensayo. Cada concentración se realizó por cuadruplicado.

## **8. TITULACION DE LA INFECTIVIDAD VIRAL**

La titulación de la infectividad viral se realizó por el método de unidades formadoras de placas (UFP). Para ello monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 24 cavidades, se infectaron con un inóculo de 0,1 ml de diferentes diluciones seriadas al décimo de la muestra a titular. Cada ensayo se realizó por duplicado. Después de 1 hora de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y cada cavidad se cubrió con 1 ml de medio semisólido. Las microplacas se incubaron a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub> durante 7 días. Por último se fijaron las células con formol 10% durante 20 minutos y se revelaron las placas con cristal violeta al 1%.

El título viral expresado en unidades formadoras de placas por mililitro se determinó de la siguiente forma:

$$\text{Título (UFP/ml)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ promedio de placas}}{\text{Dilución utilizada} \times \text{volumen del inóculo}}$$

## **9. ENSAYO DE INHIBICION DEL RENDIMIENTO VIRAL**

Se crecieron monocapas de células Vero en microplacas de 24 cavidades y fueron infectadas con el JUNV (m.i.=0,1) y luego de 1 hora de adsorción se retiró el inóculo. Al tiempo adecuado las células fueron tratadas, siempre por duplicado, con distintas concentraciones del compuesto a evaluar. Luego de la infección se mantuvieron en la estufa de CO<sub>2</sub> hasta el momento de realizar la cosecha. Una vez obtenidos, los sobrenadantes (Sn) se titularon por el método de UFP para calcular la infectividad remanente. Con la cuantificación de placas se realiza el cálculo del porcentaje de inhibición de

los compuestos respecto a los controles infectados y sin tratamiento con los compuestos como:

$$\% \text{ de inhibición} = 1 - (\text{Título Sn tratado} / \text{Título Sn control})$$

## **10. ACCION DE LOS COMPUESTOS A DISTINTOS TIEMPOS**

### **10.1 Adición post-infección**

Los cultivos de células Vero crecidos en monocapa hasta la confluencia fueron infectados con JUNV (m.i.=0,1). A las dos horas post-infección se colocó MM conteniendo distintas concentraciones del compuesto a estudiar. A las 16 hs p.i. se lisaron las células y se extrajo el ARN total. Como control se utilizaron los sobrenadantes de las células infectadas y sin tratar.

### **10.2 Adición pre-tratamiento**

Los cultivos de células Vero se crecieron en monocapas hasta la confluencia y fueron incubados con MM conteniendo las distintas concentraciones del compuesto a ensayar, durante distintos tiempos según el compuesto. Luego del período de pretratamiento se retiró el medio y se realizó la adsorción de JUNV en presencia de las distintas concentraciones de la droga. Finalmente se retiró el inóculo, se cubrieron las monocapas con medio fresco y se cosecharon los sobrenadantes correspondientes a las 24 horas p.i. para ser titulados por el método de UFP.

## **11. ESTUDIO DE LA EXPRESION DE PROTEINAS**

### **11.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Se crecieron monocapas de células sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades. A las 24 hs fueron tratadas con distintas concentraciones del compuesto a evaluar durante distintos tiempos dependiendo del compuesto. Pasado su tiempo de tratamiento los cultivos fueron infectados con JUNV

(m.i.=0,1) en presencia de la concentración respectiva de la droga. Luego de una hora de infección a 37°C se retiró el inóculo y se incubó con MM durante 24 hs. En algunos ensayos, luego de la adsorción, los cultivos se incubaron en presencia de una dilución 1/50 de suero anti-Junín. A las 24 o 48 horas p.i. se lavaron las monocapas tres veces con PBS para su posterior fijación. Para realizar IFI citoplasmática se fijaron las células con metanol durante 10 minutos a una temperatura de -20°C o se fijó 10 minutos con formaldehído a temperatura ambiente y se permeabilizó con tritón X-100 0,2%. Luego de la fijación se realizan tres lavados con PBS, en ambos casos.

Para revelar el antígeno viral se utilizaron anticuerpos monoclonales reactivos contra NP en una dilución 1:300 y para la IFI de microtúbulos se utilizaron anticuerpos monoclonales anti- $\alpha$ -tubulina en una dilución 1:200 en PBS. En el caso de las IFI de las lectinas DC-sign o L-sign se incubaron los preparados con diluciones 1:300 de anticuerpos monoclonales reactivo contra ambas lectinas. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario específico durante 30 minutos a 37°C. Pasado ese tiempo se realizaron tres lavados con PBS. Por último se realizó una incubación con suero anti-IgG de ratón conjugados con fluoresceína, por 30 minutos a 37°C en una dilución 1:50 en PBS. En todos los casos luego de tres lavados con PBS y un lavado final con agua destilada las células fueron montadas en una solución tamponada de glicerol conteniendo 2,5 % de DABCO (1,4-diazabicyclo octano).

Los preparados se examinaron en un microscopio óptico Olympus BX51. El porcentaje de células positivas en cada cubreobjeto fue calculado como una media de 20 campos ópticos seleccionados al azar, en los cuales se contaron células positivas y células totales, tomando como control las monocapas infectadas y sin tratar.

### **11.2 Fluorescencia directa**

Se crecieron monocapas de células en cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades. En los casos en los que se marcaron los filamentos de actina se utilizó faloidina-FICT. Luego de tres lavados con PBS se fijaron las células para fluorescencia utilizando formaldehído 4 % y tritón X-100 0,2 % para la permeabilización. Se vuelven a realizar tres lavados previos a la incubación de

una hora con la faloidina en una dilución 1:20. Al cabo de este tiempo se retira el compuesto se realizan lavados durante 45 minutos con agitación y en oscuridad.

En los casos en que se utilizó la transferrina-TRITC, previo a la incubación con el compuesto se hicieron lavados sucesivos con PBS. Para la incubación con el compuesto se diluyó la solución madre en una concentración de 20 µg/ml en PBS. Luego se incubaron las células con 250 µl de esta concentración, en presencia o ausencia de alguna droga, según el tratamiento, durante 20 minutos a 4°C y una hora a 37°C. Pasado este tiempo se retira el compuesto y se mantienen las monocapas sobre hielo durante tres lavados con PBS. Se fijan las células con formaldehído 4% y se procede con la permeabilización de las células con tritón X-100 0,2 %.

En todos los casos luego de un lavado final con agua destilada las células fueron montadas, examinadas y cuantificadas como los preparados de IFI.

## **12. ENSAYO DE ADSORCION E INTERNALIZACION DEL VIRUS**

Cultivos de células Vero crecidas en monocapa fueron infectadas con un stock de JUNV marcado radiactivamente como se indica anteriormente. Para ello 100 µl de la suspensión (200.000 dpm) se adsorbieron al cultivo, en presencia o ausencia del compuesto, incubando a 4°C durante 1 hora. Luego se retiró el inóculo, se lavó tres veces con PBS-BSA 0.2% y se lisaron los cultivos con una solución de NaOH-SDS (0.1 N, 1% respectivamente) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se recogieron las muestras y se resuspendieron en 2 ml de líquido de centelleo para cuantificar la radioactividad asociada.

Cuando se evaluó la internalización se procedió a adsorber el inóculo y lavar las monocapas como se mencionó anteriormente. Luego de los lavados se incubaron los cultivos durante 1 hora a 37°C en PBS-BSA 0,2% para permitir la internalización de los viriones marcados radiactivamente. Finalizado el tiempo se retiró el medio y se adicionó una solución de proteinasa K en PBS (1mg/ml) para eliminar el virus adsorbido pero no internalizado. Se incubó durante 45 minutos a 4°C y se detuvo la reacción con 0,5 ml de una solución PBS-BSA 3%

adicionada con 2 mM de fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF). Se centrifugaron las muestras, se resuspendieron en 0,2 ml de NaOH-SDS y se agregó líquido de centelleo para cuantificar la radioactividad como se mencionó anteriormente.

### **13. EFECTO DE LOS COMPUESTOS EN LA SINTESIS DE ARN VIRAL**

Monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 6 cavidades fueron tratadas con Latrunculina A o Paclitaxel en distintas concentraciones, luego se infectaron con JUNV (m.i.=5). A las 4 u 8 horas post infección, el ARN total fue extraído con el kit comercial Totally ARN (Ambion, USA). El ARN extraído de cada muestra fue cuantificado por medición de absorbancia a 260 nm y utilizado como molde para la síntesis de del ADNc (ADNcopia), utilizando “*random primers*”, para evitar resultados falsos negativos. Para la síntesis del ADNc se tomaron 2 µg de cada muestra de ARN y se llevo a un volumen de 8 µl. Luego se agregaron 2 µl “*random primers*” en una concentración 10 µM y 4 µl de buffer 5X para la transcriptasa reversa (RT) de AMV (avian myeloblastosis virus), la retrotranscriptasa (4 unidades), 1 µl de RNAsin (Promega, USA) y 3 µl de H<sub>2</sub>O libre de ARNsas. El volumen final de cada reacción fue de 20 µl. Esta reacción fue incubada a 42°C durante 2 horas.

Este ADNc sintetizado con “*random primers*” fue empleado como molde en reacciones de PCR en tiempo real. En esta reacción el volumen final fue de 25 µl y fue llevada a cabo en presencia de buffer de reacción Master Mix 2xSYBR (Applied Biosystems, USA) y primers 1 µM.

Los cálculos iniciales del número de copias de ARNm en cada muestra se hicieron en base al método C<sub>T</sub> (“cycle threshold”). El C<sub>T</sub> es el número de ciclos mínimos de PCR (amplificaciones) necesarias para que el producto de amplificación sea detectado por el equipo. Es decir, que a menor valor de C<sub>T</sub>, mayor es la concentración de sustrato con el que se inicia la reacción. Los valores de C<sub>T</sub> fueron normalizados usando la amplificación del gen celular *gapdh* como control interno. Se realizó un análisis de disociación de los productos de PCR para confirmar la especificidad de la reacción.

El C<sub>T</sub> de cada muestra fue calculado en el límite fluorescencia (Rn) determinado automáticamente al utilizar el 5.700 SDS software (PerkinElmer). Para ambos pares de *primers* la linealidad de la señal de fluorescencia de la

amplificación fue determinada por un amplio rango de diluciones seriadas de ADNc de referencia que cubre el rango de concentraciones en el cual espera encontrarse la muestra. Se encontró una clara correlación entre la cantidad de ADNc y el  $C_T$  por lo menos por la duración de 40 ciclos de RT-PCR. La expresión del gen blanco NP se normalizó contra la expresión del gen control *gapdh*. Los resultados se expresan como cantidades relativas (QR) para comparación entre las distintas muestras. Las UA se definen como los niveles de expresión relativos de las células tratadas respecto al de las células control.

$C_T$ : n ciclos de PCR

$\Delta C_T$ : es la diferencia entre el promedio de los valores de  $C_T$  de las muestras de interés (NP) y los valores de  $C_T$  de los controles internos (*gapdh*) ( $\Delta C_T = C_{TNP} - C_{Tgapdh}$ )

$\Delta\Delta C_T$ : es la diferencia entre los promedios de  $\Delta C_T$  para el gen de interés entre la condición control (células infectadas, no tratadas) y el promedio de los valores  $C_T$  de cada muestra tratada ( $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ NP de células controles} - \Delta C_T \text{ NP de células tratadas con los compuestos}$ )

QR (cantidad relativa):  $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Para estas reacciones de amplificación por PCR en tiempo real se utilizaron *primers* específicos para el gen NP/JUNV o para el gen celular *gapdh*:

-vN (N186): 5' GGCATCCTCAGAACATC 3'.

*Primer* complementario a las secuencias del ARNm viral y ARN S antigenómica ubicadas en el extremo 5' del ARNm de NP.

-vcN (Arena): 5'CGCACAGTAAGGGGATCCTAGGC 3'.

*Primer* complementario a las secuencias ubicadas en los extremos 3' del ARN S genómico y 5' del ARN S antigenómico de la mayoría de los arnavirus.

-GAPDH F: 5' GTTGCCATCAATGACCCCTTCATTG 3'.

-GAPDH R: 5' CAGCCTTCTCCATGGTGGTG 3'.

Los resultados de las amplificaciones fueron validados basados en las curvas de disociación generados al final del ciclado de la PCR, barriendo temperaturas de 60°C a 95°C mientras continúa la colección de los datos de fluorescencia. Además, luego de la colección de datos la pureza de cada amplificación fue confirmada por electroforesis en geles de agarosa. Cada

muestra fue analizada en duplicados junto con standards y controles sin moldes para monitorear el ADN contaminante.

#### **14. CONSTRUCCION DE LOS PSEUDOTIPOS RETROVIRALES**

Se utilizó la construcción de empaquetamiento CMV-Gag-Pol MLV (murine leukemia virus), codificando los genes de *gag-pol* de MLV, y el plásmido MLV-Luc, que codifica un vector de transferencia basado en MLV conteniendo una unidad transcripcional interna CMV-Luciferasa (Negre y col., 2000) y el vector de expresión pcDNA3.1 GFP-myc que codifica para la GPC del JUNV. Para generar las partículas pseudovirales de JUNV, se transfectaron las células 293T con los vectores de expresión que codifican para los componentes virales: el vector de expresión de la GPC del JUNV pcDNA3.1-GPC (2,7µg), la construcción que codifica para las proteínas de empaquetamiento MLV Gag-Pol (8,1 µg) y el vector de transferencia MLV-Luc (8,1 µg), utilizando el protocolo de transfección provisto por el proveedor (Exgen, Fermentas). Se reemplazó el medio por OptiMEM previo a la transfección. 72 hs post-transfección se cosecharon los sobrenadantes y se filtraron a través membranas de 0,45µm.

#### **15. TRANSFECCION DE LAS CONSTRUCCIONES DE MUTANTES DOMINANTES NEGATIVAS**

Cultivos de células Vero fueron crecidos en cubreobjetos en placas de 24 cavidades. Cuando alcanzaron aproximadamente un 50% de confluencia fueron transfectados con las construcciones de los plásmidos que codifican las proteínas salvajes o mutantes dominantes negativas de Eps15, dinamina II (provistas por el Dr. Whittaker, Cornell University, Ithaca, NY) Rab5 o Rab7 (provistas por la Dra. Colombo, Universidad del Cuyo, Mendoza) fusionadas a la proteína verde fluorescente (GFP). Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las indicaciones del proveedor: 1µg de cada preparación de los plásmidos, obtenida utilizando el kit de extracción de DNA plasmídico de Promega, fue diluida en 50 µl de OptiMEM y se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente. Al mismo tiempo se diluyó 1 µl

del reactivo Lipofectamina en 50 µl de OptiMEM. Pasados los 10 min de incubación se preparo la mezcla de transfección combinando los 50 µl de la solución conteniendo el ADN con los 50 µl de la solución conteniendo la Lipofectamina. Esta se dejo reposar durante 20 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de ADN-Lipofectamina. Durante el periodo de las incubaciones se reemplazo el medio de cultivos de las células por 300 µl de OptiMEM. Pasados los 20 min de incubación los 100 µl de mezcla de transfección conteniendo los complejos ADN-Lipofectamina fueron agregados a una cavidad de una microplaca de 24 cavidades. Estas células fueron incubadas durante 24 hs a 37°C, pasado este tiempo las células fueron infectadas con JUNV a una m.i. de 1 durante 1 hora a 37°C. Luego se retiró el inóculo y se reemplazó por MM durante 24 hs para permitir la replicación viral. A las 24 hs post-infección los cultivos infectados o control sin infectar fueron fijados para IFI citoplasmática con metanol. Se realizó la IFI como se indicó anteriormente contra la NP viral, pero en este caso el anticuerpo secundario anti IgG de cabra utilizado se encuentra acoplado a TRITC, para permitir distinguir las transfecciones con la GFP de la infección con en este caso se verá como roja. Los cultivos fueron examinados utilizando un microscopio Olympus BX51. La cuantificación se realizó tomando 100 células transfectadas por cada preparado y se contó la cantidad de células infectadas. Así se tomaron como positivas las células transfectadas e infectadas mientras que las negativas fueron aquellas células transfectadas que no presentaron antígeno virales.

## **16. ANALISIS DE DATOS**

Todos los experimentos fueron realizados por duplicado y repetidos al menos 3 veces. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente calculando las medias aritméticas y los errores estándar para cada punto.

# **RESULTADOS**

---

---

# ***CAPÍTULO I***

*Estudio de las proteínas  
celulares involucradas en  
la entrada del Virus Junín*

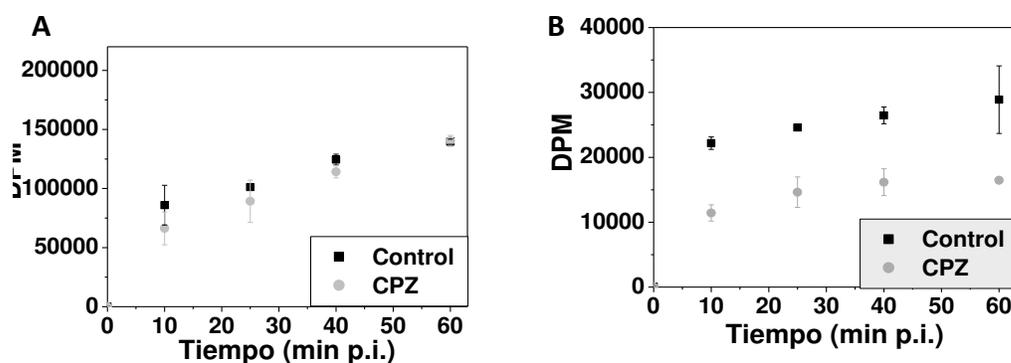
## 1. ESTUDIO DE LA VIA DE ENTRADA UTILIZADA POR EL VIRUS JUNIN EN CELULAS VERO

### 1.1 Rol de la endocitosis mediada por clatrina en la entrada del JUNV

Para cumplir con el primer objetivo propuesto, estudiar los pasos tempranos en la replicación del virus Junín, se empleó la línea celular Vero. Esta línea es utilizada de rutina para la producción del virus Junín y la mayoría de los arnavirus, en ella se han realizado la mayoría de las caracterizaciones del ciclo de multiplicación *in vitro* ya que es fácilmente cultivable y en ella se alcanzan valores de producción viral altamente aceptables. Se estudiaron los pasos tempranos en la infección por JUNV utilizando compuestos que inhiben específicamente las distintas vías de entrada. En estudios previos (Martinez y col., 2007), se evaluó el rol de la endocitosis mediada por clatrina pretratando las células con clorpromacina (CPZ), la cual actúa desestabilizando la red de clatrina subyacente a la membrana plasmática previniendo así la formación de las vesículas (Wang y col., 1993). También fue evaluado el efecto del pretratamiento con medio hipertónico utilizando sacarosa en altas concentraciones, lo que resulta en la disociación de las vesículas de clatrina de la membrana plasmática (Hansen y col., 1993, Heuser y col., 1989), obteniendo resultados similares a los que obtuvimos utilizando CPZ. Estos resultados indicaron que los tratamientos con compuestos que inhiben la endocitosis mediada por vesículas recubiertas con clatrina, inhibieron la entrada del JUNV, lo que pudo verse reflejado en la disminución de la expresión de la NP, sugiriendo que el JUNV utiliza esta vía de entrada para su internalización en las células Vero. Al realizar los mismos tratamientos y procesar las células para Western blot, se obtuvieron los mismos resultados: la expresión de la NP del JUNV se vió inhibida al pretratar las células con CPZ o sacarosa. Además fue investigado el efecto de la CPZ y la sacarosa en células infectadas con distintas m.i.: 5 y 0,5. Se ha visto en trabajos anteriores que al infectar con una m.i. mayor a 1 muchos virus pueden utilizar una vía de entrada alternativa. Por este motivo, se estudió el efecto de los compuestos por IFI para cuantificar el nivel de infección a cada m.i. La CPZ redujo la infección viral a

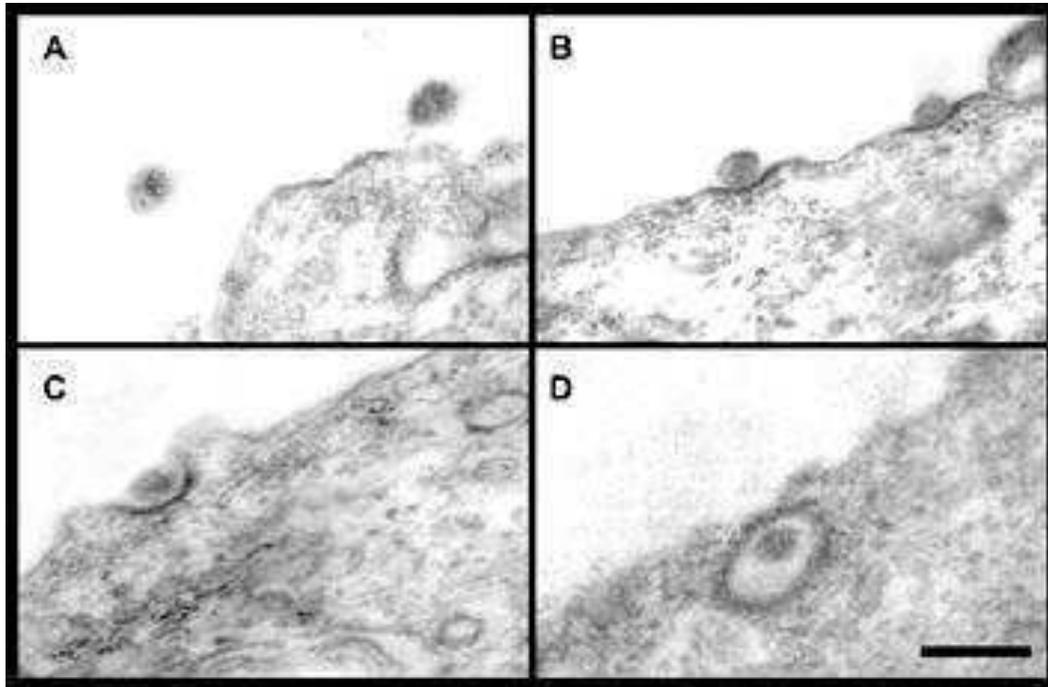
ambas m.i. pero a una m.i.=5 solamente hubo un 50% de inhibición, indicando que a altas m.i. otra vía de entrada estaría siendo utilizada.

El siguiente objetivo fue analizar en qué etapa temprana estaba actuando la CPZ, ya que los experimentos hasta ahora realizados indicaron que esta vía está involucrada en el ciclo de replicación y probablemente en una etapa temprana, pero no puede discriminarse si el compuesto ejerce su efecto en la adsorción del virus a su receptor celular o durante la internalización del mismo. Por lo tanto, a continuación se realizaron ensayos con el JUNV marcado con  $^{35}\text{S}$ -metionina para determinar la cinética de adsorción y penetración, bajo las mismas condiciones de tratamiento con la CPZ e infección utilizadas en los ensayos previos. Como puede observarse en la figura 17A cuando la vía de entrada dependiente de vesículas recubiertas por clatrina está siendo alterada por la CPZ, la adsorción del virión marcado no se ve alterada. Por el contrario, los niveles de radioactividad, que representan la internalización del virus a la célula, mostraron una disminución significativa al compararse con los cultivos controles (Fig. 17B). Estos resultados proporcionaron mayor información sobre la etapa temprana del ciclo de replicación del JUNV en la cual la CPZ estaba actuando. Es decir que la vía dependiente de clatrina juega un rol esencial en la internalización del JUNV, pero no en su adsorción a su receptor celular.



**Figura 17- Cinéticas de adsorción y penetración.** Monocapas de células Vero fueron crecidas durante 48 hs y luego se pretrataron con CPZ 40  $\mu\text{M}$  o con MM en el caso del control. Para la adsorción (A), luego del pretratamiento se infectaron las células con JUNV marcado radioactivamente a 4°C. Se fueron procesando las células a distintos tiempos como se detalla en materiales y métodos. En el caso de la cinética de internalización (B), luego del pretratamiento y la adsorción por un período de 60 minutos a 4°C, los cultivos fueron incubados a 37°C para permitir la internalización del JUNV. A distintos tiempos procesaron según lo detallado en materiales y métodos.

Estos ensayos reafirman la idea de que la vía de entrada por vesículas recubiertas por clatrina es utilizada por el JUNV, pero al ser la CPZ un compuesto que puede presentar efectos pleiotrópicos sobre las células necesitamos determinar de forma más directa esta interacción. Es por esto que para continuar con el estudio, y determinar el destino de las partículas virales durante la infección temprana se utilizó microscopía electrónica. Se incubaron las células Vero con partículas de JUNV, preparadas por protocolos de concentración (ver materiales y métodos) para alcanzar una m.i. de 50 UFP/célula, a 4°C durante 60 min. Esta infección a baja temperatura permite que los viriones puedan adsorberse a las células pero no internalizarse. A continuación las células infectadas se incubaron a 37°C durante 15 min y luego fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión (MET). Los viriones fueron claramente identificados por su morfología: se observaron partículas ovaladas, con un diámetro promedio entre 80 y 120 nm, lo cual es comparable con el tamaño reportado previamente para JUNV y otros arenavirus (Fig. 18A) (Borrow y Oldstone, 1994, Murphy y col., 1970). Se observó que la entrada es un proceso asincrónico: todas las fotos de la figura 18 corresponden a diferentes estadios de la internalización del virus, aunque todas ellas fueron tomadas luego de 15 min de incubación a 37°C. El primer contacto del virus con la célula se observó en depresiones electrodensas de la membrana, como puede observarse en la figura 18B. Estas depresiones, corresponden a membranas recubiertas por clatrina (Marsh y Helenius, 1980, Matlin y col., 1982). Más aún, todas las partículas virales endocitadas fueron observadas dentro de las vesículas recubiertas por clatrina (Fig. 18C y D).



**Figura 18- Análisis ultraestructural de la entrada del JUNV a células Vero.** Las células Vero fueron incubadas con JUNV concentrado (m.i.=50) durante 60 min a 4°C. La infección fue iniciada al elevar la temperatura a 37°C. Pasados 15 min a 37°C las células se lavaron en PBS y se fijaron en glutaraldehído 2%. Se realizaron cortes de secciones finas para su análisis ultraestructural por MET. (A) Población de JUNV fuera de las células Vero (B) Absorción de las partículas de JUNV a la membrana plasmática. (C) Entrada del JUNV en superficies recubiertas por clatrina, (D) finalmente internalización dentro de una vesícula recubierta por clatrina. La barra representa 200 nm.

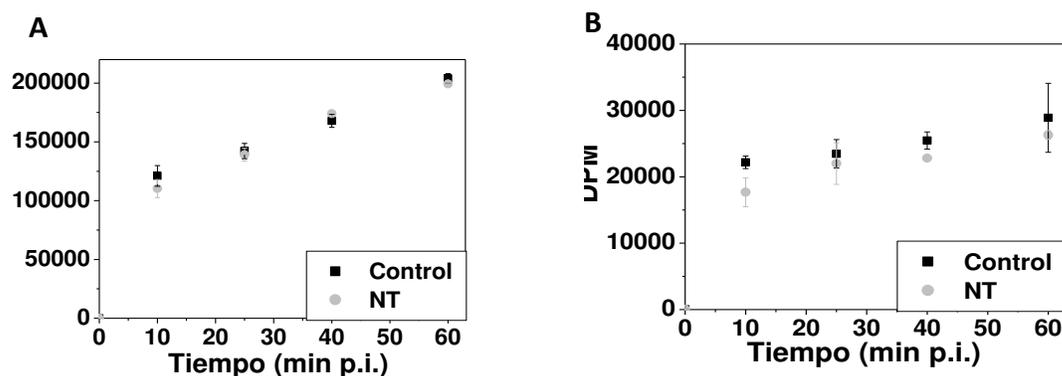
### 1.2 Rol de la vía de entrada dependiente de caveolas

El colesterol es un componente dominante de los microdominios de membrana enriquecidos en colesterol y esfingolípidos ("*lipid raft*"), los cuales están involucrados en la formación de las caveolas. Se ha demostrado que la depleción del colesterol de la membrana con M $\beta$ CD o el "secuestro" del mismo con drogas que se unen al colesterol como la NT, impiden la formación de las caveolas (Sieczkarski y Whittaker, 2002a). La efectividad de estos compuestos fue examinada midiendo la entrada de la subunidad B de la toxina colérica acoplada a FITC (FICT-CTx), dado que esta toxina ingresa por esta vía (Orlandi y col., 1998). En estudios realizados durante la tesis de licenciatura, las células fueron pretratadas con NT o M $\beta$ CD y luego fueron infectadas. La entrada del JUNV no

fue afectada por el pretratamiento con NT o M $\beta$ CD, indicando que no sería necesaria la integridad de los raft en las etapas tempranas del ciclo de replicación del JUNV.

Como fue mencionado en la sección A1, a altas m.i. el JUNV estaría usando otra vía de entrada alternativa, es por esto que también estudiamos por IFI el efecto de la NT en células infectadas con distintas m.i. del JUNV. Se infectaron células Vero con dos m.i. distintas, 5 y 0,5. En estos ensayos se observó que la infección por el JUNV no fue afectada a ninguna de las m.i. utilizadas cuando los cultivos fueron pretratados con NT. Esto indica que la otra vía utilizada a altas m.i. no sería dependiente del colesterol presente en la membrana plasmática.

Para continuar con estos estudios y confirmar los resultados obtenidos se realizaron ensayos de adsorción y penetración. Los niveles de radiactividad representativos de la adsorción (Fig. 19A) e internalización (Fig. 19B) de JUNV a las células Vero, en presencia de los compuestos no mostraron una reducción significativa respecto al control celular. Estos resultados indican que la perturbación de los rafts lipídicos no afecta las etapas tempranas del ciclo de replicación del JUNV.

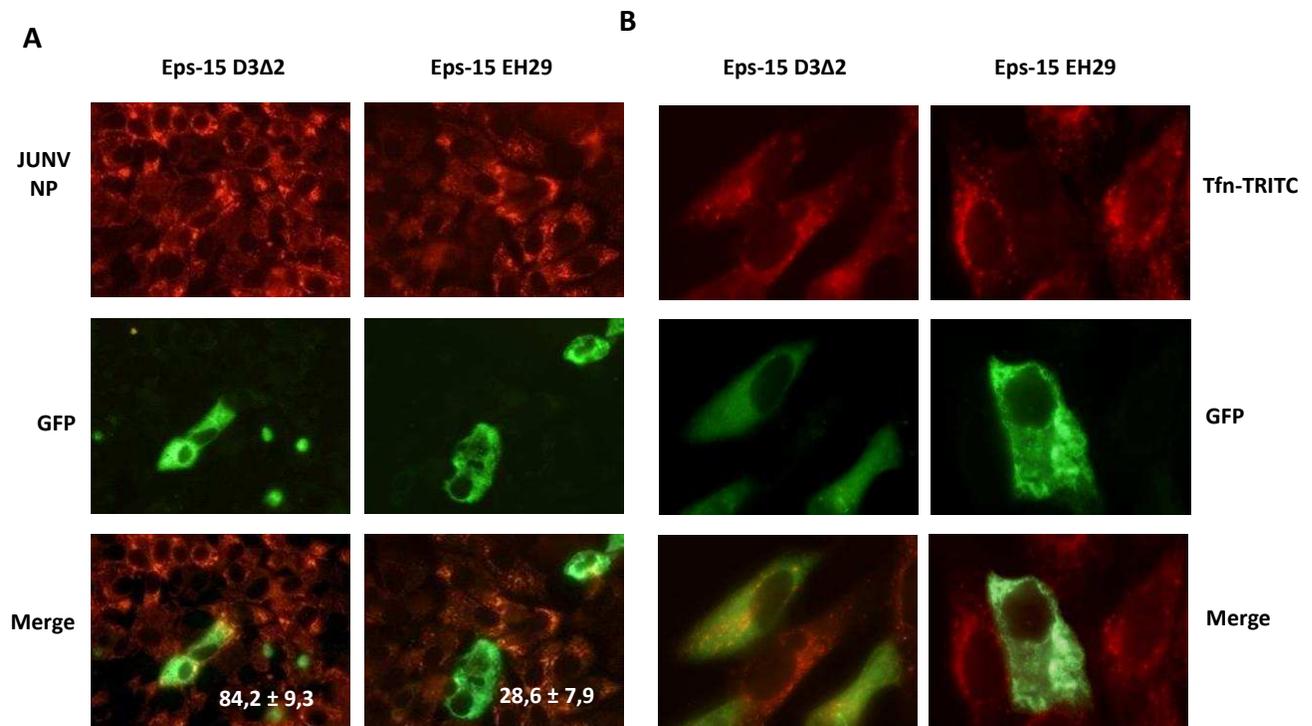


**Figura 19- Cinéticas de adsorción y penetración.** Monocapas de células Vero fueron crecidas durante 48 hs y luego se pretrataron con NT 40  $\mu$ M o con medio en el caso del control. Para la adsorción (A), luego del pretratamiento se infectaron las células con JUNV marcado radioactivamente a 4°C. Se fueron procesando las células a distintos tiempos como se detalla en materiales y métodos. En el caso de la cinética de internalización (B) luego del pretratamiento y la adsorción por un período de 60 minutos a 4°C, los cultivos fueron incubados a 37°C para permitir la internalización del JUNV. A distintos tiempos se procesaron según lo detallado en materiales y métodos.

## **2. ANALISIS DE LAS PROTEINAS CELULARES INVOLUCRADAS EN LA ENTRADA DEL VIRUS JUNIN EN CELULAS VERO**

### **2.1 Rol de la proteína celular Eps-15 en la entrada del JUNV**

Se utilizó la expresión de proteínas dominantes negativas como inhibidores moleculares específicos para confirmar la entrada del JUNV en vesículas recubiertas por clatrina. La proteína Eps-15 es esencial en el proceso de endocitosis dependiente de vesículas recubiertas por clatrina. Esta proteína se encuentra organizada en 3 dominios: el N-terminal (DI) que contiene los tres dominios EH, involucrados en la interacción proteína-proteína, el dominio central (DII) y el dominio C-terminal (DIII) que contiene los sitios de unión al complejo adaptador de la membrana plasmática AP-2. Se ha propuesto que Eps-15 actúa como un puente entre AP-2 y otras proteínas a través del dominio EH en el proceso de formación de las vesículas recubiertas con clatrina. Por este motivo utilizamos la forma dominante negativa de la Eps-15, EH29, la cual expresa una forma de Eps-15 que no posee el segundo ni el tercer dominio EH, característica que interfiere específicamente con la formación de vesículas recubiertas con clatrina en la membrana plasmática (Benmerah y col., 1998). Se realizaron infecciones con el JUNV en células que expresan la versión dominante negativa de Eps-15, EH29, fusionada a GFP (Green Fluorescent Protein): GFP EH29. Además se utilizó una construcción que no afecta la formación de vesículas recubiertas como control (GFP DIIIΔ2). Con este fin se transfectaron transientemente células Vero con cada una de las construcciones y a las 24 hs post transfección las células fueron incubadas con JUNV a una m.i. de 1 durante 60 min a 37°C. Pasadas las 24 hs p.i. las células se fijaron y procesaron para IFI citoplasmática. Se examinaron las muestras por microscopia de fluorescencia y se seleccionaron para la cuantificación las células que expresaban niveles similares de proteínas marcadas con GFP. El porcentaje de infección en las células expresando el transgen fue determinado cuantificando las células que expresan el antígeno viral NP.



**Figura 20- Rol de la Eps-15 en la entrada del JUNV en células Vero.** Las células Vero fueron transfectadas con la forma control de la Eps-15 (DIIIΔ2) o su mutante dominante negativa (EH29). 24 h post transfección, las células fueron infectadas con JUNV (m.i.=1). Luego de 24 hs las células fueron fijadas y la infección se analizó por IFI utilizando un anticuerpo monoclonal contra la NP y un anticuerpo anti-ratón secundario conjugado a rodamina (rojo) (Panel A). En el panel B, luego de la transfección con la proteína salvaje o su mutante dominante negativa, las células se incubaron con tfn-TRITC. La cuantificación de los datos se muestra en el panel. Para la cuantificación se tomaron 100 células con un nivel similar de expresión del transgen, determinado por intensidad de GFP, y se cuantificaron las células positivas para el antígeno viral ( $n=3$ ) (media  $\pm$  SD).

Como se observa en la figura 20 panel A, las células transfectadas con GFP-DIIIΔ2 mostraron un patrón de infección con la NP citoplasmática y puntillada, como en las células control sin transfectar, indicando que la infección no estaba siendo alterada en presencia del plásmido control y además la cantidad de células positivas se mantuvo similar al control. Por el contrario, las células que expresan la proteína dominante negativa Eps-15 EH29 mostraron una disminución significativa de la infección por JUNV, proporcionando más evidencia sobre la dependencia del camino de entrada dependiente de clatrina para la internalización del JUNV. Como control del efecto de la mutante Eps-15 EH29 se transfectaron células Vero con las proteína control o la dominante negativa y a

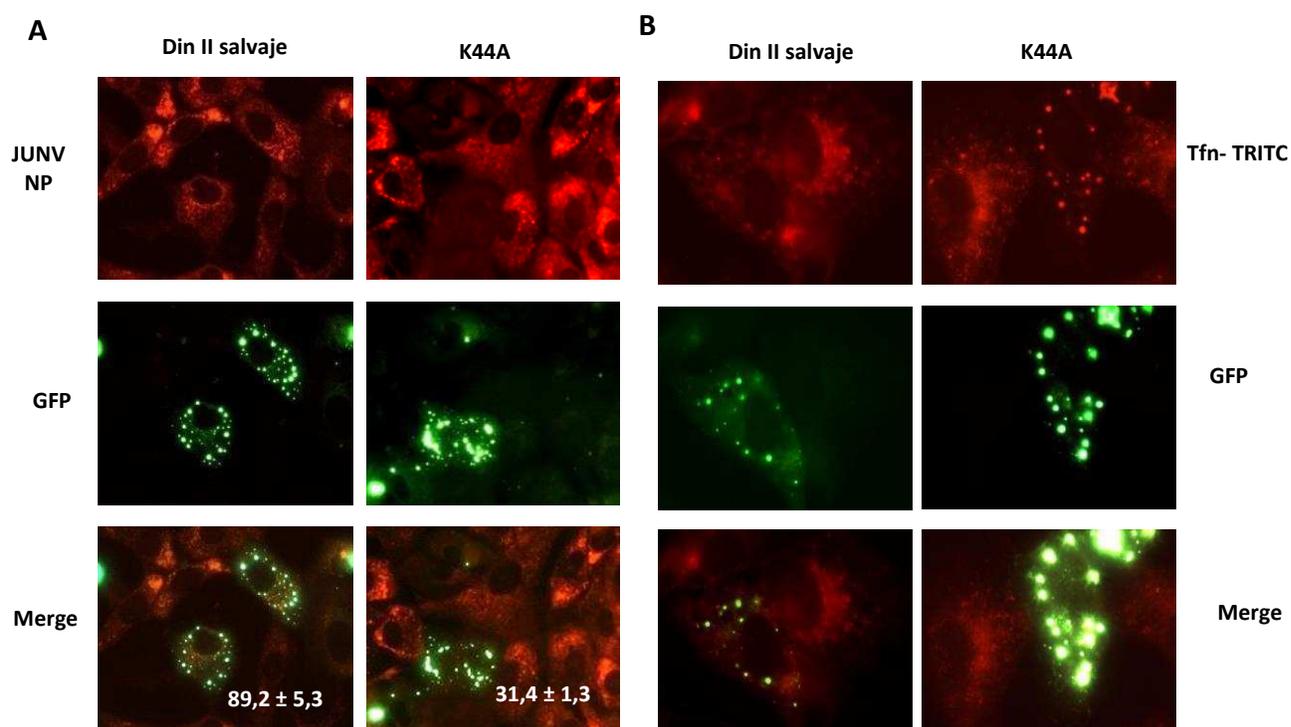
las 24 hs post transfección se incubaron las células durante 60 min con tfn conjugada con rodamina. Se analizó la internalización de la tfn por fluorescencia directa de la tfn. Como se observa en la figura 20 panel B, la tfn marcada fue correctamente internalizada en las células transfectadas con el plásmido control EPS15 DIIIΔ2, mientras que su internalización se encuentra afectada en las células que expresan la proteína dominante negativa EPS15EH29.

## **2.2 Rol de la proteína celular Dinamina II en la entrada del JUNV**

Se continuó el estudio de las proteínas celulares involucradas en el proceso endocítico del JUNV, analizando la dependencia de la GTPasa celular Dinamina II (Din II) en la entrada del JUNV. Existen 3 genes en células de mamíferos que codifican para la Din I, II y III respectivamente (Gray y col., 2003). Estos 3 genes son expresados en tejido de cerebro de mamíferos y producen más de 27 isoformas por splicing alternativo. La segunda isoforma, conocida como Din II es la única que se expresa ubicuamente, presenta un 79% de homología con la Din I (Cook y col., 1994). Ha sido previamente demostrado que la Din I participaría de funciones neuronales específicas, como el reciclaje sináptico, mientras que la Din II media la internalización convencional por clatrina y por caveolas (Gray y col., 2003; Henley y col., 1998), pero hasta el momento la función y localización específica de la Din III aún se encuentra indefinida. Fue demostrado que la sobreexpresión de una mutante defectiva de la GTPasa dinamina, pero no la sobreexpresión de la proteína salvaje bloquea la endocitosis en el estadio posterior al ensamblaje de la envoltura pero previo al secuestro de los ligandos unidos a los receptores dentro de vesículas cubiertas (van der Bliet y col., 1993). Estos estudios concluyeron que la sobreexpresión de la mutante de dinamina defectiva en la unión e hidrólisis del GTP inhibe la constricción y liberación de la vesícula.

Se realizaron ensayos utilizando plásmidos que codifican la expresión de la proteína mutante dominante negativa K44A, previamente descrita por inhibir la función de la dinamina celular tanto de tipo I como de tipo II, bloqueando así la endocitosis dependiente de clatrina como de caveolas (Damke y col., 1994). Se transfectaron las células Vero con los plásmidos correspondientes a la proteínas

Din II salvaje o su correspondiente dominante negativo K44A. A las 24 hs post-transfección se infectaron las células tranfectadas con JUNV (m.i.=1), se prosiguió la infección durante 24 hs y los cultivos se fijaron para IFI citoplasmática. Se examinaron las muestras por microscopia de fluorescencia y se seleccionaron para la cuantificación las células que expresaban niveles similares de proteínas marcadas con GFP. El porcentaje de infección en las células expresando el transgen fue determinado cuantificando las células que expresan el antígeno viral NP.



**Figura 21- Rol de la Dinamina II en la entrada del JUNV en células Vero.** Las células Vero fueron transfectadas con la forma control de la Din II o su mutante dominante negativa K44A. 24 h post transfección, las células fueron infectadas con JUNV (m.i.=1). Luego de 24 hs las células fueron fijadas y la infección se analizó por IFI utilizando un anticuerpo monoclonal contra la NP y un anticuerpo anti-ratón secundario conjugado a rodamina (rojo) (Panel A). En el panel B, luego de la transfección con la proteína salvaje o su mutante dominante negativa, las células se incubaron con tfn-TRITC. La cuantificación de los datos se muestra en el panel. Para la cuantificación se tomaron 100 células con un nivel similar de expresión del transgen, determinado por intensidad de GFP, y se cuantificaron las células positivas para el antígeno viral ( $n=3$ ) (media  $\pm$  SD).

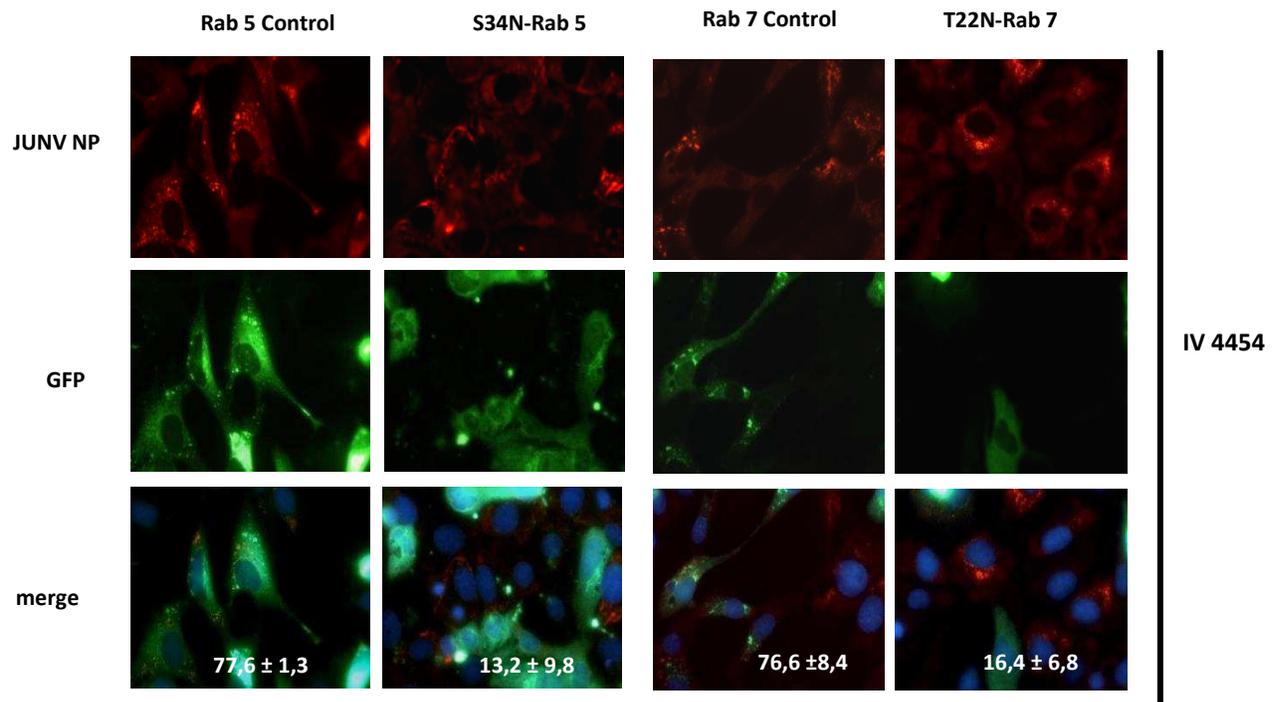
Como se observa en el panel A de la figura 21, las células transfectadas con Din II salvaje mostraron un patrón de infección con la NP citoplasmática y puntillada, como en las células control sin transfectar, indicando que la infección no estaba siendo alterada en presencia del plásmido control y además la cantidad de células positivas se mantuvo similar al control. Por el contrario, las células que expresan la proteína dominante negativa K44A mostraron una disminución significativa de la de infección por JUNV, indicando la necesidad de esta proteína celular para la correcta internalización del JUNV. Como control del efecto de la mutante K44A se analizó la internalización de la tfn conjugada con rodamina en células transfectadas. Como se observa en la figura 21, panel B la tfn fue correctamente internalizada en las células transfectadas con el plásmido control de la dinamina, mientras que su internalización se encuentra afectada en las células que expresan la proteína dominante negativa K44A.

### **2.3 El JUNV viaja a través de endosomas tempranos y alcanza a los tardíos.**

El estudio prosiguió analizando el camino explotado por el virus una vez que ha sido internalizado. Trabajos previos indican que la replicación del JUNV es dependiente de la acidificación endosomal y mediante ensayos de fusión se demostró que el pH 5 sería el óptimo para mediar la fusión (Castilla y col., 1994). Sin embargo, hasta el momento no habían sido estudiados los endosomas involucrados en el proceso de internalización y fusión del JUNV. Basados en los requerimientos de pH para la fusión del JUNV, se esperaba que la fusión con la membrana endosomal ocurra en los endosomas tardíos. El pH alcanzado por los endosomas tempranos es entre 6,2 y 6,5 mientras que los endosomas tardíos alcanzan un pH entre 5 y 6 (Guiducci y col., 2006; Maxfield y McGraw, 2004). Estos endosomas son evidenciados por la presencia de las proteínas celulares Rab5 y Rab7 respectivamente, pertenecientes a la familia de pequeñas GTPasas Rab, las cuales controlan distintos pasos del transporte intracelular. Con el objetivo de analizar el rol de las mismas en el camino endocítico del JUNV, se utilizaron mutantes de expresión dominantes negativas de las mismas. En el caso de Rab5 se utilizó la mutante S34N-Rab5, construida en base a la mutante dominante de

p21-ras S17N, la cual presenta mayor afinidad por el GDP. Por este motivo, la sobreexpresión de la misma induce a la acumulación de vesículas muy pequeñas e inhibe la endocitosis de la tfn. Además fue demostrado que esta proteína inhibe la fusión entre los endosomas tempranos *in vitro*, ya que el GTP es necesario en un paso previo a la fusión de la membrana y su hidrólisis por Rab5 inactiva a la proteína (Stenmark y col., 1994). La GTPasa Rab7 es otro miembro de esta familia, encontrada en endosomas tardíos (Zuk y Elferink, 1999) y está implicada en el transporte desde los compartimentos endocíticos tempranos a los tardíos (Ohashi y col., 1999). Además Rab7 está presente en compartimentos conectados a los lisosomas (Meresse y col., 1995) y se ha postulado que esta proteína controlaría el agregado y fusión de endosomas tardíos/lisosomas (Bucci y col., 2000). Se utilizó la mutante dominante negativa T22N-Rab7, la cual presenta mayor afinidad por el GDP, haciendo que la sobreexpresión de la misma cause la acumulación de la tfn en endosomas tempranos y reduzca la fusión de endosomas tempranos con tardíos (Feng y col., 1995).

Se transfectaron las células Vero con los plásmidos correspondientes a la proteínas Rab5 o Rab7 salvaje o su correspondiente dominantes negativas S34N-Rab5 o T22N-Rab7. A las 24 hs post-transfección se infectaron las células transfectadas con JUNV (m.i.=1), se prosiguió la infección durante 24 hs y los cultivos se fijaron para IFI citoplasmática. Se examinaron las muestras por microscopia de fluorescencia y se seleccionaron para la cuantificación las células que expresaban niveles similares de proteínas marcadas con GFP. El porcentaje de infección en las células expresando el transgen fue determinado cuantificando las células que expresan el antígeno viral NP. Como se observa en la figura 22 las células transfectadas con las Rab5 o 7 salvajes mostraron un patrón de infección con la NP citoplasmática y puntillada, como en las células control sin transfectar, indicando que la infección no estaba siendo alterada en presencia del plásmido control. Además la cantidad de células positivas se mantuvo similar al control. Por el contrario, las células que expresan la proteína dominante negativa S34N-Rab5 o T22N-Rab7 mostraron una disminución significativa de la de infección por JUNV, indicando la necesidad de estas proteínas celulares para la correcta internalización del JUNV.



**Figura 22- Rol de Rab 5 y 7 en la entrada del JUNV en células Vero.** Las células Vero fueron transfectadas con la forma control de la Rab5 o Rab7 o sus respectivas mutantes dominantes negativa S34N-Rab5 o T22N-Rab7. A las 24 h post transfección, las células fueron infectadas con JUNV (m.i.=1). Luego de 24 hs las células fueron fijadas y la infección se analizó por IFI utilizando un anticuerpo monoclonal contra la NP y un anticuerpo anti-ratón secundario conjugado a rodamina (rojo). La cuantificación de los datos se muestra en el panel. Para la cuantificación se tomaron 100 células con un nivel similar de expresión del transgen, determinado por intensidad de GFP, y se cuantificaron las células positivas para el antígeno viral ( $n=3$ ) (media  $\pm$  SD).

# ***CAPÍTULO II***

*Participación del  
citoesqueleto en la  
entrada del virus Junín*

### 3. ESTUDIO DE LA INTERACCION DEL JUNV CON LOS FILAMENTOS DE ACTINA

#### 3.1 Caracterización del sistema celular utilizado

##### 3.1.1 Determinación de la de viabilidad celular en presencia de compuestos que alteran los microfilamentos.

Con el fin de estudiar la participación de los microfilamentos en las etapas tempranas del ciclo de multiplicación de JUNV se indujo la desorganización de esta red del citoesqueleto utilizando los compuestos Citocholasina D (CitD), Latrunculina A (LatA) y Jasplakinolida (Jas). Seleccionamos inhibidores que causan despolimerización o estabilización de los filamentos. El mecanismo de acción de los compuestos, junto con la concentración final utilizada de cada uno, se observan en la tabla 3.

Blanco	Inhibidor	Conc. (µM)	Mecanismo de acción
Microfilamentos	Latrunculina A (Morton y col., 2000)	5	Se une a la G-actina y previene la polimerización
	Citocholasina D (Stossel, 1989)	2	Se une a la F-actina y previene la polimerización
	Jasplakinolida (Bubb y col., 1994)	0,5	Se une a la F-actina y estabiliza los filamentos.

**Tabla 3- Agentes que desorganizan el citoesqueleto de actina.** Modo de acción y concentración final utilizada.

La actividad metabólica de los cultivos se tomó como signo de viabilidad evaluándose por el método del MTT, bajo las condiciones de cada uno de los tratamientos (ver materiales y métodos) (Tabla 3). Al mismo tiempo, se observaron los cultivos al microscopio óptico durante todos los períodos de tratamiento y en cada uno de los experimentos. Los cultivos fueron sembrados y crecidos hasta alcanzar confluencia sobre vidrios cubiertos con poli-L-lisina, para favorecer la adhesión ya que las células al ser tratadas con los compuestos muestran una

alteración morfológica que propicia su desprendimiento de la superficie a la cual se adhieren. Las monocapas fueron tratadas con estos compuestos durante 90 min utilizando concentraciones crecientes dependiendo de cada uno de ellos y teniendo en cuenta datos de bibliografía (Ver tabla 1). La tabla 4 muestra los valores de viabilidad para la línea celular Vero correspondientes a las concentraciones de cada uno de los compuestos ensayadas.

Concentración de los compuestos					
<b>Cit D</b>	0 $\mu$ M 100 %	1 $\mu$ M 100% ( $\pm$ 1,2)	1,5 $\mu$ M 97,7% ( $\pm$ 0,9)	2 $\mu$ M 93% ( $\pm$ 1,7)	2,5 $\mu$ M 90% ( $\pm$ 1,5)
<b>Lat A</b>	0 $\mu$ M 100%	1 $\mu$ M 99% ( $\pm$ 0,8)	2 $\mu$ M 98,3 ( $\pm$ 1,2)	5 $\mu$ M 95,5 ( $\pm$ 1,4)	7 $\mu$ M 93,5 ( $\pm$ 1,7)
<b>Jas</b>	0 $\mu$ M 100%	0,1 $\mu$ M 98,3%	0,3 $\mu$ M 97,7%	0,5 $\mu$ M 96,3%	0,7 $\mu$ M 88,3%

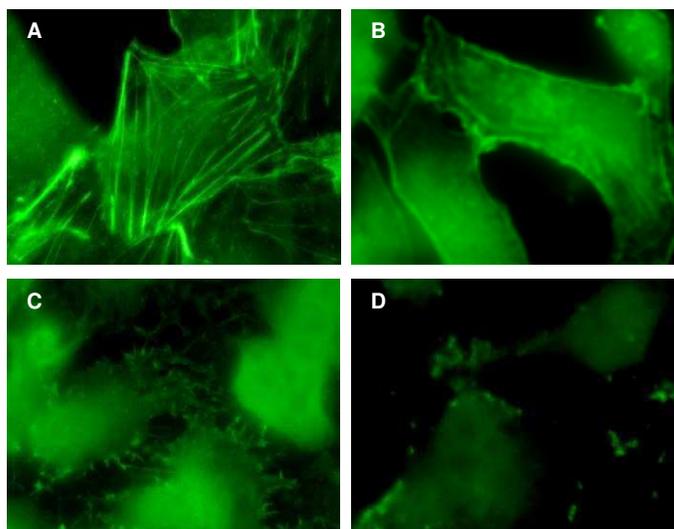
**Tabla 4. Viabilidad celular.** Cultivos de células Vero crecidos en monocapas fueron tratados durante 90 min con distintas concentraciones de los compuestos. Al finalizar el tratamiento se determinó la viabilidad por el método de MTT en un lector de ELISA. El porcentaje se calculó con respecto a controles sin tratar.

Como se puede observar la viabilidad disminuye de manera dependiente de la dosis del compuesto ensayado. Los cultivos mostraron ser susceptibles al tratamiento, lo cual se observó al microscopio óptico como una morfología redondeada en concentraciones superiores a 2  $\mu$ M para la Cit D, 5  $\mu$ M para la Lat A o 0,5  $\mu$ M para la Jas.

### 3.1.2. Efecto de los compuestos sobre el citoesqueleto

La acción de estos compuestos sobre los elementos del citoesqueleto se ha descrito en trabajos anteriores, sin embargo para corroborar y caracterizar su efecto en nuestro sistema, se determinó la integridad estructural de los microfilamentos mediante la técnica de IFI. Los cultivos controles y tratados con los distintos compuestos en sus concentraciones adecuadas fueron crecidos sobre cubreobjetos tratados con poli-L-lisina y fijados luego del tratamiento. Fueron

evidenciados los microfilamentos con el intercalante de actina, faloidina conjugada a FITC.



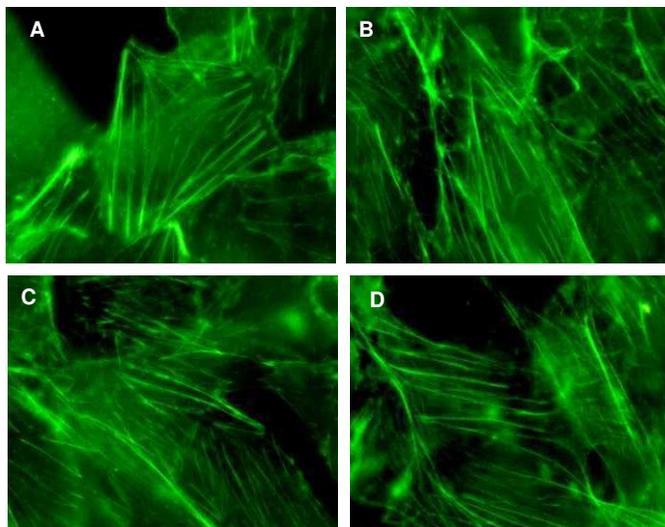
**Figura 23. Acción de los compuestos sobre los filamentos de actina.** Cultivos de células Vero fueron incubados durante 90 min en ausencia o presencia de los compuestos: A-control sin tratar, B-tratamiento con Cit D (2  $\mu$ M), C-tratamiento con Lat A (5  $\mu$ M) y D-tratamiento con Jas (0,5  $\mu$ M). Los cultivos se lavaron con PBS, y se fijaron con formaldehído como se describió en materiales y métodos. Los filamentos se revelaron incubando con faloidina conjugada con FITC. Datos específicos de la tinción en materiales y métodos. Aumento X1000.

En la figura 23 se muestran las fotografías representativas que corresponden al efecto de los distintos compuestos sobre los filamentos de actina. Como puede observarse los delgados filamentos de actina forman una red adyacente a la membrana plasmática en células Vero comparable a los descritos para otros sistemas celulares (Fig. 23A). Cuando los cultivos se trataron con Cit D el patrón de IFI se alteró completamente. La figura 23B muestra una evidente desaparición de los filamentos de actina, principalmente de los citoplasmáticos, luego de 90 min de tratamiento. Las fibras de F-actina citoplasmáticas se vieron gravemente alteradas y la actina libre se asoció formando cúmulos en el citoplasma, mientras que la morfología celular no se vio alterada. Como ha sido previamente descrito, la Cit D no desorganiza totalmente los microfilamentos sino que como puede observarse en la figura 23B los filamentos corticales quedan prácticamente intactos (Stossel, 1989). Como

estos filamentos son los que se encuentran más relacionados con la internalización del virus, se estudió otro compuesto que posee propiedades depolimerizantes del citoesqueleto de actina, actuando principalmente sobre los filamentos corticales. Utilizamos LatA, compuesto que interactúa con la actina globular libre impidiendo su unión a los filamentos y por ende, propicia la despolimerización de los filamentos tanto citoplasmáticos como corticales. Como puede observarse en la figura 23C, luego de 90 min de tratamiento con LatA tanto los filamentos corticales como citoplasmáticos desaparecieron y en su lugar se observaron los característicos cúmulos de actina.

Con el objetivo de estudiar el efecto causado en la célula, por un compuesto que altere el cambio dinámico y constante del citoesqueleto de actina, las células Vero fueron tratadas con Jasplakinolida (Jas). La Jas es un compuesto que se une y estabiliza los polímeros de actina, vinculando subunidades adyacentes entre sí (Bubb y col., 1994). Tratando a las células Vero durante 90 min con una dosis no tóxica del compuesto (0,5  $\mu$ M), se observaron agregados de actina y casi completa desaparición de la F-actina, comparada con las células control (Fig. 23D).

En algunos casos al afectar el citoesqueleto de actina, se observaron cambios morfológicos en las células, y aunque la viabilidad celular se mantiene sobre el 90% en las concentraciones y tiempos ensayados, nos preguntamos si estas células serían capaces de revertir el efecto causado por el compuesto. Para evaluar la capacidad de las células de recuperarse luego de retirar el compuesto del medio, los cultivos celulares fueron tratados durante 90 min en presencia de la concentración adecuada del compuesto, pasado este tiempo se realizaron lavados exhaustivos con PBS con calcio y magnesio. Las células fueron fijadas 2 hs pasado el tratamiento y se realizaron las marcaciones correspondientes a cada componente del citoesqueleto. Como se observa en la figura 24, luego de 90 min. con medio sin el compuesto, las células no solamente recuperaron la morfología sino también la red de filamentos.

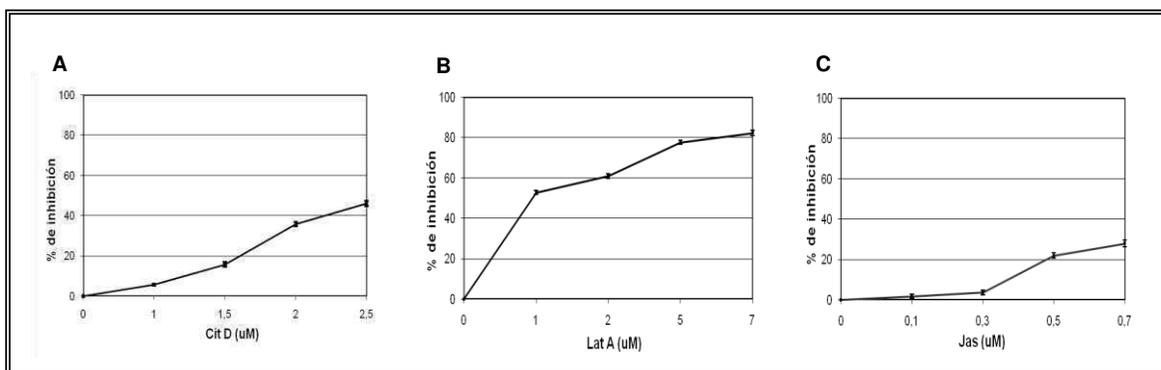


**Figura 24. Recuperación del citoesqueleto de actina luego del tratamiento con los compuestos.** Cultivos de células Vero fueron incubados durante 90 min en ausencia o presencia de los compuestos: A-control sin tratar, B-tratamiento con Cit D ( $2 \mu\text{M}$ ), C-tratamiento con Lat A ( $5 \mu\text{M}$ ) y D-tratamiento con Jas ( $0,5 \mu\text{M}$ ). Los cultivos se lavaron con PBS, y se incubaron con MM durante 90 min. Pasado este tiempo se fijaron con formaldehído como se describió en materiales y métodos. Los filamentos se revelaron incubando con faloidina conjugada con FITC. Datos específicos de la tinción en materiales y métodos. Aumentos x 1000.

### **3.2. CARACTERIZACION DE LA ACCION DE LOS COMPUESTOS QUE DESORGANIZAN EL CITOESQUELETO DE ACTINA SOBRE CULTIVOS INFECTADOS**

#### 3.2.1. Efecto de la desorganización de los filamentos de actina sobre la producción de partículas infecciosas

Una vez determinado el efecto de los compuestos sobre el citoesqueleto y teniendo en cuenta su efecto sobre la viabilidad celular se ensayaron los distintos compuestos sobre el sistema viral (Fig. 25). Se trataron las monocapas con concentraciones crecientes de cada uno de los compuestos durante 30 min, y luego se infectaron con JUNV (m.i.=1) en presencia de las correspondiente concentraciones del compuesto. Luego de la infección los cultivos fueron incubados con MM, se cosecharon los sobrenadantes a las 24 hs p.i. y se titularon por el método de UFP.



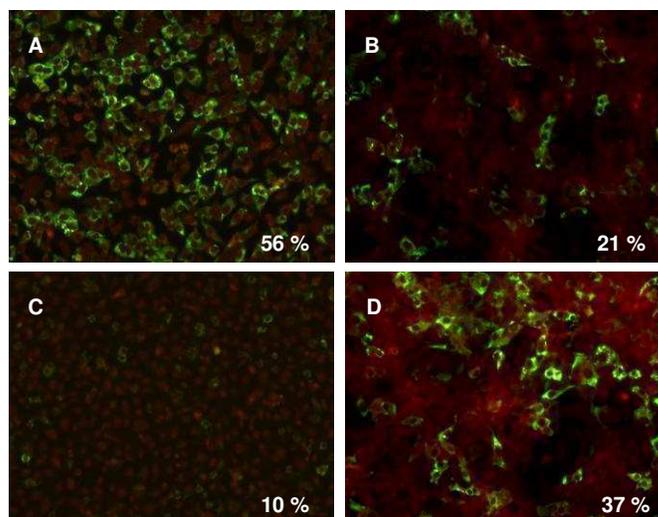
**Figura 25. Efecto de los compuestos que desorganizan el citoesqueleto de actina en la infectividad de JUNV.** Cultivos de células Vero fueron incubados durante 30 min en presencia de los compuestos: a-tratamiento con Cit D, b-tratamiento con Lat A y c-tratamiento con Jas. Luego se incubaron con JUNV (m.i.=1) en presencia de la concentración adecuada del compuesto. Pasada la hora de infección los cultivos se lavaron con PBS, y se incubaron con medio fresco durante 24 hs. Se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por el método de UFP.

La figura 25 muestra el porcentaje de inhibición de la producción viral de los cultivos tratados e infectados con respecto a las monocapas infectadas y sin tratar durante 24 hs. Como puede observarse en la figura 25B, la infectividad fue inhibida más de un 80% en presencia de Lat A, mientras que solamente disminuyó un 40% con Cit D. y alcanzó un 20% de inhibición en presencia de Jas (Fig. 25 A y C).

### 3.2.2 Expresión de los antígenos virales en células tratadas con los compuestos

Utilizando los datos obtenidos hasta el momento y para iniciar los estudios que nos permitan determinar si la etapa temprana que depende de la integridad o dinámica de los microfilamentos es la entrada, se seleccionaron las concentraciones de los compuestos que se indican en la tabla 3, dado que son las que producen el mayor efecto inhibitorio sobre la producción viral. Asimismo, bajo estas condiciones, las monocapas no mostraron alteraciones morfológicas y los efectos observados pudieron ser revertidos al retirar el compuesto.

Se realizaron estudios para analizar las consecuencias de la desorganización estructural de los filamentos de actina sobre la expresión de antígenos virales en cultivos infectados. Para ello se realizó IFI citoplasmática en todos los cultivos tratados durante 30 min y durante la infección con las concentraciones adecuadas de Cit D, Lat A o Jas. Luego de la infección los compuestos y el inóculo fueron removidos, las células se lavaron con PBS con calcio y magnesio y luego se incubaron en presencia de suero neutralizante contra el JUNV. Bajo estas condiciones experimentales nos aseguramos que no se produzca la re-infección de las células con el virus progenie, acotando el tratamiento a un tiempo temprano de la infección. A las 48 hs p.i. se fijaron las células y se examinó la expresión de la NP del JUNV por IFI. En las condiciones control las células muestran el patrón de proteínas virales característico. La NP presenta una típica fluorescencia punteada y distribuida uniformemente en todo el citoplasma (Fig. 26). Cuando los cultivos fueron tratados con los compuestos se observó una disminución en el número de células fluorescentes para el antígeno viral NP. Se observó una disminución significativa de la expresión del antígeno viral NP con Lat A (80,4%), mientras que la reducción fue menor con Cit D (58,8%), y aún menor al utilizar Jas que solo redujo la expresión de la NP un 44%. Estos datos sugieren que los eventos tempranos del ciclo de replicación de JUNV dependen del citoesqueleto de actina intacto, y como Lat A afecta no solamente los microfilamentos corticales sino también los citoplasmáticos, es posible que los filamentos corticales sean los que están involucrados durante el proceso de internalización del virus.

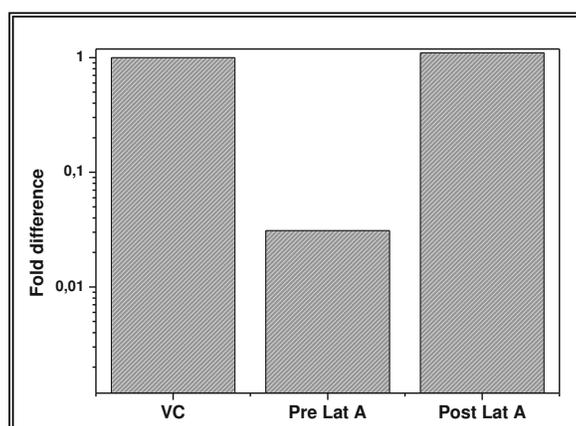


**Figura 26. Efecto de los compuestos que desorganizan el citoesqueleto de actina en la expresión de antígenos virales.** Cultivos de células Vero fueron incubados durante 30 min en ausencia o presencia de los compuestos: A-control sin tratar, B-tratamiento con Cit D (2  $\mu\text{M}$ ), C-tratamiento con Lat A (5  $\mu\text{M}$ ) y D-tratamiento con Jas (0,5  $\mu\text{M}$ ). Luego se incubaron con JUNV (m.i.=1) en presencia de la concentración adecuada del compuesto. Pasada la hora de infección los cultivos se lavaron con PBS, y se incubaron con MM, en presencia de suero neutralizante durante 48 hs. Luego las células fueron fijadas para IFI citoplasmática como se indica en materiales y métodos para medir la síntesis de la NP del JUNV. Aumento X400.

### 3.2.3 Efecto de los compuestos en los niveles de ARN

Durante la primera parte de esta sección, fue demostrado que la despolimerización de la actina cortical por Lat A es el mayor causante de inhibición de la expresión de la NP de JUNV comparado con los otros compuestos evaluados. A continuación se realizaron estudios para determinar si el virus estaba siendo bloqueado en su entrada o un si un paso de replicación temprano posterior a la misma se encontraba bloqueado por los compuestos. Con este objetivo, examinamos la habilidad del JUNV de transcribir el gen de la NP por RT PCR en tiempo real. Para esto se realizaron dos experimentos: el primero fue diseñado con el objetivo de determinar si entraban menos partículas de JUNV en presencia de los compuestos. Para esto los cultivos de células Vero se trataron con Lat A de la misma forma que en los ensayos anteriores, y luego se infectaron con JUNV. Luego de 4 hs de infección en medio sin el compuesto, se extrajo el ARN total de los lisados celulares y se midieron los niveles del gen *np* y del gen

control *gapdh*. El segundo experimento fue realizado con el objetivo de estudiar si la LatA afectaba la replicación del JUNV. Para esto infectamos las células sin los compuestos, y luego de la hora de infección se agregó la concentración adecuada de LatA. Pasadas las 8 hs de infección, se extrajo el ARN total de los lisados celulares y se midieron los niveles del gen *np* y del gen celular *gapdh*. En ambos casos, para medir los niveles del ARN viral se utilizaron *primers* específicos para el gen *np* de JUNV. Los niveles de transcripción del gen celular *gapdh* se utilizaron como control de las posibles variaciones en la extracción de ARN entre las distintas muestras. Los resultados de estos experimentos mostraron muy poca diferencia entre las muestras tratadas con los compuestos y las muestras control, cuando los compuestos fueron agregados luego de la infección (Fig. 27). Por el otro lado, cuando las células fueron pretratadas con los compuestos e infectadas en presencia de los mismos, se observó una inhibición significativa de los niveles de ARN viral a las 4 hs p.i., indicando una inhibición del paso de entrada del JUNV en presencia de los compuestos. Como puede observarse en la figura 27, la cuantificación de la síntesis de ARN bajo estas condiciones mostró mas de 1 log de inhibición luego del tratamiento con Lat A.



**Figura 27. Niveles de ARN viral en las células tratadas.** Cultivos de células Vero fueron incubados durante 30 min en ausencia o presencia de Lat A ( $5 \mu\text{M}$ ). Luego se infectaron con JUNV (m.i.=5) en presencia de la concentración adecuada del compuesto (Pre LatA). Pasada la hora de infección los cultivos se lavaron con PBS, y se incubaron con MM. A las 4 hs p.i. se extrajo el ARN total. En el caso de post Lat A, las células Vero se infectaron con JUNV (m.i.=5) y luego se trataron con los compuestos. A las 8 hs p.i. se extrajo el ARN total. En ambos casos, luego de la extracción de ARN se sintetizó ADNc utilizando *primers random*. Luego se sometieron las muestras a RT-PCR en tiempo real y se detectaron los niveles del ARNm de *np* relativos a los del control celular *gapdh*.

## 4. ESTUDIO DE LA INTERACCION DEL JUNV CON LOS MICROTUBULOS

### 4.1. Caracterización del sistema celular utilizado

#### 4.1.1. Determinación de viabilidad celular en presencia de compuestos que alteran los microtúbulos

Comenzamos el estudio de la participación de los microtúbulos en las etapas tempranas del ciclo de multiplicación de JUNV utilizando compuestos que desorganizan la red de tubulina. Se utilizó el Nocodazol (Noc) con el objetivo de despolimerizar los microtúbulos y así evaluar el posible rol de los mismos en las etapas tempranas del ciclo de replicación viral. Para suprimir el continuo intercambio de monómeros de tubulina de las fibras, y estabilizar los microtúbulos, se trataron a las células Vero con una dosis no tóxica de Paclitaxel (Pac). El mecanismo de acción de cada uno de los compuestos junto con la concentración final utilizada de cada uno, se observan en la tabla 5.

Blanco	Inhibidor	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Mecanismo de acción
Microtúbulos	Nocodazol (Hamel, 1996)	40	Se une a la $\beta$ -tubulina y previene la polimerización.
	Paclitaxel (Manfredi y col., 1982)	100	Se une al N-terminal de la $\beta$ -tubulina y promueve la formación de microtúbulos altamente estables.

**Tabla 5- Agentes que desorganizan el citoesqueleto de actina.** Modo de acción y concentración final utilizada.

La actividad metabólica de los cultivos se tomó como signo de viabilidad evaluándose por el método del MTT, bajo las condiciones de cada uno de los tratamientos (ver materiales y métodos) (Tabla 6). Al mismo tiempo, se observaron los cultivos al microscopio óptico durante todos los períodos de tratamiento y en cada uno de los experimentos. Los cultivos fueron sembrados y crecidos hasta

alcanzar confluencia sobre vidrios cubiertos con poli-L- lisina, para favorecer la adhesión, ya que al ser tratadas las células presentan una marcada alteración morfológica que propicia su desprendimiento de la superficie a la cual se adhieren. Las monocapas fueron tratadas con estos compuestos durante 90 min utilizando concentraciones crecientes cuyo rango depende de cada uno de ellos y teniendo en cuenta datos bibliográficos anteriores (Ver tabla 5). La Tabla 6 muestra los valores de viabilidad para la línea celular Vero, correspondientes a las concentraciones de cada uno de los compuestos ensayadas.

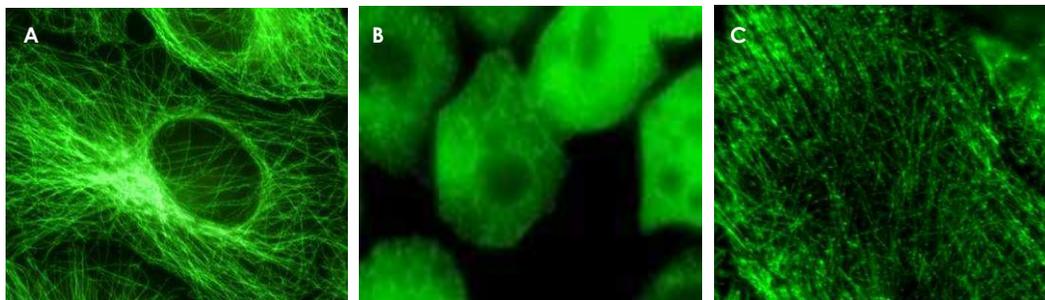
Concentración de los compuestos					
<b>Noc</b>	0 $\mu$ M 100 %	20 $\mu$ M 107% ( $\pm$ 9,4)	30 $\mu$ M 100% ( $\pm$ 5,6)	40 $\mu$ M 100%( $\pm$ 6,9)	50 $\mu$ M 93%( $\pm$ 4,6)
<b>Pac</b>	0 $\mu$ M 100%	25 $\mu$ M 100% ( $\pm$ 1,45)	50 $\mu$ M 99,8( $\pm$ 3,5)	100 $\mu$ M 99,5( $\pm$ 2,13)	200 $\mu$ M 99,7( $\pm$ 0,96)

**Tabla 6. Viabilidad celular.** Cultivos de células Vero crecidos en monocapas fueron tratados durante 90 min con distintas concentraciones de los compuestos. Al finalizar el tratamiento se determinó la viabilidad por el método de MTT en un lector de ELISA. El porcentaje se calculó con respecto a controles sin tratar.

Como se puede observar la viabilidad disminuye de manera dependiente de la dosis del compuesto ensayado. Los cultivos mostraron cambios morfológicos, como redondeamiento de las células y posterior desprendimiento, distinguibles al microscopio óptico en concentraciones superiores a 100  $\mu$ M para el Pac y 40  $\mu$ M para el Noc.

#### 4.1.2. Efecto de los compuestos sobre el citoesqueleto

La acción de estos compuestos sobre los elementos del citoesqueleto se ha descrito en trabajos anteriores (Hamel y col., 1996; Manfredi y col., 1982), sin embargo para corroborar y caracterizar su efecto en nuestro sistema, se determinó la integridad estructural de los microtúbulos mediante la técnica de IFI.



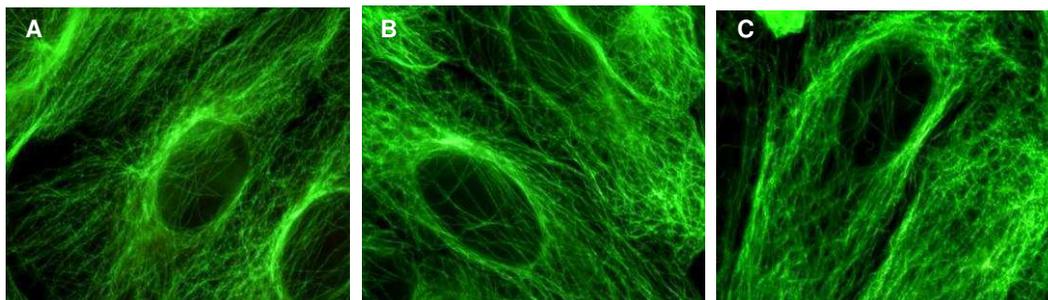
**Figura 28. Acción de los compuestos sobre los microtúbulos.** Cultivos de células Vero fueron incubados durante 90 min en ausencia o presencia de los compuestos, A- control, B-Noc (40  $\mu$ M) o C-Pac (100  $\mu$ M) Los cultivos se lavaron con PBS, y se fijaron con formaldehído como fue descrito en materiales y métodos. Los microtúbulos se revelaron incubando con el anticuerpo monoclonal anti  $\beta$ -tubulina, el cual fue revelado con un anticuerpo anti ratón conjugado con FITC. Datos específicos de la tinción en materiales y métodos. Aumentos x 1000.

Los cultivos controles y tratados con los distintos compuestos en sus concentraciones adecuadas fueron crecidos sobre cubreobjetos tratados con poli-L-lisina y fijados luego del tratamiento. Se evidenciaron los microtúbulos con el anticuerpo monoclonal anti  $\beta$ -tubulina, que fue luego revelado con el anticuerpo anti ratón conjugado a FITC (ver materiales y métodos).

En la figura 28 se muestra las fotografías correspondientes al efecto de los distintos compuestos sobre la red de tubulina. Como se observa en el control, la red de microtúbulos se origina desde el "centro de organización de los microtúbulos", con localización perinuclear, a partir del cual se irradian los túbulos hacia la periferia. El tratamiento con Noc no solamente despolimerizó los microtúbulos, sino que alteró la morfología celular, vacuolándola y encogiéndola (Fig. 28b). Al tratarse los cultivos con Pac, se observó el efecto característico del mismo: la formación de arreglos de tubulina gruesos y paralelos debido a la mayor polimerización y bloqueo de la despolimerización de las fibras (Fig. 28C).

Como al afectar el citoesqueleto de tubulina se observaron cambios morfológicos, nos preguntamos si estas células serían capaces de revertir el efecto causado por los compuestos o si el mismo sería irreversible. Para evaluar la capacidad de las células de recuperarse, los cultivos celulares fueron tratados durante 90 min en presencia de la concentración adecuada del compuesto,

pasado este tiempo se realizaron lavados exhaustivos con PBS con calcio y magnesio. Las células fueron fijadas 90 min pasado el tratamiento y se realizaron las marcaciones a los microtúbulos. Como se observa en la figura 29, las células no solamente recuperaron la morfología sino también la red de microtúbulos.

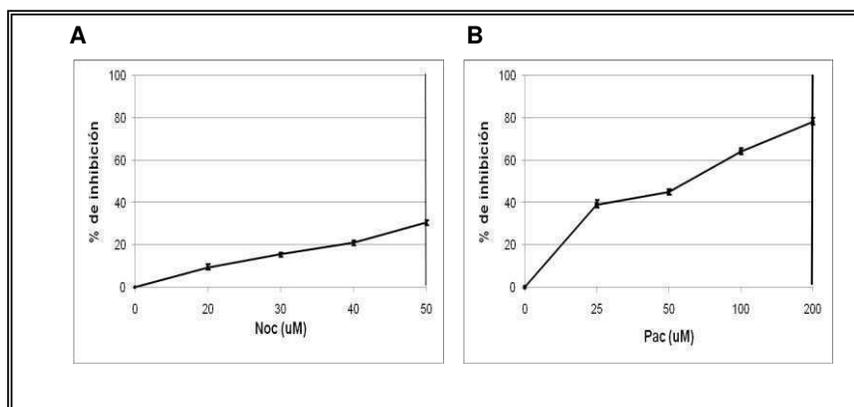


**Figura 29. Recuperación de los microtúbulos luego del tratamiento con los compuestos.** Cultivos de células Vero fueron incubados durante 90 min en ausencia o presencia de los compuestos: a-control sin tratar, b-tratamiento con Noc (40  $\mu$ M), c-tratamiento con Pac (100  $\mu$ M). Los cultivos se lavaron con PBS, y se incubaron con MM durante 90 min. Pasado este tiempo se fijaron con formaldehído como fue descrito en materiales y métodos. Los filamentos se revelaron incubando con el anticuerpo anti tubulina y luego con anticuerpo anti ratón conjugado con FITC. Datos específicos de la tinción en materiales y métodos. Aumentos x 1000.

## **4.2. Caracterización de la acción de los compuestos que desorganizan los microtúbulos sobre cultivos infectados**

### 4.2.1. Efecto de la desorganización de los filamentos de tubulina sobre la producción de partículas infecciosas

Una vez determinado el efecto de los compuestos sobre los microtúbulos y teniendo en cuenta su efecto sobre la viabilidad celular se ensayaron los distintos compuestos sobre el sistema viral (Fig. 30). Se trataron las monocapas con concentraciones crecientes de cada uno de los compuestos durante 30 min, y luego se infectaron con JUNV (m.i.=1) en presencia de las correspondiente concentraciones del compuesto. Los sobrenadantes fueron cosechados a las 24 hs p.i. y se titularon por el método de UFP.



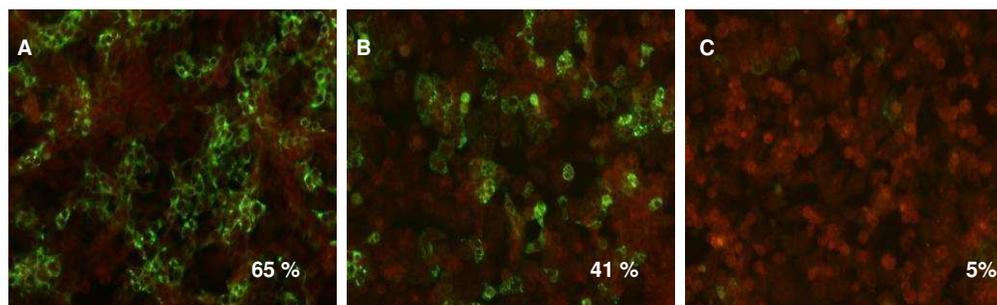
**Figura 30. Efecto de los compuestos que desorganizan los microtúbulos en la infectividad de JUNV.** Cultivos de células Vero fueron incubados durante 30 min en presencia de los compuestos: a- tratamiento con Noc, c-tratamiento con Pac. Luego se incubaron con JUNV (m.i.=1) en presencia de la concentración adecuada del compuesto. Pasada la hora de infección los cultivos se lavaron con PBS, y se incubaron con medio fresco durante 24 hs. Se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por el método de UFP.

La figura 30 muestra el porcentaje de inhibición de la producción viral de los cultivos tratados e infectados con respecto a las monocapas infectadas y sin tratar durante 24hs. Como puede observarse en la figura 30B, la infectividad fue inhibida más de un 60% en presencia del Pac, mientras que solamente disminuyó un 30% con Noc, en las mayores concentraciones de los compuestos utilizadas (Fig. 30A).

#### 4.2.2 Expresión de los antígenos virales en células tratadas con los compuestos

Utilizando los datos obtenidos hasta el momento y para iniciar los estudios que nos permitan determinar si la etapa temprana que depende de la integridad o dinámica de los microtúbulos es la entrada, se seleccionaron las concentraciones de los compuestos que se indican en la tabla 5, dado que son las que producen el mayor efecto inhibitorio sobre la producción viral. Asimismo, bajo estas condiciones, las monocapas no mostraron alteraciones morfológicas significativas y los efectos observados pudieron ser revertidos al retirar el compuesto.

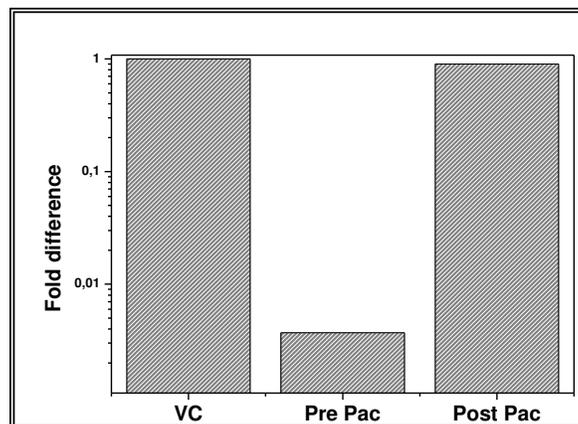
Se realizaron estudios para analizar las consecuencias de la desorganización o estabilización de las fibras de tubulina sobre la expresión de antígenos virales en cultivos infectados. Para ello se realizó IFI citoplasmática en todos los cultivos tratados durante 30 min. y durante la infección con las concentraciones adecuadas de Noc o Pac. Luego de la infección los compuestos y el inóculo fueron removidos, las células se lavaron con PBS con calcio y magnesio y luego se incubaron en presencia de suero neutralizante contra el JUNV. A las 48 hs. p.i. se fijaron las células y se examinó la expresión de la NP del JUNV por IFI. En las condiciones control las células muestran el patrón de proteínas virales característico: la NP presenta la típica fluorescencia punteada y distribuida uniformemente en todo el citoplasma (Fig. 31A). Cuando los cultivos fueron tratados se observó una disminución en el número de células fluorescentes para el antígeno viral NP con Pac (92,7%) (Fig.31B), mientras que la inhibición con el Noc solo alcanzó valores del 35% (Fig. 31C). Estos datos sugieren que los eventos tempranos del ciclo de replicación de JUNV dependen de la dinámica de los microtúbulos, mientras que la integridad de los mismos no sería esencial en un paso temprano de la replicación viral.



**Figura 31. Efecto de los compuestos que desorganizan los microtúbulos en la síntesis de antígenos virales.** Cultivos de células Vero fueron incubados durante 30 min en ausencia o presencia de los compuestos: a-control sin tratar, b-tratamiento con Noc (40  $\mu$ M), c-tratamiento con Pac (100  $\mu$ M). Luego se incubaron con JUNV (m.i.=1) en presencia de la concentración adecuada del compuesto. Pasada la hora de infección los cultivos se lavaron con PBS, y se incubaron con medio fresco, en presencia de suero neutralizante durante 48 hs. Luego las células fueron fijadas para IFI citoplasmática como se indica en materiales y métodos para medir la síntesis de la NP del JUNV. Aumento X400.

#### 4.2.3 Efecto de los compuestos en los niveles de ARN

Hasta el momento, fue demostrado que la estabilización de los microtúbulos es lo que provoca la mayor inhibición de la expresión de la NP de JUNV. Para determinar si el virus estaba siendo bloqueado en su entrada o un paso de replicación temprano posterior a la entrada, examinamos la habilidad del JUNV de transcribir el gen de la NP por RT PCR en tiempo real. Para esto se realizaron dos experimentos: el objetivo del primero fue determinar si entraban menos partículas de JUNV en presencia de los compuestos. Para esto los cultivos de células Vero se trataron con Pac de la misma forma que en los ensayos anteriores, y luego se infectaron con JUNV. Luego de 4 hs de infección en medio fresco, se extrajo el ARN total de los lisados celulares y se midieron los niveles del gen *np* y del gen control *gapdh*. El segundo experimento fue realizado con el objetivo de testear si este compuesto estaba afectando la replicación del JUNV. Para esto infectamos las células sin los compuestos, y luego de la hora de infección se agregaron las concentraciones adecuadas de cada uno de los compuestos. Pasadas las 8 hs de infección, se extrajo el ARN total de los lisados celulares y se midieron los niveles del gen *np* y del gen celular *gapdh*. En ambos casos, para medir los niveles del ARN viral se utilizaron *primers* específicos para el gen *np* de JUNV. Los niveles de transcripción del gen celular *gapdh* se utilizaron como control de las posibles variaciones en la extracción de ARN entre las distintas muestras. Los resultados de estos experimentos mostraron muy poca diferencia entre las muestras tratadas con los compuestos y las muestras control, cuando el Pac fue agregado luego de la infección. Por el otro lado, cuando las células fueron pre-tratadas con el compuesto e infectadas en presencia del mismo, se observó una inhibición significativa de los niveles de ARN viral a las 4 hs p.i., indicando una inhibición del paso de entrada del JUNV en presencia de los compuestos. Como puede observarse en la figura 31, la cuantificación de la síntesis de ARN bajo estas condiciones mostró más de 2 log de inhibición luego del tratamiento con Pac.



**Figura 32. Niveles de ARN viral en las células tratadas.** Cultivos de células Vero fueron incubados durante 30 min en ausencia o presencia de Pac (100  $\mu$ M). Luego se infectaron con JUNV (m.i.=5) en presencia de la concentración adecuada del compuesto (Pre Pac). Pasada la hora de infección los cultivos se lavaron con PBS, y se incubaron con MM. A las 4 hs p.i. se extrajo el ARN total. En el caso de post Pac, las células Vero se infectaron con JUNV (m.i.=5) y luego se trataron con los compuestos. A las 8 hs p.i. se extrajo el ARN total. En ambos casos, luego de la extracción de ARN se sintetizó ADNc utilizando *primers random*. Luego se sometieron las muestras a RT-PCR en tiempo real y se detectaron los niveles del ARNm de np relativos a los del control celular *gapdh*.

# ***CAPÍTULO III***

*Interacción del JUNV con  
proteínas de la  
membrana celular*

## 5. ESTUDIO DE LA INTERACCION DE PROTEINAS DE MEMBRANA CON LOS PSEUDOTIPOS RETROVIRALES DE JUNV

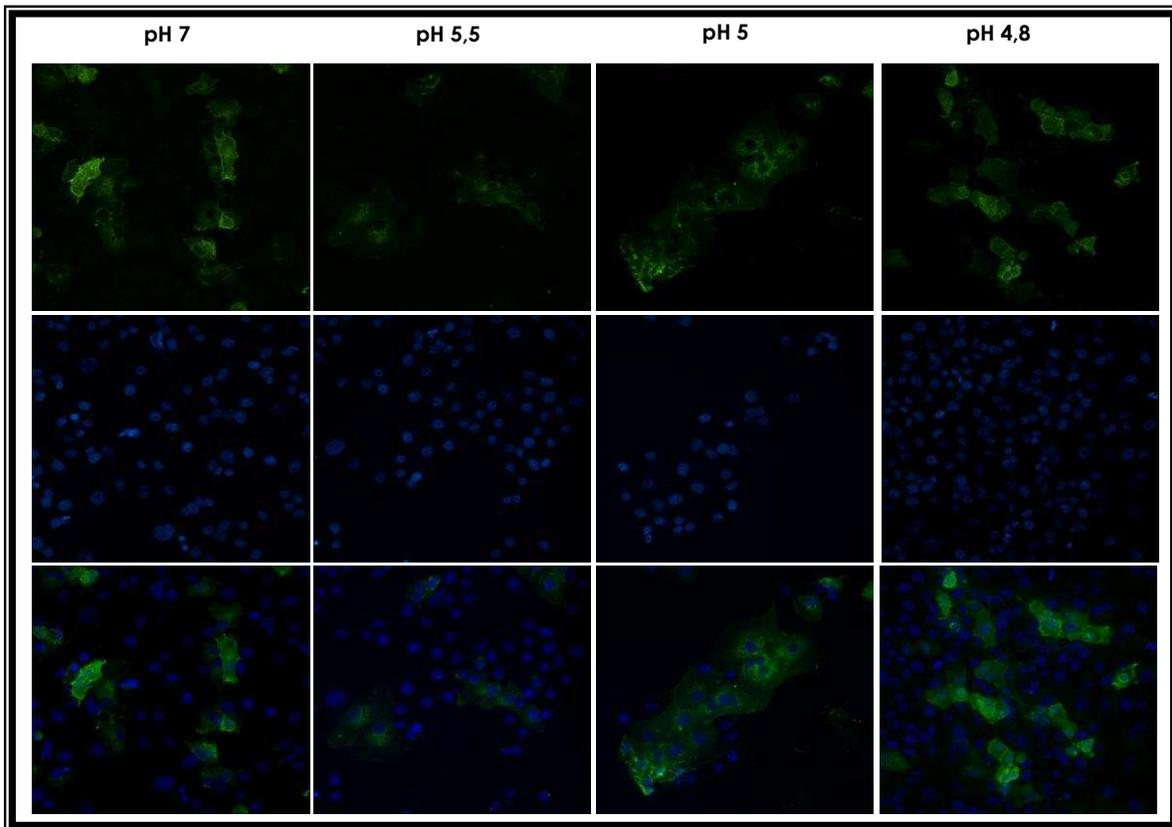
### 5.1 Construcción de los pseudotipos

El JUNV es clasificado según el CDC (Center for disease control) como un patógeno de bioseguridad tipo 4, lo cual restringe los lugares de uso fuera de Argentina. Esta parte del trabajo fue realizada en la Universidad Cornell (Ithaca Nueva York, Estados Unidos) por lo que el uso del JUNV no fue posible. Por este motivo se produjeron partículas pseudovirales que expresan la GPC del JUNV (cepa IV4454). Los sistemas pseudovirales son seguros y además son excelentes para caracterizar la entrada viral ya que aseguran un solo ciclo de infección (no forman progenie ni brotan de la células transducida). Se diseñó un plásmido, el cual fue sintetizado por GeneArt, que codifica para la GPC del JUNV con sitios de restricción para BAMH1 y ECOR1, para ser subsecuentemente clonado en un vector de expresión pcDNA3.1. (Ver materiales y métodos). Como ya ha sido descrito los virus envueltos pueden incorporar glicoproteínas heterólogas en sus membranas lipídicas durante el proceso de brotación, y estos pseudotipos virales adquieren la especificidad de adsorción del receptor del virus del cual deriva la GP heteróloga (Wool-Lewis y Bates, 1998).

El primer paso para la producción de las partículas pseudovirales fue verificar que la GPC del JUNV se estaba expresando correctamente en la membrana de las células transfectadas. Una vez que se subclonó el fragmento de la GPC en el vector de expresión pcDNA3.1 (ver materiales y métodos), este se amplificó y purificó por kit de midiprep (Quiagen). Se crecieron las células Vero sobre vidrios en microplacas de 24 cavidades, y a las 24 hs se llegó a una confluencia del 50% (óptima para la transfección). En esta confluencia óptima las células fueron transfectadas y a las 24 hs de la transfección, se fijaron las células para IFI de membrana (ver materiales y métodos). Se evidenció la presencia de la GPC utilizando el anticuerpo monoclonal GB03-BE08 y este fue reconocido utilizando un anticuerpo anti ratón conjugado a Alexa488. Como puede observarse en la figura 33 en las células tratadas con pH7, pasadas las 24 hs de la

transfección se observa que la expresión de la GPC es comparable con el patrón observado en las infecciones.

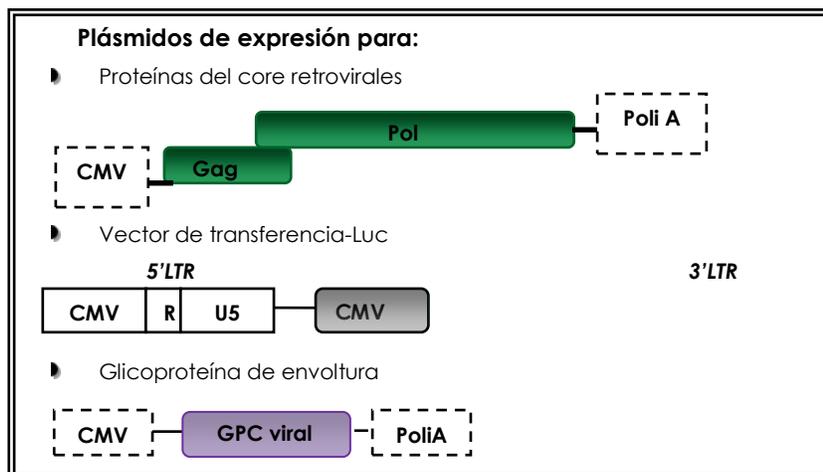
Una vez evaluada la correcta expresión del plásmido que contiene la GPC, se estudiaron sus propiedades funcionales. Para esto se transfectaron las células con el pcDNA3.1-JUNVGPC. A las 24 hs de la transfección se realizó un ensayo de fusión, exponiendo las células transfectadas a un bajo pH durante un minuto. Pasados los 60 min de la exposición se observaron las células al microscopio óptico. A pH 7 fueron semejantes a las células control pero a menor pH se observaron agrupamientos correspondientes a células con la membrana fusionada y con varios núcleos en su citoplasma, correspondientes a los sincicios. Para corroborar la presencia de los mismos se realizó la IFI, incubando las células transfectadas con anticuerpo anti GPC del JUNV (Fig. 33). Luego estas proteínas fueron evidenciadas utilizando un anticuerpo anti ratón conjugado a Alexa 488. Como se observa en la figura 33, y como fue previamente descrito en las células transfectadas con la GPC del IV se observa la formación de sincicios cuando se trató con pH 5 (Castilla y col., 1991), indicando no solamente la correcta expresión y localización de la GPC del JUNV, sino también su correcta funcionalidad.



**Figura 33- Control de la correcta expresión y funcionalidad de la GPC.** Se crecieron monocapas de células Vero hasta llegar a una confluencia del 50% a las 24 hs. Luego se transfectaron con el plásmido pcDNA3.1-GPCIV. Pasadas las 24 hs de la transfección se trataron a las células durante 1 min con pH7 como control y pH 5,5, 5 o 4,5. Las células se incubaron con MM durante 60 min y luego se fijaron para IFI citoplasmática. Se evidenció el antígeno GPC con anticuerpos monoclonales específicos contra esta proteína. Aumento 200X.

Una vez verificada la correcta expresión y funcionalidad del plásmido expresando la GPC del JUNV, se prosiguió con la producción de los pseudotipos retrovirales. Usando la estrategia detallada previamente (Bartosch et al., 2003) y señalada en la figura 34, se insertó la GPC del JUNV en un retrovirus recombinante MLV (Moloney leukemia virus). Brevemente, las células de origen humana 293T fueron co-transfectadas con un vector de transferencia basado en el MLV que codifica la expresión de la luciferasa, una construcción de empaquetamiento que codifica las proteínas gag-pol del MLV y el vector de expresión que codifica la proteína de envoltura GPC del JUNV (pcDNA3,1-GPCIV4454) usando PEI (Exgen 500, Fermentas). Las células, transfectadas según el protocolo recomendado por

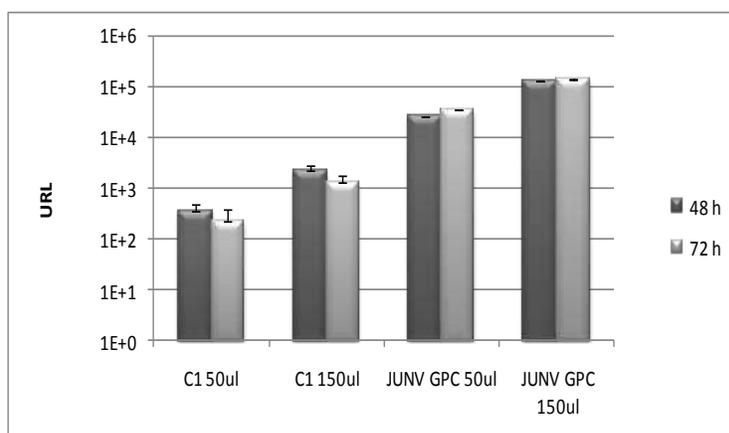
el proveedor, fueron incubadas durante 72 hs a 37°C . Pasado este período de incubación se cosecharon los sobrenadantes y se pasaron por filtros de 0,45 µm de tamaño de poro. Estos sobrenadantes contienen las partículas pseudovirales infecciosas que llevan la GPC del JUNV y por lo tanto conservan sus propiedades infecciosas.



**Figura 34. Construcción de los pseudotipos retrovirales-** Plásmidos de expresión que codifican los distintos componentes necesarios para producir partículas pseudovirales. Los cuadros coloreados representan los genes virales y los marcadores (Luc). Los cuadros sin color muestran las secuencias que actúan en cis. LTR (long terminal repeat), CMV (citomegalovirus immediate early promoter) poliA (sitio de poliadenilación). Los pseudotipos fueron obtenidos mediante la co-transfección de plásmidos que llevan las distintas secuencias de empaquetamiento, el vector de transferencia y las glicoproteínas virales en células 293T.

En la figura 35 se muestra la producción de pseudotipos conteniendo la GPC del JUNV transduciendo cultivos de células Vero, las cuales son susceptibles a la infección por JUNV, y se observó la correcta expresión del gen de la luciferasa el cual es el gen reportero usado en este ensayo. Los cultivos de células Vero fueron transducidos con distintas diluciones de los pseudotipos construidos con la GPC del JUNV (50 µl o 150 µl) durante 4 hs. Pasadas las 4 hs se retiró el inóculo y se incubaron los cultivos a 37°C durante 48 hs o 72 hs. Al finalizar la incubación las células fueron lisadas utilizando el buffer de lisis provisto por el kit de medición de la actividad luciferasa (Promega). Como se detalla en materiales y métodos la actividad luciferasa de las células lisadas fue medida incubando 10 µl

del lisado con 20  $\mu$ l del reactivo luciferina provisto por el kit. Se expresan los resultados como medida arbitraria de unidades relativas de luz (URL).

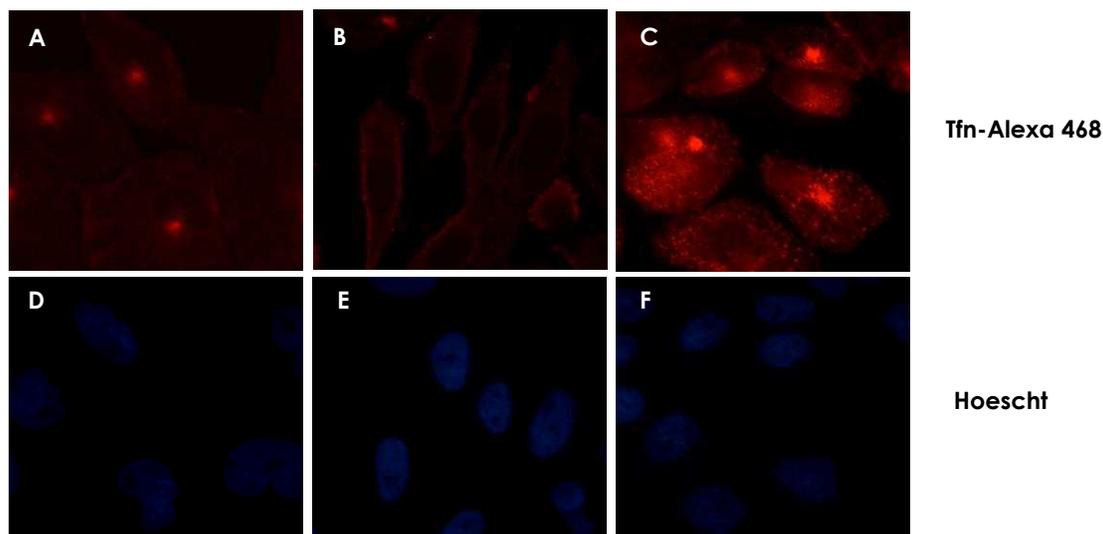


**Figura 35. Transducción de células Vero con pseudovirus de JUNV-** Cultivos de células Vero fueron transducidos con distintas cantidades (50 o 150  $\mu$ l) de los pseudotipos retrovirales obtenidos (C: control sin plásmidos de expresión para la GPC, solo plásmido C1 que codifica para la GFP o JUNV GPC). Se incubaron durante 48 o 72 hs a 37°C. Pasado estos tiempos los cultivos se lisaron y se midió la actividad Luciferasa como URL. Para la cuantificación se tomaron datos de 3 experimentos independientes. Las barras de error representan el desvío estándar de las medias de cada experimento.

## 5.2 Estudio de las características de adsorción de los pseudotipos retrovirales que expresan la glicoproteína del JUNV

Con el fin de caracterizar las partículas pseudovirales distintos cultivos celulares fueron transducidos para evaluar si conservan la capacidad del JUNV para adsorberse e internalizarse en los mismos. Se transdujeron líneas celulares derivadas de hámster (CHO) y líneas celulares derivadas de la línea celular CHO que no poseen el TfR endógeno (TRVb) o aquellas que no poseen su receptor endógeno pero están transfectadas establemente de forma tal que expresan el hTfR1 (TRVb1). Se comenzó verificando que el hTfR1 expresado en las TRVb1 mantenía su funcionalidad. Para esto realizamos un ensayo de internalización de la tfn conjugada a Alexa 568. Como se observa en la figura 36 la tfn es correctamente endocitada en células CHO y TRVb1, mientras que en las células TRVb que no tienen TfR1 endógeno, la tfn no presenta el patrón de internalización característico. Es decir que la tfn no es endocitada en ausencia del TfR1 (TRVb) y

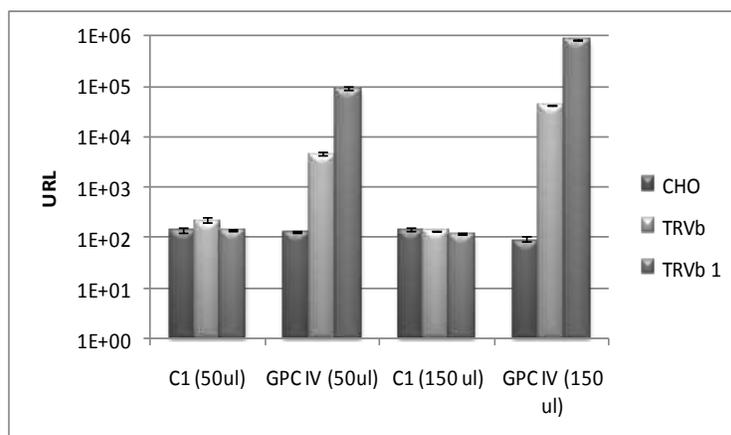
las células TRVb1 que expresan el hTfR absorben e internalizan la tfn de manera correcta.



**Figura 36- Internalización de la tfn-Alexa 488 en células CHO, TRVb o TRVb1.** Se crecieron monocapas de células CHO (A,D) TRVb (B,E) o TRVb1 (C,F). Estas fueron incubadas con tfn conjugada a Alexa 468 durante 60 min y reveladas con Hoescht, luego fueron fijadas para inmunofluorescencia. 1000X.

Como control negativo se produjeron partículas en ausencia de la glicoproteína, utilizándose en su lugar el plásmido C1. En cada caso las células fueron transducidas con dos concentraciones distintas de los pseudotipos (ver materiales y métodos) y el nivel de transducción fue medido evaluando la actividad luciferasa a las 48 hs post transducción y la misma fue expresada como URL. Como se observa en la figura 37, y acorde con lo previamente publicado para el JUNV (Radoshitzky y col., 2007), cuando las células CHO fueron transducidas con el pseudotipo retroviral expresando la GPC del JUNV hubo muy baja expresión de luciferasa, lo cual se ve reflejado en las mediciones de URL, indicando que esta línea celular se comporta como relativamente no permisiva a la transducción con el pseudotipo de JUNV. Algo similar ocurrió al transducir cultivos de células TRVb observándose un bajo nivel de URL, mientras que cuando se transdujeron cultivos de células TRVb1 se observó un incremento significativo de las mediciones de URL. Estos resultados pueden explicarse por la presencia del receptor utilizado por el virus en las TRVb1 (hTfR1). En las células CHO y TRVb todavía queda por ser estudiado cual es el receptor que permite la entrada de

los arenavirus, ya que ha sido previamente demostrado que los arenavirus del nuevo mundo no son capaces de utilizar el mTfR1 de cualquier especie, sino solamente de su hospedados natural, en el caso de JUNV el *calomys musculus* (Radoshitzky y col., 2008), es decir que no podrían utilizar el TfR1 de las células CHO, mientras que en las células TRVb este receptor está ausente.

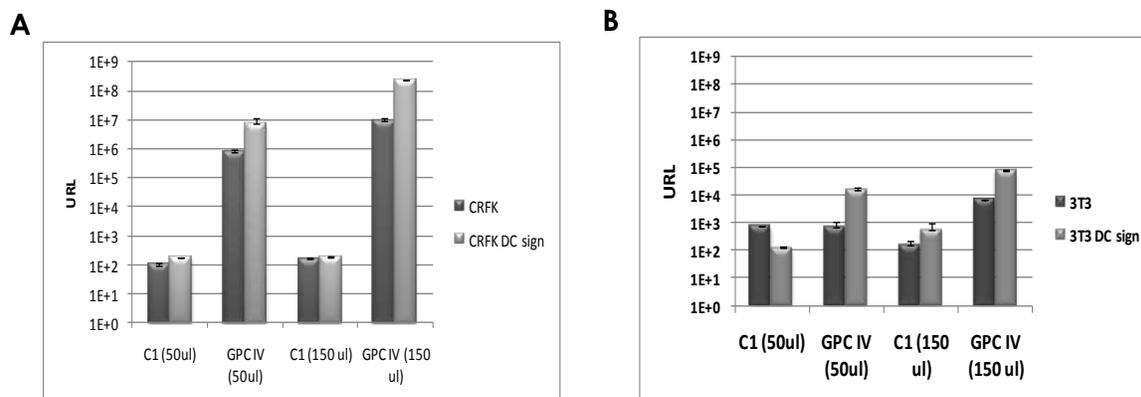


**Figura 37. Transducción de células CHO y derivadas con pseudovirus de JUNV-** Cultivos de células CHO, TRVb o TRVb1 fueron transducidos con distintas cantidades (50 o 150  $\mu$ l) de los pseudotipos retrovirales obtenidos o distintas cantidades del control negativo C1 (C1: control sin plásmidos de expresión para la GPC, solo plásmido C1 que codifica para la GFP o la GPC del JUNV). Se incubaron durante 48 hs a 37°C. Pasado estos tiempos los cultivos se lisaron y se midió la actividad Luciferasa como URL. Para la cuantificación se tomaron datos de 3 experimentos independientes. Las barras de error representan el desvío estándar de las medias de cada experimento.

### 5.3 Estudio de la entrada del pseudotipo de JUNV en presencia de DC-sign o L- sign

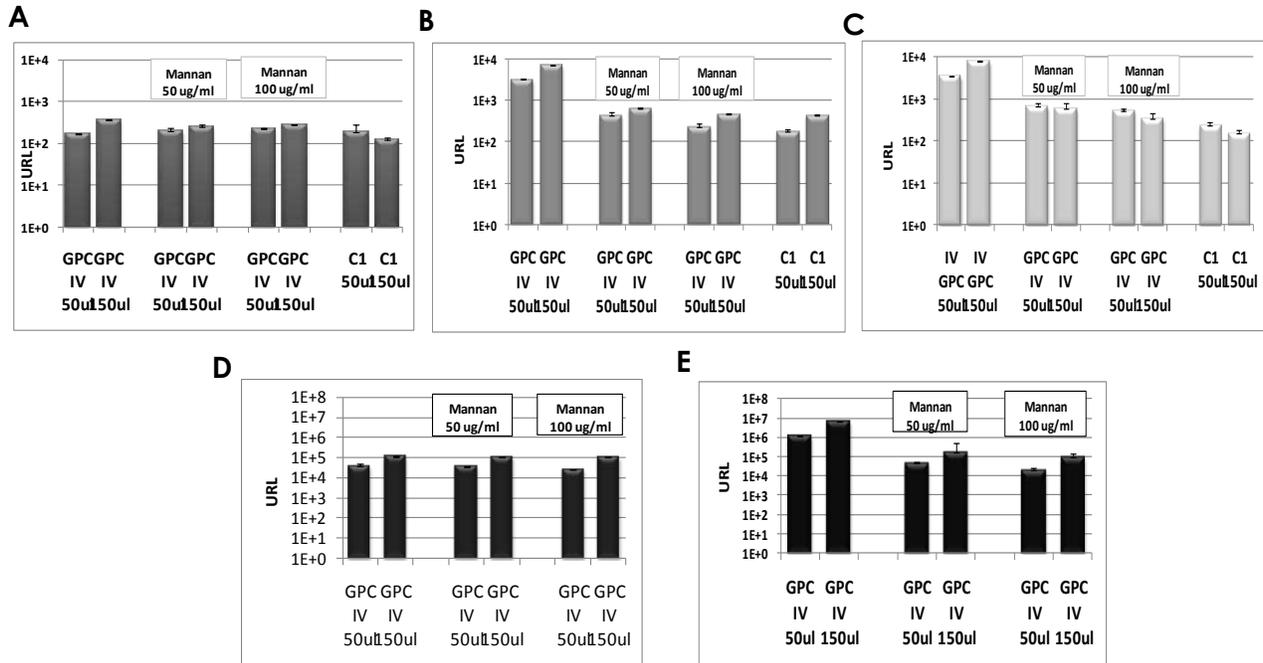
La entrada del JUNV es dependiente de endocitosis mediada por clatrina (Martinez y col., 2007) y como se ha demostrado necesita del hTfR 1 para endocitarse (Radoshitzky y col., 2007). Asimismo se ha demostrado que la glicoproteína viral 1 (GP1) que es la encargada de mediar la entrada, solo posee alta afinidad por el TfR1 humano y felino, pero no posee alta afinidad por el canino o murino (Radoshitzky y col., 2008). Para diversos virus se ha estudiado que además de poseer un receptor principal, interactúan con diversos receptores inespecíficos, siendo de gran importancia para los virus envueltos las lectinas de

tipo C (Regan y Whittaker, 2008). El uso de las lectinas celulares de tipo C fue primero estudiado para el virus de la inmunodeficiencia humano (HIV) de tipo 1 (Baribaud y col., 2001), y se sabe que virus de varias familias usan DC-sign y/o L-sign para internalizarse en las células y propagarse, actuando tanto en infección *en cis* como en *trans* (Lozach y col., 2007). Las lectinas de tipo C actúan como factores que favorecen la entrada, reconociendo preferentemente glicoproteínas virales que contienen residuos azucarados altamente manosilados (Cambi y col., 2005). Basados en estos estudios y teniendo en cuenta el rol de DC-sign o L-sign para diversos virus envueltos (HIV, Dengue, SARS), nuestro objetivo fue examinar el posible rol de las lectinas humanas, DC-sign o L-sign, en la infección por JUNV. Por este motivo, a continuación se evaluó la capacidad de las mismas de participar en la entrada de los pseudotipos de JUNV en distintos cultivos celulares. Se utilizaron las células felinas susceptible a la infección CRFK y su derivadas que expresan establemente la lectina DC-sign: CRFK-DC-sign (construido por A. Regan, laboratorio del Dr. Whittaker) y la línea celular murina 3T3 no susceptible a la infección por JUNV y su derivada que expresan establemente la lectina DC-sign, (DC-sign-3T3) (NIAID AIDS Research y Reference Reagent Program). Como puede observarse en la figura 38A, la infección con el pseudotipo que posee la GPC del JUNV aumentó significativamente en los cultivos felinos que expresan la lectina DC-sign. Al transducir las líneas celulares murinas, que son poco susceptibles a la infección por el pseudotipo de JUNV, se observó un incremento de la infección cuando las lectinas estaban siendo expresadas establemente (Fig. 38 B). Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo nos llevaron a explorar la posibilidad de que estas lectinas estén cumpliendo un posible rol como receptoras en la entrada de los pseudotipos virales que expresan la GPC del JUNV.



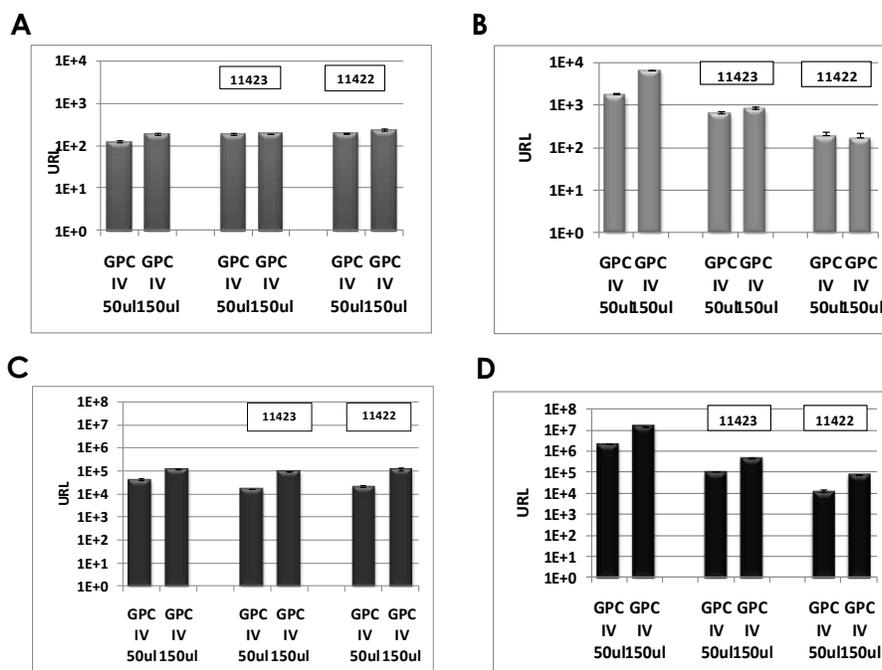
**Figura 38. Rol del DC-sign en la infección con el pseudotipo de JUNV.** Cultivos de células CRFK o CRFKDC-sign (A) o de 3T3 o 3T3DC-sign (B) fueron transducidos con distintas cantidades (50 o 150  $\mu$ l) de los pseudotipos retrovirales obtenidos o distintas cantidades del control negativo C1 (C1: control sin plásmidos de expresión para la GPC, solo plásmido C1 que codifica para la GFP o la GPC del JUNV). Se incubaron durante 48 hs a 37°C. Pasado estos tiempos los cultivos se lisaron y se midió la actividad Luciferasa como URL. Para la cuantificación se tomaron datos de 3 experimentos independientes. Las barras de error representan el desvío estándar de las medias de cada experimento.

Con el objetivo de confirmar que este aumento de la infectividad en los cultivos celulares, que expresan establemente las lectinas, se debe específicamente a la presencia de las mismas, se trataron a los cultivos durante 60 min previo a la infección con un compuesto que actúa como competencia por los sitio de unión a las lectinas de tipo C. El compuesto utilizado fue un manano (Mannan, Sigma-Aldrich), polímero de azúcares manosa, que presenta alta afinidad de unión por estas lectinas de tipo C. Las células fueron tratadas con Mannan (50  $\mu$ g/ml o 100  $\mu$ g/ml) y luego fueron transducidas en presencia de las concentraciones respectivas del compuesto. Como se observa en la figura 39 las dos concentraciones de Mannan testeadas reducen la infectividad a los niveles basales en ausencia de las lectinas.



**Figura 39. El Mannan bloquea el aumento de la infección con los pseudotipos de JUNV.** Cultivos de células 3T3 (A), 3T3DC-sign (B) 3T3L-sign (C) CRFK (E) o CRFK DC-sign (F) fueron tratados con Mannan (50 o 100 ug/ml) o solo con medio en el caso del control durante 60 min, luego fueron transducidos con distintas cantidades (50 o 150  $\mu$ l) de los pseudotipos retrovirales obtenidos o distintas cantidades del control negativo C1 (C1: control sin plásmidos de expresión para la GPC, solo plásmido C1 que codifica para la GFP o la GPC del JUNV). Se incubaron durante 48 hs a 37°C. Pasado estos tiempos los cultivos se lisaron y se midió la actividad Luciferasa como URL. Para la cuantificación se tomaron datos de 3 experimentos independientes. Las barras de error representan el desvío estándar de las medias de cada experimento.

Además se comprobó la especificidad de esta unión utilizando anticuerpos monoclonales específicos contra el dominio C-terminal de reconocimiento de carbohidratos (DRC) de las lectinas de tipo C (11422 o 11423 en una concentración 20  $\mu$ g/ml; NIAID AIDS Research and Reference Reagent Program) (Fig. 40): las células fueron incubadas con los distintos anticuerpos y pasados los 60 min. fueron transducidas con el pseudotipo.



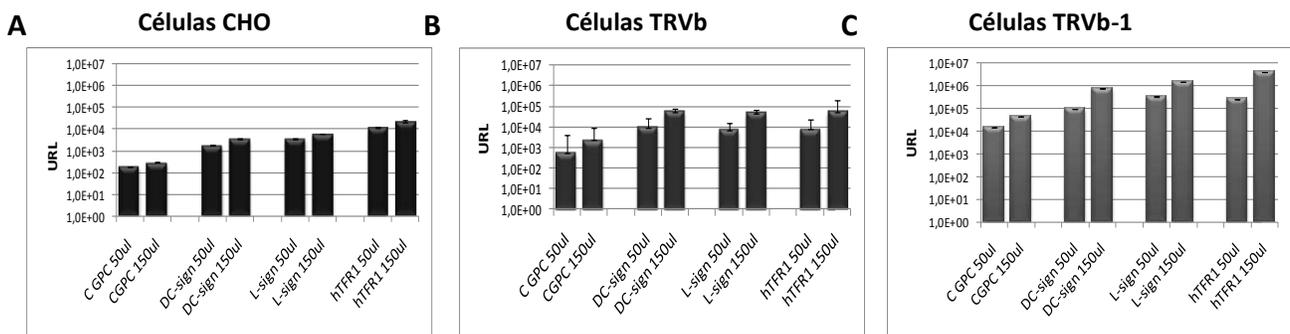
**Figura 40. Los anticuerpos monoclonales contra DC-sign y/o L-sign bloquean el aumento de la infección con los pseudotipos de JUNV.** Cultivos de células 3T3 (A), 3T3DC-sign (B) CRFK (D) o CRFK DC-sign (E) fueron tratados con anticuerpos monoclonales contra el CBD: 11422 y 11423 (20 µg/ml) o solo con medio en el caso del control durante 60 min, luego fueron transducidos con distintas cantidades (50µl o 150 µl) de los pseudotipos retrovirales obtenidos o distintas cantidades del control negativo C1 (C1: control sin plásmidos de expresión para la GPC, solo plásmido C1 que codifica para la GFP o la GPC del JUNV). Se incubaron durante 48 hs a 37°C. Pasado estos tiempos los cultivos se lisaron y se midió la actividad Luciferasa como URL. Para la cuantificación se tomaron datos de 3 experimentos independientes. Las barras de error representan el desvío estándar de las medias de cada experimento.

#### 5.4 Estudio de la interacción de distintos receptores de Tfn y/o lectinas de tipo C en la entrada del JUNV

A continuación se estudió la habilidad de los pseudotipos de JUNV de interactuar con cultivos celulares que expresan de forma diferencial los distintos Tfr, en presencia o ausencia de las lectinas. Hasta el momento se conoce que el JUNV puede utilizar como receptor al Tfr1 humano y felino, aunque no el canino o murino, aunque si es posible el uso del Tfr1 ortólogo de la especie huésped de cada uno de los arenavirus (Abraham y col., 2009). Con el objetivo de evaluar la capacidad de las lectinas para mediar la entrada del JUNV en cultivos celulares

que no expresen el receptor conocido para JUNV, se utilizaron las células CHO, que expresan el TfR1 de hámster, las células derivadas de las CHO que no expresan el TfR1 endógeno, las células TRVb y las TRVb-1. Como se demostró en la sección anterior el pseudotipo no es capaz de transducir las líneas celulares CHO y TRVb, ya que ninguna expresa el TfR1 adecuado para permitir la entrada del JUNV mientras que el pseudotipo fue capaz de infectar eficientemente los cultivos de las TRVb-1 las cuales expresan de forma correcta el hTfR1 (Fig. 37).

Se extendió el estudio para evaluar de si tanto DC-sign como L-sign son capaces de mediar la infección de los pseudotipos en cultivos que no expresen TfR1, de ninguna especie, es decir si las lectinas por si solas pueden mediar la transducción de los pseudotipos, actuando como moléculas receptoras de la GPC de JUNV. Para esto se transfectaron transientemente cultivos de células CHO, TRVb o TRVb1 con plásmidos de expresión que codifican para las lectinas DC-sign o L-sign, el hTfR1 o solo eGFP como control. Pasadas las 24 hs de la transfección los cultivos fueron transducidos con el pseudotipo de JUNV y se cuantificó la infección midiendo la actividad luciferasa a las 48 hs post transducción.



**Figura 41. Rol de las lectinas de tipo C y el hTfR 1 en la infección con el pseudotipo de JUNV.** Cultivos de células CHO (A), TRVb (B) o TRVb1 (C) fueron transfectados con pcDNA3DC-sign, pcDNA3L-sign, pcDNA3hTfR1 o con el plásmido N1 como control. A las 24 hs post-transfección fueron transducidos con distintas cantidades (50 o 150 µl) de los pseudotipos retrovirales obtenidos. Se incubaron durante 48 hs a 37°C. Pasado estos tiempos los cultivos se lisaron y se midió la actividad Luciferasa como URL. Para la cuantificación se tomaron datos de 3 experimentos independientes. Las barras de error representan el desvío estándar de las medias de cada experimento.

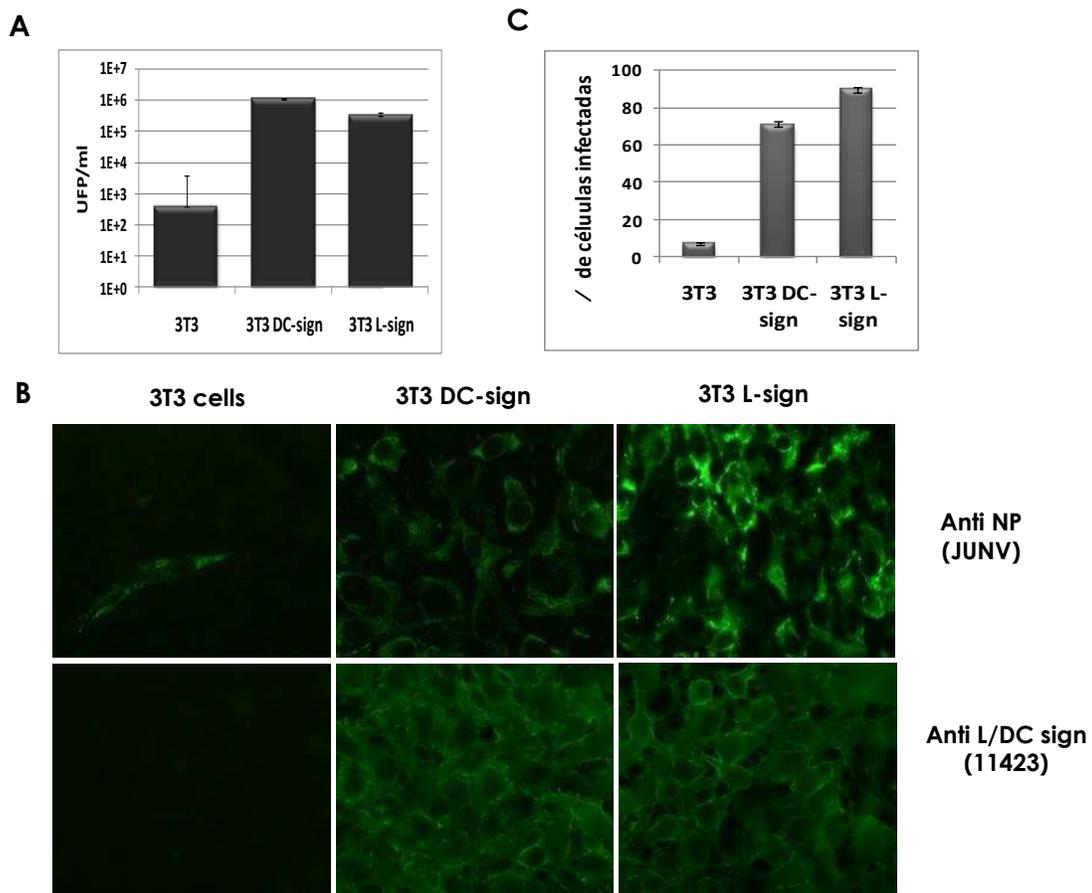
Como se puede observar en la figura 41 en ausencia del TfR1 adecuado para mediar la infección del JUNV (paneles A y B) la expresión del gen de la luciferasa es basal. Mientras que al transducir las células TRVb1 como en el caso anterior hay un aumento de actividad luciferasa. En los 3 casos se observa que al transfectar los cultivos con las lectinas DC-sign o L-sign, o con el hTfR1 la transducción con el pseudotipo aumenta en las células CHO y TRVb y aún más en el caso de las TRVb1. Estos resultados nos indican que la infección óptima con los pseudotipos con la GPC del JUNV se da en cultivos que expresen el TfR1 adecuado como de las lectinas (humano), aunque también nos indican que la sola presencia de las lectinas en las células que no poseen TfR endógeno podría mediar la infección (Fig. 40B), aunque queda por ser determinado si en estas células la GPC del JUNV no estaría interactuando con otro posible receptor celular.

## **6. ESTUDIO DE LA INTERACCION DE PROTEINAS DE MEMBRANA CON LA INTERNALIZACION DEL JUNV.**

### ***6.1 Estudio de la entrada del JUNV en presencia de DC-sign o L-sign***

Como fue descrito en la sección anterior, muchos virus utilizan las lectinas celulares DC-sign o L-sign para potenciar su entrada a las células. Asimismo, el estudio de los pseudotipos retrovirales del JUNV demostró que usan las lectinas DC-sign o L-sign para infectar cultivos celulares, aún en ausencia del hTfR1. Con el objetivo de evaluar si el JUNV se comporta igual que los pseudotipos que llevan la GPC del JUNV, se analizó la infección por el JUNV en la línea celular murina 3T3, y sus derivadas establemente expresando DC-sign o L-sign (NIAID AIDS Research y Reference Reagent Program). Se comparó la infección por el JUNV en las células 3T3 salvajes, las cuales no expresan ninguna lectinas de tipo C y mostraron ser relativamente no susceptibles a la infección por JUNV (Sección 1.1), con las 3T3 que expresan establemente DC-sign o L-sign. Las células fueron infectadas con el JUNV a una m.i.=1. Los sobrenadantes de las células infectadas fueron cosechados a las 24 hs p.i. y titulados por el método de UFP. Al mismo tiempo, los

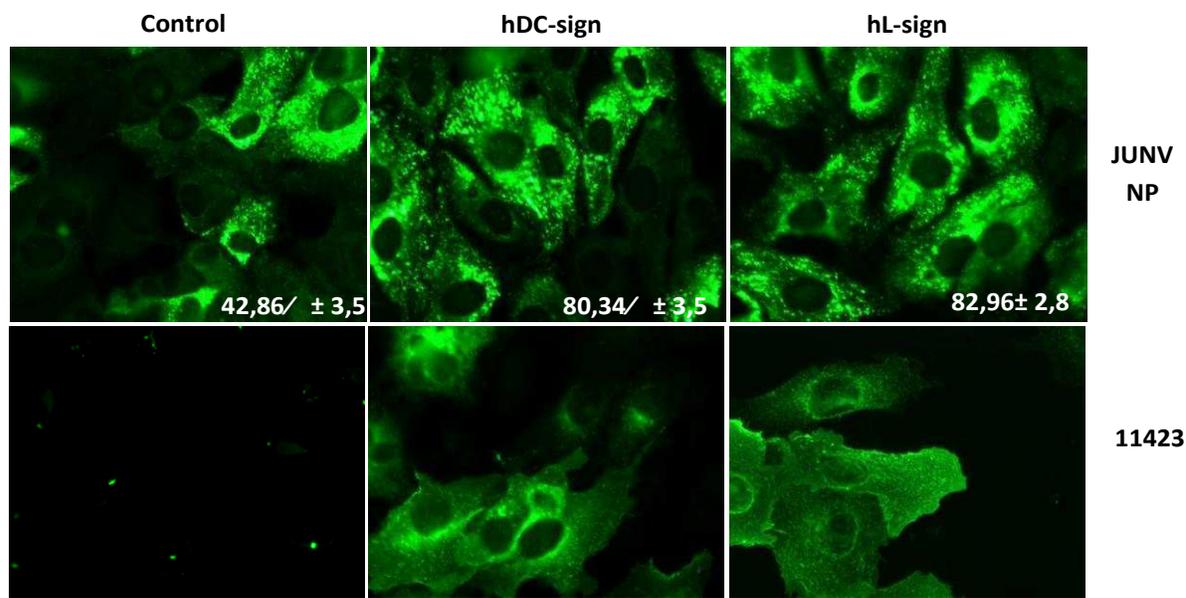
cultivos crecidos en vidrios, fueron fijados y analizados para la presencia de antígeno viral por el método de IFI, utilizando anticuerpo anti la NP para detectar las células infectadas. Las células 3T3 no son susceptibles a la infección por el JUNV, a ninguna de las m.i. ensayadas, mientras que las 3T3-DC-sign y las 3T3-L-sign permitieron la propagación de JUNV con un alto título viral. La producción viral fue aproximadamente 3 unidades logarítmicas más altas en las células que expresan establemente DC-sign o L-sign que en las células parentales que no expresan estas lectinas (Fig. 42).



**Figura 42- Aumento de la infección con JUNV por las lectinas de tipo C.** Cultivos de células 3T3, 3T3 DC-sign o 3T3 L-sign fueron crecidos en vidrios cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades. Estos fueron infectados con JUNV a una m.i. de 1. Pasadas las 24 hs de infección se cosecharon los sobrenadantes y se fijaron los cultivos para IFI citoplasmática. Los sobrenadantes fueron titulados por el método de UFP (A). Se realizó la IFI de las células fijadas utilizando anticuerpos monoclonales anti la NP del JUNV o anticuerpo anti DC-sign y/o L-sign y luego anti ratón conjugado a FITC. Aumento 400X (B). Se expresaron los datos como porcentaje de células infectadas en 3 experimentos independientes. Las barras de error representan el desvío estándar de los mismos (C).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la expresión de antígeno viral obtenido en la IFI: tanto las células 3T3 expresando DC-sign como L-sign mostraron una alta cantidad de células expresando la NP del JUNV, mientras que la cantidad de células positivas cuantificadas en las 3T3 parentales no alcanzaron un 5%, apoyando los resultados obtenidos hasta el momento que mostraban que estas células no serían permisivas para la infección del arenavirus. Para confirmar la presencia de las lectinas DC-sign o L-sign, y su correspondiente ausencia en las 3T3 salvajes, las células fueron fijadas y analizadas por IFI usando el anticuerpo monoclonal 11423 (NIAID AIDS Research and Reference Reagent Program). Como puede observarse en la figura 42 (B panel inferior) solo las células establemente transfectadas dieron un patrón positivo para estas lectinas, mientras que no se observó su presencia en las parentales.

Para evaluar el efecto de las lectinas en la infección con JUNV, se transfectaron células Vero, negativas para DC-sign y L-sign (Fig. 43), con los plásmidos pcDNA3.1-DC-sign o pcDNA3.1-L-sign (NIAID AIDS Research and Reference Reagent Program) para expresar transientemente las respectivas lectinas. A las 24 hs post transfección, las células fueron infectadas con JUNV (m.i.=1) o fijadas para IFI. Estas células fijadas fueron sometidas a IFI con el anticuerpo monoclonal 11423 para detectar la eficiencia de transfección de las células Vero en el momento de la infección por el JUNV. Como se observa en la figura 43, en el momento de la infección alrededor del 60% del cultivo expresa las lectinas, mientras que el control sin transfectar es negativo para la presencia de las mismas. Pasadas las 24 hs de infección, las células fueron fijadas y analizadas para la presencia de la NP viral. Se tomaron imágenes y cuantificaron células positivas para el antígeno NP de 3 experimentos independientes, contando en cada caso 20 campos al azar. Las células control, sin transfectar presentan un nivel de infección que alcanza el 40%, mientras que en los cultivos transfectados con DC-sign o L-sign, la infección aumentó hasta valores cercanos al 80%.

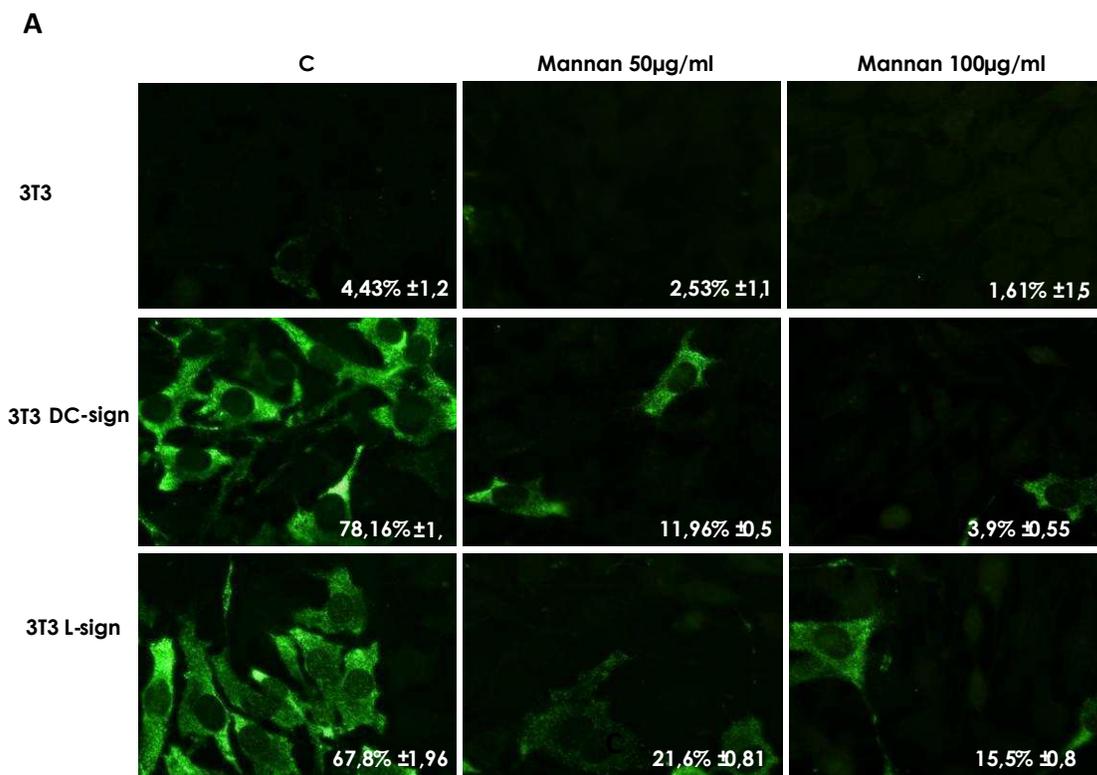


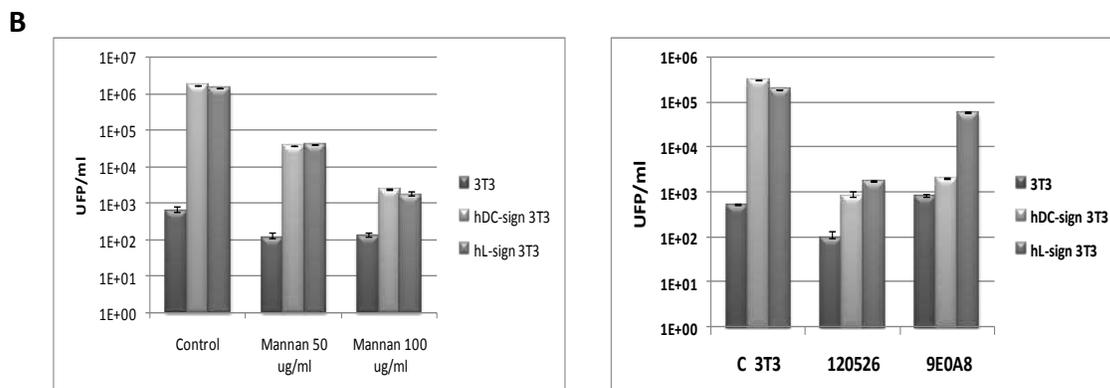
**Figura 43. Aumento de la infección por JUNV en presencia de DC-sign o L-sign.** Las células Vero fueron transfectadas con DC-sign o L-sign. A las 24 hs post-transfección las células se infectaron con JUNV a una m.i. de 1. Las células fueron fijadas a las 24 hs p.i. para IFI citoplasmática. Se detectó el antígeno viral NP utilizando anticuerpos específicos anti NP, los cuales fueron evidenciados utilizando un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a FITC. Se tomaron imágenes de 3 experimentos independientes y se cuantificaron las células positivas y las totales. Los datos de la cuantificación se expresan en cada figura como el porcentaje de células positivas sobre el total de células. Imágenes 400X. Los errores representan el desvío estándar de las medias.

Para confirmar que este aumento de la infección es específicamente mediado por DC-sign o L-sign, las células 3T3, 3T3-DC-sign o 3T3-L-sign fueron tratadas con distintas concentraciones de Mannan, compuesto que compite por los sitio de unión a DC-sign o L-sign, o con anticuerpos específicos que bloquean a las lectinas (9E9A8 and 120526, 20 mg/ml; NIAID AIDS Research and Reference Reagent Program) 60 min previo a la infección con JUNV (m.i.=1) y durante la misma. A las 24 hs. p.i., se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por el método de UFP.

Como puede observarse en la figura 44 B y C, tanto el Mannan como los dos anticuerpos monoclonales testeados reducen la infectividad del virus, demostrando la especificidad del aumento de la infección a la presencia de las lectinas. Se evaluó de manera similar la capacidad del Mannan para bloquear la síntesis de antígenos virales medida por la presencia de la NP viral. Con este fin se

crecieron las monocapas de células 3T3, 3T3-DC-sign o 3T3-L-sign en vidrios durante 24 hs, pasado este tiempo los cultivos fueron tratados con Mannan en distintas concentraciones durante 60 min y luego infectados con JUNV a una m.i. de 1 durante 60 min en presencia del compuesto. Luego de la hora de infección tanto el inóculo como el compuesto fueron retirados y las células lavadas con PBS. Se continuó la infección durante 24 hs, y al cabo de este tiempo se fijaron los cultivos para IFI. Se detectó la presencia del antígeno viral utilizando un anticuerpo anti NP, y luego un anticuerpo anti ratón conjugado a FITC. Como puede observarse en la figura 44 A la presencia de Mannan en todas sus concentraciones bloqueó la infección del JUNV.





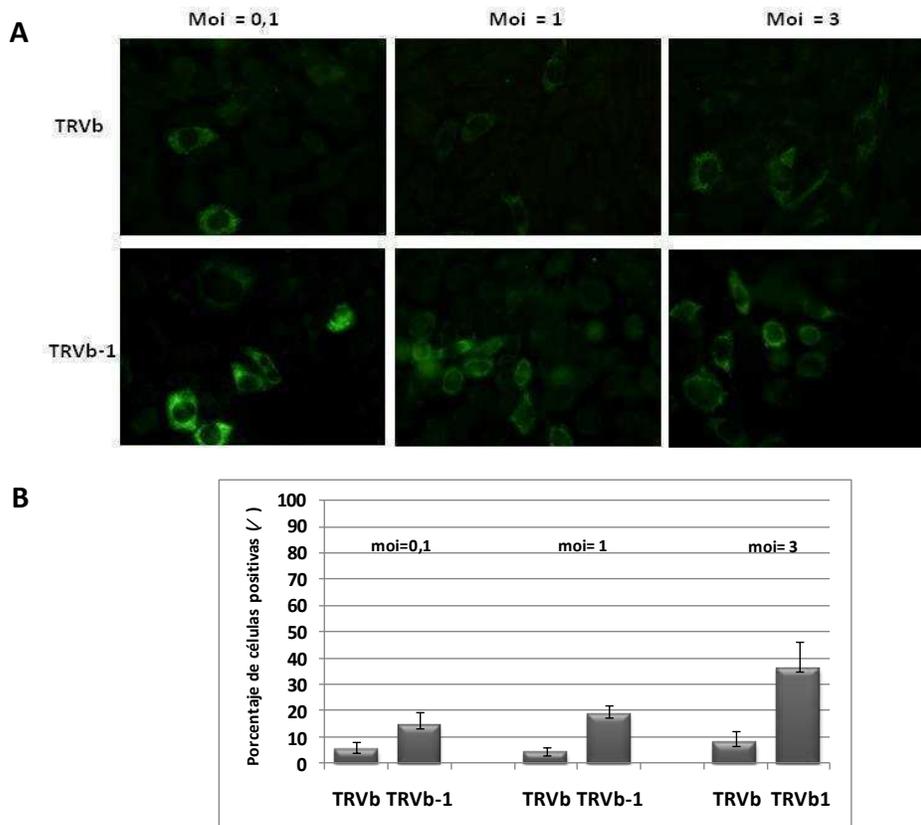
**Figura 44- El mannan y anticuerpos específicos contra las lectinas bloquean el aumento de la infección por JUNV.** Las células 3T3, 3T3DC-sign o L-sign fueron pretratadas con mannan (50 ug/ml o 100ug/ml) durante 60 min., luego fueron infectadas con JUNV a una m.i de 1 en presencia de las concentraciones correspondientes del compuesto. **A-** 24 h p.i. las células fueron fijadas para IFI utilizando el anticuerpo anti NP (SA05AG12) y un anticuerpo secundario anti ratón FITC. Se tomaron imágenes correspondientes a 3 experimentos independientes y se cuantificaron células positivas y totales en 20 campos al azar. Los datos indicados en el panel A corresponden a la media del porcentaje de células positivas para el antígeno viral sobre la cantidad total de células. Aumento 400X. Los errores representan el desvío estándar de las medias. **B-** Cultivos de células 3T3, 3T3 DC-sign o L-sign fueron pretratadas con mannan (50 µg/ml o 100µg/ml) durante 60 min. y luego fueron infectadas con JUNV a una m.i. de 1. Se cosecharon los sobrenadantes a las 24 hs p.i. y se titularon en células Vero por ensayo de UFP. Se realizó la cuantificación de tres experimentos independientes. **C-** Cultivos de células 3T3, 3T3 DC-sign o 3T3 L-sign fueron pretratados con anticuerpos anti DC-sign y/o L-sign 9E9A8 (20 ug/ml), o anti DC-sign y/o L-sign 120526 (20 ug/ml), y luego fueron infectados con JUNV a una m.i. de 1. A las 24 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por el método de UFP en células Vero.

Estos estudios sugieren que ambas lectinas de tipo C, DC-sign y L-sign aumentan la infección de células no permisivas, actuando en un mecanismo en *cis* (ver introducción). Hasta el momento no hay estudios que demuestren el uso de estas proteínas para la infección en *trans* del JUNV *in vivo* como en el caso de HIV (Geijtenbeek y col., 2000).

## 6.2 Estudio de la interacción de distintos receptores de *fn* y/o lectinas de tipo C en la entrada del JUNV

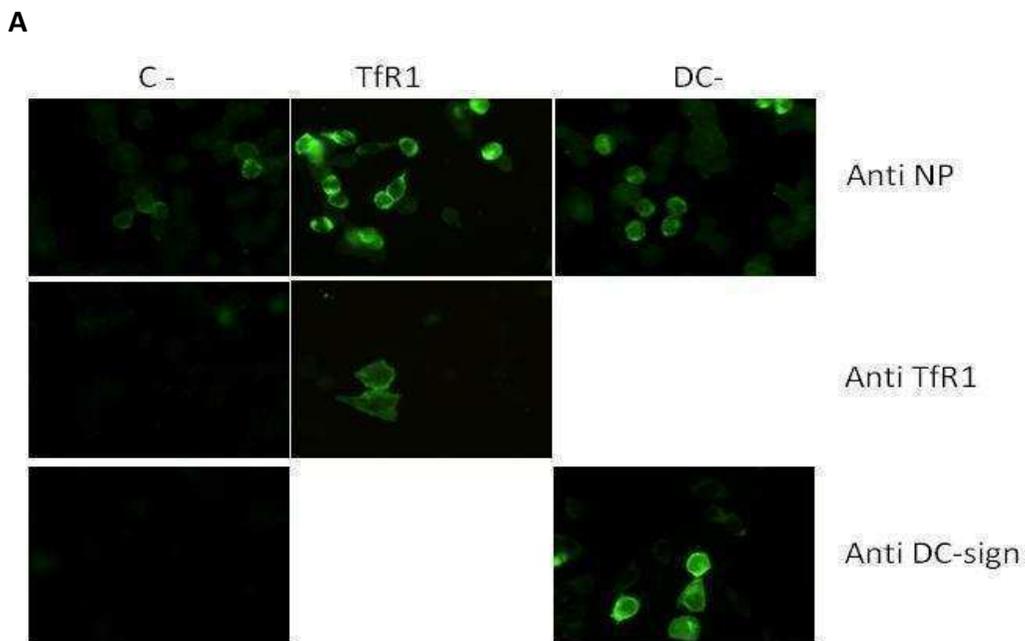
Se continuó el estudio evaluando la habilidad del JUNV de interactuar con cultivos celulares que expresan de forma diferencial los distintos TfR, ya descritos en la sección anterior, en presencia o ausencia de las lectinas. Comenzamos evaluando la capacidad del JUNV de infectar estas células que no poseen TfR

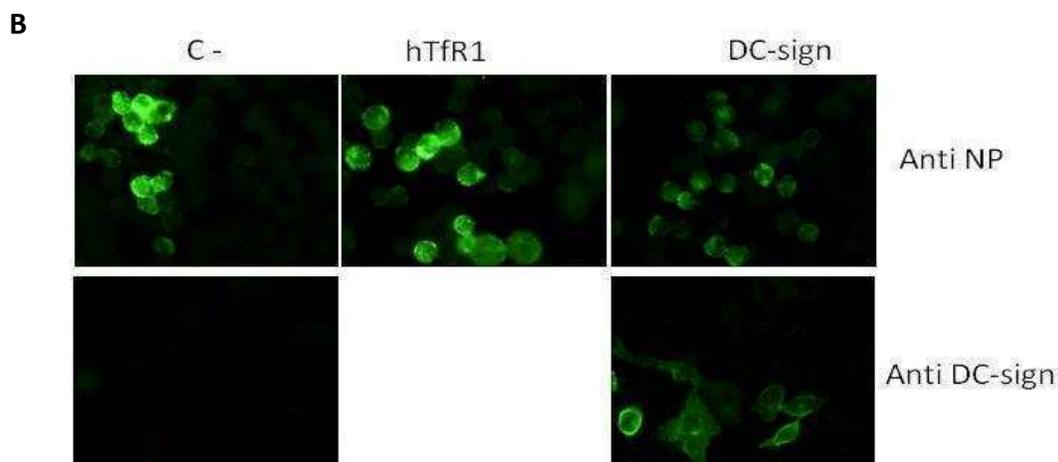
(TRVb) o poseen el hTfR1 (TRVb-1). Para esto infectamos estos cultivos con distintas m.i. del JUNV durante 60 min. Pasada la hora de infección los cultivos fueron incubados durante 24 hs y luego se fijaron para evaluar la expresión de la NP por IFI. Como se observa en la figura 45, el virus es capaz de infectar a las células que no expresan el TfR aunque con un nivel de infección que no llega al 10% en ninguna de las m.i. utilizada. En contraste, al aumentar la m.i. en las células que expresan el hTfR el porcentaje de células positivas para el antígeno NP del JUNV fue aumentando.



**Figura 45- Infección con el JUNV en cultivos que expresan de forma diferencial el TfR.** Cultivos de células TRVb o TRVb-1 fueron crecidos sobre vidrios en microplacas de 24 cavidades. Estos fueron infectados con JUNV a una m.i. de 0,1, 1 o 3. Pasadas las 24 hs de infección se fijaron los vidrios para IFI citoplasmática. **A-** Se realizó la IFI de los vidrios fijados utilizando anticuerpos monoclonales anti la NP del JUNV y luego anti ratón conjugado a FITC. Aumento 400X. **B-** Se expresaron los datos como porcentaje de células infectadas en 3 experimentos independientes. Las barras de error representan el desvío estándar de los mismos.

Con el objetivo de evaluar la capacidad de las lectinas para mediar la entrada del JUNV en cultivos celulares que no expresen el receptor conocido para JUNV, se utilizaron las células derivadas de las CHO, las TRVb y las TRVb-1. El pseudotipo no fue capaz de transducir las líneas celulares CHO y TRVb, ya que ninguna expresa el TfR1 adecuado para permitir la entrada del JUNV mientras que fue capaz de transducir eficientemente los cultivos de las células TRVb-1, que expresan de forma correcta el hTfR1 (Fig. 36), al transfectar con DC-sign o L-sign la transducción aumentó de forma significativa. Es por eso que se extendió el estudio para evaluar si tanto DC-sign como L-sign son capaces de mediar la infección del JUNV en cultivos que no expresen TfR1, de ninguna especie, es decir si las lectinas por si solas pueden mediar la infección con el JUNV, actuando como moléculas receptoras. Para esto se transfectaron transientemente cultivos de células TRVb o TRVb1 con plásmidos de expresión que codifican para las lectinas DC-sign o L-sign o hTfR1 (Fig. 45). Pasadas las 24 hs de la transfección los cultivos fueron infectados con el JUNV. A las 24 hs. p.i. los cultivos fueron fijados para IFI citoplasmática y se evaluó la presencia de la NP del JUNV por IFI.





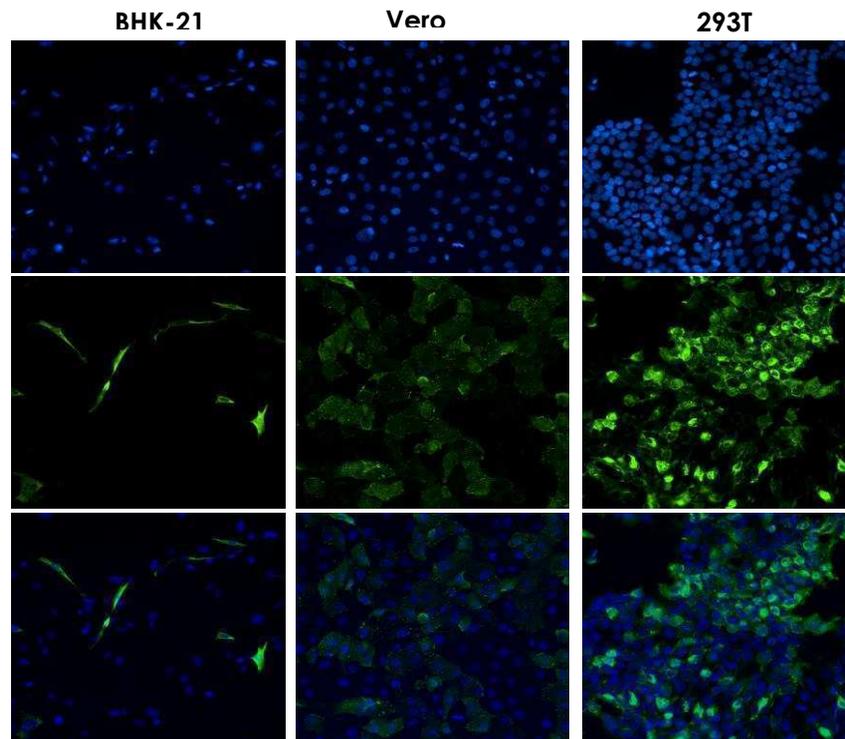
**Figura 46. Rol de las lectinas de tipo C y el hTfR 1 en la infección con el JUNV.** Cultivos de células TRVb (A) o TRVb1 (B) fueron transfectados con pcDNA3DC-sign o pcDNA3hTfR1. A las 24 hs post-transfección fueron infectados con el JUNV a una m.i. de 1. Se incubaron durante 24 hs a 37°C. Pasado este tiempo las células fueron fijadas para IFI utilizando el anticuerpo anti NP (SA05AG12) y un anticuerpo secundario anti ratón FITC. Se tomaron imágenes correspondientes a 3 experimentos independientes y se cuantificaron células positivas y totales en 20 campos al azar. Los datos indicados en el panel A corresponden a la media del porcentaje de células positivas para el antígeno viral sobre la cantidad total de células. Aumento 400X. Los errores representan el desvío estándar de las medias

Como se observa en la figura 45 al transfectar los cultivos con DC -sign, o con el hTfR1 la infección con el JUNV aumenta en las células TRVb y aún más en el caso de las TRVb-1. Estos resultados nos indican que la infección óptima con el JUNV se da en cultivos que expresen el TfR1 humano o las lectinas, aunque también nos permiten concluir que la sola presencia de las lectinas en las células que no poseen TfR endógeno podría mediar la infección. Queda por ser determinado si en estas células la GPC del JUNV no estaría interactuando con otro posible receptor celular.

## 7-ESTUDIO DE LA INTERACCION DE PROTEINAS DE MEMBRANA CON LA INTERNALIZACION DEL TCRV.

### 7.1 Estudio de la internalización del TCRV en distintos cultivos celulares

Con el objetivo de estudiar las similitudes y diferencias entre la vía de entrada del TCRV con el JUNV, ambos pertenecientes al Clado B del Nuevo Mundo, muy cercanos filogenéticamente pero que utilizan distintos receptores, se realizaron los siguientes experimentos. Se amplió el estudio dentro de la familia de los arenavirus se evaluó la capacidad del TCRV de infectar cultivos celulares provenientes de distintas especies.



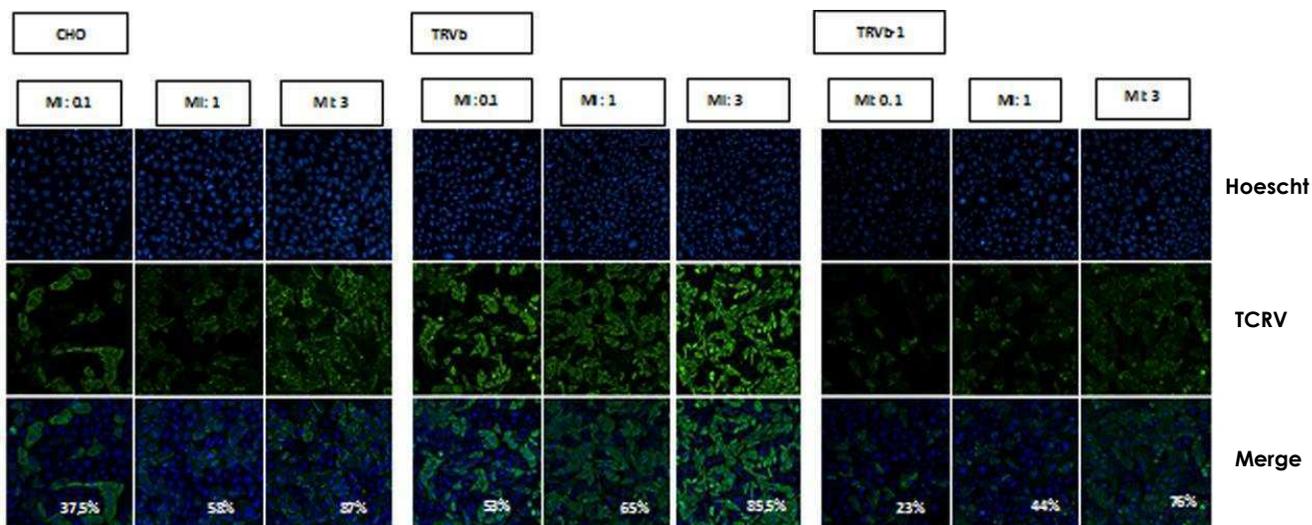
**Figura 47- Infección de líneas celulares de distintos orígenes con TCRV.** Se crecieron los cultivos celulares en cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades. Estos cultivos fueron infectados con TRCV a una m.i. de 1. A las 24 hs p.i. se fijaron para IFI citoplasmática. Se realizó la IFI utilizando anticuerpos policlonales contra el TCRV y luego anti ratón conjugado a FITC.

Como se puede observar en la figura 47 el TCRV fue capaz de infectar líneas celulares provenientes de hámster (BHK-21), mono (Vero E6) y humano (293T). Las mismas fueron infectadas utilizando una m.i. de 1 y fijando las células a

las 24 hs p.i. para IFI, utilizando un anticuerpo anti TCRV policlonal (ver materiales y métodos). Con este resultado corroboramos el uso de distintos receptores de TCRV al compararse con el JUNV, el cual tiene capacidad restringida de infección en cultivos de células CHO, mientras que TCRV, que ya ha sido estudiado que no utilizaría el hTfR1 infecta todas estas células con la misma efectividad.

### 7.2 Estudio de la interacción del receptor de *fn* en la entrada del TCRV

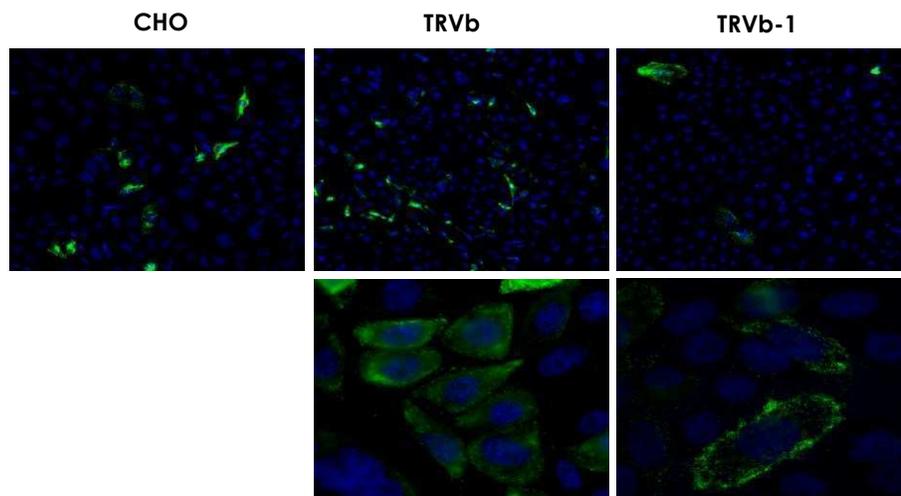
Como ha sido previamente descrito, el TCRV no utilizaría el hTfR1 como receptor para ser endocitado en las células (Radoshitzky y col., 2007). Como hasta el momento el receptor de este virus no se ha caracterizado, el objetivo de los siguientes ensayos fue interiorizarse un poco más en la estrategia utilizada por el TCRV, sobretodo estudiar la influencia del TfR1 (tanto humano como murino) en la capacidad de infección del TCRV. Con este fin se utilizaron las líneas celulares CHO, TRVb y TRVb1.



**Figura 48- Infección de CHO, TRVb y TRVb1 con TCRV.** Se crecieron los cultivos celulares en cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades. Estos cultivos fueron infectados con TCRV a una m.i. de 0,1, 1 o 3. A las 24 hs p.i. se fijaron para IFI citoplasmática. Se realizó la IFI utilizando anticuerpos policlonales contra el TCRV y luego anti ratón conjugado a FITC. Se expresaron los datos como porcentaje de células infectadas en 3 experimentos independientes. Los errores representan el desvío estándar de los mismos. Aumento 200X.

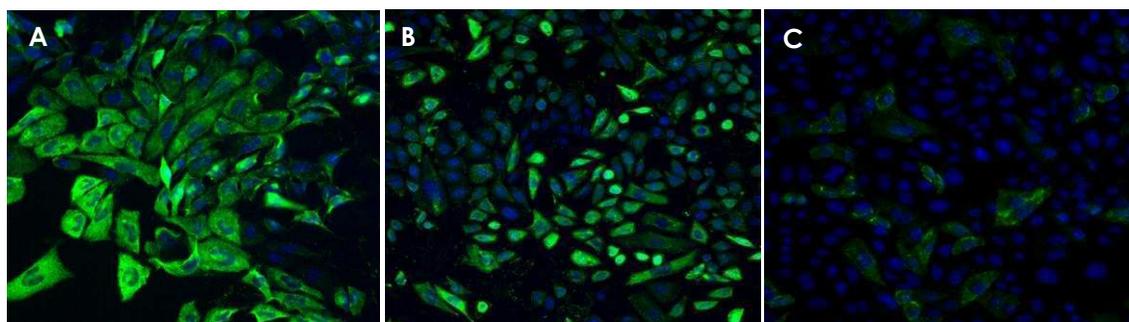
Se infectaron los cultivos celulares con distintas m.i. del TCRV. Pasada la hora de infección se retiraron los inóculos y se incubaron las células con medio fresco. Se fijaron los cultivos a las 24 hs p.i. y se evidenció el antígeno viral por IFI con anticuerpo policlonal anti TRCV. Como se puede observar en la figura 48 el TCRV pudo infectar eficientemente las células CHO y TRVb, en todas las multiplicidades probadas, presentando su patrón habitual de infección, comparable al de las Vero (ver sección B). Al infectar las células TRVb-1, en cambio, se observó un patrón diferente: no solo hay un menor número de células infectadas, sino que las células que se infectaron expresan una menor cantidad de antígeno viral.

Por este motivo, a continuación se estudió con más detalle las diferencias entre estas líneas celulares, con el fin de determinar si la presencia del hTfR1 está alterando la entrada del TCRV. En la figura 49 se observa el patrón de infección de los distintos cultivos celulares en un objetivo de mayor aumento a las 24 hs p.i.. En estas células se observó claramente la diferencia en los patrones de infección de estas células, indicando una posible deficiencia del TCRV de infectar las líneas celulares que expresan el hTfR1.



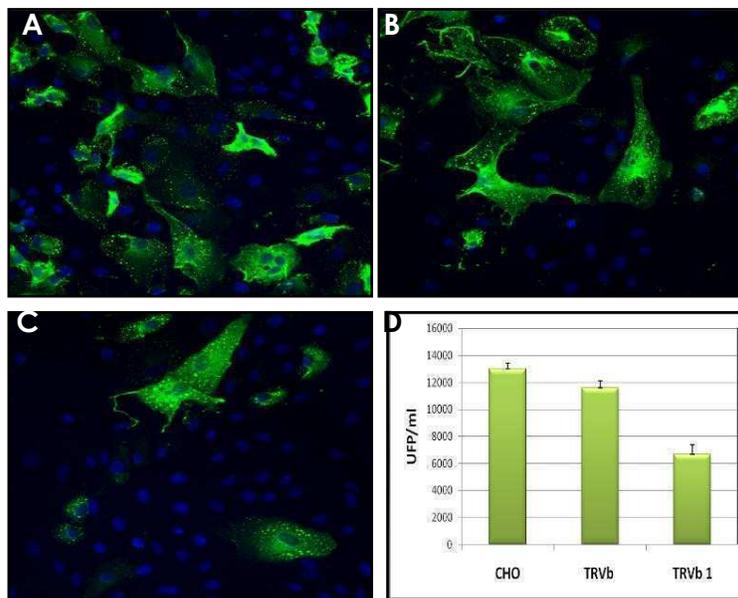
**Figura 49- Infección de CHO, TRVb o TRVb-1 con TCRV.** Se crecieron los cultivos celulares en cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades. Estos cultivos fueron infectados con TCRV a una m.i. de 1. A las 24 hs p.i. se fijaron para IFI citoplasmática. Se realizó la IFI utilizando anticuerpos policlinales contra el TCRV y luego anti ratón conjugado a FITC. Aumento 1000X.

Para determinar si la infección en estas líneas celulares es productiva se realizaron dos ensayos: se continuó la infección durante 48 hs para ver si esta progresaba y se observaba un aumento de las células positivas para la infección y, por otro lado, se cosecharon los sobrenadantes a las 48hs y se infectaron células Vero con una dilución 1 en 10 del mismo para determinar si es infeccioso.



**Figura 50- Infección de células CHO, TRVb o TRVb-1 con TCRV a las 48 hs p.i.** Cultivos de células CHO (A), TRVb (B) o TRVb-1 (C) fueron crecidos en cubreobjetos en placas de 24 cavidades. Estos fueron infectados con TCRV a una m.i. de 1. A las 48 hs p.i. se fijaron para IFI citoplasmática. Se realizó la IFI utilizando anticuerpos policlonales contra el TCRV y luego anti ratón conjugado a FITC. .

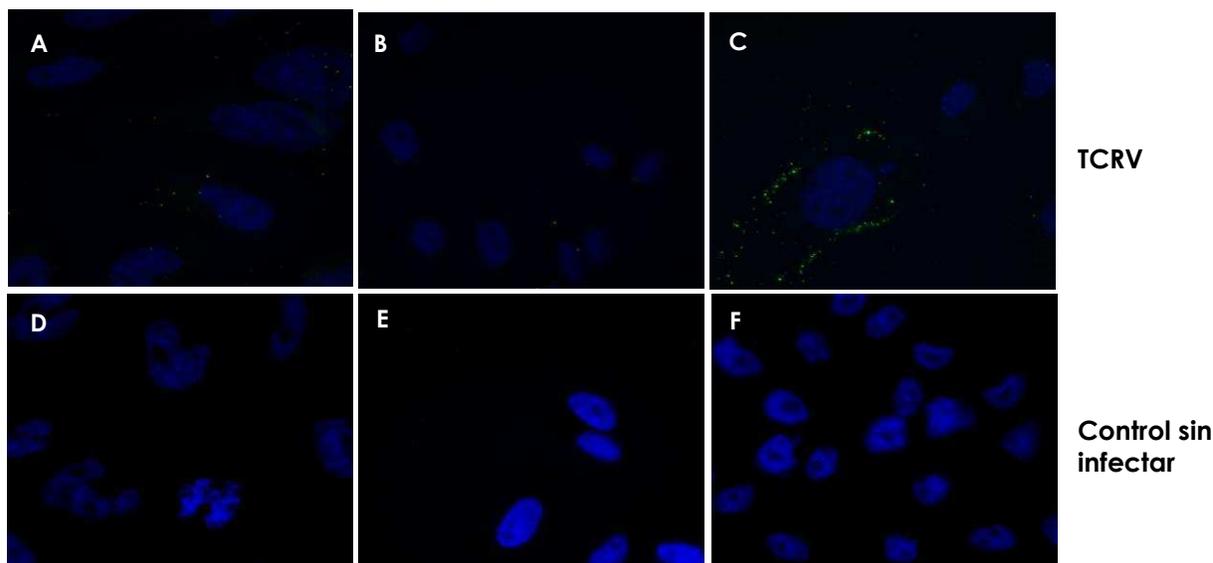
Como se observa en la figura 50 la infección continúa a las 48hs en las células CHO y TRVb. Sin embargo la infección a las 48 hs en las células TRVb-1 no aumenta de la misma forma que en los otros cultivos celulares. Al cosechar los sobrenadantes de estas células e infectar células Vero con los mismos observamos una disminución significativa del título viral obtenido en las TRVb-1 con respecto al obtenido en las CHO y las TRVb (Fig. 51). Es decir que si bien hay una menor cantidad de células expresando el antígeno viral, las que lo expresan producen virus infeccioso. Si bien estos resultados sugieren que el hTfR1 altera la infección con el TCRV, queda por ser estudiado el mecanismo de esta diferencia.



**Figura 51- Infección de células Vero con sobrenadantes producidos por células CHO, TRVb o TRVb-1 infectadas con TCRV.** Se cosecharon los sobrenadantes de las células CHO (A), TRVb (B) o TRVb-1 (C) que habían sido previamente infectadas con TCRV a una m.i. de 1. Se realizaron diluciones 1 en 10 de los sobrenadantes y se infectaron cultivos de células Vero crecidos en cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades. A las 24 hs p.i. se fijaron para IFI citoplasmática. Se realizó la IFI utilizando anticuerpos policlonales contra el TCRV y luego anti ratón conjugado a FITC. Aumento 200X. Al mismo tiempo estos sobrenadantes fueron titulados por ensayo de UFP/ml (D).

El defecto de la internalización del TCRV a estas células no se debe a un problema en el hTfR, sino a alguna posible interacción entre este receptor y el TCRV que afecte su infección. Podría ser posible que el TCRV pueda estar adsorbiéndose al hTfR1 expresado en las TRVb1, pero que este receptor no conduzca a la internalización del virus sino que lo retenga en la membrana siendo otro el receptor que participe en la entrada del virus. Con el objetivo de estudiar esta hipótesis se infectaron las distintas líneas celulares con TCRV a una m.i. de 3 durante 60 min. Pasada la hora de infección los cultivos se incubaron a 4°C con anticuerpo policlonal contra el TCRV durante 2 hs. Pasado este tiempo los cultivos se fijaron con formaldehído. Este tratamiento asegura la observación de los antígenos virales en la membrana de la célula. Como se observa en la figura 52 luego del periodo de infección casi todo el TCRV es endocitado en las células CHO y TRVb, mientras que se observa en mayor proporción en la superficie de las células TRVb1, indicando que en estas células el virus queda mayormente

retenido en la superficie, lo cual explicaría la menor cantidad de células positivas para el antígeno viral a las 24 hs p.i. y la menor producción viral en estas células.



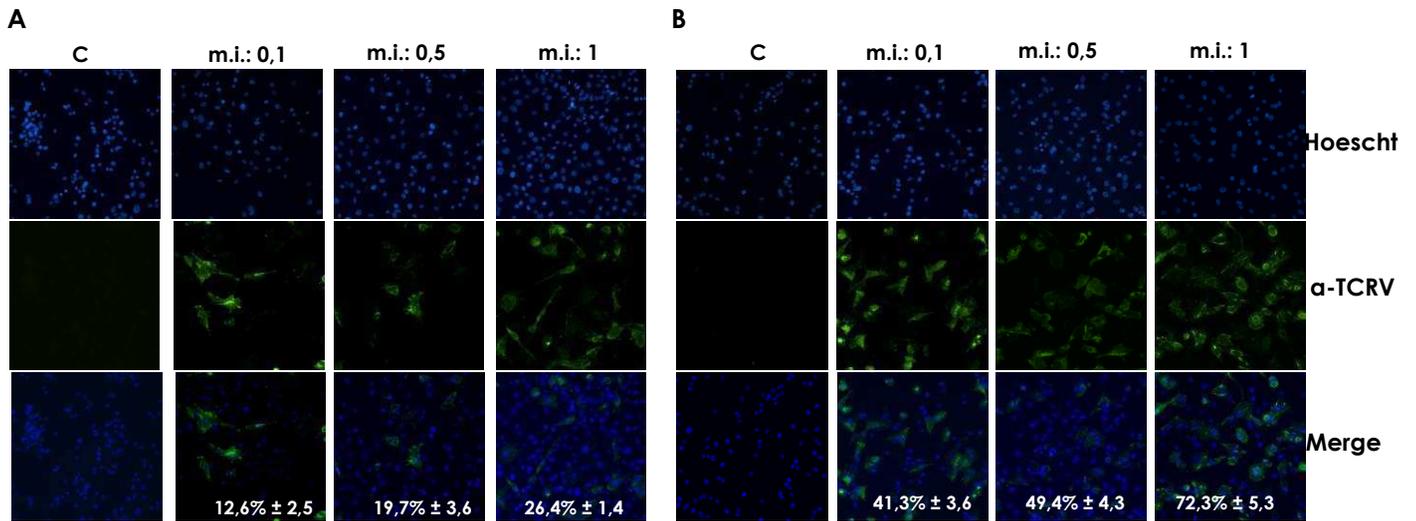
**Figura 52- Internalización del TCRV en células CHO, TRVb o TRVb1.** Se crecieron monocapas de células CHO (A, D) TRVb (B, E) o TRVb1 (C, F). Los paneles A, B y C fueron infectados con TCRV a una m.i. de 3 durante 60 min. Los paneles D, E y F fueron incubados solo con medio como control. Luego se realizaron 3 lavados con PBS y se incubaron los cultivos durante 2 hs con anticuerpo policlonal anti TCRV a 4°C. Estos cultivos fueron fijados con formaldehído 3% para realizar IFI de membrana. Luego se incubaron con anti ratón conjugado a FITC. Aumento 1000X.

### 7.3 Estudio de la entrada del TCRV en presencia de DC-sign o L-sign

Con el objetivo de continuar con la caracterización de la entrada del TCRV, se evaluó la capacidad del TCRV de infectar células en presencia de la lectina DC-sign. Como se demostró en las secciones anteriores de este capítulo (A y B), tanto los pseudotipos retrovirales que expresan la GPC del JUNV como el JUNV utilizan estas lectinas de tipo C para internalizarse. Se evaluó para TCRV la infección de las células felinas CRFK y su derivado que expresa establemente DC-sign (Reagan y Whittaker, 2008). Como se observa en la figura 53, TCRV es capaz de infectar las células CRFK controles (panel A) en todas las m.i. ensayadas.

Sin embargo al realizar la cuantificación de las células infectadas en el caso de las CRFK-DC-sign se observó un aumento de la infección en todas las m.i.

ensayadas (Fig. 53, panel B) indicando que también en el caso de TCRV, esta lectina estaría ayudando en el proceso de infección.



**Figura 53- Infección de CRFK y CRFK DC-sign con TCRV.** Se crecieron los cultivos celulares CRFK (A) y CRFK DC-sign (B) en cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades. Estos cultivos fueron infectados con TRCV a una m.i. de 0,1, 1 o 3. A las 24 hs p.i. se fijaron para IFI citoplasmática. Se realizó la IFI utilizando anticuerpos policlonales contra el TCRV y luego anti ratón conjugado a FITC. Se expresaron los datos como porcentaje de células infectadas en 3 experimentos independientes. Los errores corresponden a los desvíos estándar.

# CONCLUSIONES

---

---

El virus Junín es uno de los cinco miembros de la familia arenaviridae capaz de producir fiebre hemorrágica en humanos. Distintos grupos de investigación han abordado el estudio de esta enfermedad y sus respectivos agentes etiológicos con el objetivo de esclarecer los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la infección. Hasta el momento no se conoce con exactitud la interacción del JUNV con la célula huésped y con el sistema inmunológico del organismo infectado, así como tampoco existen terapias antivirales efectivas.

El conocimiento del ciclo de replicación viral es el punto de partida para el desarrollo de estrategias tendientes al control, cura y/o prevención de las enfermedades virales. Los eventos tempranos del ciclo de replicación viral, tanto el reconocimiento del receptor específico como la adecuada internalización y desnudamiento constituyen una serie de eventos determinantes en el ciclo de replicación y el tropismo viral. La infectividad de la progenie, y su consecuente potencial patogénico, dependen de la adecuada interacción virus-célula huésped. La oportuna utilización de los recursos celulares es determinante para la supervivencia y prevalencia del virus en la naturaleza. Cada paso del ciclo de replicación posee requerimientos específicos y cada estructura celular utilizada representa un punto de estudio básico para la virología.

En este trabajo se estudió la interacción virus-célula huésped con particular interés en los eventos tempranos del ciclo de replicación. Se estudiaron sobretudo las interacciones entre el JUNV y las membranas celulares, el citoesqueleto, así como también la interacción del virus con distintas proteínas involucradas en procesos endocíticos. Como ha sido descrito en la sección de resultados, al utilizar compuestos que inhiben específicamente las distintas vías de entrada se ha demostrado que el JUNV utiliza principalmente la vía de vesículas recubiertas por clatrina para internalizarse en células Vero (Martinez y col., 2007). Hasta el momento han sido descritos caminos de entrada alternativos para varios virus envueltos o no envueltos, sensible o no al pH ácido. El Echovirus 1 y los rotavirus son internalizados por caminos independientes de clatrina y caveola que requieren de la dinamina II (Din II) y son sensibles a la depleción de colesterol por

el compuesto M $\beta$ CD. Por otro lado, el virus influenza puede ser endocitado por un mecanismo tanto dependiente como independientemente de clatrina en el mismo tipo celular (Rust y col., 2004). Con el objetivo de examinar el rol de la endocitosis mediada por clatrina en la entrada del JUNV en un modo más preciso, se realizaron ensayos de adsorción y penetración utilizando virus marcado. Estos estudios demostraron que la CPZ inhibe la internalización del virus a las células sin alterar su adsorción. Estos datos confirmaron que los compuestos actúan en un estadio post-adsorción durante la entrada viral, reafirmando los resultados obtenidos durante la tesina de licenciatura: la reducción de la expresión de la NP obtenida por IFI se debe a la inhibición de la internalización del JUNV y no a la adsorción del mismo.

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos de un modo más directo se realizaron ensayos de microscopía electrónica de transmisión. En estas observaciones el virus fue siempre encontrado dentro de vesículas recubiertas por clatrina o cerca de zonas de la membrana recubiertas por la misma. Las vesículas recubiertas por clatrina se observan usualmente con una morfología de "barril" o "pelota" de 65-75 nm o 90-100 nm de diámetro respectivamente, aunque se han encontrado estructuras de mayor tamaño con diámetro de hasta 120 nm (aproximadamente el 20% del total de las vesículas) (Ehrlich y col., 2004). Estas vesículas son generalmente de mayor diámetro que los virus que entran a las células por endocitosis. Sin embargo, para que la endocitosis mediada por clatrina sea esencial en el ciclo de replicación de los rbdovirus como VSV, que tienen forma de bala con diámetros de 75 nm y un largo máximo de 180 nm, las vesículas recubiertas con clatrina deben sufrir una deformación de su morfología típica (Brodsky y col., 2001). Esta deformación es notable en micrografías electrónicas de VSV en vesículas endocíticas altamente electrodensas, características de las recubiertas con clatrina (Matlin y col., 1982). Consecuentemente el JUNV podría utilizar la misma estrategia que VSV para internalizarse dependientemente de vesículas recubiertas con clatrina a pesar de su diámetro variable entre 50 y 300 nm (Murphy y col., 1970).

Asimismo, estudios previos en miembros de la misma familia como LCMV mostraron, por microscopía electrónica de transmisión, que es endocitado dentro de vesículas no recubiertas en líneas celulares de fibroblastos de roedores (Borrow y Oldstone, 1994). Asimismo, se observó que los agentes que alteran el colesterol de la membrana inhiben la endocitosis del LCMV (Shah y col., 2006). Dado que los arnavirus del Viejo mundo como LCMV utilizan al  $\alpha$ -distroglicano como receptor, mientras que el JUNV utiliza al TfR1 (Rhadoshitzi y col., 2007), no debería resultar extraño que los distintos grupos utilicen además distintas vías de entrada. Coincidentemente, el hecho de que el marcador de la entrada viral utilizada en este trabajo sea la transferrina corrobora el hecho de que la vía de entrada utilizada por este ligando sea utilizada también por el virus.

Las proteínas celulares dominantes negativas han demostrado ser una herramienta útil para analizar la función de las distintas proteínas involucradas en una determinada vía de tráfico intracelular. Cuando son expresadas a altas concentraciones, estas mutantes actúan solapando el efecto de las proteínas salvajes de la célula e inhibiendo su función. En estudios de entrada viral, han sido ampliamente utilizadas la expresión de proteínas dominantes negativas para analizar el rol de la dinamina, que es la GTPasa requerida para liberar la vesícula de clatrina. Pero además de ser necesaria para la endocitosis mediada por clatrina la dinamina también es necesaria para la formación de caveolas (Henley y col., 1998), la exocitosis de vesículas derivadas de Golgi (Jones y col., 1998; Nicoziani y col., 2000), fagocitosis (Gold y col., 1999) y endocitosis no mediada por clatrina (Lamaze y col., 2001). Debido a los efectos pleiotrópicos de la dinamina se recurre en paralelo al uso de moléculas que inhiban más específicamente la endocitosis mediada por clatrina. La más utilizada hasta el momento es la proteína Eps15, la cual se une al adaptador AP-2 requerido para la internalización a través de vesículas recubiertas con clatrina (Benmerah y col., 1998). En consecuencia el siguiente objetivo de este trabajo fue estudiar las proteínas celulares involucradas en este proceso endocítico. Se corroboró el uso de la vía de endocitosis mediada por vesículas recubiertas por clatrina utilizando la

expresión de la proteína mutante dominante negativa EPS-15. La sobreexpresión de la mutante EH29 resulta en una interferencia específica sobre el ensamblado de las vesículas recubiertas con clatrina, sin afectar otras vías endocíticas que no dependen de la red de clatrina (Benmerah y col., 1998; Nichols, 2003). Se utilizó como control la endocitosis de la transferrina, observando que la internalización de la misma solo se veía afectada cuando se sobreexpresó la proteína dominante negativa, pero no en el caso de la sobreexpresión de la proteína salvaje conjugada a GFP. Al realizar estos ensayos utilizando al JUNV se observó que la infección se ve inhibida en células que expresan la proteína dominante negativa de Eps-15, mientras que la infección en células que expresan la proteína salvaje no se ve afectada. Estos resultados indican que la misma sería esencial durante las etapas tempranas del ciclo de replicación del JUNV. Asimismo, se estudió la función de la GTPasa dinamina II en la entrada del JUNV. Se utilizó la mutante dominante negativa K44A, caracterizada por inhibir la función de la dinamina celular tanto de tipo I como de tipo II, bloqueando así la endocitosis dependiente de clatrina como de caveolas (Damke y col., 1994). Este estudio reveló la necesidad de esta GTPasa celular para la infección por el JUNV.

Trabajos previos han descrito que la infección con el JUNV es sensible a agentes que interfieren con la acidificación de los endosomas (Castilla y col., 1994). Estos datos son consistentes con un mecanismo de endocitosis mediada por clatrina, ya que las vesículas recubiertas con clatrina transportan su "carga" a endosomas de pH ácido. La sensibilidad hacia los agentes lisosomotrópicos ha sido generalmente considerada evidencia de entrada mediada por endocitosis, aunque también ha sido publicado que existen virus insensibles a agentes lisosomotrópicos, como el poliomavirus murino, que pueden utilizar esta vía de entrada (Liebl et al., 2006). De hecho, varios caminos endocíticos han sido recientemente identificados además de la vía de entrada dependiente de clatrina, ya ampliamente estudiada (Conner y Schmid, 2003; Pelkmans y Helenius, 2003). Estos nuevos caminos difieren en el tipo de vesículas y proteínas involucradas en la formación de las mismas, además del tipo de compartimento

intracelular al cual el material internalizado es transportado. Algunas llevan sus ligando a los clásicos endosomas ácidos tempranos y tardíos, en donde se reúnen con los ligandos endocíticos internalizados por vesículas recubiertas por clatrina, mientras que otras vesículas liberan su "carga" a compartimentos endosomales de pH neutro, como los caveosomas, retículo endoplasmático o el aparato de Golgi (Nichols, 2003; Pelkmans y Helenius, 2003).

Los ensayos utilizando la GPC del JUNV demostraron que el pH óptimo para mediar la fusión es 5. Estos datos demostraron que la fusión de la proteína de envoltura del JUNV con la membrana celular ocurre a un pH ácido que mimetiza el bajo pH requerido para la fusión dentro de los endosomas (Castilla y col., 1994). Consecuentemente, se evaluó el camino endocítico utilizado por el JUNV una vez internalizado. Para esto se utilizaron como marcadoras de los distintos compartimentos endosomales las proteínas Rab. Existen por lo menos 12 proteínas Rab que regulan el tráfico a través del camino endosomal en células de mamífero (Jordens y col., 2005). Dentro de este grupo las proteínas Rab5 y Rab7 juegan un papel esencial en el tráfico de vesículas endocíticas. La proteína Rab5 está presente en endosomas tempranos (ET) y regula el transporte de vesículas endocíticas desde la membrana plasmática hacia los ET y la fusión entre los ET (Barbieri y col., 1996). La proteína Rab7 se encuentra principalmente en endosomas tardíos (LE "late endosomes") y regula el tráfico entre los ET y los LE y entre los LE y los lisosomas (Bucci y col., 2000). Esta organización única de las proteínas Rab en distintos compartimentos celulares y su especificidad como reguladores del tráfico vesicular las ha convertido en importantes herramientas para el estudio de la endocitosis. En este trabajo se utilizó la expresión de formas mutantes dominantes negativas (DN) de las proteínas Rab5 y Rab7 para identificar los pasos del transporte intracelular requeridos para la infección del JUNV. El pH presente en los ET se encuentra generalmente entre 6,2-6,5, no siendo suficientemente ácido para mediar la fusión entre la GPC del JUNV y la membrana plasmática, mientras que el pH alcanzado en los LE es de 5-6 (Guiducci y col., 2006; Maxfield y McGraw, 2004). Basados en el requerimiento de

pH para la fusión, fue predicho que el JUNV debería fusionar en endosomas tardíos, viajando o no a través de endosomas tempranos. Para evaluar esta vía se utilizaron las proteínas mutantes dominantes negativas de Rab5 y Rab7. Se observó una disminución de la infección al estar estas DN expresadas en las células, indicando que ambas cumplirían un rol esencial en la infección por el JUNV. Estos datos revelaron que el JUNV viajaría por una vía mediada por endosomas tempranos hacia los endosomas tardíos donde ocurriría la fusión. En la figura 53 se describe el mecanismo propuesto para la internalización del JUNV. Los datos obtenidos demostraron que la entrada del JUNV a las células Vero es dependiente de endocitosis mediada por clatrina, y son esenciales las proteínas dinamina II y Eps-15 en este proceso, mientras que una vez que ha sido internalizado utiliza el camino de ET hacia los LE, indicado por la presencia de Rab5 y Rab7 respectivamente.

Casi todos los virus utilizan el citoesqueleto para su transporte dentro de la célula durante la infección. A pesar de esto, se conoce muy poco sobre el mecanismo por el cual los virus utilizan la dinámica del citoesqueleto. En esta parte del trabajo se mostraron una serie de experimentos que fueron diseñados para comprender el mecanismo y los elementos esenciales de la entrada del JUNV. Desorganizando selectivamente la arquitectura o dinámica de los dos componentes principales del citoesqueleto, los microfilamentos y los microtúbulos, fueron estudiados los participantes del transporte de JUNV durante la infección temprana.

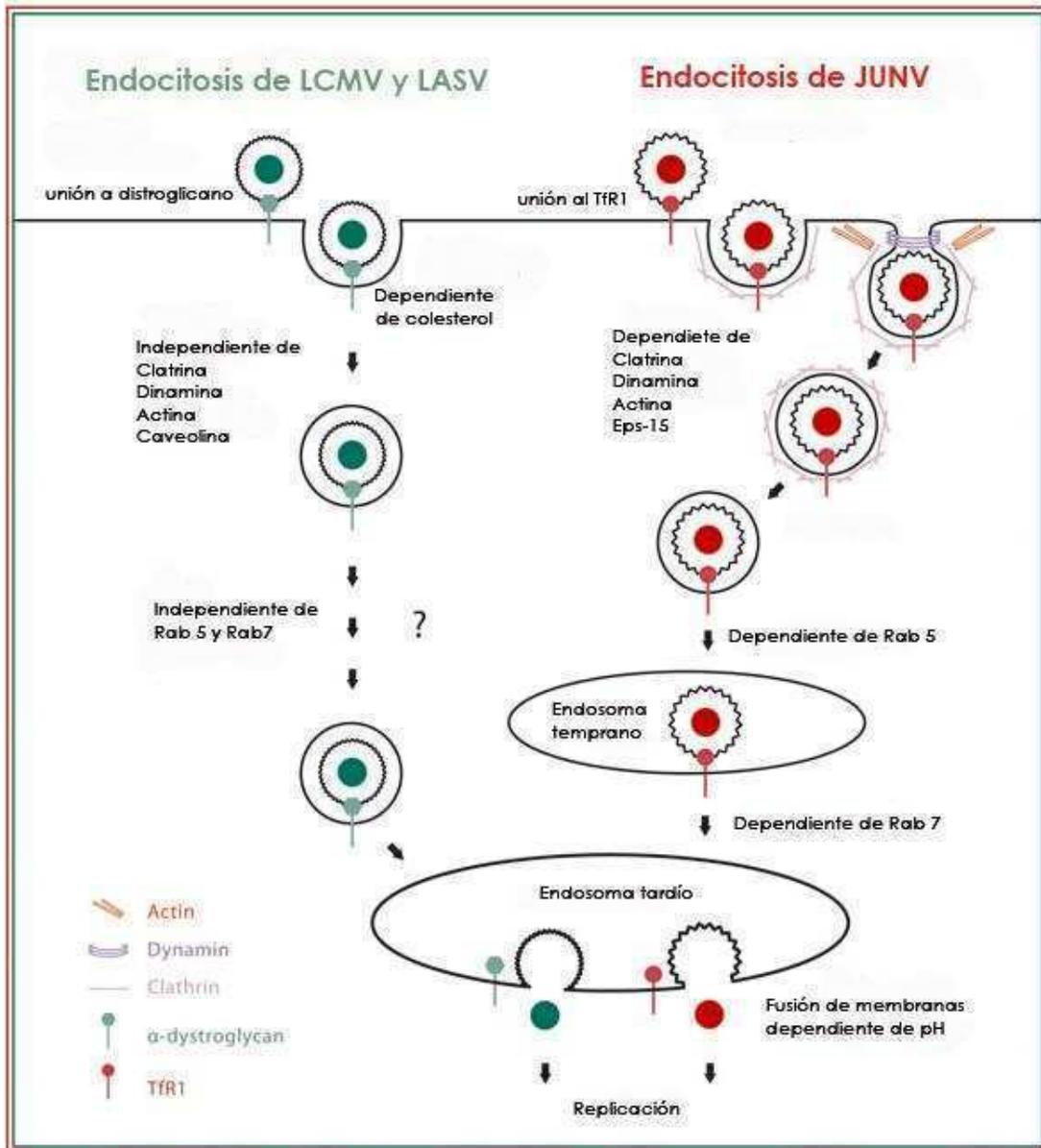


Figura 54. Camino endosomal propuesto para la entrada del JUNV.

Primero se estudió el rol de los microfilamentos durante la entrada del JUNV. Con este fin se utilizaron dos compuestos que se unen a la actina y manipulan la integridad de los microfilamentos por mecanismos de acción opuestos. Cuando la Citochalasin D fue utilizada para desorganizar los microfilamentos citosólicos, se observó una disminución de la cantidad de células infectadas. Al realizar la inmunomarcación para evidenciar la acción del compuesto sobre los microfilamentos se observó que los filamentos periféricos permanecían intactos al

tratarse con Citochalasin D. Por este motivo se continuó el estudio utilizando la Latrunculina A, que elimina los almacenamientos de actina-G utilizados para reparar o formar filamentos *de novo*, y despolimeriza la actina tanto cortical como citoplasmática (Spector y col., 1999). Con este tratamiento se vió inhibida la infección con el JUNV. Estos hallazgos son de particular interés ya que mostraron que la disminución de la actina-G disponible para formar filamentos, junto con la integridad de la actina cortical, son esenciales en la entrada del JUNV, mientras que la integridad de los filamentos de actina citoplasmáticos no sería un requerimiento esencial en esta etapa. De manera similar, se ha demostrado que la entrada del adenovirus tipo 2 y de los pseudotipos retrovirales con la glicoproteína del virus Ebola es inhibida cuando los filamentos de actina son despolimerizados, indicando la necesidad de su integridad para internalizarse (Nakano et al., 2000; Yonezawa et al., 2005). Por otro lado, la entrada del JUNV en presencia de Jasplakinolida, compuesto que estabiliza los microfilamentos de actina preexistentes, no se vió inhibida, a pesar de los notables cambios morfológicos observados en las células. Hasta el momento, los estudios con otros virus no han mostrado un consenso sobre los requerimientos del citoesqueleto durante los pasos iniciales de la infección. Por ejemplo, se ha demostrado que la despolimerización de los filamentos de actina con Latrunculina A no previene la infección por BKV, mientras que la dinámica de los mismos resulta esencial según lo demostrado por ensayos con Jasplakinolida (Eash y Atwood, 2005). El colapso de la red de actina, con los compuestos utilizados hasta el momento en este estudio, no ha mostrado ser esencial en la entrada de arenavirus pertenecientes al grupo del Viejo Mundo como LCMV. Los trabajos realizados en este grupo relacionados con el citoesqueleto demuestran que no sería necesaria ni la integridad estructural ni la dinámica de los microfilamentos en los eventos tempranos de su ciclo de replicación viral (Rojek y col., 2008). Estos hallazgos concuerdan con el hecho de que los arenavirus del viejo mundo utilizan una vía de entrada diferente de la endocitosis mediada por vesículas recubiertas con clatrina, utilizada por JUNV Y TCRV (Martinez y col., 2007). Nuestros resultados,

sobre la progresión de la infección temprana del JUNV en células con el citoesqueleto de actina desorganizado concuerdan con reportes previos que muestran el requerimiento de una red de actina intacta durante eventos tempranos de endocitosis mediada por clatrina (Yarar y col., 2005).

A continuación el estudio se centró en la función de los microtúbulos durante los eventos tempranos del ciclo de replicación del JUNV en células Vero. Con este objetivo se utilizaron dos compuestos con mecanismos de acción altamente caracterizados, el Nocodazol y el Paclitaxel, los cuales ejercen efectos opuestos en la estabilidad de los microtúbulos. La inhibición reversible de la polimerización de los microtúbulos no resultó en una inhibición significativa de los niveles de expresión de la NP del JUNV. Sin embargo, el arresto del estado dinámico de los microtúbulos con Paclitaxel, interfirió con la expresión de la NP del JUNV. El tratamiento de las células Vero con Paclitaxel llevo a la formación característica de arreglos paralelos de tubulina, debidos a la polimerización aumentada y el bloqueo de la despolimerización de los microtúbulos. Nuestras observaciones demostraron que el nivel de la expresión de la NP del JUNV disminuyó en células con la dinámica de los microtúbulos alterada, indicando que durante la invasión a la célula el virus haría uso de las propiedades mecánicas intrínsecas de estas fibras. Esto concuerda con los estudios realizados en otros virus, que habiendo manipulado su camino utilizando actina cortical dentro de vesículas o por fusión directa con la membrana, los virus como los endosomas parecen cambiar de moverse sobre actina a moverse sobre microtúbulos para alcanzar el centro de la célula. Esto podría ser logrado por la unión del virus o de la vesícula a miosina y dineína simultanea o secuencialmente, permitiendo que el virus pase de una vía a la otra, una vez que se encuentra cerca de los microtúbulos (Radtko y col., 2006). Hasta el momento ninguna de estas proteínas motoras ha sido asociada con la internalización del JUNV o alguno de sus pasos del ciclo de replicación, como tampoco había sido caracterizada la necesidad de la integridad de la red de tubulina en eventos tempranos del ciclo de replicación del JUNV o cualquier miembro de la familia Arenaviridae.

Con el fin de confirmar que los pasos iniciales del ciclo de replicación viral estaban siendo inhibidos al desorganizar el citoesqueleto celular, se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real. Estos experimentos demostraron una disminución del ARN que representa al fragmento S del RNA del JUNV al tratar a las células con Latrunculina A o Paclitaxel, e infectarlas en presencia de concentraciones adecuadas de los mismos. Estos resultados nos indican que un paso temprano, previo a la replicación del virus, se ve inhibido en presencia de estos compuestos. Se descartó la posibilidad de que la replicación o transcripción pueda verse afectada por estos compuestos, ya que el citoesqueleto puede verse involucrado de manera directa con la maquinaria de replicación viral. Este es el caso del VSV y el virus Sendai, que requieren de los microtúbulos para su replicación eficiente *in vitro*, mientras que el virus parainfluenza tipo 3 y el RSV requieren de la actina para su replicación *in vitro* (Moyer y col., 1986; Burke y col., 1998; De y col., 1991). Para estudiar esta posibilidad, fue evaluada la habilidad del JUNV para replicar y transcribir su genoma eficientemente en presencia de los inhibidores, cuando estos fueron agregados en el momento de la replicación. Los ensayos cuantitativos realizados demostraron que los niveles de ARN del JUNV en células infectadas no variaron en presencia de los compuestos. Por este motivo se determinó que la entrada del virus a la célula es la etapa del ciclo de replicación afectada por estos compuestos en estas condiciones. Además, nuestros resultados sugirieron que la integridad del citoesqueleto no sería esencial para organizar el complejo de transcripción/replicación del JUNV en las células, aunque se necesitarían experimentos más concluyentes para asegurarlo.

En síntesis, en esta etapa del trabajo se examinó el rol de los microfilamentos y microtúbulos en las etapas tempranas del ciclo de replicación del JUNV. Para esto se expusieron los cultivos de células Vero a una selección de agentes farmacológicos que afectan específicamente a la estructura o propiedades antes mencionada de los distintos componentes del citoesqueleto. Así se demostró que la despolimerización de los filamentos de actina resulta en una disminución significativa de la entrada del JUNV, mientras que el arresto de la

dinámica de los microfilamentos no interfiere significativamente en este paso. En contraste, la infección temprana con el JUNV es exitosa aún cuando los microtúbulos se hallan desensamblados, mientras que resulta esencial la dinámica de los mismos para su correcta replicación. La naturaleza exacta de las interacciones entre el JUNV y los elementos participantes del citoesqueleto en el proceso de internalización del JUNV todavía no queda completamente definida. Sin embargo los estudios presentados en esta tesis son la base para comenzar a profundizar la interacción entre el JUNV y el citoesqueleto.

En la última etapa de éste trabajo de tesis se investigó la interacción del JUNV o su pseudotipo retroviral llevando la GPC del JUNV, con lectinas de tipo C. Se ha demostrado que la expresión de DC-sign y su homólogo L-sign aumentan la susceptibilidad de las células a ser infectadas con JUNV, y de hecho su expresión es suficiente para conferirle permisibilidad en un cultivo celular no susceptible al virus. La unión de estas lectinas a los patógenos depende de la presencia de cadenas de manosas con unión N u oligosacáridos fucosilados en la glicoproteína de envoltura del patógeno. Como el JUNV presenta una GPC altamente glicosilada se pensó en evaluar la interacción del patógeno con las lectinas de tipo C.

Se ha demostrado que el JUNV puede utilizar DC-sign o L-sign como factores de adhesión, resultando en infecciones productivas de células que expresan estas lectinas en su superficie. Estos resultados in vitro sugieren que estos factores de adhesión podrían ser responsables por el patrón característico de tipos celulares y órganos que son predominantemente infectados en una etapa temprana de la infección, capturando al virus y promoviendo su entrada. EL DC-sign es expresado por células dendríticas (CDs) de la dermis y macrófagos, mientras que el L-sign es expresado en células endoteliales. La interacción está dada por la unión de los dominios de reconocimiento de carbohidratos (DRC) de las lectinas a las manosilaciones con unión N en la GPC del JUNV. Las células 3T3 y CRFK que se encuentran establemente transfectadas con el ADNc para la expresión de DC-sign o L-sign demostraron ser alrededor de 2 órdenes de magnitud más permisivas

que las células control para la infección del JUNV. La especificidad de la interacción con las lectinas fue demostrada bloqueando la infección de las células que expresan las lectinas con Mannan o con anticuerpos monoclonales reactivos tanto contra DC-sign como L-sign.

Las lectinas de tipo C reconocen al patógeno asociado a un arreglo de glicosilaciones que activa las células centinelas del sistema inmune. Sin embargo no está del todo claro como estas moléculas reconocen lo propio de lo patogénico. Para la gp120 de HIV y la glicoproteína del virus Ebola, ha sido demostrado que el procesamiento de sus carbohidratos pueden mostrar distintos patrones dependiendo del tipo de célula huésped humana en la cual fueron producidos, lo cual altera la interacción con las lectinas de tipo C (Simmons y col, 2003). Por lo tanto, la unión a DC-sign o L-sign puede ser distinta en distintas fases de la replicación dentro de un mismo huésped o entre huéspedes cercanos.

Tanto las células 3T3 como las TRVb demostraron ser poco permisivas a la infección por JUNV. Sin embargo, cuando estas son transfectadas con las lectinas de tipo C, ya sea estable o transientemente, o el hTfR1 en el caso de las TRVb, promueven una alta infección del virus. Estos resultados sugieren que tanto la expresión de las lectinas como la del receptor específico conocido para el JUNV (hTfR1) median la infección productiva del JUNV. Sin embargo se observó una infección basal tanto en las células TRVb como las 3T3 salvajes, sugiriendo que por lo menos un grupo de estas células son permisivas a la infección con JUNV. De cualquier forma el hallazgo de factores de adhesión que permitan la entrada e infección productiva, en células poco permisivas a la infección en su forma salvaje, es un avance significativo en el estudio de la biología de los arenavirus del Nuevo Mundo.

Además de DC-sign y L-sign existen otras lectinas presentes en las CDs (Dzionic y col., 2001), así como también en macrófagos, células endoteliales y otros tipos celulares (Figdor y col., 2002). Aunque ha sido demostrado que la expresión de DC-sign o L-sign promueve la unión a las células, y esta unión resulta en una infección productiva, todavía queda por ser determinado si existen otras

proteínas en estas células que puedan facilitar la unión del virus. La molécula DC-sign media la interacción entre las CDs y las células T por unión a la molécula de adhesión intracelular 3 (ICAM3), y además sirve como un factor de unión para HIV. Geijtenbeek y col. (2000), también han demostrado que el DC-sign es responsable en gran parte de la habilidad de las CDs de unirse a HIV-1 y presentarlo a células expresando CD4 y un co-receptor adecuado, lo cual resulta en una infección viral eficiente. El DC-sign es una proteína de membrana tipo II que contiene un dominio de tipo lectina C, y se ha demostrado que las interacciones entre DC-sign y HIV pueden prevenirse por EGTA o mannan. Esto demuestra que DC-sign interactúa con uno o más de los carbohidratos presentes en la glicoproteína de envoltura de HIV-1. En trabajos realizados estudiando distintas cepas de HIV-1, HIV-2 y SIV, se demostró que todas podían interactuar con DC-sign, demostrando que esta lectina actuaría de forma universal para los lentivirus primates (Pöhlmann y col., 2001).

El mecanismo por el cual DC-sign media la transmisión viral aún no está del todo claro. No se conoce todavía si la unión al DC-sign significa que JUNV será transmitido a células positivas para su receptor específico, es decir si la unión a DC-sign media una infección en *trans* o si el mismo será internalizado en las células positivas para lectina, es decir mediante un mecanismo de infección en *cis*. La eficiencia de transmisión del virus puede ser dependiente en parte de las interacciones entre DC-sign y las moléculas como ICAM3 en la superficie de las células positivas para el receptor. En presencia de interacciones célula-célula muy fuertes, como ocurre entre las células T y las CDs, el virus unido a DC-sign en la superficie de una de las células podría ser puesto en gran proximidad con la superficie de la otra célula. Como resultado, la interacción entre la GPC del JUNV y su receptor podría aumentar. Si esta especulación es correcta, entonces podría esperarse que la eficiencia con la cual DC-sign se une al virus sea independiente del tipo celular en el cual esta expresada la lectina, mientras que la habilidad de DC-sign de transmitir el virus sería altamente dependiente de los tipos celulares involucrados y las interacciones que ocurren entre ellos. Otra posibilidad es que

DC-sign sea capaz de incrementar la infección viral alterando la estructura de la proteína de envoltura de una forma que aumente la eficiencia de la interacción con el receptor o induzca un cambio conformacional que haga que la GPC cambie a su forma fusogénica más rápidamente, aumentando la fusión. Estas posibilidades todavía quedan por ser evaluadas para poder entender completamente el mecanismo por el cual DC- y L- sign pueden unirse y participar en el ciclo de replicación viral.

Una vez que el virión fue adsorbido por la lectina podría permanecer asociado a la superficie de la célula o podría ser endocitado. El dominio citoplasmático de DC-sign y L-sign contiene dos motivos capaces de mediar endocitosis y reciclaje en múltiples contextos. Para el caso de HIV-1 ha sido demostrado que permanece asociado en la membrana de la célula por periodos prolongados de tiempo. Aunque trabajos más recientes demuestran que luego de interactuar con DC-sign o L-sign el virión sería internalizado en las células dendríticas y seguiría su camino hacia endosomas de pH ácido. Una vez dentro de los endosomas el virión permanecería en compartimentos aún no completamente caracterizados, pero los mismos le permitirían mantenerse "ocultos" del sistema inmune, hasta llegar a un tejido cuyas células expresen CD4 y allí sería transmitido desde las CDs a las células blanco a través de estructuras llamadas "sinaptosomas infecciosos".

La interacción de JUNV con lectinas como DC- y L-sign presentes en macrófagos, hepatocitos y células endoteliales puede ser consecuencia del ciclo de replicación del virus. L-sign se expresa principalmente en células sinusoidales endoteliales del hígado (LSECs), las cuales forman los vasos que separan el flujo sanguíneo hepático de los hepatocitos. Las LSECs proveen una barrera difusional para los virus pero también están involucradas en el proceso de transcitosis mediada por receptor. Además de regular el transporte, las LSECs son células presentadoras de antígeno que pueden contribuir con la vigilancia inmune junto con los macrófagos residentes que se adhieren a las LSECs. El proceso de transcitosis del virus podría resultar en una eficiente forma de pasar de sangre

circulante a la población de células blanco, pero la identidad de este receptor aún no ha sido descubierta, así como tampoco se ha demostrado para el caso de los arenavirus que ocurra este proceso de transcitosis como en el caso del virus de la hepatitis B (Knolle y Gerken, 2000). Por analogía a la habilidad del DC-sign de mediar la infección en trans para HIV-1 es posible que tanto DC-sign como L-sign promuevan la infección de células adyacentes luego de la transcitosis del virus.

JUNV es uno de los tantos patógenos humanos que interactúan con DC-sign y L-sign. La especificidad de estas interacciones se observó con virus que poseen proteínas de envoltura altamente glicosiladas pero no interactúan con DC-sign ni L-sign (Colmenares y col., 2002). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el JUNV ha alcanzado caminos de glicosilación del huésped que lo llevan a incrementar su interacción con estas lectinas. En conclusión, se ha demostrado que el JUNV interactúa específicamente con DC-sign y L-sign, y que esta interacción está mediada por la GPC. Estos hallazgos muestran la posibilidad de que la interacción del JUNV con estas moléculas en macrófagos, CDs, y células endoteliales tenga importantes consecuencias en la infección con JUNV. Finalmente, el descubrimiento de que DC-sign y su homólogo L-sign incrementen la infección con el JUNV muestra la importancia de investigar interacciones de la GPC con otras proteínas de superficie en una gran variedad de tipos celulares, para determinar si los cambios en la eficiencia de la unión impactan en la infectividad del virus y su tropismo y patogenicidad.

En este trabajo de tesis se han caracterizado los pasos tempranos implicados en la internalización del JUNV así como la interacción del virus con distintos componentes de la célula huésped. El conocimiento de esta relación entre los arenavirus y la célula huésped no solo provee información sobre su mecanismo de replicación básico sino que también ayuda en la búsqueda de nuevas terapias profilácticas y antivirales.

# **BIBLIOGRAFÍA**

---

---

- Abraham J, Kwong JA, Albariño CG, Lu JG, Radoshitzky SR, Salazar-Bravo J, Farzan M, Spiropoulou CF, Choe H. (2009). Host-species transferrin receptor 1 orthologs are cellular receptors for nonpathogenic new world clade B arenaviruses. *PLoS Pathog.* 5(4):e1000358.
- Agnihothram SS, York J, Trahey M, Nunberg JH. (2007). Bitopic membrane topology of the stable signal peptide in the tripartite Junín virus GP-C envelope glycoprotein complex.. *J Virol.* Apr; 81(8):4331-7.
- Albariño, C. G., P. D. Ghiringhelli, et al. (1997). "Molecular characterization of attenuated Junin virus strains." *J Gen Virol* 78 (Pt 7): 1605-10.
- Ambrosio, A. M., D. A. Enria, et al. (1986). "Junin virus isolation from lymphomononuclear cells of patients with Argentine hemorrhagic fever." *Intervirology* 25(2): 97-102.
- Ambrosio AM, Riera LM, Saavedra Mdel C, Sabbattini MS. (2006). Immune response to vaccination against Argentine hemorrhagic Fever in an area where different arenaviruses coexist. *Viral Immunol.* 19(2):196-201.
- Armstrong, C. L. R. (1934). "Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic." *Public Health Republic* 49: 1019-1027.
- Aronson, J. F., N. K. Herzog, et al. (1995). "Tumor necrosis factor and the pathogenesis of Pichinde virus infection in guinea pigs." *Am J Trop Med Hyg* 52(3): 262-9.
- Auperin, D. D., V. Romanowski, et al. (1984). "Sequencing studies of pichinde arenavirus S RNA indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S RNA." *J Virol* 52(3): 897-904.
- Barbieri, M. A., R. L. Roberts, A. Mukhopadhyay, and P. D. Stahl. (1996). Rab5 regulates the dynamics of early endosome fusion. *Biocell* 20:331-338.;
- Baribaud F, Pöhlmann S, Doms RW. (2001). The role of DC-SIGN and DC-SIGNR in HIV and SIV attachment, infection, and transmission. *Virology.* 286(1):1-6. Review.
- Barrera Oro, J. G. Eddy, G. A. (1982) "Characteristics of Candidate live attenuated Junin virus vaccine" IV International Conference on Comparative Virology. Banff, Alberta, Canada. Abstract S4-10.
- Barrera Oro, J. G., Lupton, H. W., Jahrling, P. B. et al. (1988) "Cross protection against Machupo virus with Candid #1 live-attenuated Junin virus vaccine. I. The post-vaccination prechallenge immune response" Second International Conference on Comparative Virology, Mar del Plata, Argentina.
- Barrera Oro, J. G. and K. T. McKee, Jr. (1991). "Toward a vaccine against Argentine hemorrhagic fever." *Bull Pan Am Health Organ* 25(2): 118-26.
- Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med.* 197(5):633-42.

- Bashirova, A. A., T. B. H. Geijtenbeek, G. C. F. van Duijnhoven, S. J. van Vliet, J. B. G. Eilering, M. P. Martin, L. Wu, T. D. Martin, N. Viebig, P. A. Knolle, V. N. KewalRamani, Y. van Kooyk, and M. Carrington. (2001). A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 193:671–678
- Bayer N., Schober D., Huttlinger M., Blaas D., Fuchs R. (2001). "Inhibition of clathrin-dependent endocytosis has multiple effects on human rhinovirus serotype 2 cell entry". *Journal of Biological Chemistry* 276, 3952-3962.
- Benmerah A, Gagnon J, Bègue B, Mégarbané B, Dautry-Varsat A, Cerf-Bensussan N. (1995). The tyrosine kinase substrate eps15 is constitutively associated with the plasma membrane adaptor AP-2. *J Cell Biol.* Dec; 131(6 Pt 2):1831-8.
- Benmerah A, Bègue B, Dautry-Varsat A, Cerf-Bensussan N. (1996). The ear of alpha-adaptin interacts with the COOH-terminal domain of the Eps 15 protein. *J Biol Chem.* May 17; 271(20):12111-6.
- Benmerah A., Lamaze C., Begue B., Schmid S.L., Dautry-Varsat A., Cerf-Bensussan N. (1998). "AP-2/Eps15 interaction is required for receptor mediated endocytosis". *Journal of Cell Biology* 140, 1055-1062.
- Bergold G. H., Gonzalez Marquez L.A., y col. (1969). "Structure of nine arboviruses". *J Gen Virol* 5(1): 135-40.
- Borrow P., Oldstone M.B. (1994). "Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells". *Virology* 198(1):1-9.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* 349(6305):117-27. Review.
- Bowen, M. D., Peters, C. J. & Nichol, S. T. (1996). The phylogeny of New World (Tacaribe complex) arenaviruses. *Virology* 219, 285-90.
- Brodsky F.M., Chen C.Y., Knuehl C., Towler M.C., Wakeham D.E. (2001). "Biological basket weaving: formation and function of clathrin coated vesicles". *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17, 517-568.
- Bubb, M., Senderowicz A., Sausville E., Duncan K., Korn E. (1994). Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J. Biol. Chem.* 269:14869–14871.
- Bucci, C., P. Thomsen, P. Nicoziani, J. McCarthy, and B. van Deurs. (2000). Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol. Biol. Cell* 11:467–480
- 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.

- Buchmeier M.J., Lewicki H.A., Tomori O., Oldstone M.B., (1981). Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis and pichinde viruses: generation, characterization, and cross-reactivity with other arenaviruses. *Virology*. Aug; 113(1):73-85.
- Buchmeier, M. J., P. J. Southern, et al. (1987). "Site-specific antibodies define a cleavage site conserved among arenavirus GP-C glycoproteins." *J Virol* 61(4): 982-5.
- Buchmeier MJ. Arenaviruses: protein structure and function. (2002). *Curr Top Microbiol Immunol.*; 262:159-73. Review.
- Burke, E., Dupuy, L., Wall, C., Barik, S. (1998). Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus. *Virology* 252 (1), 137-148.
- Burns J.W., Buchmeier M.J. (1991). "Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus". *Virology* 183(2): 620-9.
- Cambi A, Koopman M, Figdor CG. (2005). How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol.* 7(4):481-8. Review.
- Candurra N.A., Maskin L., Damonte E.B. (1996). "Inhibition of arenavirus multiplication in vitro by phenothiazines". *Antiviral research* 31, 149-58.
- Candurra N.A., Lago M.J., Maskin L, Damonte E.B. (1999). "Involvement of the cytoskeleton in Junin virus multiplication". *Journal of General Virology* 80, (Pt 1), 147-56.
- Cao, W., Henry, M.D., Borrow P., Yamada H., Elder J.H., Ravkov E.V., Nichol S.T., Compans R.W., Campbell K.P., Oldstone M.B. (1998). Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science*. Dec 11; 282(5396):2079-81.
- Castilla V., Mersich S.E., y Damonte EB. (1991). "Lysosomotropic compounds inhibiting the multiplication of junin virus". *Rev Argent Microbiol* 23(2): 86-9.
- 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.
- Castilla V & Mersich SE. (1996). Low-pH-induced fusion of Vero cells infected with Junin virus. *Arch Virol.* 141 (7):1307-17.
- Clegg JCS, B. M., Buchmeier MJ, Gonzalez J-P, Peters CJ, Rico-Hesse R, Romanowski V (2000). "Family Arenaviridae. In: Regenmortel MHV van, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (eds)." *Virus Taxonomy*. (Seventh report of International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic, Orlando.)
- Clegg J (2002). "Molecular Phylogeny of the Arenavirus". *Curr Top Microbiol Immunol* 263, 1-24.
- Colmenares M, Puig-Kröger A, Pello OM, Corbí AL, Rivas L. (2002). Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin

- (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania amastigotes*. *J Biol Chem*. Sep 27;277(39):36766-9.
- Compans R. (1993). "Arenavirus ultrastructure and morphogenesis". In the *Arenaviridae*, Salvato (eds). Plenum Press, New York, pp 51-83.
  - Conner, S. D. & Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44.
  - Contigiani M.S., Sabattini M.S. (1977). "Virulencia diferencial de cepas de virus Junín por marcadores biológicos en ratones y cobayos". *Medicina (Bs.As.)* 37 (1977) 244-251.
  - Cook TA, Urrutia R, McNiven MA. (1994). Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(2):644-8.
  - Cordo S.M., Candurra N.A. (2003). "Intermediate filament integrity is required for Junin virus multiplication". *Virus Research* 97: 47-55.
  - Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, Andino R, Cameron CE. (2000) The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med*. Dec;6(12):1375-9.
  - Crotty S, Cameron CE, Andino R. (2001). RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 5;98(12):6895-900.
  - Curtis, B. M., S. Scharnowske, and A. J. Watson. (1992). Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8356-8360.
  - Damke H, Baba T, Warnock DE, Schmid SL. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol*. 127(4):915-34.
  - Damonte E.B., Mersich S.E., Candurra N.A., Coto C.E. (1986). "Cross reactivity between Junin and Tacaribe viruses as determined by neutralization test and immunoprecipitation". *Med. Microbiol. Inmunol.*, 175, 85-88.
  - De B.P., Lesoon, A., Banerjee, A.K. (1991). Human parainfluenza virus type 3 transcription in Vitro: role of cellular actin in mRNA synthesis. *J. Virol*. 65 (6), 3268-3275
  - Di Simone, C., M. A. Zandonatti, Buhcmeier M.J. (1994). "Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike." *Virology* 198(2): 455-65.
  - Downs, W. G., Anderson, C. R., Spence, L., Aitken, T. H. G. & Greenhal, A. G. (1963) "Tacaribe virus, a new agent isolated from *Artibeus* bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies" *Am J Trop Med Hyg*. 12, 640.
  - Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Günther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen

- capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med.* 194(12):1823-34.
- Eash S. & Atwood W.j. (2005). Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *J. Virol.* 79, 11734-11741.
  - Eddy GA, Wagner FS, Scott SK, Mahlandt BJ. (1975). Protection of monkeys against Machupo virus by the passive administration of Bolivian haemorrhagic fever immunoglobulin (human origin). *Bull World Health Organ.*; 52(4-6):723-7.
  - Ehrlich, M., Boll, W., Van Oijen, A., Hariharan, R., Chandran, K., Nibert, M. L. & Kirchhausen, T. (2004). Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* 118, 591-605.
  - Eichler R, Lenz O, Strecker T, Eickmann M, Klenk HD, Garten W. (2003). Identification of Lassa virus glycoprotein signal peptide as a trans-acting maturation factor. *EMBO Rep.* Nov;4(11):1084-8.
  - Ellenberg, P., M. Edreira, Lozano M, Scolaro L (2002). "Synthesis and expression of viral antigens in Vero cells persistently infected with Junin virus." *Arch Virol* 147(8): 1543-57.
  - Enria DA, Maiztegui JI. (1994). Antiviral treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* Jan;23(1):23-31.
  - Feng Y, Press B, Wandinger-Ness A. (1995). Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol.* 131(6 Pt 1):1435-52.
  - Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol.* Feb;2(2):77-84. Review.
  - Franze-Fernandez M.T., Zetina C., Lapalucci s., Lucero M.A., Boissou C., Lopez R., Rey O., Daheli M., Cohen G.N., Zakin M.M. (1987). "Molecular structure and early events in the replication of Tacaribe arenavirus S RNA". *Virus res.* 7, 309-24.
  - Fuller-Pace, F. V. and P. J. Southern (1989). "Detection of virus-specific RNA-dependent RNA polymerase activity in extracts from cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus: in vitro synthesis of full-length viral RNA species." *J Virol* 63(5): 1938-44.
  - Garcia, J., Calderon, G., Sabattini, M. & al., e. (1996). "Infección por virus Junín (VJ) de *Calomys musculinus* (Cm) en áreas con diferente situación epidemiológica para la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA)" *Medicina* (B Aires). 56, 624.
  - Garcia, C. C., B. N. Brousse, García CC, Brousse BN, Carlucci MJ, Moglioni AG, Martins Alho M, Moltrasio GY, D'Accorso NB, Damonte EB. (2003). "Inhibitory effect of thiosemicarbazone derivatives on Junin virus replication in vitro." *Antivir Chem Chemother* 14(2): 99-105.
  - 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.

- Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk, and C. G. Figdor. (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575-585
- Geisbert TW, Jahrling PB. (2004). Exotic emerging viral diseases: progress and challenges. *Nat Med*. Dec;10(12 Suppl):S110-21. Review.
- Ghiringhelli, P. D., C. G. Albarino, et al. (1997). "The glycoprotein precursor gene of the attenuated Junin virus vaccine strain (Candid #1)." *Am J Trop Med Hyg* 56(2): 216-25.
- Gold E.S., Underhill D.M., Morrisette N.S., Guo J., McNiven M.A., Aderem A. (1999). "Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages". *Journal of Experimental Medicine* 190, 1849-1856.
- Goswami BB, Borek E, Sharma OK, Fujitaki J, Smith RA. (1979). The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits capping of mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 13;89(3):830-6.
- Gray NW, Fourgeaud L, Huang B, Chen J, Cao H, Oswald BJ, Hémar A, McNiven MA. (2003). Dynamin 3 is a component of the postsynapse, where it interacts with mGluR5 and Homer. (*Curr Biol*. 13(6):510-5.
- Guiducci C, Ott G, Chan JH, Damon E, Calacsan C, Matray T, Lee KD, Coffman RL, Barrat FJ. (2006). Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J Exp Med*. 7;203(8):1999-2008.
- Hamel E., (1996). Antimitotic natural products and their interactions with tubulin. *Med Res Rev Mar* ;16(2):207-31.
- Hansen S.H., Sandvig K, van Deurs B. (1993). Clathrin and HA2 adaptors: effects on potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification". *Journal of Cell Biology* 121, 61-72.
- Heller, M. V., Marta, R. F., Sturk, A., Maiztegui, J. I., Hack, C. E., Cate, J. W. & Molinas, F. C. (1995) "Early markers of blood coagulation and fibrinolysis activation in Argentine hemorrhagic fever" *Thromb Haemost*. 73, 368-73.
- Henley J.R., Krueger E.W.A., Oswald B.J., McNiven M.A. (1998). "Dynamin-mediated internalization of caveolae". *Journal of Cell Biology* 141, 85-99.
- Heuser J.E., Anderson R.G. (1989). "Hypertonic media inhibits receptor mediated endocytosis by blocking clathrin coated pit formation". *Journal of Cell Biology* 108, 389-400.
- Hill V.M., Harmon S.A., Summers D.F. (1986). "Stimulation of vesicular stomatitis virus in vitro RNA synthesis by microtubule associated proteins". *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 83: 5410-5415.
- Howard, C. R. (1986) "Arenaviruses" In: *Perspectives in medical virology*. Vol 2. Amsterdam: Elsevier, 1986.

- Howard, C. R. (1993). "Antigenic diversity among the arenaviruses." In: Salvato MS (ed) *The Arenaviridae*. Plenum, New York.
- Jahrling, P. B., Trotter, R. W., Barrera Oro, J. G. & al., e. (1988) "Cross-protection against Machupo virus with Candid #1 Junin vaccine: III, post-challenge clinical findings". Second International Conference on the Impact of Viral Diseases on the Development of Latin American Countries and the Caribbean Region, Mar del Plata, Argentina. Abstract PE3.
- Johnson, K. M., Webb, P. A. & Justines, G. (1973) "Biology of Tacaribe-complex viruses" In *Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenaviruses* (F. Lehmann-Grube, ed). Springer-Verlag, Vienna, pp 241-258.
- Jones S.M., Howel K.E., Henley J.R., Cao H., McNiven M.A. (1998). "Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-golgi network". *Science* 279, 573-577.
- Jordens I, Marsman M, Kuijl C, Neefjes J. (2005). Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic*. 6(12):1070-7. Review.
- Kenyon R.H., McKee K.T., Jr., y col (1992). "Aerosol infection of rhesus macaques with Junin virus" *Intervirology* 33(1): 23-31.
- Knolle PA & Gerken G. (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev*. Apr;174:21-34. Review.
- Lamaze C., Dujancourt A., Baba T., Lo C., Benmerah A., Dautry-Varsat A. (2001). "Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway". *Molecular cell* 7, 661-671.
- Lascano E.F., Berria M.I. (1971). "Electron microscopy of the Junin virus in primary rabbit and hamster kidney cultures". *Medicina (B Aires)*. 31, 1-5.
- Lascano E.F., Berria M.I. (1974). "Ultrastructure of Junin virus in mouse whole brain and mouse brain tissue cultures" *J Virol*. 14, 965-74.
- Lee, K. J., I. S. Novella, et al. (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(8): 3470-7.
- Lehmann-Grube, F. (1972). "Persistent infection of the mouse with the virus of lymphocytic choriomeningitis." *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 6: 8-21.
- Lehmann-Grube, F. (1984). "Portraits of viruses: arenaviruses." *Intervirology* 22(3): 121-45.
- Liebl, D., Difato, F., Hornikova, L., Mannova, P., Stokrova, J. & Forstova, J. (2006). Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes. *J Virol* 80, 4610-22.
- Liu, C. T., P. B. Jahrling, et al. (1986). "Evidence for the involvement of sulfidopeptide leukotrienes in the pathogenesis of Pichinde virus infection in strain 13 guinea pigs." *Prostaglandins Leukot Med* 24(2-3): 129-38.

- Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Amara A. (2007). The C type lectins DC-SIGN and L-SIGN: receptors for viral glycoproteins. *Methods Mol Biol* 379:51-68. Review.
- Lupton, H. W., Jahrling, P. B., Barrera Oro, J. G. & al., e. (1988) "Cross-protection against Machupo virus with Candid #1 Junin vaccine: II, post-challenge virological and immunological findings" Second International Conference on the Impact of Viral Diseases on the Development of Latin American Countries and the Caribbean Region, Mar del Plata, Argentina. Abstract PE2.
- Madshus I.H., Sandvig K., Olsnes S., van Deurs B. (1987). "Effect of reduced endocytosis induced by hypotonic shock and potassium depletion on the infection of Hep 2 cells by picornavirus". *Journal of Cell Physiology* 131, 14-22.
- Magee T & Newman C. (1992). The role of lipid anchors for small G proteins in membrane trafficking. *Trends Cell Biol.* Nov;2(11):318-23.
- Maiztegui J. I. (1975). "Clinical and epidemiological patterns of Argentine hemorrhagic fever". *Bull World Health Organ* 52(4-6): 567-75.
- 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.
- Manfredi, J., Parness J., Horwitz S. B., (1982). Taxol binds to cellular microtubules. *J. Cell Biol.* 94:688-696.
- Marsh M., Helenius A. (1980). "Adsorptive endocytosis of Semliki Forest virus". *Journal of Molecular Biology* 142, 439-454.
- Marsh M., Bron R. (1997). "SFV infection in CHO cells: cell-type specific restrictions to productive virus entry at the cell surface". *Journal of Cell Science* 110, 95-103.
- Marsh M., McMahon H.T. (1999). "The structural era of endocytosis". *Science* 285, 215-220.
- Martinez M.G., Cordo S.M., Candurra N.A., (2007). Characterization of Junin arenavirus cell entry..*J Gen Virol.* Jun; 88(Pt 6):1776-84.
- Martinez Segovia Z. M., De Mitri M.I. (1977). "Junin virus structural proteins". *J Virol* 21(2): 579-83.
- Matlin K.S., Regio H., Helenius A., Simons K. (1981). "Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line". *Journal of Cell Biology* 91, 601-613.
- Matlin K.S., Regio H., Helenius A., Simons K. (1982). "Pathway of vesicular stomatitis virus leading to infection". *Journal of Molecular Biology* 156, 609-631.
- Maxfield FR & McGraw TE. Endocytic recycling. (2004) *Nat Rev Mol Cell Biol.* 121-32. Review.

- McCormick JB, King IJ, Webb PA, Scribner CL, Craven RB, Johnson KM, Elliott LH, Belmont-Williams R. (1986). Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N Engl J Med.* Jan 2; 314(1):20-6.
- McGraw TE, Greenfield L, Maxfield FR. (1987). Functional expression of the human transferrin receptor cDNA in Chinese hamster ovary cells deficient in endogenous transferrin receptor. *J Cell Biol.* Jul;105(1):207-14.
- McKee, K. T., Jr., B. G. Mahlandt, et al. (1985). "Experimental Argentine hemorrhagic fever in rhesus macaques: viral strain-dependent clinical response." *J Infect Dis* 152(1): 218-21.
- McKee KT Jr, Huggins JW, Trahan CJ, Mahlandt BG. (1988). Ribavirin prophylaxis and therapy for experimental argentine hemorrhagic fever. *Antimicrob Agents Chemother.* Sep;32(9):1304-9.
- Méresse S, Gorvel JP, Chavrier P. The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. (1995). *J Cell Sci.* 108 ( Pt 11):3349-58.
- Mersich S.E., Castilla V., Damonte EB. (1988). "Lectin affinity of Junin virus glycoproteins". *Ann Inst Pasteur Virol* 139(3): 277-83.
- Mettler, N., Casals, J. & Shope, R. (1963) "Study of antigenic relationship between Junín virus, the etiological agent of Argentine hemorahagic fever, and other arthropode borne viruses" *Am J of Trop Med Hyg.* 12, 647-652.
- Mills, J. N., B. A. Ellis, et al. (1991). "Junin virus activity in rodents from endemic and nonendemic loci in central Argentina." *Am J Trop Med Hyg* 44(6): 589-97.
- Mills, J. N., Ellis, B. A., McKee, K. T., Jr., Calderon, G. E., Maiztegui, J. I., Nelson, G. O., Ksiazek, T. G., Peters, C. J. & Childs, J. E. (1992) A longitudinal study of Junin virus activity in the rodent reservoir of Argentine hemorrhagic fever, *Am J Trop Med Hyg.* 47, 749-63.
- Molinas F.C., B.M. d., Maiztegui J.I. (1989) "Hemostasis and the complement system in Argentine Hemorrhagic Fever". *Rev Infect Dis* 11(suppl 4): 762-67.
- Morton, W., Ayscough K., McLaughlin P. (2000). Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nat. Cell Biol.* 2:376-378.
- Mosmann, T., (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. immunol. Methods* 65, 55-63.
- Moyer S.A., Baker S.C., Lessard J.L. (1986). Tubulin: a factor necessary for the synthesis of both Sendai virus and vesicular stomatitis virus RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug;83(15):5405-9.
- Murphy, F. A., Webb, P. A., Johnson, K. M., Whitfield, S. G. & Chappell, W. A. (1970). Arenoviruses in Vero cells: ultrastructural studies. *J Virol* 6, 507-18.
- Nakano, M.Y., Boucke, K., Suomalainen, M., Stidwill, R.P., Greber, U.F. (2000). The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape to the cytosol. *J Virol* 74: 7085-7095.
- Nègre D, Mangeot PE, Duisit G, Blanchard S, Vidalain PO, Leissner P, Winter AJ, Rabourdin-Combe C, Mehtali M, Moullier P, Darlix JL, Cosset FL. (2000).

- Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther.* 7(19):1613-23.
- Nichols, B. (2003). Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci* **116**, 4707-14.
  - Nicoziani P., Vilhardt F., Llorente A., Hilout L., Courtoy P.J., Sandvig K., van deurs B. (2000). "Role for dynamin in late endosomes dynamics and trafficking of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor". *Molecular Biology of the Cell* 11, 481-495.
  - Novick P & Brennwald P. (1993). Friends and family: the role of the Rab GTPases in vesicular traffic. *Cell.* Nov 19;75(4):597-601. Review.
  - Novick, P. & M. Zerial. (1997). The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:496-504; 61.
  - Ohashi M, Miwako I, Nakamura K, Yamamoto A, Murata M, Ohnishi S, Nagayama K. (1999) An arrested late endosome-lysosome intermediate aggregate observed in a Chinese hamster ovary cell mutant isolated by novel three-step screening. *J Cell Sci.* 112 ( Pt 8):1125-38.
  - Orlandi P.A. y Fishman P.H. (1998). "Filipin-dependet inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains". *Jounal of Cell biology* 141, 905-915.
  - Parodi A.S., Greenway D.J., Rugiero HR., Rivero E., Frigero M.J., Mettler W.E., Garzon R., Boxaca M., Guerrero L.B., Nota N.R. (1958). "Sobre la etiología del brote epidémico de Junín". *Día Médico* 30: 2300-2302.
  - Pasian E.L., Fernandez Cobo M., Padula P., De Mitri M.I., Martinez Segovia Z.M. (1983). "Presence of actin on Junin virus". *Comunicaciones Biológicas* 2, 25-30.
  - Pelkmans, L. & Helenius, A. (2003). Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 15, 414-22.
  - Peters, C. J., Jahrling PB (1987). "Experimental studies of arenaviral hemorrhagic fevers." (In: Oldstone MB (ed) *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Vol 134. *Arenaviruses: epidemiology and immunoterapy*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York): pp 5-68.
  - Peters, C. J., C. T. Liu, et al. (1989). "Pathogenesis of viral hemorrhagic fevers: Rift Valley fever and Lassa fever contrasted." *Rev Infect Dis* 11 Suppl 4:S 743-9.
  - Peters, C. J. (1997). "Pathogenesis of viral hemorrhagic fevers." (In: Nathanson N, Ahmed R, Gonzalez-Scarano F, Griffin D, Holmes KV, Murphy FA, Robinson HL (eds) *Viral pathogenesis*. Lippincott-raven, Philadelphia.): pp 779-799.
  - Pfeffer SR. (1992). GTP-binding proteins in intracellular transport. *Trends Cell Biol.* Feb;2(2):41-6.
  - Pfeffer, S. R. (2005). Structural clues to Rab GTPase functional diversity. *J. Biol. Chem.* 280:15485-15488.

- Pöhlmann, S., F. Baribaud, B. Lee, G. J. Leslie, M. D. Sanchez, K. Hiebenthal-Millow, J. Münch, F. Kirchhoff, and R. W. Doms. (2001). DCSIGN interactions with human immunodeficiency virus type 1 and 2 and simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 75:4664–4672
- Quirin, K., B. Eschli, I. Scheu, L. Poort, J. Kartenbeck, and A. Helenius. (2008). Lymphocytic choriomeningitis virus uses a novel endocytic pathway for infectious entry via late endosomes. *Virology* 378:21–33. 42.
- Radtke K., Döhner K., Sodeik B. (2006). Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol.* 2006 Mar;8 (3):387-400. Review.
- 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.* Mar 1;446 (7131):92-6.
- Radoshitzky SR, Kuhn JH, Spiropoulou CF, Albariño CG, Nguyen DP, Salazar-Bravo J, Dorfman T, Lee AS, Wang E, Ross SR, Choe H, Farzan M. (2008). Receptor determinants of zoonotic transmission of New World hemorrhagic fever arenaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(7):2664-9.
- Rauma, T., J. Tuukkanen, J. M. Bergelson, G. Denning, and T. Hautala. (1999). rab5 GTPase regulates adenovirus endocytosis. *J. Virol.* 73:9664–9668
- Rawls, W. E., M. A. Chan, et al. (1981). "Mechanisms of persistence in arenavirus infections: a brief review." *Can J Microbiol* 27(6): 568-74.
- Regan AD, Whittaker GR. (2008). Utilization of DC-SIGN for entry of feline coronaviruses into host cells.. *J Virol.* 82(23):11992-6.
- Ren, M., G. Xu, J. Zeng, C. De Lemos-Chiarandini, M. Adesnik, and D. D. Sabatini. (1998). Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6187–6192.
- Rey O., Canon J., Krogstad P. (1996). " HIV- gag protein associates with f-actin present in microfilaments". *Virology* 220, 530-534.
- Roberts M, Barry S, Woods A, van der Sluijs P, Norman J. (2001). PDGF-regulated rab4-dependent recycling of alphavbeta3 integrin from early endosomes is necessary for cell adhesion and spreading. *Curr Biol.* Sep 18;11(18):1392-402.
- Rojek J.M., Perez M., Kunz S. (2008). Cellular entry of lymphocytic choriomeningitis virus. *Virol.* Feb; 82(3):1505-17.
- Romanowski V, Bishop DH. (1983). The formation of arenaviruses that are genetically diploid. *Virology.* Apr 15;126(1):87-95.
- Rowe WP, Pugh WE, Webb PA, Peters CJ. (1970). Serological relationship of the Tacaribe complex of viruses to lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol.* Mar; 5(3):289-92.

- Rust, M. J., Lakadamyali, M., Zhang, F. & Zhuang, X. (2004). Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat Struct Mol Biol* 11, 567-73.
- Sabbatini M., Gonzales de Rios L., Dias G., Vega V. (1977). "Infección natural y experimental de roedores con virus Junín"
- 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):1-10.
- 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.
- Seaman MN. Endosome protein sorting: motifs and machinery. (2008). *Cell Mol Life Sci. Sep*;65(18):2842-58. Review.
- Shah, W. A., Peng, H. & Carbonetto, S. (2006). Role of non-raft cholesterol in lymphocytic choriomeningitis virus infection via alpha-dystroglycan. *J Gen Virol* 87, 673-8.
- Siczekarski, S. B. & Whittaker, G. R. (2002a). Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol* 83, 1535-45.
- Simmons G, Reeves JD, Grogan CC, Vandenberghe LH, Baribaud F, Whitbeck JC, Burke E, Buchmeier MJ, Soilleux EJ, Riley JL, Doms RW, Bates P, Pöhlmann S. (2003). DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology*. 305(1):115-23.
- Southern P.J., Singh M.K., y col. (1987). "Molecular characterization of the genomic S RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus". *Virology* 157(1): 145-55.
- Sodeik, B., (2000). Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol.* 8 (10), 465-472.
- Spector, I., Braet F., Shochet N., Rubb M. (1999). New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microsc. Res. Technique* 47:18-37.
- Speir, R. W., Wood, O., Liebhaber, H. & Buckley, S. M. (1970) "Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. IV. Electron microscopy of Vero cell cultures infected with Lassa virus" *Am J Trop Med Hyg.* 19, 692-4.
- Spiropoulou, C. F., Kunz, S., Rollin, P. E., Campbell, K. P., Oldstone, M. B. (2002). New World arenavirus clade C, but not clade A and B viruses, utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor. *J Virol* 76, 5140-6.
- Stenmark H, Parton RG, Steele-Mortimer O, Lütcke A, Gruenberg J, Zerial M. (1994). Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* 13(6):1287-96.

- Stossel, T.P., (1989). From signal to pseudopod. How cells control cytoplasmatic actin assembly. *J. Biol. Chem.* 264: 18261-18264.
- 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" *J Virol.* 77, 10700-5.
- Streeter DG, Simon LN, Robins RK, Miller JP. (1974). The phosphorylation of ribavirin by deoxyadenosine kinase from rat liver. Differentiation between adenosine and deoxyadenosine kinase. *Biochemistry.* Oct 22;13(22):4543-9.
- Strom M, Vollmer P, Tan TJ, Gallwitz D. (1993). A yeast GTPase-activating protein that interacts specifically with a member of the Ypt/Rab family. *Nature.* Feb 25;361(6414):736-9.
- Tebar F, Sorkina T, Sorkin A, Ericsson M, Kirchhausen T. (1996). Eps15 is a component of clathrin-coated pits and vesicles and is located at the rim of coated pits. *J Biol Chem.* Nov 15;271(46):28727-30.
- Tkaczewski, L. Z. & Boxaca, M. C. (1970) "Cambios citoquímicos en células Vero infectadas con alguno virus del grupo Tacaribe" *Medicina (B Aires).* 30, 28-37
- Tilney R.G. (1983). "Interactions between actin filaments and membrane give spatial organization cell". In *Modern Cell Biology. Vol2: Spatial organization of Eukaryotic Cells.* McIntosh J.R., Satir B.H. (Eds.)pp 163-199.
- Tortorici, M. A., Ghiringhelli, P. D., Lozano, M. E., Albarino, C. G. & Romanowski, V. (2001) "Zinc-binding properties of Junin virus nucleocapsid protein" *J Gen Virol.* 82, 121-8.
- Traub, E. (1935). "A filterable virus recovers from withe mice." *Science* 81: 198-299.
- Ullrich O, Stenmark H, Alexandrov K, Huber LA, Kaibuchi K, Sasaki T, Takai Y, Zerial M. (1993). Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins.. *J Biol Chem.* Aug 25;268(24):18143-50
- Ullrich O, Horiuchi H, Bucci C, Zerial M. (1994). Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature.* Mar 10;368(6467):157-60
- Urbe, S., L. A. Huber, M. Zerial, S. A. Tooze, and R. G. Parton. (1993). Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells. *FEBS Lett.* 334:175-182
- Van Delft S, Schumacher C, Hage W, Verkleij AJ, van Bergen en Henegouwen PM. (1997). Association and colocalization of Eps15 with adaptor protein-2 and clathrin. *J Cell Biol.* Feb 24;136(4):811-21. Erratum in: *J Cell Biol* 1997 Apr 7;137(1):259.
- Van der Blik AM, Redelmeier TE, Damke H, Tisdale EJ, Meyerowitz EM, Schmid SL. (1993). Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol.* 122(3):553-63.

- Wang, L. H., Rothberg, K. G. & Anderson, R. G. (1993). Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* 123, 1107-17.
- Weissenbacher, M. C., M. A. Calello, et al. (1983). "Junin virus infection in genetically athymic mice." *Intervirology* 19(1): 1-5.
- Weissenbacher MC, Avila MM, Calello MA, Merani MS, McCormick JB, Rodriguez M. Effect of ribavirin and immune serum on Junin virus-infected primates. (1986). *Med Microbiol Immunol.* 175(2-3):183-6.
- Whittaker G.R., Helenius A. (1998). "Nuclear import and export of viruses and virus genomes". *Virology* 246, 1-23. Borrow, P., Oldstone, M. B., 1992. Characterization of lymphocytic choriomeningitis virus-binding protein(s): a candidate cellular receptor for the virus. *J Virol* 66, 7270-81.
- Wilcke, M., L. Johannes, T. Galli, V. Mayau, B. Goud, and J. Salamero.(2000). Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* 151:1207–1220.
- Wong WT, Schumacher C, Salcini AE, Romano A, Castagnino P, Pelicci PG, Di Fiore PP. (1995). A protein-binding domain, EH, identified in the receptor tyrosine kinase substrate Eps15 and conserved in evolution..*Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 10;92(21):9530-4
- Wool-Lewis RJ, Bates P. (1998).Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *J Virol.* 72 (4): 3155-60.
- Yarar D., Waterman-Storer C.M., Schmid S.L. (2005). A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell.* Feb;16(2): 964-75.
- Yonezawa, A., Cavrois, M., and Greene, W.C. (2005). Studies of ebola virus glycoprotein-mediated entry and fusion by using pseudotyped human immunodeficiency virus type 1 virions: involvement of cytoskeletal proteins and enhancement by tumor necrosis factor alpha. *J Virol* 79:918–926.
- 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.
- York J, Nunberg JH. (2007). A novel zinc-binding domain is essential for formation of the functional Junin virus envelope glycoprotein complex. *J Virol.* Dec;81(24):13385-91.
- York J, Dai D, Amberg SM, Nunberg JH. (2008). pH-induced activation of arenavirus membrane fusion is antagonized by small-molecule inhibitors. *J Virol.* Nov;82(21):10932-9.

- Zerial, M., and H. McBride. (2001). Rab proteins as membrane organizers. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2:107–117.)
- Zuk PA, Elferink LA. (1999). Rab15 mediates an early endocytic event in Chinese hamster ovary cells.. J Biol Chem. 274(32):22303-12.