

Tesis Doctoral

# Interacciones de los Arenavirus Tacaribe y Junín con sus células hospedadoras en las etapas tempranas de la infección

Suyay Roldán, Julieta

2015-05-26

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:

Suyay Roldán, Julieta. (2015-05-26). Interacciones de los Arenavirus Tacaribe y Junín con sus células hospedadoras en las etapas tempranas de la infección. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Suyay Roldán, Julieta. "Interacciones de los Arenavirus Tacaribe y Junín con sus células hospedadoras en las etapas tempranas de la infección". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-05-26.

**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

## **“Interacciones de los Arenavirus Tacaribe y Junín con sus células hospedadoras en las etapas tempranas de la infección”**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

**Lic. Julieta Suyay Roldán**

**Directora de tesis: Nélide A. Candurra**  
**Consejera de estudios: Viviana Castilla**

**Lugar de trabajo: IQUIBICEN, Departamento de Química  
Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA**

**Buenos Aires, 26 de Marzo de 2015**

## Interacciones de los arenavirus Tacaribe y Junín con sus células hospedadoras en las etapas tempranas de la infección

Los arenavirus son virus envueltos con genoma ARN segmentado cuyo ciclo de replicación tiene polaridad bisentido. 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 en el citoplasma se expresan 5 proteínas estructurales. La proteína mayoritaria asociada a la nucleocápside se denomina NP. A partir de un único precursor glicoproteico (GPC), se obtienen dos glicoproteínas virales denominadas GP1 y GP2 y el péptido señal (SP), los cuales conforman las estructuras claviformes encontradas en la envoltura 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 de los arenavirus Tacaribe (TCRV) y Junín (JUNV). Debido a que TCRV no utiliza el receptor de transferrina humano (hTfR) para entrar en las células, se utilizó un modelo de células que expresan diferencialmente el TfR y se analizaron las vías de entrada utilizadas por el virus. Para ello, se utilizaron inhibidores farmacológicos de las diferentes vías endocíticas (dependiente de clatrina, colesterol, dinamina, acidificación endosomal y macropinocitosis) y se confirmaron los resultados obtenidos utilizando construcciones dominantes negativas unidas a GFP de proteínas involucradas en cada una de ellas. Estos experimentos permitieron caracterizar que en aquellas líneas que no expresan el hTfR, la vía endocítica principal de entrada es la dependiente de clatrina, dinamina y acidificación endosomal mientras que en las células que si expresan dicho receptor, la vía principal es la macropinocitosis.

La endocitosis del virus mediada por la unión a un receptor celular puede desencadenar diferentes señales intracelulares para beneficiarse de procesos celulares. En este trabajo estudiamos la participación de la autofagia durante la infección con JUNV en un modelo de células humanas. Se analizó la distribución de la proteína LC3 sobreexpresada (marcador de la vía de la autofagia), se utilizaron inhibidores farmacológicos y células con el gen Atg 5 mutado (esencial para la activación de la vía convencional de la autofagia). Los resultados obtenidos permitieron determinar que esta vía se activa desde el inicio de la infección y permanece activa hasta 24 hs post-infección.

Los hallazgos presentados en este trabajo no sólo aportan conocimientos básicos sobre los pasos iniciales del ciclo de replicación de estos arenavirus, sino que además permite desarrollar nuevos blancos antivirales contra JUNV.

**Palabras claves:** Arenavirus, endocitosis, receptor de transferrina, autofagia, entrada

---

**Interactions of Tacaribe and Junin arenavirus with their host cells during early stage of infection**

Arenavirus are enveloped viruses with a segmented RNA genome which replication cycle has a bisense polarity. The entry into the target cell depends on a receptor mediated endocytosis and a subsequent fusion pH dependant. Once the nucleocapsid is in the cytoplasm, 5 structural proteins are expressed. The majority nucleocapsid associated protein it is called NP. From one glycoprotein precursor (GPC), two glycoproteins are obtained called GP1 and GP2 and the signal peptide (SP) which they shape the claviforme structures found in the viral envelope.

In this work, interactions virus-host cells were studied, characterizing the roll of different cellular proteins in the early stage of the Tacaribe (TCRV) and Junin (JUNV) Areniavirus multiplication cycle. Since TCRV does not use the human transferrine receptor (hTfR) to enter the cells, a model with a differential expression of the TfR was used and the pathways used by the virus were analyzed. In order to do that, pharmacological inhibitors of the different endocytic pathways (dependent on clathrin, cholesterol, dinamin, endosomal acidification and macropinocytosis) were used and the results obtained were confirmed using dominant negative tagged GFP constructions involved in each one of them. These experiments allowed us to characterize that in those cells that do not express the hTfR, the main endocytic pathway used by TCRV is the one dependent on clathrin, dinamin and endosomal acidification, while in those cells expressing this receptor, the main pathway is de macropinocytosis.

Receptor mediated endocytosis used by the virus can unleash different intracellular signals in order to exploit different cellular processes. In this work we studied the autophagy involvement during the infection in a human cell line model. The distribution of the protein LC3 overexpressed (an autophagic marker) was analyzed. Pharmacological inhibitors of this pathway and Atg 5 gen mutated cells (essential for the conventional autophagy activation) were also used. Results obtained allow us to determine that this pathway is activated from the early steps of infection and remains active up to 24 hs post-infection.

The findings presented in this work not only provides basic knowledge about the initial steps of these arenavirus replication cycles, but also allows to develop new antiviral targets against JUNV.

**Key words:** Arenavirus, endocytosis, transferrine receptor, autophagy, entry

Es mucha la gente que me acompañó en este camino y no hubiese llegado hasta este momento sin la paciencia, el cariño y la tolerancia de ellos. En algunos casos las palabras quedan chicas pero en todos los casos mi agradecimiento es eterno.

En primer lugar quisiera agradecer a la Dra. Nélide Candurra, Nellu, por confiar en mí para llevar a cabo este trabajo, por la paciencia, por tantas enseñanzas y los mates que me esperaban cuando volvía de cultivo. Es muy difícil expresar mi gratitud y voy a extrañar muchísimo trabajar con ella. Para mí es un ejemplo a seguir, como investigadora y como ser humano.

Gracias a todo el laboratorio de virología tanto a los investigadores (Sandra, Cybele, Flavia, Carlitos B., Claudia, Andrea, Elsa, Vivi, Luis, Carlos P., Josefina, Erina y Laura) por el día a día como al hermoso grupo de becarios. Los que todavía están: Fede, Maru, José, Vero, Ema, Luana y especialmente a mi compañera de escritorio y aventuras científicas, Belu, gracias por la ayuda, la compañía, el aguante, los almuerzos y las risas que hacen que de gusto ir a trabajar cada día. Los que alguna vez estuvieron y hoy en día la amistad continúa: Aye, Ceci T. y las que forman parte del "trío galletita", Cexy y Annette; imposible no extrañarlas, gracias por los momentos vividos tanto en el labo como fuera de él. Tengo que incluir en esta sección a mis dos mendocinas favoritas, Lau y Ceci. Gracias a la autofagia conocí a estas personas maravillosas que me ayudaron con consejos tanto científicos como de vida y me acogieron en más de una oportunidad. Estoy segura que esta amistad se va a mantener en el tiempo.

Fue fundamental el apoyo de mi familia a lo largo de mi vida y especialmente durante estos 5 años, a pesar de no entender muy bien qué es lo que estaba haciendo. Quisiera destacar el agradecimiento especial a mi hermanita del alma Mena, fue la que más tuvo que aguantar mis fines de semana trabajando y mis rayes, sobre todo en un momento muy difícil que nos tocó vivir juntas. Gracias por estar SIEMPRE, te quiero con el alma y agradezco a la vida el tenerte siempre a mi lado.

Quiero destacar a los amigos que encontré gracias a esta carrera y hoy en día son un pilar fundamental: Ana, Cyn, Lau, Xime y Juancho; mejor conocidos como los ñoños. La mayoría me acompañó a la distancia pero no por eso estuvieron menos presentes, no sé qué sería de mí sin ustedes, gracias por tanto. Aprovecho para destacar la ayuda con la estadística y por hacerme tía postiza por primera vez a Juancho, la vida me regaló el hermano que siempre quise tener. También quiero

destacar a Xime, mi compañera de viajes irremplazable, siempre buscando nuevas aventuras para vivir juntas. Rama y Flor (también conocidos como Chandler y Mónica), gracias por las juntadas con comida casera para acompañar las series ñoñas y/o películas tan raras que es imposible no pasar una excelente velada.

Por último quiero agradecer a toda la gente del Roffo, especialmente a los que fueron mis directores: Gaby y Made. No hubiera logrado hacer este doctorado sin todo lo que aprendí en los dos años que estuve ahí, gracias por confiar en mí cuando nadie más lo hacía. Gracias también al grupo maravilloso de becarios: Yani, Cata, Denu, Diego, Pao, Jopi, Ova y un agradecimiento especial para mi compañera de escritorio y trabajo Ani, la persona más buena e inteligente que conozco, gracias por el apoyo y la ayuda constante.

A todo ellos y a muchos otros que de manera pasajera me han ayudado en este largo y hermoso camino, GRACIAS TOTALES!

Dedicado a mi padre, mi hermana y especialmente a mi madre,  
ese angelito que me guía y me cuida.

***“Estamos impulsados por la insaciable curiosidad habitual del científico,  
Y nuestro trabajo es un encantador juego.”***

Murray Gell-Mann

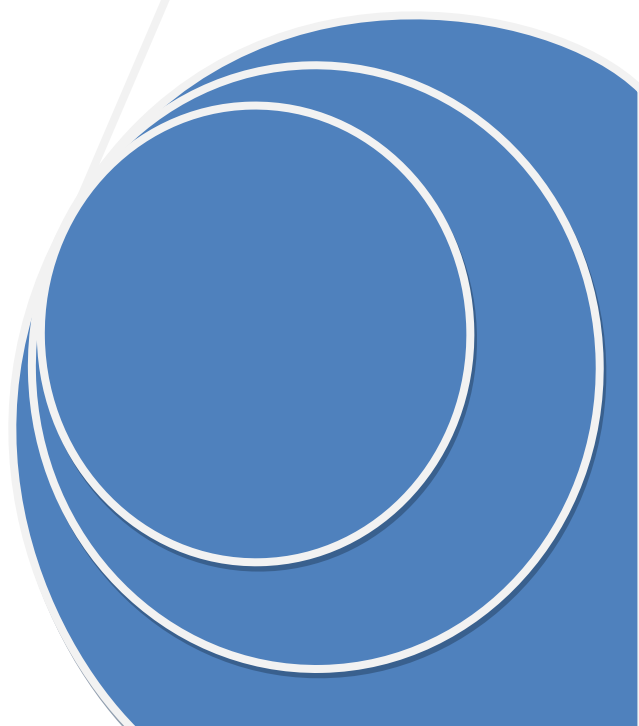


ABREVIATURAS.....	10
INTRODUCCIÓN.....	14
<b>I- LOS ARENAVIRUS</b> .....	15
<b>II- FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA</b> .....	20
<b>III- TRATAMIENTO Y PREVENCION DE LA FHA</b> .....	21
<b>IV- ESTRUCTURA MOLECULAR</b> .....	22
<b>V- CICLO DE REPLICACION</b> .....	23
<b>VI- INTERACCION VIRUS-CELULA</b> .....	28
<b>VII-VIAS DE ENTRADA</b> .....	30
VII.1- <i>La endocitosis como vía de entrada</i> .....	32
VII.2- <i>La importancia de los lípidos en la endocitosis</i> .....	36
<b>VIII- RED ENDOSOMAL Y TRAFICO VESICULAR</b> .....	37
VIII.1- <i>Regulación del tráfico endocítico</i> .....	39
<b>IX- AUTOFAGIA</b> .....	40
IX.1- <i>Biología molecular de la autofagia</i> .....	43
IX.2- <i>Autofagia y virus</i> .....	45
<b>OBJETIVOS</b> .....	49
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	51
<b>1) CULTIVOS CELULARES</b> .....	52
1.1. <i>Línea celular Vero (ATCC CCL 81)</i> .....	52
1.2. <i>Línea CHO-K1 (ATCC CCL 9618)</i> .....	52
1.3. <i>Líneas TRVb y TRVb-1</i> .....	52
1.4. <i>Línea BHK-21 (ATCC CCL-10)</i> .....	53
1.5. <i>Línea A549 (ATCC CL-185)</i> .....	53
1.6. <i>Líneas MEF (ATCC SCRC-1040) y MEF Atg5<sup>-/-</sup></i> .....	53
<b>2) VIRUS</b> .....	53
2.1 <i>Inactivación por luz ultravioleta (UV)</i> .....	54
<b>3) COMPUESTOS UTILIZADOS</b> .....	54
<b>4) REACTIVOS, MARCADORES Y ANTICUERPOS UTILIZADOS</b> .....	55
<b>5) CURVAS DE CRECIMIENTO</b> .....	56
<b>6) ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR: MÉTODO DEL MTS</b> .....	56
<b>7) TITULACIÓN DE LA INFECTIVIDAD VIRAL</b> .....	57
<b>8) ENSAYO DE INHIBICIÓN DE RENDIMIENTO VIRAL</b> .....	58
<b>9) ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS A DISTINTOS TIEMPOS</b> .....	58
<b>10) ENSAYO CON VIRUS INACTIVADO</b> .....	59
<b>11) ENSAYO DE ACTIVIDAD VIRUCIDA</b> .....	59
<b>12) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS</b> .....	59
12.1 <i>Inmunofluorescencia indirecta (IFI)</i> .....	59
12.2 <i>Ensayo de internalización</i> .....	61

<i>12.3 Fluorescencia directa</i> .....	61
<i>12.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y western blot (WB)</i> .....	62
<b>13) <u>TINCIÓN DE CÉLULAS VIVAS CON NARANJA DE ACRIDINA</u></b> .....	<b>63</b>
<b>14) <u>TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS</u></b> .....	<b>64</b>
<b>15) <u>ANÁLISIS DE DATOS</u></b> .....	<b>65</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>66</b>
<b>CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DE ENTRADA DEL VIRUS TACARIBE</b>	<b>67</b>
<b>1) INTERACCIÓN DEL VIRUS CON LAS LÍNEAS CELULARES</b> .....	<b>67</b>
1.1. <i>Detección del receptor de transferrina</i> .....	67
1.2. <i>Virus Tacaribe en las diferentes líneas utilizadas</i> .....	68
1.3. <i>VSV en las diferentes líneas utilizadas</i> .....	69
1.4. <i>Efecto del receptor de transferrina en la entrada del TCRV</i> .....	70
<b>2) PARTICIPACIÓN DEL PH ENDOSOMAL</b> .....	<b>72</b>
<b>3) ROL DE LA ENDOCITOSIS DEPENDIENTE DE CLATRINA</b> .....	<b>76</b>
3.1. <i>Inhibición farmacológica</i> .....	76
3.2. <i>Participación de la proteína celular Eps-15 en la entrada del TCRV</i> .....	79
<b>4) PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA DINAMINA EN LA ENTRADA DE TCRV</b> .....	<b>81</b>
4.1. <i>Inhibición farmacológica</i> .....	81
4.2. <i>Rol de la proteína celular dinamina-II en la entrada del TCRV</i> .....	84
<b>5) ROL DE LA ENDOCITOSIS DEPENDIENTE DE COLESTEROL</b> .....	<b>86</b>
<b>6) ROL DE LA MACROPINOCITOSIS</b> .....	<b>91</b>
6.1. <i>Estudio de la interacción del TCRV con los Filamentos de Actina – Caracterización del sistema</i> .	91
6.2. <i>Efecto de los compuestos sobre el citoesqueleto</i> .....	92
6.3. <i>Estudio de la interacción de TCRV con los Filamentos de Actina – Efecto sobre la producción de partículas infecciosas</i> .....	96
6.4. <i>Estudio de la interacción de TCRV con los Filamentos de Actina – Efecto sobre la expresión de los antígenos virales</i> .....	97
6.5. <i>Inhibición de la macropinocitosis–controles</i> .....	100
6.6. <i>Inhibición de la macropinocitosis–efecto sobre la producción de partículas infecciosas</i> .....	102
6.7. <i>Inhibición de la macropinocitosis – Efecto sobre la expresión de los antígenos virales</i> .....	104
6.8. <i>Inhibición de la macropinocitosis – co-localización de los antígenos virales con el marcador de macropinocitosis</i> .....	106
<b>7) PARTICIPACIÓN DE LOS ENDOSOMAS TEMPRANOS Y TARDÍOS</b> .....	<b>108</b>
<b>CAPITULO II: PARTICIPACION DE LA AUTOFAGIA EN LA INFECCION DEL VIRUS JUNÍN</b> .....	<b>111</b>
<b>1) EFECTO DE LA MODULACIÓN DE LA AUTOFAGIA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS INFECTIVAS</b> .....	<b>111</b>
<b>1) EFECTO DE LA MODULACIÓN DE LA AUTOFAGIA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES</b> .....	<b>113</b>
<b>2) MEDICIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LA AUTOFAGIA - CUANTIFICACIÓN</b> .....	<b>115</b>

3) <i>MEDICIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LA AUTOFAGIA – WESTERN BLOT .....</i>	<i>116</i>
4) <i>CINÉTICA DE LA INFECCIÓN CON EL JUNV Y LA PARTICIPACIÓN DE LA AUTOFAGIA .....</i>	<i>118</i>
5) <i>ROL DEL GEN ATG5 EN LA REPLICACIÓN DEL JUNV.....</i>	<i>119</i>
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>123</b>
<i>CAPÍTULO I: ENTRADA DEL VIRUS TACARIBE .....</i>	<i>124</i>
<i>CAPÍTULO II: ESTUDIO DE LA AUTOFAGIA DURANTE LA INFECCIÓN CON EL VIRUS JUNÍN.....</i>	<i>130</i>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>133</b>

# **Abreviaturas**



3-MA: 3-metiladenina

AM: amiloride

Anti-TfR: anticuerpo contra el receptor de transferrina

ARN: ácido ribonucleico

Atg: genes asociados a autofagia

ATP: adenosina tri-fosfato

BAF A: bafilomicina A1

CA: conacanamicina A

CITO D: citochalasin D

CPZ: clorpromacina

Ctx: toxina colérica

DAC: dansilcadaverina

Din II: dinamina II

DMEM: medio esencial modificado por Dulbecco

DN: dominante negativa

DYN: dynasore

EE: endosomas tempranos

ES: error estándar

FHA: fiebre hemorrágica Argentina

GFP: *green fluorescent protein*

GP1/GP2: glicoproteína de envoltura 1 y 2 respectivamente

GPC: precursor glicoprotéico

hs: horas

hTfR1: receptor de transferrina tipo 1 humano

IFI: inmunofluorescencia indirecta

Ji: virus Junín inactivado

JUNV: virus Junín

LASV: virus de Lassa

LAT A: latrunculina A

LC3: *microtubule-associated protein 1 light chain 3*

LCMV: virus de la coriomningitis linfocitaria

LE: endosomas tardíos

m.i.: multiplicidad de infección

mARN: ácido ribonucléico mensajero

ME: microscopía electrónica de transmisión

MEM: medio mínimo esencial

m.i.: mutiplicidad de infección

min: minutos

MM: medio de mantenimiento

mTOR: *mammalian target of rapamycin*

MTS: 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxyfenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium

M $\beta$ CD: metil- $\beta$ -cilcodextrina

N: nucleoproteína

NT: nistatina

p.i.: post infección

PI3K: quinasa de fosfoinositol 3

RAPA: rapamicina

SFB: suero fetal bovino

Sn: sobrenadantes

SSP: péptido señal asociado

ST: suero de ternera

Ti: virus Tacaribe inactivado

TCRV: virus Tacaribe

Tfn: tansferrina

UFP: unidad formadora de placas

vRNP: ribonucleoproteína viral

VSV: virus de la estomatitis vesicular

WT: wortmanina

wt: *wild type* o tipo salvaje

# **Introducción**





### I- LOS ARENAVIRUS

La familia *Arenaviridae* está constituida por virus normalmente asociados a enfermedades transmitidas por roedores. Las partículas virales son esféricas o pleiomórficas y de un diámetro entre 60-130 nm. Están envueltas con una membrana lipídica, en cuyo interior se encuentra el genoma del virus formado por dos nucleocápsides helicoidales que contienen las moléculas de ARN de cadena simple y polaridad bisentido, L (*large*) y S (*small*). Al observar las partículas virales con microscopía electrónica se observa que las mismas poseen un aspecto arenoso debido a los ribosomas provenientes de la célula hospedadora, este aspecto es el que le da nombre a la familia (figura 1).



**Figura 1.** Microscopía electrónica de transmisión de partículas virales pertenecientes a la familia *Arenaviridae*.

Poseen genoma de ARN bisegmentado y una estrategia de replicación bisentido. El primer miembro de esta familia, el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV), fue aislado en 1933 durante un estudio por la epidemia de la encefalitis de St. Louis. Aunque no fue la causa del brote, se encontró que LCMV era el causante de la meningitis no bacteriana (Armstrong y Lillie 1934; Traub 1935). Desde que el virus Tacaribe (TCRV) fue descubierto en 1956 (Downs et al. 1963), nuevos virus fueron descubiertos y clasificados dentro de la familia de arenavirus. Si

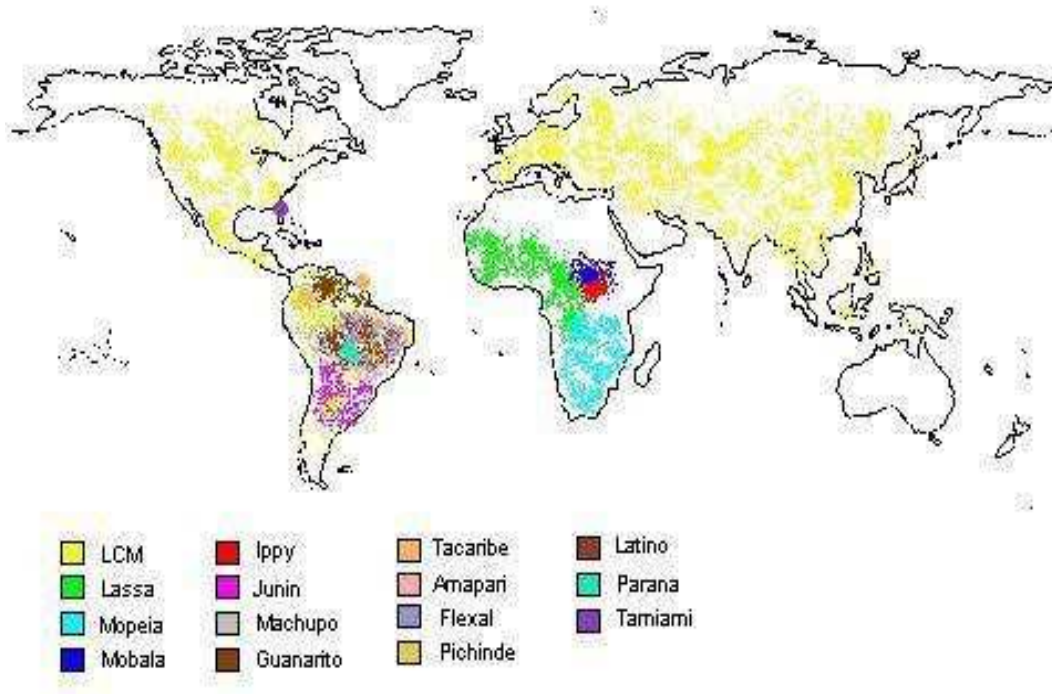
bien varios virus fueron aislados de roedores, solo algunos causan fiebres hemorrágicas. El virus Junín, aislado en 1958, fue el primero en ser reconocido como agente causal de la FHA (Parodi et al. 1958). Hasta el momento la familia consta de 25 especies reconocidas por el “*International Committee on Taxonomy of Virus*” (tabla I) y 2 nuevas especies tentativas aún no incluidas en la familia.

Todos los virus de esta familia se encuentran antigénicamente relacionados (Wulff et al. 1977; Buchmeier et al. 1981) y geográficamente clasificados (figura 2). Según su origen se dividen en dos grandes grupos: los del Viejo Mundo y los del Nuevo Mundo (tabla I).

	ESPECIE	RESERVORIO NATURAL	REGIÓN
VIEJO MUNDO	Ippy virus	<i>Arvicanthis sp.</i>	Africa Central
	Lassa virus	<i>Mástomys sp.</i>	Africa Oriental
	LCM virus	<i>Mus musculus</i>	Mundial
	Lujo virus	<i>Desconocido</i>	Sudáfrica
	Luna virus	<i>Mastomys natalensis</i>	Sudáfrica
	Mobala virus	<i>Praomys sp.</i>	Africa Central
	Mopeia virus	<i>Mástomys natalensis</i>	Mozambique, Zimbabwe
NUEVO MUNDO	Amapari virus	<i>Oryzomys capito</i> <i>Neacomys guianae</i>	Brasil
	Allpaahuayo virus	<i>Oecomys bicolor, Oecomys paricola</i>	Perú
	Bear Canyon virus	<i>Peromyscus californicus</i>	EEUU
	Cupixi virus	<i>Oryzomys megacephalus</i>	Brasil
	Chapare virus	<i>Desconocido</i>	Bolivia
	Flexal virus	<i>Oryzomys sp.</i>	Brasil

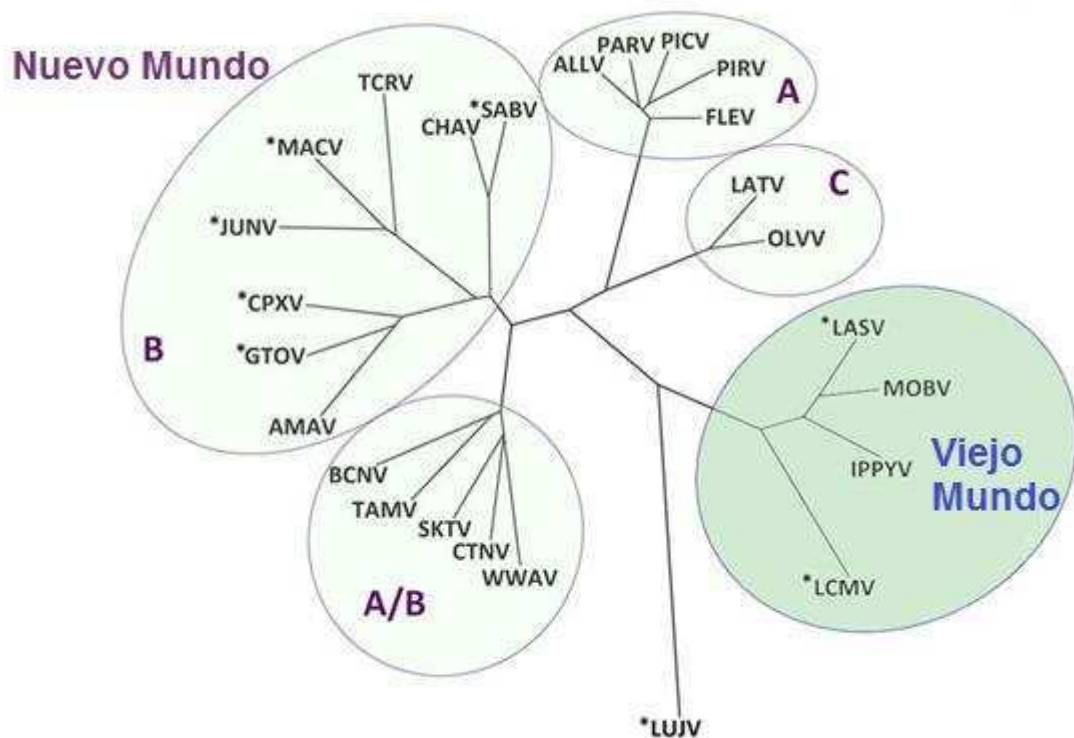
Guanarito virus	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	Venezuela
Junín virus	<i>Calomys musculinus</i>	Argentina
Latino virus	<i>Calomys callosus</i>	Bolivia
Machupo virus	<i>Calomys callosus</i>	Bolivia
Oliveros virus	<i>Bolomys obscurus</i>	Argentina
Pampa virus	<i>Bolomys obscurus</i>	Argentina
Paraná virus	<i>Oryzomys buccinatus</i>	Paraguay
Pichinde virus	<i>Oryzomys albigularis</i>	Colombia
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 México, EEUU

**Tabla I.** Arenavirus del Viejo y Nuevo Mundo, sus especies reservorio y área de incidencia.



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

Dentro del Complejo del Nuevo Mundo, anteriormente llamado Complejo Tacaribe, se encuentran todos los virus americanos descritos hasta el momento. El análisis exhaustivo del segmento S del ARN genómico permitió establecer relaciones filogenéticas entre los arenavirus (Bowen et al. 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 del Nuevo Mundo. El árbol filogenético resultante y los linajes A, B, C y el recombinante A/B se muestran en la figura 3.



**Figura 3.** Árbol filogenético de los arenavirus. Los asteriscos indican los virus causantes de fiebre hemorrágica en humanos.

Todos los arenavirus son zoonóticos, lo cual implica que todos pueden ser hallados en animales. Cada virus se asocia con una o unas pocas especies de roedores cercanamente relacionadas lo cual constituye el “reservorio natural” del virus. Los virus del Complejo Tacaribe están generalmente relacionados a las

roedores del Nuevo Mundo (familia *Muridae*, subfamilia *Sigmodontinae*) mientras que los virus del complejo LCMV/Lassa están asociados con roedores del Viejo Mundo (familia *Muridae*, subfamilia *Murinae*). El TCRV, encontrado en Trinidad, es una excepción ya que fue aislado de murciélagos, mosquitos y recientemente también aislado de garrapatas (Sayler et al. 2014). Aunque el TCRV fue asociado a un caso no fatal de fiebre hemorrágica adquirido por un trabajador de un laboratorio, el mismo se encuentra agrupado dentro del clado B de los arenavirus del nuevo mundo. Esta clasificación del TCRV dentro del clado B se basa en la secuencia de su precursor glicoprotéico y nucleoproteína, las cuales están involucradas en la invasión a la célula hospedadora (Charrel y de Lamballerie 2010; Bowen et al. 1997).

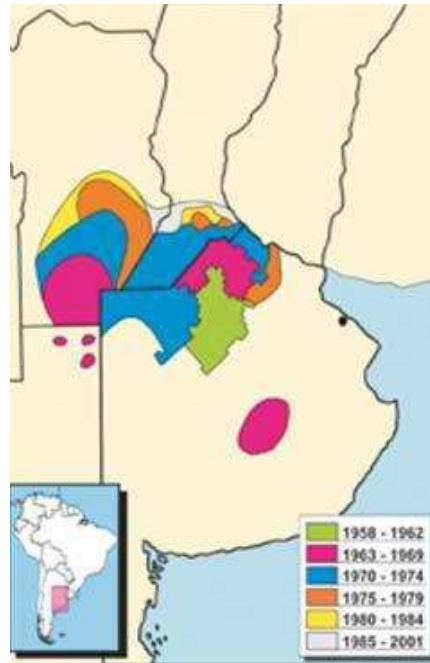
Los roedores hospedadores de los arenavirus están crónicamente infectados, sin embargo el virus no parece causar enfermedad evidente en ellos. Algunos arenavirus pueden pasar de la madre a las crías durante la preñez, permaneciendo en la población de roedores generación tras generación. Los más infecciosos son transmitidos entre roedores adultos por medio de peleas y mordidas. Los virus se esparcen al ambiente por medio de la orina o el excremento de los hospedadores infectados. La infección de humanos ocurre cuando un individuo entra en contacto con excrementos o material contaminado con las excreciones de un roedor infectado, como la ingesta de comida contaminada o por contacto directo de piel lastimada con excremento de roedores. La infección también puede ocurrir por inhalación de pequeñas partículas de orina o saliva del roedor (transmisión por aerosol).

Algunos arenavirus, como Lassa, Machupo y Lujo, están asociados con transmisión secundaria persona a persona. Esto ocurre cuando una persona infectada por exposición al virus presente en un roedor hospedador propaga el virus a otra persona. La transmisión persona a persona está asociada al contacto directo con sangre u otros fluidos conteniendo partículas virales de la persona infectada. El contacto con objetos contaminados también está asociado a este tipo de transmisión.

### II- FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA

La fiebre hemorrágica argentina (FHA) es una enfermedad endemoepidémica de la región central de la República Argentina (figura 4), caracterizada por presentar síntomas hemorrágicos, neurológicos, cardiovasculares, renales y alteraciones del sistema inmune. En 1958, cuando el virus fue descubierto, los casos se limitaban a un área de 16.000 km<sup>2</sup>, con epicentro en la ciudad de Junín. La figura 4 representa la sucesiva extensión del área endémica que actualmente abarca las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos y La Pampa (Ambrosio et al. 2006).

Durante la primera semana de la enfermedad, es común la aparición de fiebre y sintomatología no específica (dolor de cabeza, debilidad, desgarro, dolores articulares y oculares, pérdida de apetito), mientras que durante la segunda semana puede desarrollarse, en un 20-30% de los casos, una etapa hemorrágica y/o neurológica de desenlace fatal. El tratamiento consiste en el suministro de plasma inmune, obtenido de personas recuperadas de la FHA, iniciado durante la primera semana de la enfermedad, lo que reduce la mortalidad a menos de un 1%. Sin embargo, en un 10% de los casos, se ha observado un síndrome neurológico tardío asociado a este tratamiento. La ribavirina ha sido el único antiviral de amplio espectro ensayado en modelos animales y en enfermos de FHA. Los resultados obtenidos con pacientes demostraron que si bien esta droga exhibe acción antiviral, no reduce la mortalidad, presentando además efectos colaterales adversos, tales como anemia y trombocitosis, por lo cual el tratamiento de rigor sigue siendo la administración de plasma inmune con los riesgos que implica el uso de hemoderivados. Alternativamente en algunos pacientes la respuesta inmune resulta muy efectiva en la eliminación del virus, cursando la enfermedad con los síntomas más leves.



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

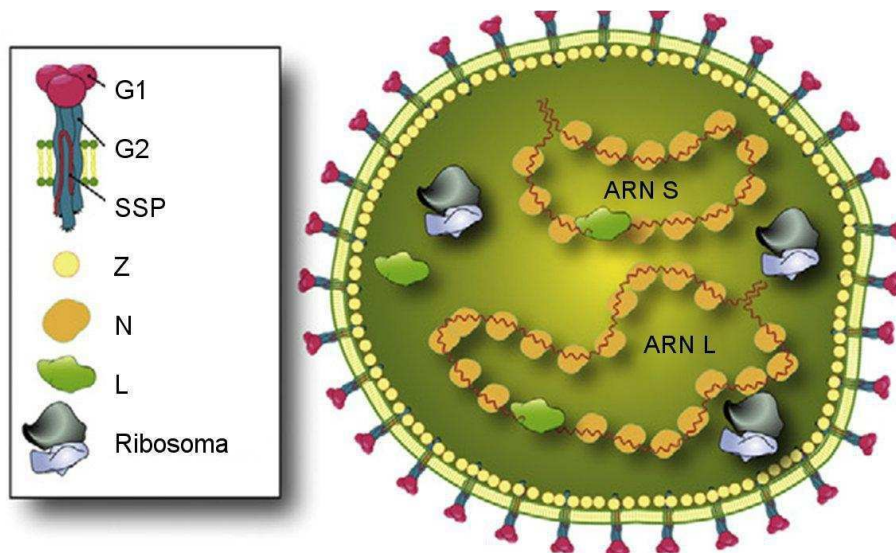
### III- TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LA FHA

La epidemiología de la FHA depende principalmente del comportamiento de su reservorio en la naturaleza, el ratón o laucha maicera *Calomys musculus*, el cual contagiaría al hombre a través de aerosoles contaminados con sus excretas. Entre 1991 y 1999 se vacunaron 202.792 personas de la zona endémica con la vacuna atenuada Candid#1 detectándose una efectividad del 98.1%. En la actualidad esta vacuna integra el plan de vacunación en la zona endémica para individuos mayores de 15 años. Si bien Candid#1 ha demostrado ser segura, inmunogénica y efectiva, los estudios con el JUNV continúan orientados al desarrollo de una vacuna en la que se eliminen los riesgos propios de una vacuna a virus atenuado, motivo por el cual resulta imprescindible continuar los estudios básicos de la biología de este agente (Enria et al. 2008). Asimismo, el empleo de los arenavirus causantes de fiebres hemorrágicas como potenciales componentes de armas biológicas empleadas en

bioterrorismo ha despertado gran interés en los estudios básicos y aplicados de estos agentes en cuanto a sus propiedades biológicas, diagnóstico y epidemiología (Borio et al. 2002).

## IV- ESTRUCTURA MOLECULAR

Las partículas virales están compuestas por una envoltura lipídica y en su interior se encuentra el genoma el cual consta de dos moléculas de cadena simple de ARN. La Figura 5 muestra el esquema de una partícula viral y sus principales componentes.



**Figura 5.** Esquema de una partícula viral y sus componentes (N: nucleocápside, L: RNA polimerasa L, Z: proteína Z, GP1 y 2: glicoproteína 1 y 2 respectivamente, SSP: péptido señal estable).

El segmento S de ARN codifica para la nucleoproteína (N) y una glicoproteína precursora (GPC). Este precursor es procesado en una glicoproteína periférica de membrana GP1 involucrada en la adsorción al receptor, responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes y cuya estructura se correlaciona con el fenotipo de virulencia (Borrow y Oldstone 1992; Scolaro et al. 1990); una glicoproteína integral de membrana GP2 con capacidad fusogénica a bajo pH (Castilla et al. 2001) y el

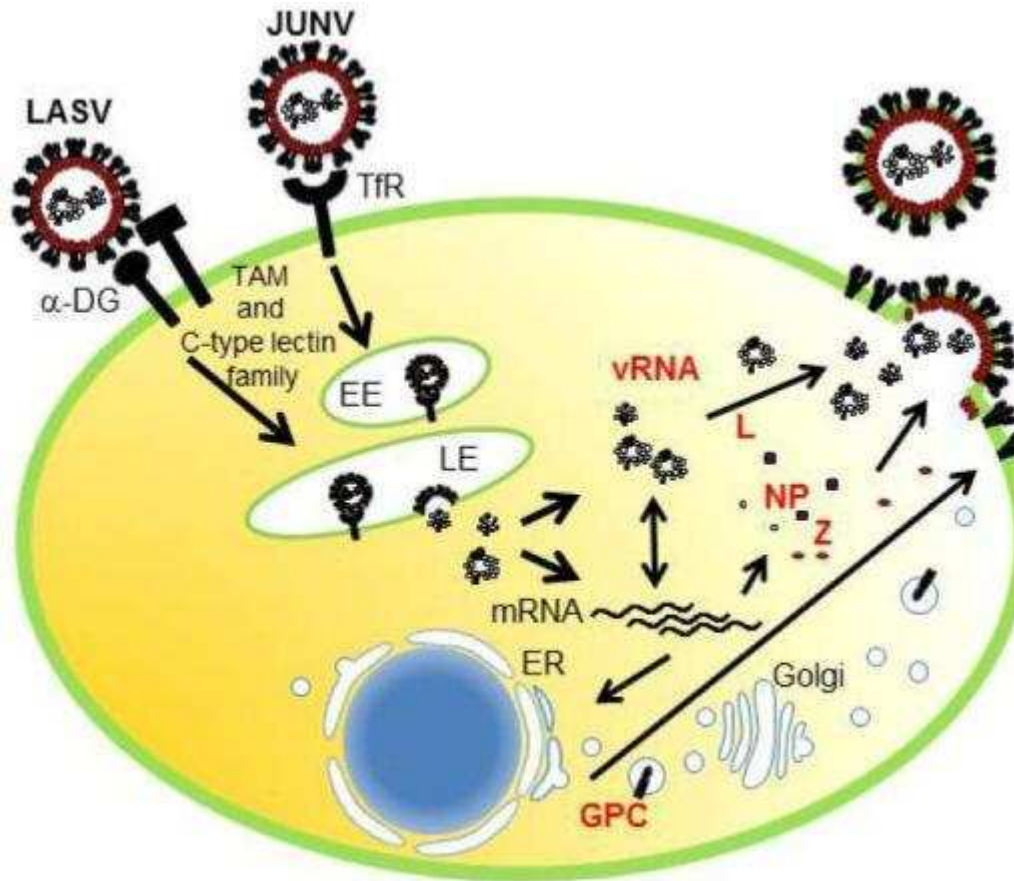


péptido señal (SSP). El SSP asociado con GP1 y GP2 es necesario para la estructura y transporte del complejo glicoproteico a la membrana y la fusión de la membrana viral con la celular durante la entrada (York et al. 2004). El segmento mayor de ARN, L, codifica para la ARN polimerasa dependiente de ARN (L) y para la proteína Z con funciones de matriz (Fan et al. 2010).

### *V- CICLO DE REPLICACION*

La figura 6 muestra un esquema del ciclo de replicación de un arenavirus. El mismo comienza con la unión de la glicoproteína de la envoltura viral al receptor celular. El primer receptor celular encontrado para los virus de esta familia fue el  $\alpha$ -dístroglicano, el cual es utilizado eficientemente por algunas cepas del virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV), por otros miembros del grupo del Viejo Mundo y por los del clado C de los arenavirus del Nuevo Mundo (Cao et al. 1998). Los virus del clado B del Nuevo Mundo utilizan el receptor de transferrina 1 (TfR1) de su huésped natural. Los estudios con virus y pseudotipos con las glicoproteínas de los arenavirus de este clado han demostrado que los miembros patógenos del clado B también utilizan el receptor de transferrina tipo 1 humano (hTfR1) para poder entrar en las células. En contraste, los miembros no patógenos Amapari y Tacaribe (TCRV) aunque son capaces de utilizar TfR1 de otras especies, no pueden utilizar hTfR1 y en su lugar entran en las células humanas utilizando una vía endocítica no caracterizada e independiente del hTfR1. Estas observaciones sugieren que los virus del clado B pueden utilizar más de un receptor, y elevan la posibilidad de que los arenavirus patógenos de este clado también puedan utilizar un receptor adicional. De hecho, ciertas cepas del LCMV utilizan tanto las vías dependientes como las independientes de  $\alpha$ -dístroglicano (Smelt et al. 2001). Asimismo si bien el TfR1 murino (mTfR1) no sería utilizado por JUNV, este virus infecta cultivos primarios

de ratón tanto como líneas celulares de esa especie a través de un receptor aún no reconocido (Martinez et al. 2007; Cuevas et al. 2011).



**Figura 6.** Esquema del ciclo de replicación de los arenavirus Lassa y Junín.

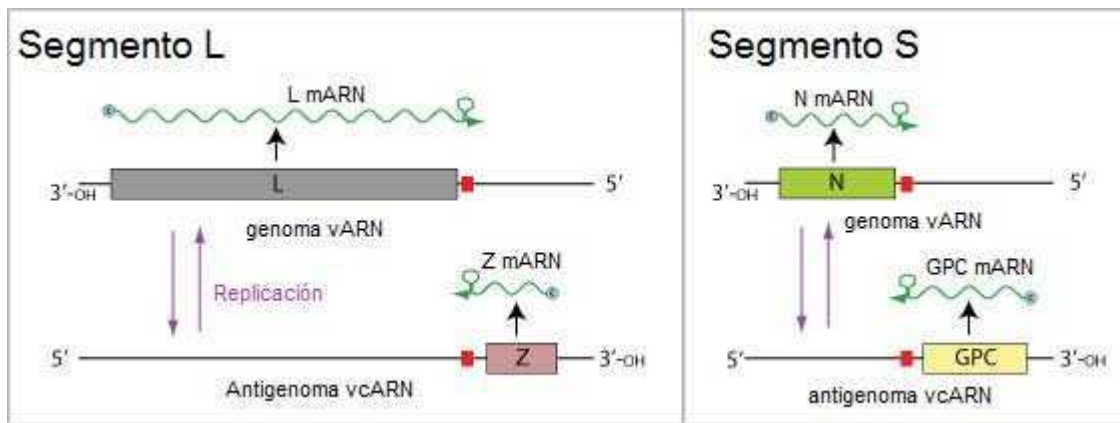
Luego de la unión a los receptores, los arenavirus se internalizan por vías endocítica pH-dependiente y fusionan su membrana con la membrana celular. Los virus del Viejo Mundo LCMV y Lassa (LASV) entran en las células predominantemente a través de una vía inusual de endocitosis que muestra cierta dependencia del colesterol de la membrana, pero es independiente de clatrina y caveolina (Rojek et al. 2008). Recientemente se ha descrito que estos arenavirus requieren la funcionalidad de los microtúbulos y la actividad de la quinasa PI3K y se indica que el LASV y el LCMV invaden la célula huésped a través de cuerpos

multivesiculares para llegar a los endosomas tardíos donde realizarían la fusión (Pasqual, Jillian M Rojek, et al. 2011).

Los arenavirus del Nuevo Mundo que utilizan el hTfR utilizan la vía dependiente de clatrina como principal vía de entrada a las células y a su vez presentan dependencia de la proteína dinamina-2 para el cierre de dichas vesículas (Martinez et al. 2007). La misma requiere la integridad del citoesqueleto de actina y la dinámica de los microtúbulos, utilizando endosomas tempranos marcados con Rab5 para fusionar en endosomas tardíos marcados con Rab7 (Martinez et al. 2008; Martinez et al. 2009). Asimismo, la interacción del JUNV con su receptor provoca la activación de la vía de señalización celular de PI3K/Akt lo que facilita el reciclado del receptor a la superficie celular, optimizando de esta manera el ingreso del virus a las células (Linero y Scolaro 2009).

Para obtener una evidencia directa de la entrada del JUNV a las células, se realizaron ensayos de microscopía electrónica de transmisión (ME). La ME mostró partículas con un diámetro ente 60 y 100 nm en depresiones electrodensas de la membrana. Además se encontraron partículas del JUNV dentro de invaginaciones de la membrana y vesículas que muestran similitud con aquellas que median la endocitosis dependiente de clatrina. Al analizar estos resultados se confirmó que la vía de entrada principal del JUNV a las células Vero es la endocitosis mediada por clatrina (Martinez et al. 2007).

La estrategia de replicación *bisentido* (figura 7) ha sido profundamente estudiada y descrita por Auperin (Auperin et al. 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*.



**Figura 7.** Esquema de la estrategia de replicación bisentido característica de los arnavirus.

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 tienen 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 et al. 1987).

No existe mucha información respecto de las etapas finales del ciclo de replicación pero se propone a la proteína Z como la principal responsable del ensamblaje y la brotación de las partículas virales. Durante las etapas tempranas,

cuando Z está en bajas concentraciones, esta proteína permite la síntesis de ARN. Una vez que Z alcanza altas concentraciones, su unión a la ribonucleoproteína viral (vRNP) inhibe la transcripción y replicación. El transporte de Z a la membrana celular no es muy conocido. Estudios con el TCRV sugieren que el ensamblado Z-Z ocurre luego de la unión a la membrana plasmática. Por este motivo, Z puede interactuar con NP y L (figura 8A). Luego del transporte de Z al lugar de brotación junto con la vRNP, Z interactúa con la membrana plasmática a través de su miristilación y puede sufrir un cambio conformacional que le permite la multimerización (figura 8B) y la unión a Tsg101 (figura 8C). Tsg101 es una proteína celular que es parte del complejo endosomal de clasificación necesario para el transporte (*endosomal sorting complex required for transportation*, ESCRT). La miristilación de Z también permite su interacción con SSP de la GP (figura 8B). Cuando Z está formando la curvatura de la membrana orquestada junto con componentes de ESCRT, la GP que ya fue clivada en el retículo o en el aparato de Golgi puede ser incorporada al virión (figura 8 B-D). No está bien estudiado como Tsg101 conecta con el ESCRT III en el proceso de brotación del virus. Finalmente la progenie viral finaliza la brotación de la célula por medio de la activación de ESCRT III y Vps4 (Urata y Yasuda 2012).

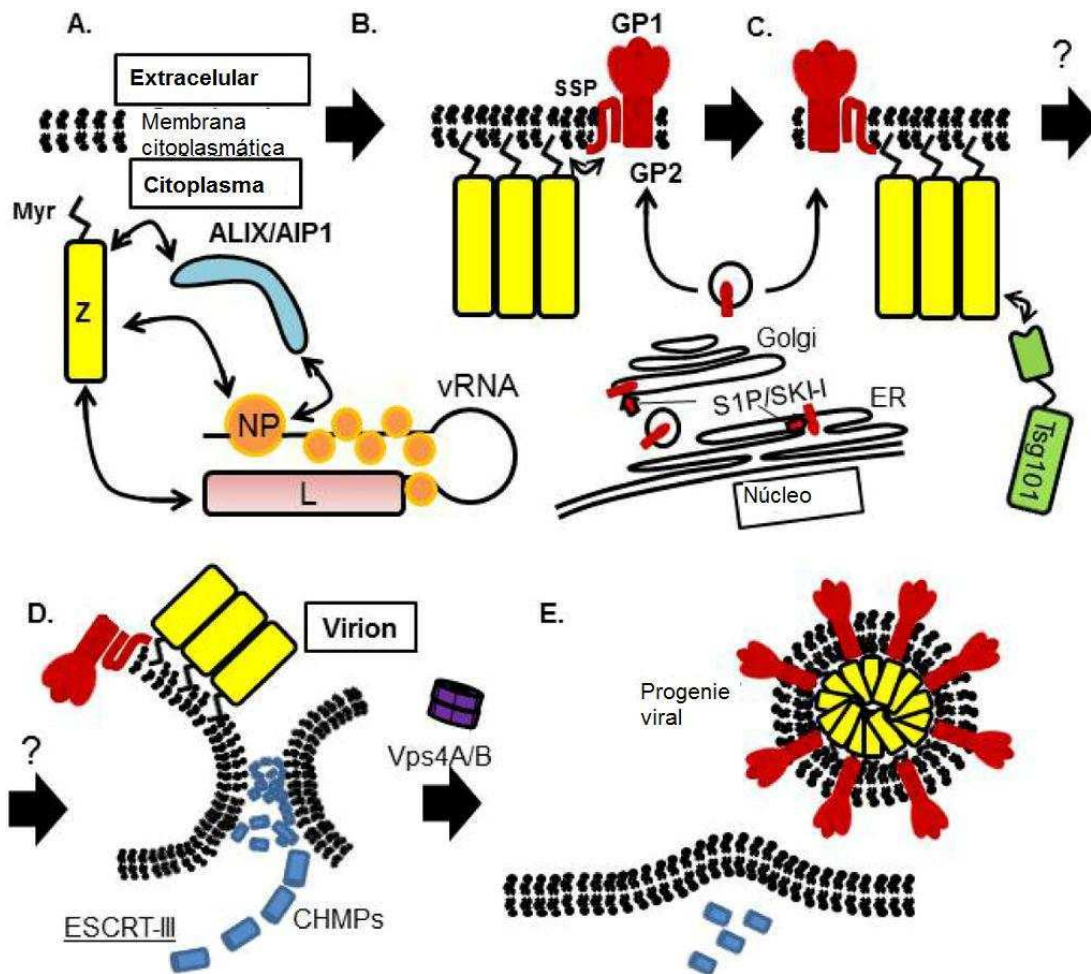


Figura 8. Modelo propuesto de ensamblado y brotación de arenavirus.

## VI- INTERACCION VIRUS-CELULA

Los virus son parásitos intracelulares obligados y por lo tanto son incapaces de reproducirse por sí mismos. Por este motivo, resulta indispensable el desarrollo de estrategias en el marco de su relación con el hospedador para asegurar su subsistencia en la naturaleza. El destino de una infección está determinado por la capacidad del agente de infectar y replicar dentro del hospedador y por la habilidad del hospedador de responder eficientemente ante la infección a través de su sistema inmune (Bucci et al. 2000). En un individuo inmunocompetente el control primario

de una infección aguda es llevado a cabo por la respuesta inmune innata y adaptativa, lo cual representa una compleja barrera a superar por el patógeno. Sin embargo, además de evadir el sistema inmune, el virus debe sortear un nivel de control secundario que se interrelaciona con dicho sistema: el control a nivel celular. La dependencia completa de los virus por los factores celulares hace que el control a este nivel sea imprescindible en la regulación de la infección viral (Ghazal et al. 2000).

El reconocimiento de la célula hospedadora 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 como carbohidratos o glicolípidos son en general los que permiten la adsorción inicial a la membrana celular. Usualmente otras moléculas co-receptoras 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 la alta capacidad replicativa de estos virus, que facilita el abordaje experimental.

Por otra parte, 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 1973; Rawls et al. 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 la 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 material genético al citoplasma de la célula.

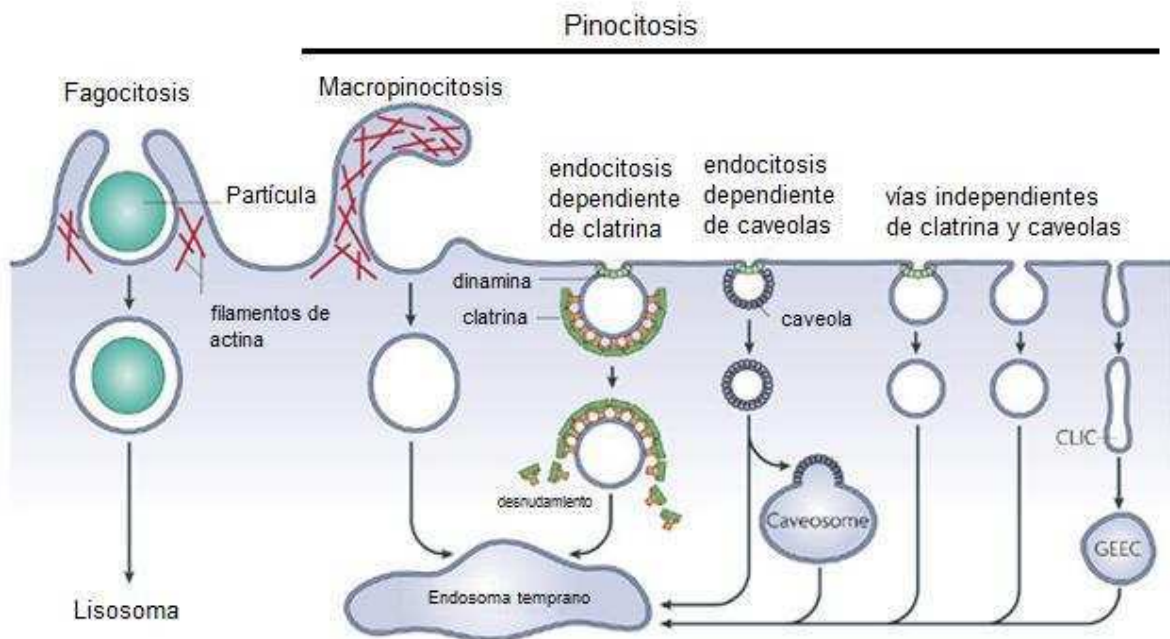
La mayoría de los virus utilizan la endocitosis como forma de entrar a la célula, ya que les ofrece grandes beneficios: muchos virus a pH ácido sufren un cambio conformacional que induce la fusión, penetración y desnudamiento. En estos casos la endocitosis es crucial debido a que por esta vía se acidifican las vesículas. Otra ventaja de este desnudamiento es que no deja 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 les ofrecen una forma facilitada y rápida de atravesar la membrana plasmática y moverse en el citoplasma hacia el compartimento celular que les garanticen 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- La endocitosis como vía de entrada

La endocitosis es un proceso que abarca diversos mecanismos utilizados por la célula para internalizar moléculas procedentes del exterior dentro de vesículas derivadas de la membrana plasmática. Por ello, cualquier proceso endocítico requerirá en primer lugar un mecanismo de selección en la superficie celular, luego la membrana plasmática debe ser inducida a doblarse y separarse, y finalmente se requerirán mecanismos que anclen la vesícula recién formada a su siguiente destino e induzca la fusión con esta nueva membrana blanco.

En las células se ha identificado una gran variedad de mecanismos endocíticos, los cuales difieren entre sí en las moléculas que transportan, en la maquinaria proteica que facilita el proceso y en el tamaño de la vesícula que se forma. Dada su complejidad y su fina regulación, son muchos los factores celulares involucrados en cada uno de estos procesos y hasta el momento solo se conoce una parte de ellos (Mercer et al. 2010).



**Figura 9.** Esquema de las diferentes vías endocíticas descritas hasta el momento.

En la figura 9 se muestra el esquema de las rutas endocíticas más descritas hasta el momento. De manera global, los mecanismos endocíticos se dividen en dos grandes grupos: la fagocitosis y la pinocitosis. La fagocitosis es el proceso mediante el cual la célula incorpora partículas de gran tamaño (generalmente asociada a células especializadas) mientras que la pinocitosis es el proceso mediante el cual se incorporan fluidos y solutos. La fagocitosis junto con tres vías pinocíticas (macropinositosis, endocitosis dependiente de clatrina y la dependiente de caveola) son consideradas vías endocíticas clásicas y son las más caracterizadas. Sin embargo, cada vez hay mayores evidencias de rutas pinocíticas no clásicas poco descritas y se las denomina como vías independientes de clatrina e independientes de caveola.

- **Fagocitosis:** Este proceso consiste en la incorporación de partículas con un tamaño superior a los 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Ghigo 2009). En células eucariotas es un proceso activo, altamente regulado que involucra receptores específicos de la membrana celular y cascadas de señalización mediadas por GTPasas de la familia Rho. Estas GTPasas disparan el reordenamiento y ensamblado de fibras de actina induciendo la formación de proyecciones de la membrana plasmática que envuelven y se ajustan a la molécula blanco. Finalmente estas proyecciones de la membrana se cierran incorporando la molécula dentro de un fagosoma, proceso que involucra a la GTPasa dinamina. Como se mencionó anteriormente, se considera que la fagocitosis es un proceso restringido a las células eucariotas especializadas, como los monocitos, macrófagos, células dentríticas y neutrófilos, los cuales se encargan de eliminar remanentes de células muertas del organismo o patógenos de gran tamaño como bacterias o levaduras. Sin embargo, se ha demostrado que tanto el virus Herpes Simplex tipo 1 (HSV1) como el baculovirus de *Autographa californica* pueden inducir su internalización en células no fagocíticas por un

mecanismo con estas características (Clement et al. 2006; Laakkonen et al. 2009).

- **Macropinocitosis:** Este es el proceso mediante el cual la célula incorpora grandes cantidades de solutos y fluidos. Al igual que la fagocitosis, la macropinocitosis se caracteriza por la formación de proyecciones de la membrana plasmática producidas por rearrreglos del citoesqueleto de actina dirigidos por la GTPasa Rho. Sin embargo, estas proyecciones no adquieren la forma de la partícula que endocitan sino que colapsan sobre la membrana plasmática y se cierran para dar vesículas de tamaño y formas diversas. Estas vesículas se caracterizan por ser más grandes que cualquier otra derivada de los otros procesos pinocíticos (Kerr y Teasdale 2009). Entre los virus que utilizan la macropinocitosis como vía de entrada se encuentra, el virus respiratorio sincicial (Krzyzaniak et al. 2013) el virus del papiloma tipo 16 (Schelhaas et al. 2012), virus del Ébola (Mulherkar et al. 2011b), adenovirus 3 y 35 (Amstutz et al. 2008; Kälin et al. 2010) y recientemente el virus herpes asociado al sarcoma de Kaposi, el virus de la leucemia amfiotrófica murina y el virus de la bursitis infecciosa (Devadas et al. 2014; Rasmussen y Vilhardt 2015; Gimenez et al. 2015).
- **Endocitosis mediada por clatrina:** Es un proceso rápido y eficiente que ocurre de manera continua, constitutiva o inducida en todas las células de mamíferos. En respuesta a una señal de internalización presente en el receptor, las moléculas de clatrina se ensamblan en la cara interna de la membrana plasmática para formar la invaginación característica que va a dar lugar a la vesícula recubierta con clatrina. Esta cubierta se ensambla en la cara citoplasmática gracias a la participación de numerosas proteínas adaptadoras y accesorias como AP-2, AP-180/CALM, Epsina y Eps 15, entre otras, que promueven el reclutamiento de la clatrina (Godlee y Kaksonen 2013). Una vez reclutada, la clatrina se polimeriza formando un enrejado curvo que junto con

varias proteínas accesorias estabilizan la curvatura de la membrana y permiten la formación de un cuello que requiere la GTPasa dinamina para completar la fisión de la vesícula. La remoción de la cobertura de clatrina de la superficie de la vesícula es necesaria para su posterior fusión con la membrana blanco y la liberación del contenido de la vesícula en su destino. Los principales participantes en el proceso de depolimerización de la cubierta de clatrina incluyen las proteínas Hsc70 y auxilina (Popova et al. 2013).

De todos los mecanismos endocíticos, el dependiente de clatrina es el más utilizado por los virus para internalizar en las células. Los primeros estudios con microscopía electrónica demostraron que algunos virus, como los adenovirus 2 y 5 y el virus de la estomatitis vesicular, se encontraban presentes en regiones engrosadas de la membrana plasmática o en vesículas electrodensas (Dahlberg 1974; Dales 1973). Posteriormente, esas membranas electrodensas fueron identificadas como zonas recubiertas por clatrina. Algunos de los numerosos virus que utilizan esta vía de entrada son: el virus de la lengua azul (Forzan et al. 2007), el virus Junín en células Vero (Martinez et al. 2008), el virus dengue tipo 1 en células de mosquito (Acosta et al. 2011), el virus de la hepatitis B en cultivo primario de hepatocitos (Cheng et al. 2012) y el virus de la rabia (Piccinotti et al. 2013).

- **Endocitosis mediada por caveolas:** Las caveolas son pequeñas invaginaciones de aproximadamente 60 a 80 nm de diámetro que se distinguieron por primera vez mediante observaciones en el microscopio electrónico en el año 1950. Estas estructuras están conformadas principalmente por la proteína caveolina, concentrada en regiones de la membrana plasmática ricas en colesterol, esfingolípidos, lipoesfingolípidos y ácidos grasos saturados; una composición de membrana que se asemeja a los “*lipid rafts*” (Stan 2005). En células de mamíferos se han identificado tres tipos de caveolinas. Las caveolinas 1 y 2 son co-expresadas y forman complejos heterooligoméricos en

muchos tipos celulares pero se encuentran en altos niveles en células adiposas mientras que la caveolina 3 es específica de células musculares y se encuentra tanto en tejido cardíaco como en músculo esquelético y liso (Smart et al. 1999). Se ha demostrado que la endocitosis dependiente de caveola es dependiente de la activación de cascadas de señales mediadas por la tirosina quinasas, Rho GTPasas y dinamina (Henley et al. 1998; Oh & Schnitzer 2001; Pelkmans et al. 2002; Pietiäinen et al. 2004). Entre los virus que utilizan esta vía de entrada se encuentra el virus SV40 (*simian virus 40*) y el virus BK (Zaas et al. 2009) así como también el adenovirus tipo 37 (Yousuf et al. 2013), el virus de la encefalitis japonesa (Zhu et al. 2012) y el virus aftosa unido al receptor de heparán sulfato (O'Donnell et al. 2008).

- **Vías independientes de clatrina y caveolas:** Además de las ya descritas vías endocíticas, existe un gran número de vías que no involucran ni a la clatrina ni a las caveolas. Estos mecanismos se caracterizan por la falta de cubierta detectable por microscopía electrónica. Este grupo puede subdividirse dependiendo de la GTPasa involucrada (dependiente de RhoA (o IL-2R $\beta$ ), de Cdc42/Arf1 o de Arf6) o de la proteína que recubre las vesículas (dependiente de flotilina) (Fröhlich y Roblegg 2012).

## VII.2- La importancia de los lípidos en la endocitosis

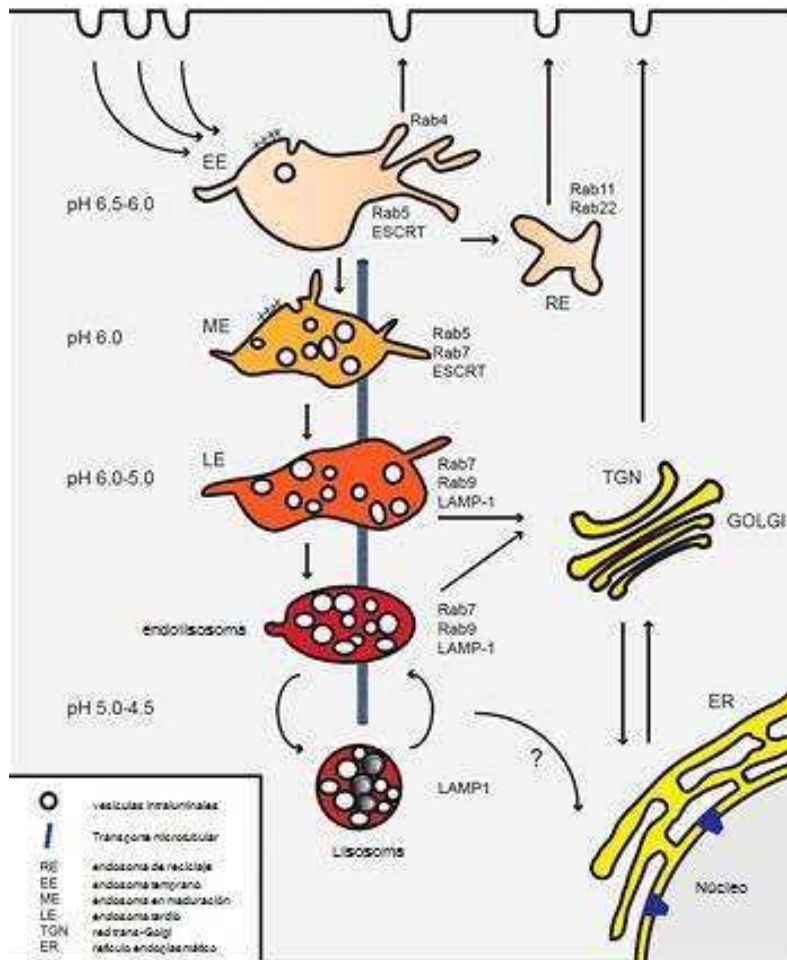
Muchos investigadores han estudiado los mecanismos endocíticos focalizándose en las proteínas involucradas pero actualmente se observó que los lípidos también cumplen un rol muy importante. En primer lugar, se demostró que la depleción de colesterol inhibe la formación de la cubierta de clatrina y caveolina (Rodal et al. 1999) y que algunos lípidos cumplen un rol fundamental en el reclutamiento de proteínas a la membrana celular (Simonsen et al. 2001). Los *lipid rafts* son microdominios dentro de la membrana plasmática ricos en receptores proteicos y esfingolípidos. Funcionan como un centro organizador para el

ensamblado de moléculas de señalización, afectan la fluidez de la membrana y median el tráfico de proteínas de membrana (Nabi y Le 2003). Se sabe que los *lipid rafts* contribuyen a la internalización de partículas virales mediando la unión de la glicoproteína y ajustando las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de la membrana (Teissier y Pécheur 2007). Estos *rafts* se pueden encontrar tanto en invaginaciones formadas por caveolina como aquellas marcadas por la proteína flotilina (Palecek et al. 1997). Se encontró que la flotilina se une a la proteína de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GP1) durante su internalización (Otto y Nichols 2011; Mulcahy et al. 2014).

### VIII- RED ENDOSOMAL Y TRAFICO VESICULAR

La endocitosis marca la entrada de receptores, membranas y fluidos extracelulares a una compleja red de tráfico endocítico (figura 10). Las moléculas internalizadas pueden seguir dos vías distintas, o son recicladas de vuelta hacia la membrana plasmática o son llevadas a degradación en endosomas tardíos y lisosomas. Esta clasificación ocurre en los endosomas tempranos (*early endosome*, EE), lugar en el que convergen las moléculas endocitadas (Jovic et al. 2010). Los EE son los primeros compartimentos endocíticos en aceptar el material incorporado de la membrana plasmática y son muy propensos a la fusión homotípica (Gruenberg et al. 1989). Los EE están compuestos por regiones con extensiones tubulares finas (60 nm de diámetro) y por vesículas largas (400 nm de diámetro) que tienen invaginaciones de la membrana y dan lugar a una apariencia multivesicular (Bissig y Gruenberg 2013). Estos dominios diferenciados en los EE son funcionalmente importantes. Las proteínas marcadas para reciclaje se encuentran principalmente en la zona tubular, mientras que los elemento multivesiculares están mayormente asociados a la vía degradativa (Sheff et al. 1999). Las vesículas generadas de estas dos regiones

diferentes también difieren en su propiedad de acidificarse. El pH desciende de 6,2 a 5,5 en el lumen de los cuerpos multivesiculares mientras que en la zona tubular aumenta a 6,5 (Mayor et al. 1993; Sheff et al. 1999).



**Figura 10.** Esquema de la red endosomal y tráfico vesicular.

Aunque la mayoría de los ligandos son degradados, sus receptores generalmente son reciclados para poder internalizar nuevos ligandos (Dunn et al. 1989). El pH levemente ácido del lumen del EE (6,3-6,8) permite la disociación entre el ligando y su receptor.

El EE madura de diferentes maneras hacia el endosoma tardío (*late endosome*, LE) (figura 10). Por un lado, por acción de la ATPasa vacuolar se acidifica el interior del endosoma y por el otro, las moléculas destinadas a reciclaje son removidas de la



región tubular (Lafourcade et al. 2008). La pérdida de estos túbulos a la vía de reciclaje hace que los LE carezcan de ellos. Por otro lado, los LE aumentan en tamaño debido a la fusión homotípica (Rink et al. 2005). Las moléculas también son distribuidas en vesículas más pequeñas que se forman en el perímetro de la membrana hacia el lumen endosomal, formando vesículas intraluminales lo cual le da al LE un aspecto multivesicular y por este motivo también reciben el nombre de cuerpos multivesiculares.

La fusión del endosoma con el lisosoma resulta en la formación de un endolisosoma o compartimento híbrido con características intermedias entre los dos compartimentos que le dan origen (Mullock et al. 1998). En este punto ocurre la degradación proteolítica de todos los elementos que se encuentran dentro del lumen del endosoma, incluidas las vesículas intraluminales.

Los autofagosomas son vesículas de doble membrana (ver más adelante) que maduran de manera similar a los endosomas y pueden requerir la fusión con un endosoma tempranos o tardíos para su maduración y fusión con el lisosoma. Producto de esa fusión se forman los llamados anfisomas (Fader y Colombo 2008).

### ***VIII.1-Regulación del tráfico endocítico***

El principal grupo de proteínas reguladoras del tráfico endocítico es el de las proteínas de unión asociadas a Ras (*Ras-associated binding proteins, Rab*). Las Rabs son pequeñas proteínas unidas a GTP que ciclan entre el estado activo (unido a GTP) y el estado inactivo (unido a GDP). En su estado activo, estas proteínas se localizan en las membranas intracelulares donde interactúan y reclutan las proteínas efectoras (Grosshans et al. 2006). Las Rabs son las encargadas de mediar la direccionalidad y especificidad de las vesículas. En el vía endocítica, Rab5 está implicada en la endocitosis y fusión homotípica entre los endosomas tempranos, Rab4 y Rab11 en el

reciclaje endocítico y Rab7 y Rab9 en el tráfico hacia los endosomas tardíos (González-Gaitán y Stenmark 2003).

Rab5 es la más estudiada del tráfico endocítico temprano (Grosshans et al. 2006). Regula el tráfico y la formación de las primeras vesículas endocíticas provenientes de la membrana plasmática hacia los endosomas tempranos, la generación de fosfatidilinositol-3-fosfato o PI(3)P (Murray et al. 2002), la fusión homotípica (Gorvel et al. 1991) y la movilidad de los EE a través del citoesqueleto celular.

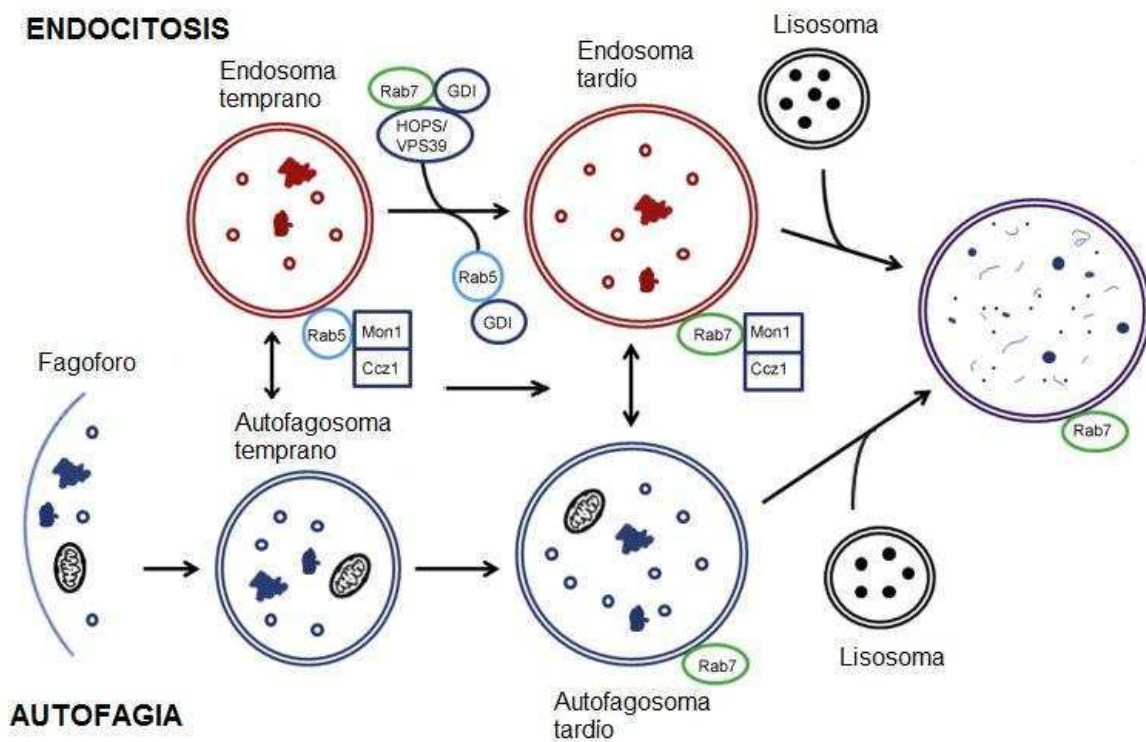
Una vez que se forma el endosoma temprano, las moléculas destinadas a ser recicladas pueden seguir una vía de reciclaje “rápida” o una “lenta”. Rab4 participa en la vía rápida regulando la salida directa desde las zonas tubulares del EE hacia la membrana plasmática (Sheff et al. 1999). Rab22 sería la proteína encargada de regular el tráfico desde el EE hacia los endosomas de reciclaje mediante la vía lenta (Magadán et al. 2006) mientras que Rab11 regula el último paso de transporte de los endosomas perinucleares hacia la membrana plasmática (Ward et al. 2005).

### ***IX- AUTOFAGIA***

En eucariotas, la degradación de componentes citoplasmáticos es vital para las células ya que ese proceso remueve restos de organelas y agregados de proteínas potencialmente tóxicos, protege al organismo de la invasión de patógenos y provee a la célula con nutrientes provenientes del reciclado de la degradación de macromoléculas en períodos de escasos nutrientes o bajo condiciones de stress (Barth y Köhler 2014).

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado en eucariotas, en el cual componentes del citoplasma son secuestrados en vesículas y liberados dentro del lisosoma para su degradación y eventual reciclado de macromoléculas

resultantes (Cuervo 2004; Levine & Klionsky 2004). Durante este proceso, se forman vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, que capturan material citoplasmático y lo transportan hasta los compartimentos lisosomales donde es degradado por enzimas hidrolíticas (figura 11). La autofagia es un proceso constitutivo esencial para la homeostasis celular que se encuentra involucrado en diferentes patologías como el cáncer, neurodegeneración y miopatías (Marino y Lopez-Otin 2004) así como también en procesos de inmunidad innata y adaptativa contra patógenos intracelulares (Schmid y Münz 2007).



**Figura 11.** Esquema general de los procesos que ocurren durante la activación de la vía de la autofagia.

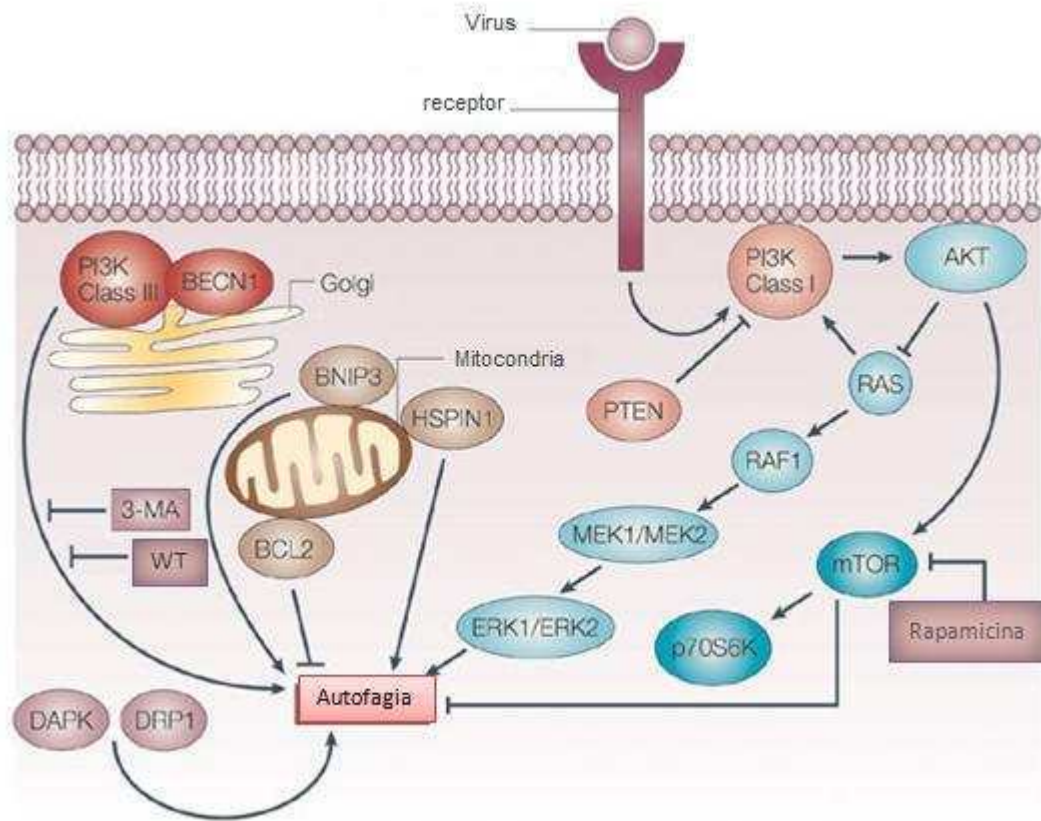
Si bien originalmente este proceso se describió en células de mamífero, el estudio en levaduras permitió la identificación de un gran número de genes relacionados con la autofagia (*autophagy-related genes*, Atgs) (Klionsky et al. 2010).

Estos Atgs juegan un rol fundamental en la biogénesis de los autofagosomas, desde su formación hasta su maduración. En su forma más clásica y conservada, la autofagia es la respuesta a la falta de nutrientes pero se ha demostrado que esta vía puede ser inducida por señales de daño celular o depolarización de mitocondrias (mitofagia) así como también por la infección de patógenos intracelulares (Jordan & Randall 2012).

Si bien el origen de las vesículas es aún desconocido, recientemente se encontró que en condiciones de carencia de nutrientes, zonas del retículo endoplasmático se encontrarían enriquecidas en marcadores de autofagia (Matsunaga et al. 2010; Orsi et al. 2010; Li et al. 2013). Esos marcadores forman un complejo con Rab5, también marcador de endosomas tempranos, y la formación de ese complejo es necesario para la formación del autofagosoma (Ravikumar et al. 2008). De este modo, Rab5 participaría en la formación de los autofagosomas, posiblemente protegiéndolo de la degradación y/o facilitando su fusión con compartimentos tardíos (Tooze y Razi 2009). Tanto la autofagia como la endocitosis proveen nutrientes y macromoléculas para el uso de la célula de fuentes internas o externas, respectivamente. Por este motivo, no es extraño que exista una relación cercana entre estas dos vías catabólicas. De hecho, los autofagosomas no solo pueden unirse con endosomas tempranos sino también con los tardíos o cuerpos multivesiculares (figura 11) formando organelas llamadas anfisomas. Posteriormente, los anfisomas se fusionan con los lisosomas para ser degradados (Hytinen et al. 2013). Varios trabajos demuestran que Rab7, un marcador de endosomas tardíos (figura 10), también estaría involucrado en la maduración final de los autofagosomas tardíos (figura 11) (Jäger et al. 2004).

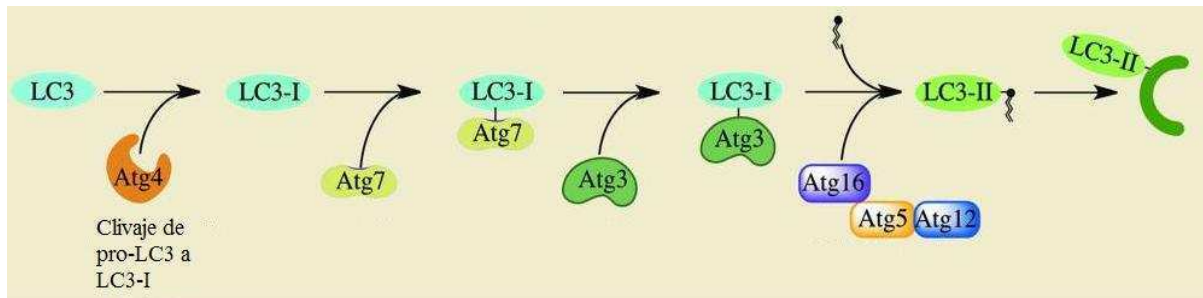
### *IX.1-Biología molecular de la autofagia*

De todos los estímulos que activa la vía de la autofagia, la mayoría (aunque no todos) convergen en el regulador mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) (figura 12). Este regulador es una quinasa de serina/treonina que actúa como un regulador negativo de la autofagia a través de su unión, fosforilación y consecuente inactivación del complejo de quinasas pro-autofágicas ULK1/2. La actividad del complejo ULK1/2 es necesario para el reclutamiento de los Atgs al sitio de formación del fagoforo (Jung et al. 2010) (figura 11). Rapamicina es un macrólido lipofílico que interacciona específicamente con mTOR inhibiendo su actividad y permitiendo así la activación de la vía de la autofagia (Raught et al. 2001; Meijer y Codogno 2004). La formación del complejo PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinasa*) clase III con beclina 1 (BECN1) es central en la regulación de la biogénesis del autofagosoma (figura 12) ya que facilita la formación del fagoforo y la expansión del autofagosoma. Por otro lado, las proteínas que se unen a este complejo también regulan la unión del autofagosoma con compartimentos endosomales y los lisosomas (Jordan y Randall 2012). Compuestos como 3-Metiladenina (3-MA), wortmanina (WT) o LY294002 (LY) son potentes inhibidores de la actividad de PI3K por diferentes mecanismos de acción permitiendo así la inhibición de la autofagia. Mientras que WT se une de manera covalente a esta enzima, lo cual lo hace un inhibidor irreversible, LY se une de manera reversible, ya que el mismo es un inhibidor por competencia con el ATP, el cual posee una estructura similar (Blommaert et al. 1997). Si bien los tres compuestos inhiben tanto la PI3K clase 1 como la clase 3, trabajos recientes muestran que el compuesto 3-MA puede presentar un efecto dual, es decir, puede tener un efecto tanto inhibitorio como activador de la autofagia además de alterar otras vías metabólicas (Wu et al. 2010; Lin et al. 2012).



**Figura 12.** Esquema de las diferentes cascadas de señales que afectan la vía de la autofagia.

LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) es un marcador muy común de autofagosomas y tiene roles muy importantes en la expansión y cierre de los autofagosomas así como también en el reclutamiento del contenido de los mismos. LC3 existe predominantemente de dos formas: LC3-I o citoplasmática y LC3-II o asociada a membrana (figura 13). Pro-LC3 es procesada a su forma citoplasmática, LC3-I, por Atg4. LC3-I es activada por Atg7 y transferida a Atg3 y luego conjugada con fosfatidiletanolamina (PE) por el complejo Atg5-Atg12-Atg16 para generar LC3-II (figura 13) (Kabeya et al. 2000; Tanida et al. 2004; Jordan y Randall 2012). LC3-II se asocia exclusivamente con la membrana del autofagosoma, definiéndolo como un marcador de la formación de autofagosomas clásico (Kabeya et al. 2000).

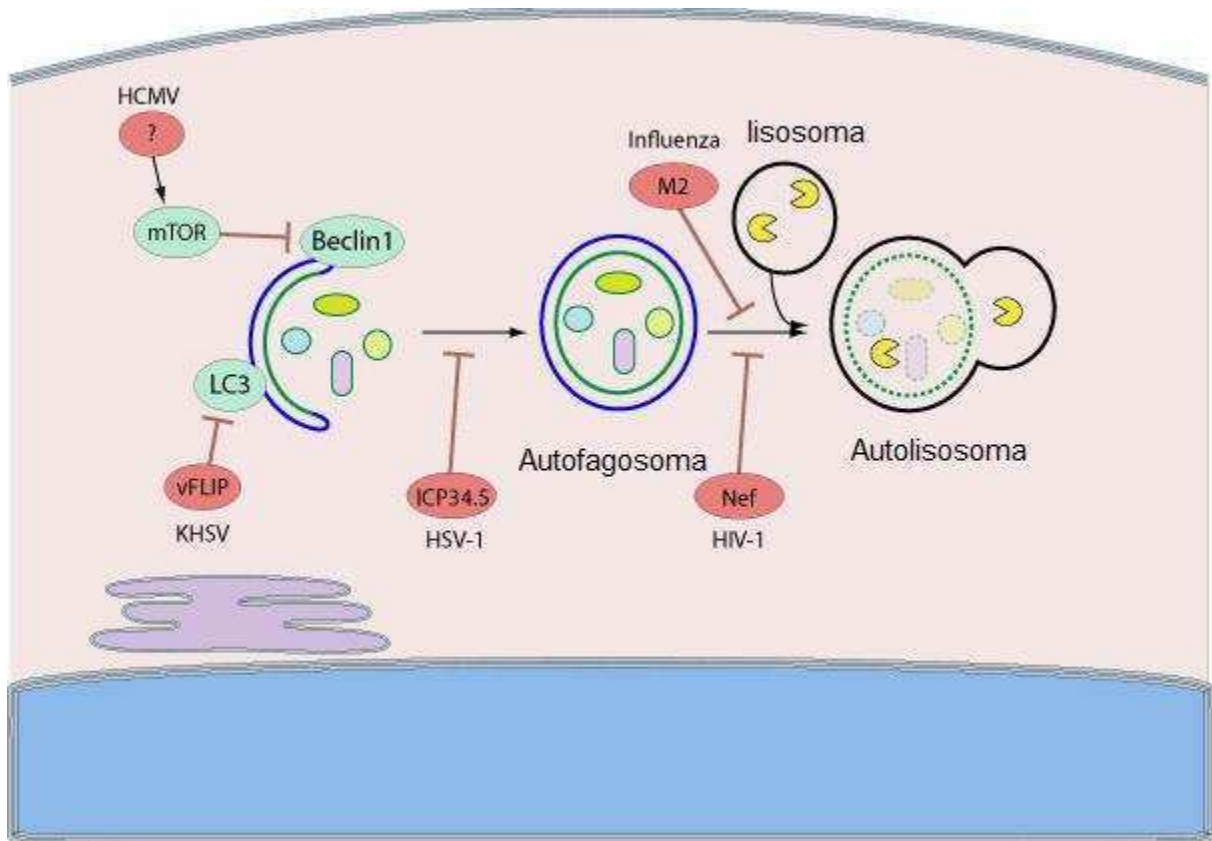


**Figura 13.** Esquema del procesamiento de LC3.

## IX.2-Autofagia y virus

La primer descripción de estructuras tipo autofágicas en células infectadas con virus fue hace décadas, cuando se visualizaron partículas del virus polio dentro de vacuolas de doble membrana semejantes a los autofagosomas (Dales et al. 1965). Sin embargo, el campo de investigación acerca del papel de la autofagia en las infecciones de origen viral ha sido desarrollado recientemente (Orvedahl y Levine 2008). Originalmente, este proceso fue descrito como un mecanismo celular de protección frente a la invasión viral (Kirkegaard et al. 2004; Subauste 2009), reforzado por las múltiples evidencias centradas en la función inductora de la vía de señalización del interferón sobre la autofagia (Stark et al. 1998) (figura 14). Para la familia de los virus Herpes (HSV-1 y KHSV), si bien han evolucionado de modo tal de adquirir estrategias para evadir los mecanismos antivirales de las células, existe una relación directa entre la autofagia y la eliminación de los viriones en las células infectadas (Tallóczy et al. 2006). En la infección con citomegalovirus (HCMV), por otra parte, se observó que si bien el virus induce la vía de la autofagia en etapas tempranas del ciclo, hacia el final del ciclo de replicación el virus inhibe la vía (Zhao et al. 2013; Chaumorcel et al. 2012). Existen evidencias de que la proteína Beclina 1 (componente de sistema autofágico) participa en la respuesta antiviral de la célula posterior a la infección (Liang et al. 1999). En el caso de infecciones por el virus influenza y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), también se observó que

inducen la formación de autofagosomas en las primeras etapas del ciclo pero los mismos inhiben el último paso de la vía, es decir que inhiben la fusión con el lisosoma y su consecuente degradación (Zhang et al. 2014; Dinkins et al. 2015).

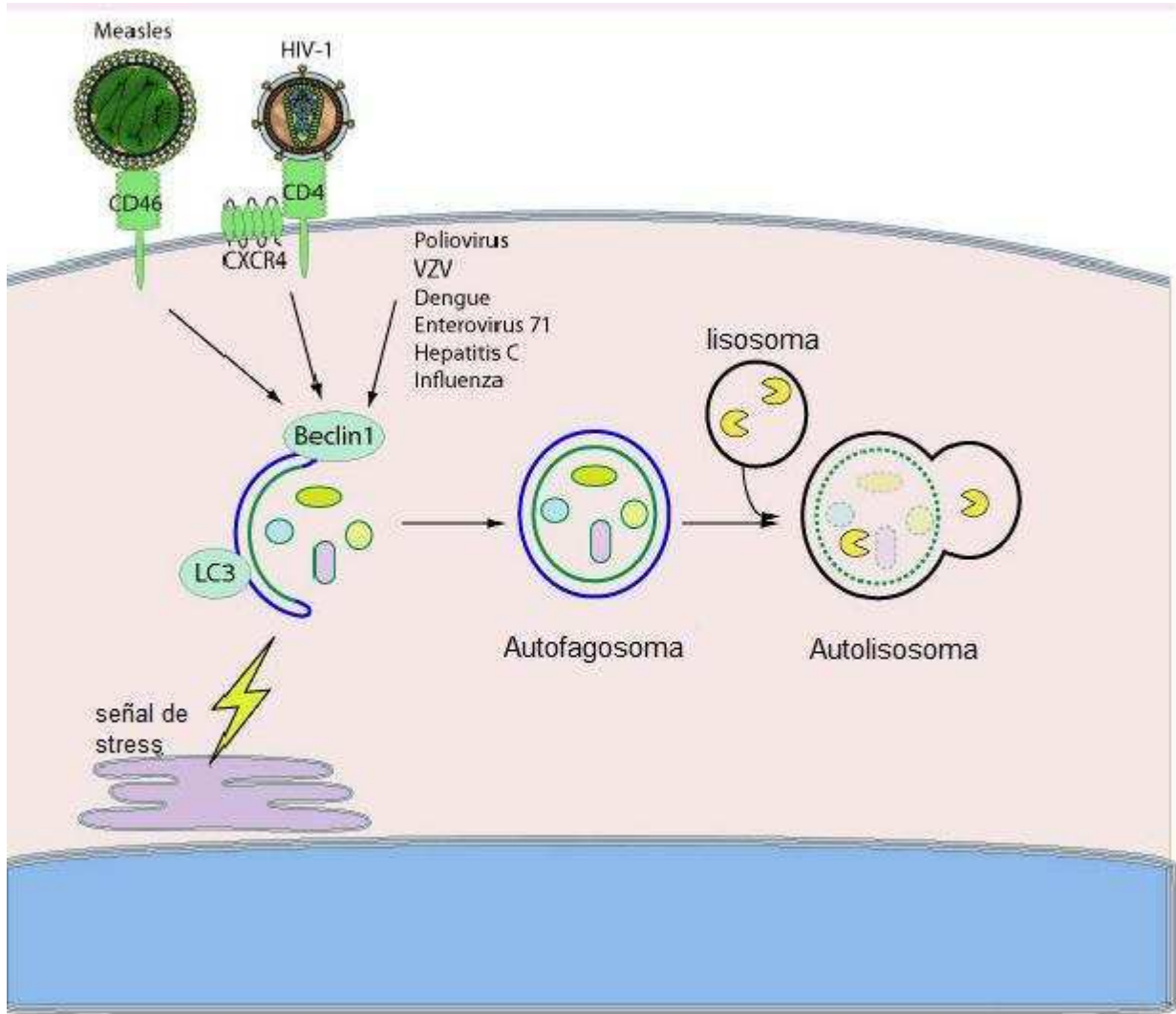


**Figura 14.** Inhibición de la vía de la autofagia mediada por infecciones virales.

Sin embargo, diferentes virus han desarrollado estrategias para aprovechar la vía de la autofagia durante su ciclo infeccioso (figura 15). Como se mencionó previamente, HCMV, HIV e influenza activan esta vía en la etapa temprana de infección. El virus del sarampión (Measles) activa la vía en diferentes etapas. La primera es mediante la interacción con su receptor (CD46), la segunda activación ocurre posterior a su replicación y esta activación se mantiene en el tiempo para evitar la muerte de las células infectadas (Richetta et al. 2013). En el ciclo de infección del virus polio, la activación de autofagia en etapas tempranas estaría relacionada con la replicación del virus mientras que la activación en etapas tardías (fusión con



lisosomas) lo estaría con la liberación de las partículas infectivas pero no en los pasos previos del ciclo de infección (Richards y Jackson 2012). En el caso del virus de la varicela zoster (VZV, perteneciente a la familia de virus herpes), la inducción de la vía producida por el virus no solo facilita la biosíntesis y maduración de las glicoproteínas virales sino que también aumenta la infectividad (Buckingham et al. 2014). En el caso del virus Dengue, la inducción de la autofagia impide la muerte de la célula infectada e incrementa la replicación viral tanto *in vitro* como *in vivo* (Lee et al. 2013). La infección con el enterovirus 71 también activa el flujo autofágico tanto *in vitro* como *in vivo* beneficiando así su replicación (Huang et al. 2009). El virus de la hepatitis C usa la autofagia para la traducción de proteínas tempranas y para la supresión de la inmunidad innata antiviral (Dreux et al. 2009; Ke y Chen 2011). Estas y otras evidencias sugieren que los virus con genoma ARN, grupo al que pertenecen los miembros de la familia *Birnaviridae*, *Arenaviridae* y *Picornaviridae*, pueden estar relacionados a la maquinaria de la autofagia celular durante su ciclo de replicación en las células infectadas.



**Figura 15.** Activación de la vía de la autofagia mediada por infecciones virales.

# Objetivos



El objetivo principal de este trabajo es estudiar los componentes celulares y virales involucrados en las etapas tempranas de la multiplicación viral.

Los objetivos específicos son:

- 1) Describir el/los mecanismos de entrada utilizados por el virus Tacaribe (TCRV) en cultivos celulares que expresan diferencialmente el receptor de transferrina.
- 2) Analizar la función de la autofagia en la infección del virus Junín (JUNV) en un cultivo de células humanas.

Para el primer objetivo, se analizaron diferentes vías endocíticas para determinar la/s vía/s de entrada utilizadas por el TCRV. Específicamente se analizó la participación de las vías dependientes de clatrina, colesterol y la macropinocitosis enfocándonos también en el estudio de la participación de las proteínas dinamina-II y la acidificación endosomal.

En relación con el segundo objetivo, se analizó la participación de la vía de la autofagia durante la entrada y durante todo el ciclo del JUNV. Se determinó la participación de proteínas esenciales para la vía como lo son mTOR, Atg5 y la quinasa PI3K. Este estudio contribuirá a la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes al ciclo de multiplicación de JUNV y a sus implicancias biológicas

Por último, mediante la concreción de los objetivos planteados en este plan de trabajo se espera poder definir la importancia y funcionalidad de factores virales y celulares involucrados en las interacciones tempranas virus-célula en infecciones productivas, tanto para el TCRV como para el JUNV.

# **Materiales y Métodos**



## 1) Cultivos celulares

### 1.1. 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 suero de ternera (ST) inactivado y 50 µg/ml de gentamicina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente y luego de alcanzada la confluencia se mantuvieron en medio de mantenimiento (MM, MEM suplementado con 1,5% ST). Cuando estos cultivos se utilizaron para titular virus se mantuvieron en medio semisólido (MEM 2X, 4% de ST inactivado, 100 µg/ml de gentamicina) en partes iguales con metilcelulosa 1,4% y se incubaron en estufa a 37°C con 4% de CO<sub>2</sub>.

### 1.2. Línea CHO-K1 (ATCC CCL 9618)

Proveniente de ovario de hámster chino (*Cricetulus griceus*). Los cultivos se crecieron en medio Ham's F12 suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado y 50 µg/ml de gentamicina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente y se incubaron en estufa a 37°C con 4% de CO<sub>2</sub>.

### 1.3. Líneas TRVb y TRVb-1

Cedida gentilmente por el Dr. Collin Parrish, (Baker's Institute, Cornell University, Ithaca, New York). La línea TRVb es un cultivo derivado de células CHO deficiente en la producción del receptor de transferrina endógeno, mientras que las TRVb-1 expresan establemente el receptor de transferrina 1 humano debido 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 en iguales condiciones que la línea CHO.

### 1.4. Línea BHK-21 (ATCC CCL-10)

Provenientes de riñón de hámster (*Mesocricetus auratus*). 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 a 37°C con 4% de CO<sub>2</sub>.

### 1.5. Línea A549 (ATCC CL-185)

Provenientes de carcinoma de pulmón humano (*Homo sapiens*). 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 a 37°C con 4% de CO<sub>2</sub>.

### 1.6. Líneas MEF (ATCC SCRC-1040) y MEF Atg5<sup>-/-</sup>

Cedidas gentilmente por la Dra. Laura R. Delgui (Instituto de Histología y Embriología, IHEM-CONICET, Mendoza Capital). Proviene de fibroblastos de embrión de ratón (*Mus musculus*). Los cultivos se crecieron en D-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 a 37°C con 4% de CO<sub>2</sub>.

## **2) Virus**

Se utilizó la cepa 11573 del virus Tacaribe (TCRV). El stock de trabajo se preparó infectando células BHK-21 o Vero con una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,1 UFP/célula. Luego de 1 hora de adsorción en estufa a 37°C, se incubó MM. 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  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Se utilizó la cepa atenuada IV4454 del virus Junín (JUNV) aislada a partir de un caso leve de fiebre hemorrágica argentina (Contigiani & Sabattini 1977). La semilla se amplificó en células Vero, infectando con una m.i. de 0,1 UFP/célula y con igual procedimiento que para obtener el stock de TCRV. Los sobrenadantes se cosecharon a partir del sexto día p.i. y se titularon por el método de UFP en la línea celular Vero.

La cepa Indiana del virus de la estomatitis vesicular (VSV) se utilizó como un control no relacionado. La semilla se amplificó en células Vero cosechando al día 1 y 2 p.i. y se tituló por el método de UFP en la misma línea celular.

### 2.1 Inactivación por luz ultravioleta (UV)

Tanto el TCRV como el JUNV fueron inactivados por luz UV. Para ello, diluciones 1/10 de stocks virales en MEM sin suero fueron expuestos durante 15 minutos a 30 Watts a 10 cm de distancia y a temperatura ambiente. Como control, alícuotas de la misma dilución fueron dejadas a temperatura ambiente durante el mismo tiempo. Una vez transcurridos los 15 minutos, las alícuotas se titularon por el método de UFP (ver más adelante) para corroborar la inactivación de los mismos.

### **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:

Metil- $\beta$ -ciclodextrina: 500 mM en agua.

Nistatina: 50 mM en DMSO.



Clorpromacina: 10 mM en etanol.  
Dansilcadaverina: 150 mM en DMSO.  
Concanamicina A: 30 mM en DMSO.  
Naranja de acridina: 1 mg/ml en PBS  
Dynasore: 15,5 mM en DMSO.  
Citochalasina D: 5 mM en etanol.  
Latrunculina A: 1 mM en DMSO  
Amiloride: 30 mM en DMSO  
Bafilomicina A1: 1 mM en DMSO  
Rapamicina: 1 mM en DMSO  
Wortmanina: 1 mM 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**

Anticuerpo policlonal reactivo contra Tacaribe desarrollado en conejo para inmunofluorescencia.

Anticuerpo monoclonal reactivo contra NP de JUNV: IC06-BE10 para inmunofluorescencia, cedido por el Dr. A. Sánchez (C.D.C., Atlanta, U.S.A.) (Sanchez et al. 1989).

Anticuerpo monoclonal reactivo contra el receptor de transferrina: anti-TfR desarrollados en ratón (Zymed).

Anticuerpo policlonal reactivo contra GFP cedido por el laboratorio del Dr. M. Monte, IQUIBICEN, FCEyN, UBA.

Anticuerpos monoclonales anti- $\alpha$ -tubulina clon B512, Anticuerpo monoclonal reactivo contra LC3B, suero anti-IgG de ratón desarrollado en cabra y anti-IgG de conejo desarrollado en cabra conjugados con fluoresceína (FITC), faloidina-FICT, toxina colérica subunidad A-FICT, MTS (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxyfenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium), obtenidos de Sigma Aldrich. Suero anti-IgG de conejo desarrollado en cabra conjugado con Alexa fluor-555, suero anti-IgG de ratón desarrollado en cabra conjugado con Alexa fluor-568 y transferrina-TRITC fueron obtenidos en Life Technologies. El dextrano acoplado a rojo Texas fue gentilmente cedido por la Dra. Laura Delgui.

### **5) Curvas de crecimiento**

Cultivos de células CHO, TRVb y TRVb1 crecidos en microplacas de 24 pocillos, se infectaron con el TCRV (m.i.= 2). A distintos días p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por el método de UFP en células Vero.

En el caso de las células MEF, también crecidas en microplacas de 24 pocillo, se infectaron con el JUNV (m.i.= 1) y los sobrenadantes se cosecharon a las 24 y 48 hs p.i. para titularlos posteriormente por el método de UFP en células Vero.

### **6) Ensayo de viabilidad celular: Método del MTS**

Para determinar el rango de concentraciones que no resulta tóxico para las células se utilizó el método colorimétrico descrito por Markovic y Zarei (2000). Se crecieron monocapas de células en microplacas de 96 cavidades y se trataron con

distintas concentraciones del compuesto a ensayar y sin el compuesto como control. Luego del tiempo necesario de tratamiento se agregan 10  $\mu$ l de MTS en cada cavidad.

El MTS es reducido por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa originando un subproducto coloreado. Transcurridas 2-3 horas a 37°C se mide la absorbancia en un lector de ELISA a una longitud de onda de 490 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 triplicado.

### **7) Titulación 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 para el JUNV y el TCRV y 2 días para el VSV. 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:

**Título (UFP/ml)**= n° promedio de placas / (dilución utilizada x volumen del inóculo)

### **8) Ensayo de inhibición de rendimiento viral**

Se hicieron crecer monocapas de células CHO, TRVb, TRVb-1 y A549 en microplacas de 24 cavidades y fueron infectadas con el TCRV (m.i.= 2 y 0,2) 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:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times [1 - (\text{Título Sn tratado} / \text{Título Sn control})]$$

### **9) Acción de los compuestos a distintos tiempos**

1 x 10<sup>5</sup> células de las líneas CHO, TRVb, TRVb-1 y A549 fueron incubados con MEM sin suero o con 1,5% de ST conteniendo las distintas concentraciones del compuesto a ensayar, durante distintos tiempos según la droga. Luego del período de pre-tratamiento, se retiró el medio y se realizó la adsorción del TCRV en presencia o ausencia 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.

## 10) Ensayo con virus inactivado

2 x 10<sup>3</sup> de células TRVb-1 crecidas en microplacas de 96 cavidades con Ham's F12 con 10% SFB y geneticina fueron incubadas a 4°C con el anticuerpo reactivo contra el receptor de transferrina humano durante 30 minutos o durante 2 horas con 10000 UFP del JUNV o del TCRV inactivado. Posteriormente, se infectó con el JUNV o con el TCRV en presencia del anticuerpo o del virus inactivado utilizado en el pre-tratamiento durante una hora, a una m.i.=1. Luego de la hora de incubación se retiró el inóculo, las células se lavaron con PBS y se incubaron a 37°C en la estufa de CO<sub>2</sub> durante 24 hs. En ese momento, se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por el método de UFP. Cada ensayo se realizó por triplicado.

## 11) Ensayo de actividad virucida

Para ensayar la actividad virucida del compuesto Amiloride se incubaron suspensiones de 10<sup>5</sup> UFP/ml de TCRV en presencia de diferentes concentraciones del compuesto o MEM sin suero (control) a 37°C durante 1 hora. Una vez transcurrido ese tiempo, las suspensiones se titularon mediante el método de unidades formadoras de placa en células Vero.

## 12) Estudio de la expresión de proteínas

### 12.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Se crecieron monocapas de células sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades. Una vez que las células se adhirieron al cubreobjetos, fueron tratadas o no con distintas concentraciones del compuesto a evaluar durante distintos tiempos

dependiendo del compuesto. Pasado el tiempo de tratamiento fueron infectados con el TCRV (m.i. = 2 y 0,2) o el JUNV (m.i. = 0, 2 y 1) en presencia o ausencia 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. A las 24 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 policlonales reactivos contra el TCRV en una dilución 1:50 y para la IFI de microtúbulos se utilizaron anticuerpos monoclonales anti- $\alpha$ -tubulina en una dilución 1:200 en PBS. En el caso del JUNV se utilizó el anticuerpo monoclonal en una dilución 1:300 en PBS. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario específico durante 30 minutos o 1 hora a 37°C. Pasado ese tiempo se realizaron tres lavados con PBS. Por último se realizó una incubación con suero anti-IgG de conejo o ratón según corresponda, conjugados con fluoresceína o Alexa fluor-555, por 30 minutos a 37°C en una dilución 1:100 o 1:500 respectivamente en PBS. En todos los casos luego de tres lavados con PBS y un lavado final con agua destilada los núcleos fueron teñidos con Hoestch y finalmente los preparados fueron montados 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 10 campos ópticos con un aumento de 100x seleccionados al azar, en los cuales se contaron células positivas y células totales, tomando como control las monocapas infectadas y sin tratar.

### 12.2 Ensayo de internalización

Se crecieron monocapas de células en cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades. Una vez que las células se adherieron fueron infectadas con el TCRV a una m.i.=5. Luego de la hora de adsorción se retiró el inóculo y se incubaron con medio fresco a 37°C durante 3 horas. En ese momento, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con una mezcla de anticuerpos anti-TCRV (1/50) y anti-TfR (1/150) durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído 4% y se permeabilizaron con Tritón X-100. Previo a la incubación con los anticuerpos secundarios (anti-conejo acoplado a FITC para TCRV y anti-ratón acoplado a Alexa fluor-568 para el TfR), se bloqueó con BSA 4% durante toda la noche. Los núcleos fueron teñidos con Hoestch y los preparados fueron montados en una solución tamponada de glicerol con 1,5% de DABCO.

Finalmente las muestras se observaron en el microscopio Olympus BX51 y se determinó el índice de co-localización de Pearson utilizando el programa ImageJ.

### 12.3 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 formaldehido 4% y tritón X-100 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 uso 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  $\mu$ l de esta concentración durante 20 minutos a 37°C. Pasado este tiempo se fijan las células con metanol durante 10 minutos a -20°C.

Cuando se uso la toxina colérica-FICT (Ctx-FICT), previo a la incubación con la misma se realizaron tres lavados con PBS, luego se incubó con los compuestos el tiempo necesario y posteriormente se incubaron esas células con una concentración 0,5  $\mu$ g/ml de Ctx preparada en MEM sin suero, durante 1 hora a 37°C y en oscuridad. Al cabo de este tiempo se realizan tres lavados con PBS y se fija para fluorescencia total con metanol frío.

Para los ensayos con dextrano-rojo Texas (dx), previo a la incubación con la misma se realizaron tres lavados con PBS, luego se incubó con los compuestos el tiempo necesario y se incubaron con 1  $\mu$ g/ml en medio sin suero durante 1 hora. Pasado este tiempo se realizaron 3 lavados con PBS y las células se fijaron con formaldehído 4% y se permeabilizaron con Tritón X-100.

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

### 12.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y western blot (WB)

Las muestras que se utilizaron para las corridas electroforéticas fueron células A549 y MEF infectadas con el JUNV en diferentes condiciones según el experimento. A distintos tiempos p.i. el sobrenadante fue retirado y las monocapas fueron lavadas 3 veces con PBS y lisadas con partes iguales de PBS y PAGE 4X (Tris-HCl 0,5M pH=6,8; glicerol 87%, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol; 0,005% azul de bromofenol; SDS 10%). Antes de ser sembradas fueron hervidas durante 5 minutos. Para la resolución de las proteínas, las muestras obtenidas se sometieron a electroforesis en minigeles desnaturalizantes de poliacrilamida 15% (Tris 1,5 M; pH



8,8 con agregado de SDS 10% utilizando como agentes catalizadores TEMED y persulfato de amonio), con un gel concentrador de poliacrilamida 4% (Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8 y SDS 10% y agentes catalizadores). En los mismos geles se sembraron patrones de peso molecular (PM). La electroforesis se realizó durante 90 minutos a 100 V utilizando como buffer de corrida, Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1%, pH 8,3. Luego se transfirió durante 60 minutos sobre membranas de PVDF (Polyscreen, PerkinElmer Life Sciences Inc.) las cuales habían sido activadas en metanol y estabilizadas con buffer de transferencia (Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, glicina 0,192 M con 20% de metanol). Las transferencias se realizaron con un sistema semiseco LKB, Multiphar, a 45 mA por gel. Luego, las membranas fueron incubadas en leche 5% (solución de bloqueo) durante 1 hora a 37°C para luego ser incubadas con el monoclonal para la LC3 (1:800), policlonal para GFP (1:2000) toda la noche o el anticuerpo anti actina (1:1000) 2 horas a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a lavar las membranas 5 veces durante 5 minutos con TBS-Tween 20 0,1%, para incubarlas nuevamente con un anticuerpo anti inmunoglobulina G de ratón (1:2000) o conejo (1:1000) según corresponda, marcado con peroxidasa en solución de bloqueo durante 1 hora en agitación y oscuridad. Posteriormente, se lavó nuevamente 5 veces durante 5 minutos con TBS-Tween 20 0,1%. Las membranas se revelaron con un sistema de detección quimiolumincente (ECL) durante unos minutos, para ser finalmente reveladas con autoradiografías. Los tiempos de exposición variaron según la intensidad de la luminiscencia.

### **13) Tinción de células vivas con naranja de acridina**

Para corroborar el efecto de la concanamicina A y la dansilcadaverina sobre el pH de las vesículas ácidas intracelulares, se realizaron tinciones de las células con el colorante naranja de acridina. Células CHO, TRVb y TRVb-1 fueron crecidas en

cubreobjetos y tratadas con concanamicina A o dansilcadaverina durante 30 minutos y luego incubadas con 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de naranja de acridina en MEM sin suero durante 15 minutos en presencia de los compuestos. Como control se utilizaron cultivos no tratados con los compuestos. A continuación, las células fueron lavadas tres veces con PBS y los cubreobjetos se montaron en portaobjetos conteniendo una gota de PBS. Los preparados fueron examinados en el microscopio Olympus BX51 en el momento.

### **14) Transfección de células**

Cultivos de células CHO, TRVb y TRVb-1 fueron crecidas en cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades. Cuando alcanzaron aproximadamente un 80% de confluencia fueron transfectadas con las construcciones de los plásmidos que codifican las proteínas salvajes o mutantes dominantes negativas de Eps15, dinamina II, Rab5 o Rab7, fusionadas a la proteína verde fluorescente (GFP). En los ensayos de autofagia, células A549 fueron transfectadas con la construcción LC3 fusionada a EGFP. Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las indicaciones del proveedor: 1 $\mu\text{g}$  de cada preparación de los plásmidos, obtenida utilizando el kit de extracción de DNA plasmídico de Promega, fue diluida en 50  $\mu\text{l}$  de OptiMEM y se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente. Al mismo tiempo se diluyó 1 $\mu\text{l}$  del reactivo Lipofectamina en 50  $\mu\text{l}$  de OptiMEM. Pasados los 10 min de incubación se preparó la mezcla de transfección combinando los 50  $\mu\text{l}$  de la solución conteniendo el ADN con los 50  $\mu\text{l}$  de la solución conteniendo la Lipofectamina. Esta se dejó reposar durante 20 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de ADN-Lipofectamina. Durante el periodo de las incubaciones se reemplazó el medio de cultivos de las células por 300 $\mu\text{l}$  de OptiMEM. Pasados los 20 min de incubación los 100  $\mu\text{l}$  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 tratadas y/o infectadas con el TCRV o el JUNV 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 distintos tiempos post-infección los cultivos tratados, infectados o control sin infectar fueron fijados para IFI citoplasmática con formaldehído 4% y tritón X-100 0,2%. Se realizó la IFI como se indicó anteriormente para el TCRV o el JUNV, pero en este caso los anticuerpos secundarios anti IgG utilizados se encuentran acoplados a Alexa fluor-555, para permitir distinguir las transfecciones con la GFP de la infección que, en este caso, se verá 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.

### 15) Análisis 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. Se utilizó el programa InfoStat para analizar los experimentos mediante un ANOVA de dos factores con contraste de Tukey y se evaluó la normalidad y homogeneidad de varianza con la prueba de Shapiro-Wilkis y Levene respectivamente.

# Resultados

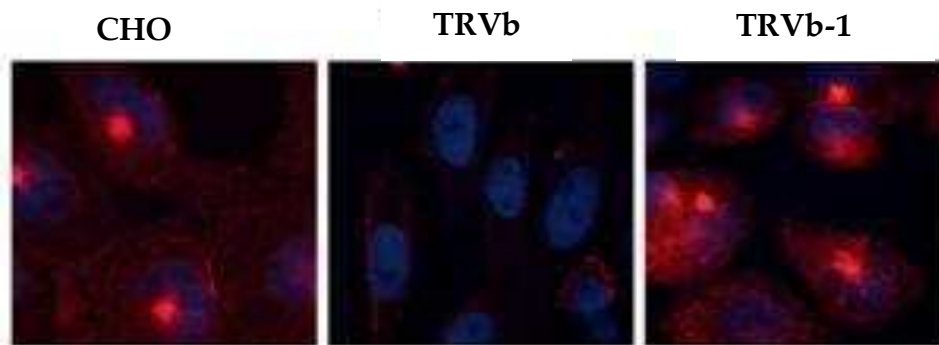


## CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DE ENTRADA DEL VIRUS TACARIBE

## 1) Interacción del virus con las líneas celulares

## 1.1. Detección del receptor de transferrina

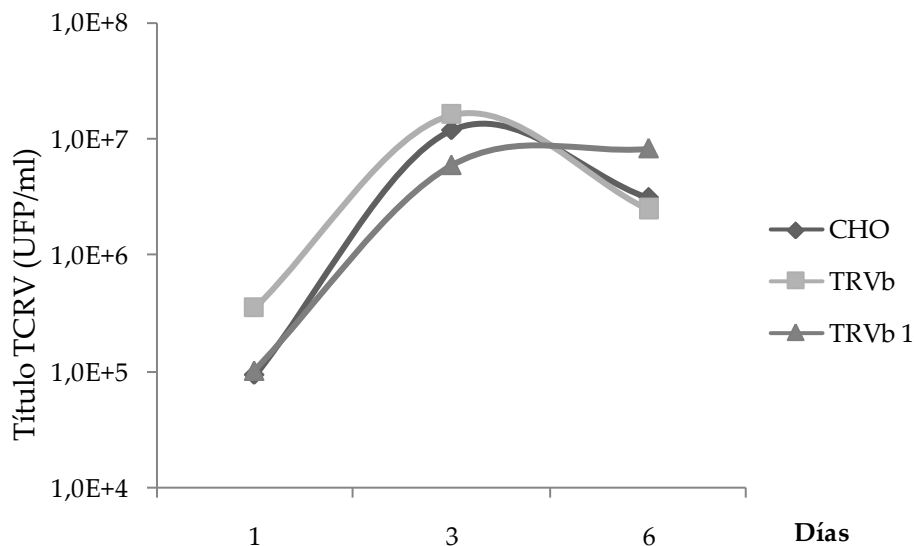
Para llevar a cabo este objetivo, se utilizó un sistema de células que expresan diferencialmente el receptor de transferrina (TfR): la línea CHO expresa el de hámster (endógeno de esta línea), la línea TRVb no expresa ningún tipo de TfR y la línea TRVb-1 expresa el TfR 1 humano (McGraw et al. 1987). En primer lugar se comprobó la presencia o ausencia de los TfRs incubando las diferentes líneas con transferrina acoplada a TRITC (Tfn-TRITC). En la figura 1 se observa que solo la línea TRVb fue incapaz de internalizar la transferrina marcada, tal como era esperado. Este ensayo se realizó en forma periódica para confirmar la expresión o ausencia de dicho receptor.



**Figura 1. Internalización de Tfn-TRITC.** Células CHO, TRVb y TRVb-1 fueron incubadas con 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Tfn-TRITC durante 30 minutos. Posteriormente fueron fijadas con metanol frío, teñidas con Hoetsch y observadas al microscopio de fluorescencia.

## 1.2. Virus Tacaribe en las diferentes líneas utilizadas

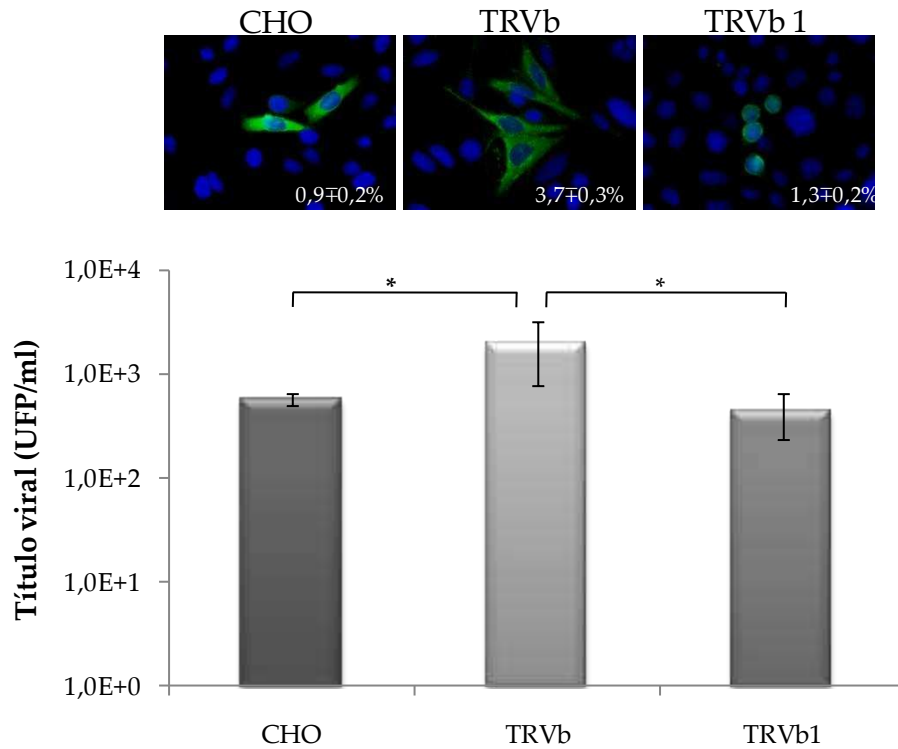
A continuación, se caracterizó la infección del virus Tacaribe (TCRV) en estas líneas realizando una curva de infectividad utilizando la cepa TRLV 11573. Para ello, se infectaron los tres tipos celulares a una multiplicidad de infección (m.i.) de 2 y se cosecharon los sobrenadantes a distintos tiempos para posteriormente titularlos por el método de formación de placa. Como puede observarse en la figura 2, tanto en la línea CHO como en la TRVb se observa una curva de crecimiento gausseana mientras que en la línea TRVb-1 hay un crecimiento más lento, sin poder determinar cuando llega al valor máximo de infectividad.



**Figura 2. Curva de multiplicación del TCRV.** Se cosecharon los sobrenadantes a 1, 3 y 6 días post infección (p.i.) y se titularon por el método de unidades formadoras de placa. Se muestra el promedio de 4 ensayos independientes con su respectivo error estándar.

Debido a que todos los ensayos realizados en este trabajo se analizaron a las 24 hs p.i., se estudió especialmente la diferencia en la infectividad en las tres líneas celulares a dicho tiempo. Como puede observarse en la figura 3, tanto el porcentaje de células infectadas con el TCRV como el título viral es mayor en aquellas células que carecen de la expresión del TfR, las TRVb. En esta figura se muestran los valores

obtenidos a una m.i.=0,2, sin embargo estos mismos resultados fueron encontrados a una m.i.=2.

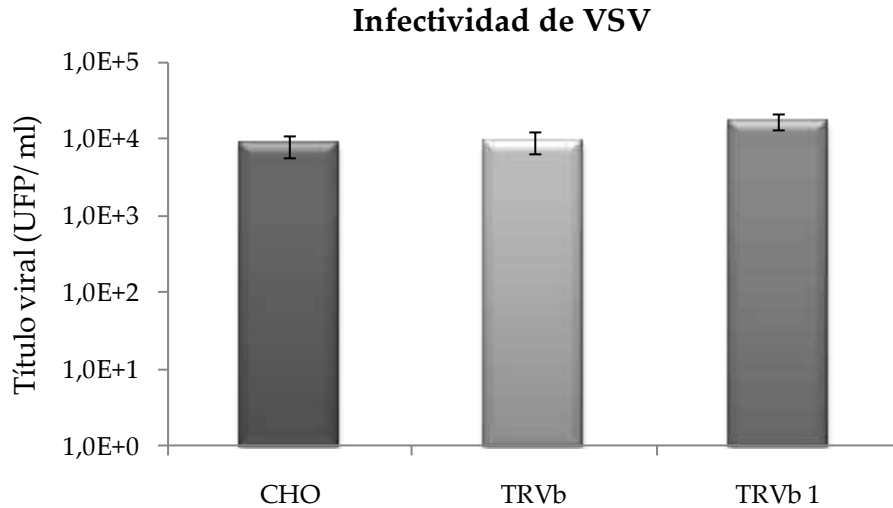


**Figura 3. Infectividad del TCRV a las 24 hs.** Se infectaron las tres líneas celulares con una m.i.=0,2 y se incubaron por 24 hs. En ese momento se cosecharon los sobrenadantes que fueron titulados por el método de UFP y las células se fijaron con metanol frío para IFI (aumento 400x). Se muestra la titulación y la cuantificación de células positivas de tres experimentos independientes (\*p<0,05).

### 1.3. VSV en las diferentes líneas utilizadas

Con el fin de corroborar que la diferencia en la infectividad encontrada se debe únicamente a la diferencia en la expresión del TfR, se realizó la infección de las tres líneas utilizadas con el virus de la estomatitis vesicular (VSV). La elección de este virus se basó en que el mismo no utiliza este receptor para internalizar en las células (Finkelshtein et al. 2013). Se infectaron los tres tipos celulares a una m.i.=0,1 y se cosecharon los sobrenadantes 7 hs p.i. para titularlos por el método de formación de placa. Como puede observarse en la figura 4, no se encontró diferencia en la

producción de partículas infectivas de VSV confirmando que la diferencia en infectividad encontrada con el TCRV se debe a la presencia del hTfR.

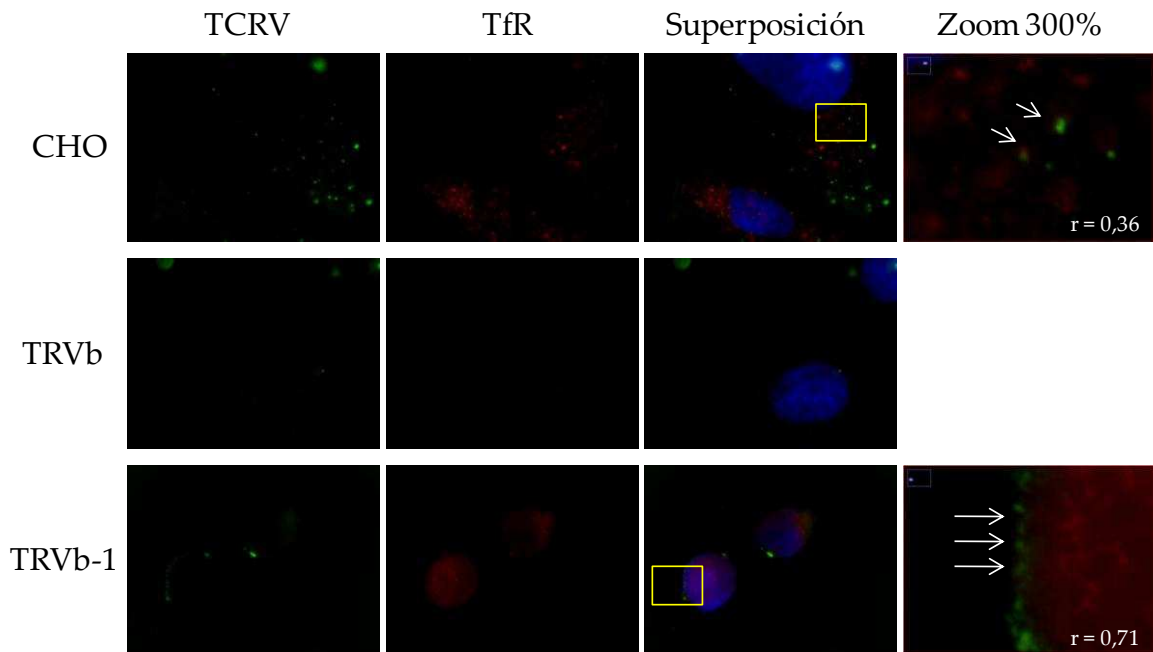


**Figura 4. Infectividad de VSV.** Los sobrenadantes de las células infectadas con VSV se cosecharon a las 7 hs p.i. y se titularon por el método de UFP. Se muestra el promedio de 2 ensayos independientes con su respectivo desvío estándar.

#### 1.4. Efecto del receptor de transferrina en la entrada del TCRV

Debido a que las glicoproteínas del JUNV y del TCRV presentan una alta tasa de similitud (63,5%) (Oldenburg et al. 2007) y que el JUNV utiliza el hTfR, la baja infectividad detectada en aquellas líneas que expresan el TfR podría deberse a un reconocimiento entre dicho receptor y la glicoproteína viral del TCRV; es decir, una unión no efectiva del virus al receptor. Para probar esta hipótesis, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia marcando tanto el virus como el receptor a las 3 hs p.i. Para evaluar el grado de co-localización, se utilizó el test de Pearson utilizando el programa Image J. En la figura 5 puede observarse que en la línea que expresa el hTfR el índice de co-localización es mayor que en las CHO que expresan el de hámster. Esto podría ser un indicio de que el TCRV se puede unir al hTfR pero dicha unión no permite la internalización.

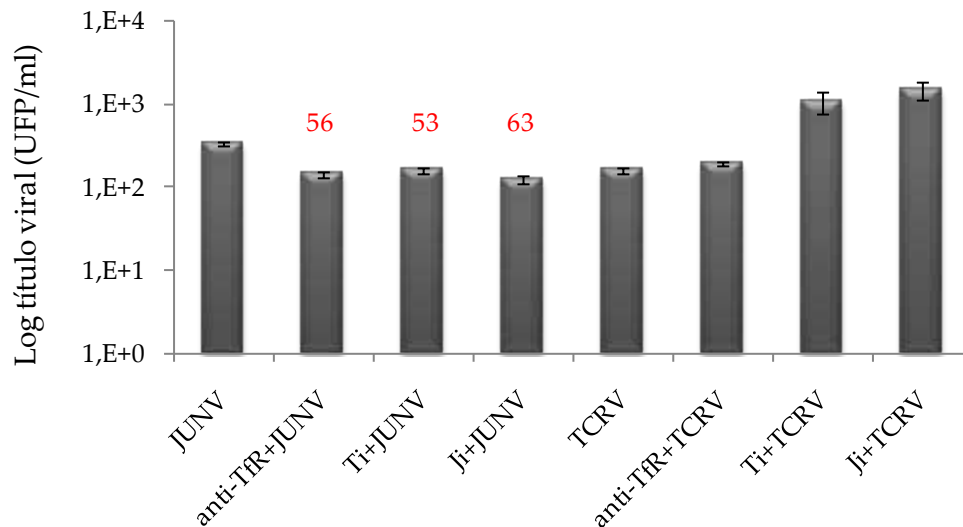




**Figura 5. Localización del TCRV a 3 hs p.i.** Células CHO, TRVb y TRVb-1 crecidas en cubreobjetos se infectaron con una m.i.=5 y 3 hs p.i. se incubaron en presencia del anticuerpo monoclonal anti-Tfn y el anticuerpo policlonal anti-TCRV durante 2 hs a 4°C. Posteriormente se fijaron con formaldehído y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa fluor-568 (para transferrina) y anti-conejo acoplado a FITC (TCRV). Imágenes tomadas en el aumento 1000x. Se muestra zoom de 300% y el valor del coeficiente de colocalización de Pearson,  $r$ .

Para confirmar estos resultados, se realizó un ensayo de infección de células TRVb-1 con el TCRV o el JUNV donde previamente se trató 30 minutos con el anticuerpo reactivo contra el TfR (anti-TfR) o 2 hs con 10000 UFP del JUNV inactivado (Ji) o del TCRV inactivado (Ti) y como control se utilizó MM. Todas las incubaciones se realizaron a 4°C. Posteriormente se infectó con el TCRV o el JUNV a una m.i. de 1 en presencia del anti-TfR o del virus inactivado correspondiente durante 1 hora a 37°C. Luego de la hora de infección se lavaron las células y se incubaron con medio fresco hasta 24 hs p.i., momento en el cual se cosecharon los sobrenadantes para titularlos por el método de UFP. Como puede observarse en la figura 6, la infección con el JUNV disminuyó tanto en presencia del anti-TfR como en presencia del Ti y del Ji. En cuanto a la infección con el TCRV, la misma se vio levemente incrementada en presencia del anti-TfR pero fue 7 y 9 veces mayor en presencia del Ti y el Ji respectivamente. Si bien era esperable una diferencia mayor

en el ensayo con el anti-TfR, estos resultados podrían confirmar que es el hTfR el que disminuye la entrada del TCRV en esta línea celular.

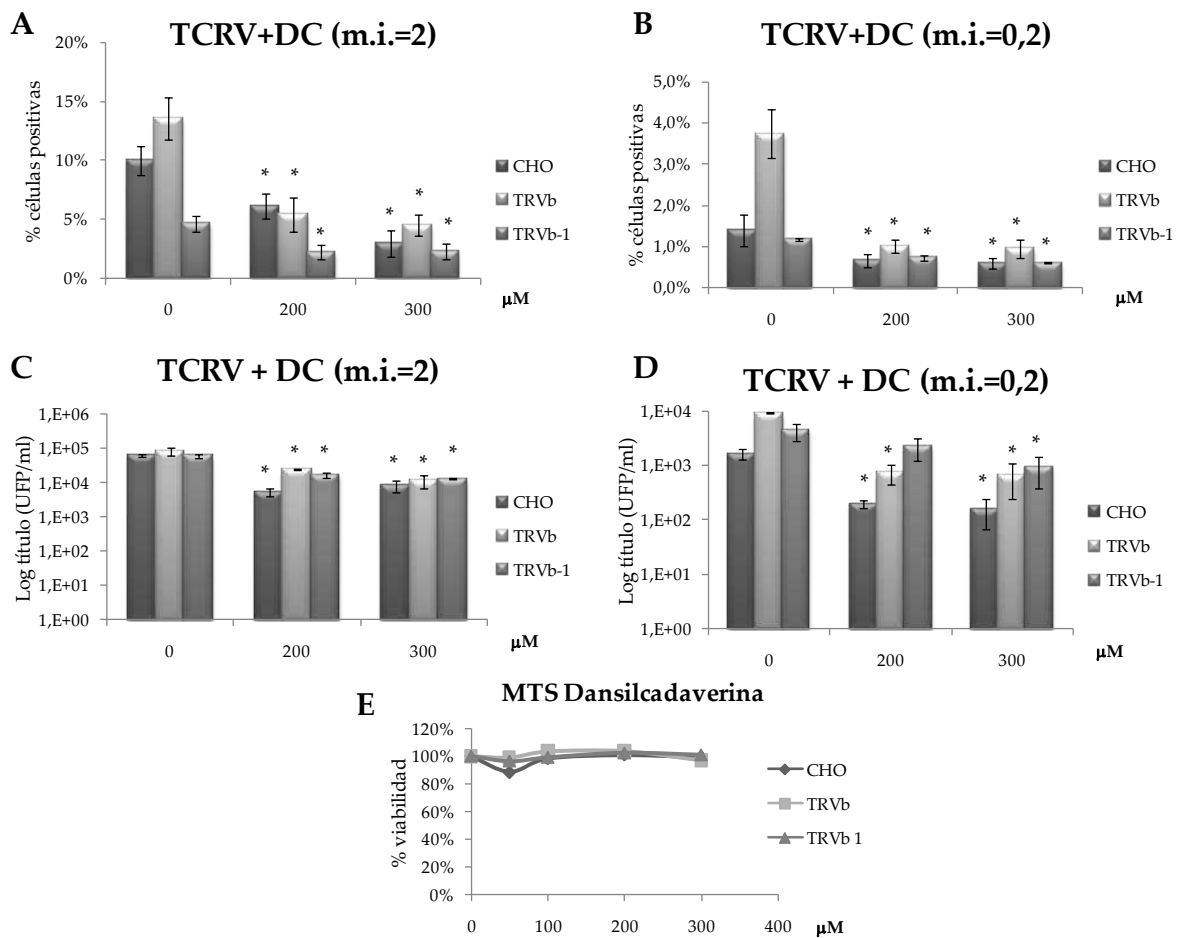


**Figura 6. Infectividad del TCRV luego de bloquear el hTfR.** Células TRVb-1 fueron incubadas en MM (JUNV y TCRV), en presencia del anticuerpo monoclonal anti-Tfn (anti-TfR) durante 30 min o en presencia del JUNV o del TCRV inactivado (Ji y Ti respectivamente) durante 2 hs a 4°C. Posteriormente se infectó con el JUNV o con el TCRV en presencia del medio de pre-tratamiento correspondiente durante 1 hora a 37°C (m.i.=1). Los sobrenadantes se cosecharon 24 hs p.i. y se titularon por el método de UFP. En rojo se muestra el porcentaje de inhibición.

## 2) Participación del pH endosomal

Para establecer la vía endocítica utilizada por el TCRV, se evaluó en primer lugar el efecto del aumento del pH endosomal. 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 et al. 1994). Debido a que en células CHO, TRVb y TRVb-1 no se caracterizó la entrada del TCRV, utilizamos compuestos lisosomotrópicos para verificar la dependencia del pH en este sistema celular. La dansilcadaverina (DC) es una base débil por lo cual puede captar protones de los compartimentos ácidos, generando una disrupción del gradiente de pH entre el compartimento ácido y el citoplasma (Pérez y Carrasco

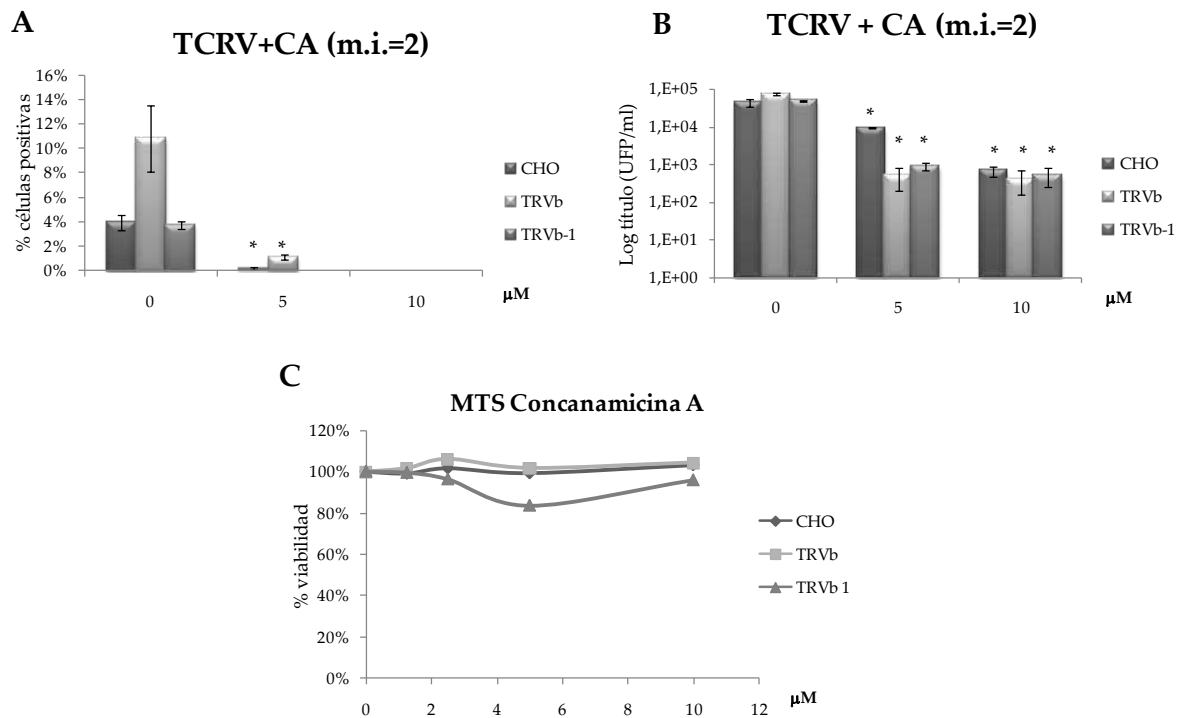
1993). Células CHO, TRVb y TRVb-1 fueron incubadas con diferentes concentraciones de DC durante 30 minutos, momento en el cual se infectaron en presencia de la misma concentración de la droga (m.i.=2 y 0,2). Luego de la hora de infección, las células fueron lavadas 3 veces con PBS y se incubaron con medio fresco durante 24 hs. Transcurrido este tiempo, se cosecharon los sobrenadantes para su posterior titulación y se fijaron las células para IFI citoplasmática. Como se puede observar en la figura 7, la DC inhibió tanto el porcentaje de células positivas como el título viral en las tres líneas y con las 2 multiplicidades de infección. Se muestra también el porcentaje de viabilidad obtenido mediante la técnica de MTS confirmando que las concentraciones utilizadas no resultaron tóxicas para las células.



**Figura 7.** Efecto de la CD en las células CHO, TRVb y TRVb-1. Se trataron los cultivos con CD y luego de 30 min se infectó con el TCRV en presencia del compuesto con 2 multiplicidades distintas.

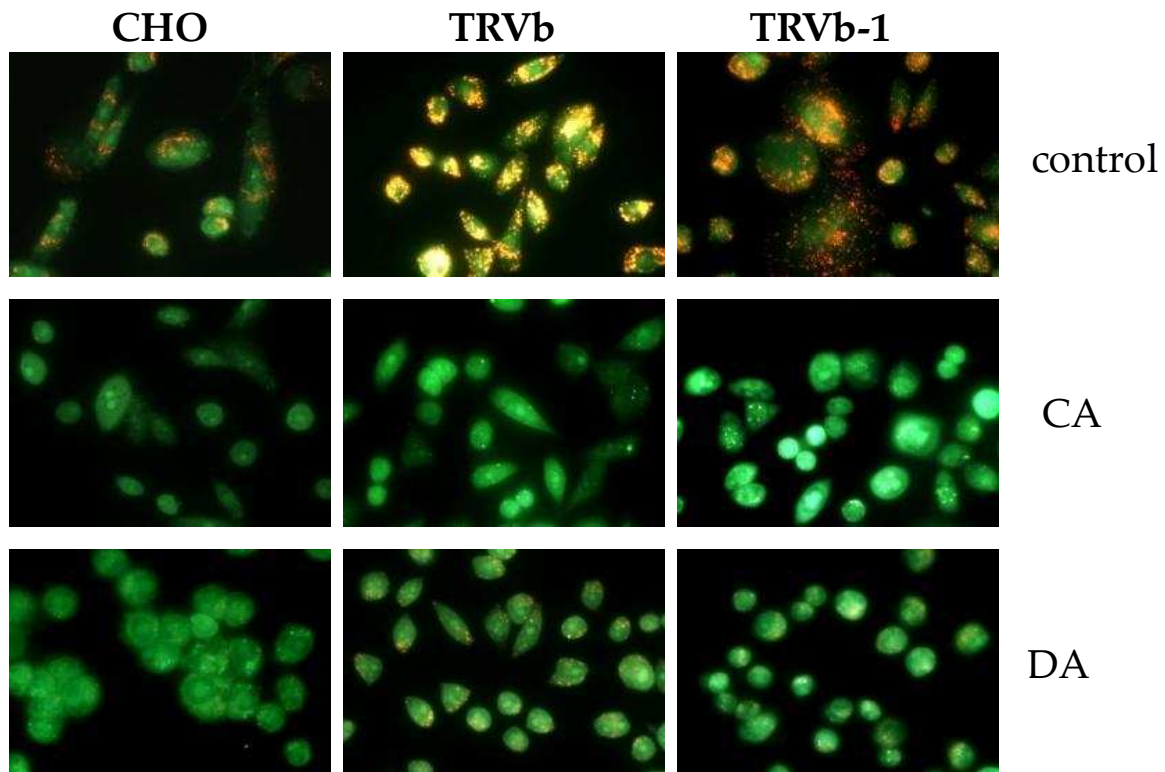
Las células se procesaron para IFI (A y B) y los sobrenadantes se titularon por el método de UFP como se detalla en materiales y métodos (C y D). En las IFIs se cuantificaron al menos 5 campos en el aumento 100x (media  $\pm$  SE, \* $p < 0,05$ ). El porcentaje de viabilidad se determinó por MTS y cada punto se realizó por triplicado (E).

La concanamicina A (CA) es un nacrólido inhibidor selectivo de la bomba H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar, provocando así la pronta basificación de los compartimentos ácidos (Muroi et al. 1993). Células CHO, TRVb y TRVb-1 fueron incubadas con diferentes concentraciones de CA durante 30 minutos, momento en el cual se infectó en presencia de la misma concentración de la droga (m.i.=2). Luego de la hora de infección, las células fueron lavadas para sacar el excedente de compuesto e incubadas con medio fresco durante 24 hs. Transcurrido este tiempo, se cosecharon los sobrenadantes para su posterior titulación y se fijaron las células para IFI citoplasmática como se describe en materiales y métodos. En la figura 8 se observa que la CA inhibió tanto el porcentaje de células positivas como el título viral en las tres líneas. Este ensayo se realizó con una sola m.i porque la inhibición observada fue muy alta. Se muestra también el porcentaje de viabilidad obtenido mediante la técnica de MTS para confirmar que las concentraciones utilizadas no fueron tóxicas para las células.



**Figura 8. Efecto de la CA en las células CHO, TRVb y TRVb-1.** Se trató con CA y se infectó con el TCRV en presencia del compuesto. Las células se procesaron para IFI (A) y los sobrenadantes se titularon por el método de UFP como se detalla en materiales y métodos (B). En las IFIs se cuantificaron al menos 5 campos en el aumento 100x (media  $\pm$  SE, \* $p < 0,05$ ). El porcentaje de viabilidad se determinó por MTS y cada punto se realizó por triplicado (C).

Para corroborar el efecto de la DC y de la CA, se utilizó el compuesto naranja de acridina ya que el mismo presenta un color verde a pH básico y naranja a pH ácido (Palmgren 1991). Células CHO, TRVb y TRVb-1 se trataron con los compuestos y luego se incubaron con 1  $\mu\text{g/ml}$  de naranja de acridina durante 15 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se montaron los vidrios en una gota de PBS y se observaron al microscopio. Como se puede observar en la figura 9, en presencia de los compuestos prácticamente no se observan compartimentos ácidos, es decir, que ambos compuestos tienen efecto lisosomotrópico, como era esperado.



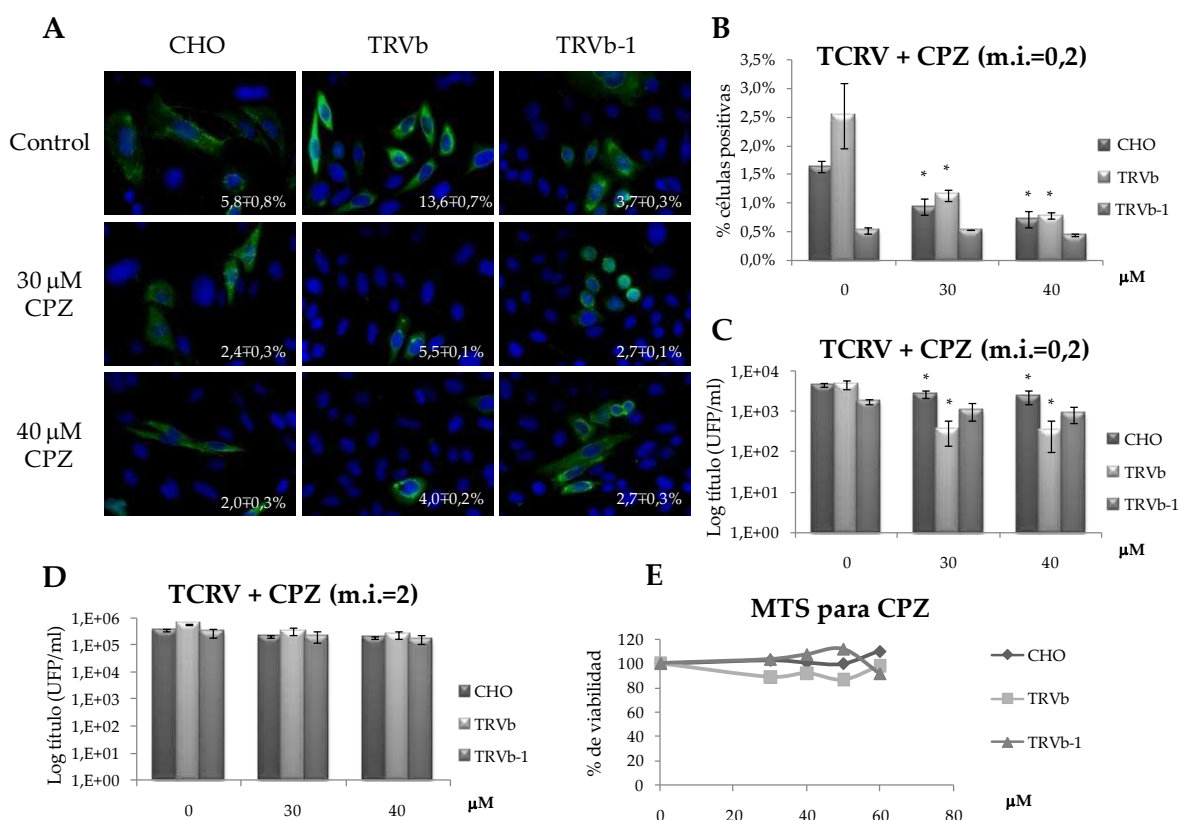
**Figura 9. Efecto de la CA y la CD el pH endosomal.** Células CHO, TRVb y TRVb-1 fueron incubadas 30 minutos con CA y CD y sus respectivos controles fueron incubaciones con MEM. Trascorrido ese tiempo, se incubaron con naranja de acridina durante 15 minutos en estufa y luego se observaron las células al microscopio (aumento 400x).

### 3) Rol de la endocitosis dependiente de clatrina

#### 3.1. *Inhibición farmacológica*

Para evaluar la participación de la vía endocítica dependiente de clatrina, se utilizó en primer lugar, un compuesto que inhibe específicamente dicha vía. La clorpromacina (CPZ) desestabiliza la red de clatrina subyacente a la membrana plasmática, previniendo así la formación de la vesícula (Wang et al. 1993). Las células fueron tratadas durante 2 horas con distintas concentraciones del compuesto y, luego de este tiempo, fueron infectadas con distintas m.i. del TCRV en presencia

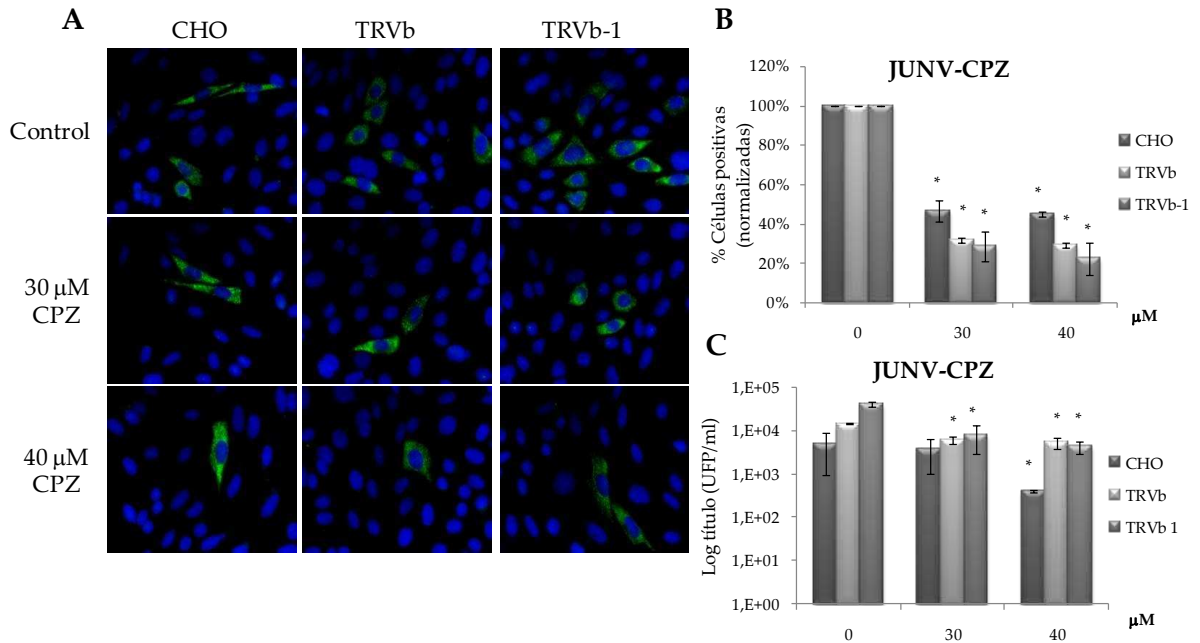
del compuesto durante 1 hora. Una vez retirado el inóculo se agregó medio fresco y se incubó a 37°C durante 24 hs, momento en el que se cosecharon los sobrenadantes y se fijaron las células para IFI (ver materiales y métodos). En la figura 10 se muestra el resultado de viabilidad obtenido por MTS y se observa que para ambas multiplicidades, la CPZ inhibió significativamente la endocitosis en las líneas CHO y TRVb (disminuyó tanto el número de células infectadas como el título) pero no en las TRVb-1.



**Figura 10. Efecto de CPZ en la entrada del TCRV en CHO, TRVb y TRVb-1.** Se muestran las fotos de inmunofluorescencia con el porcentaje de células infectadas (A, aumento 400x, m.i.=2) y el gráfico de titulación correspondiente (D). Las figuras B y C corresponden al gráfico de cuantificación correspondiente a la IFI y el gráfico de la titulación respectivamente (media ± SE, \*p<0,05). Por último, se muestra el gráfico de viabilidad obtenido por la técnica de MTS (E).

Para corroborar que el efecto de la CPZ es efectivamente el de inhibir la internalización mediante la endocitosis por clatrina, se realizaron infecciones con el JUNV ya que está descripto que en diferentes cultivos celulares, la vía principal de

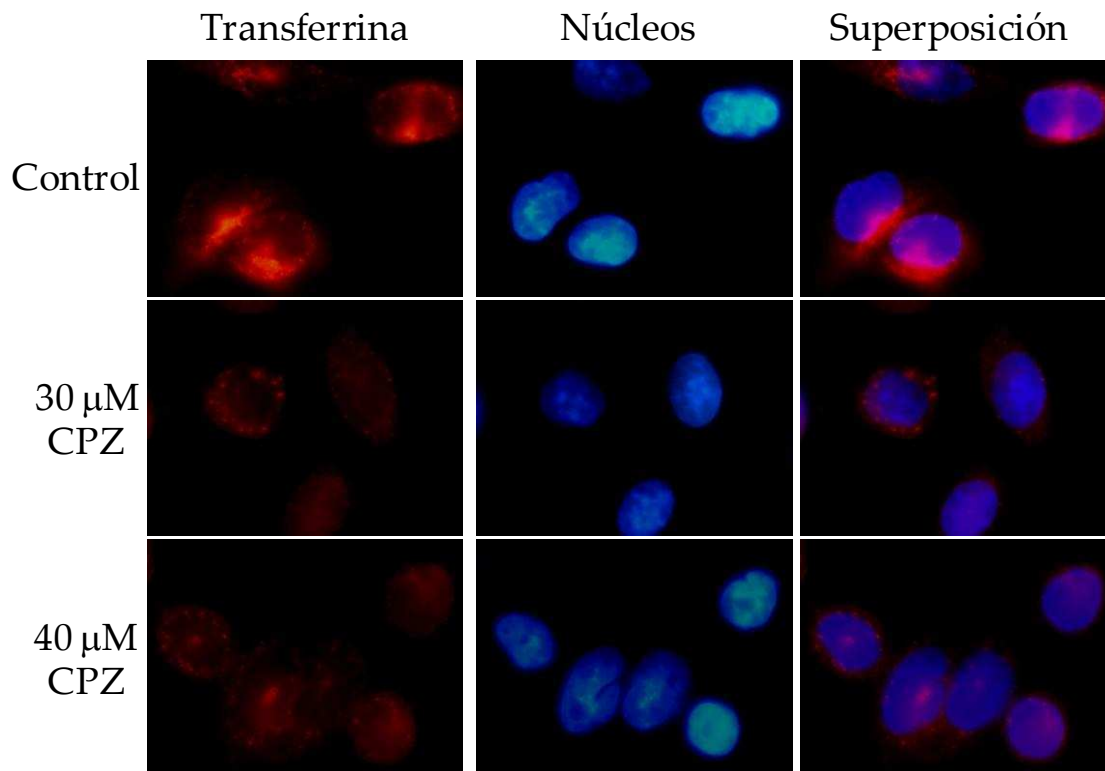
entrada de este virus es la dependiente de clatrina (Martinez et al. 2007). La metodología empleada fue la misma que con el TCRV y se utilizó una m.i.=2. En la figura 11 se observa que las tres líneas, CPZ inhibió significativamente tanto el porcentaje de células infectadas como la producción viral.



**Figura 11. CPZ inhibe la infección del JUNV.** Células CHO, TRVb y TRVb-1 fueron tratadas con CPZ e infectadas con el JUNV. Se muestran imágenes representativas de la IFI (A, aumento: 400x) y su respectiva cuantificación (B). Se cuantificaron al menos 10 campos para cada ensayo y se calculó el porcentaje de células positivas respecto del total. Los sobrenadantes se titularon por el método de UFP como se detalla en materiales y métodos (C) (media  $\pm$  SE, \* $p < 0,05$ ).

Como último control, se utilizó transferrina acoplada a TRITC pero solo en la línea TRVb-1 ya que es la línea que sobreexpresa dicho receptor y es la que no presenta inhibición en la infectividad del TCRV. En la figura 12 puede observarse que las concentraciones utilizadas de CPZ disminuyeron la internalización de la transferrina marcada.





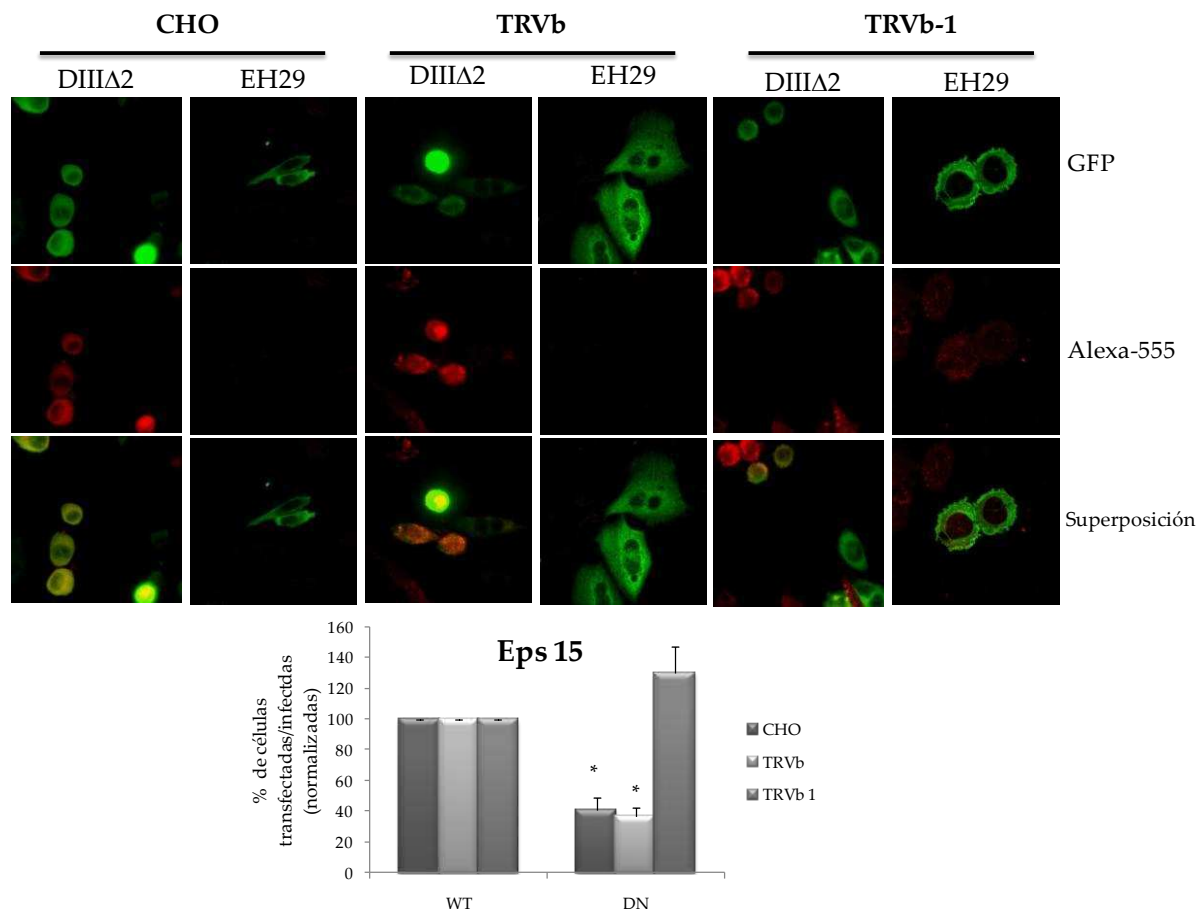
**Figura 12. CPZ disminuye la internalización de transferrina.** Células TRVb-1 fueron incubadas CPZ o MM (control) durante 2 horas y posteriormente incubadas con Tfn-TRITC en presencia o ausencia (control) del compuesto durante 15 minutos. Imágenes tomadas en microscopio de fluorescencia (1000x).

### 3.2. Participación de la proteína celular Eps-15 en la entrada del TCRV

Se utilizó la expresión de proteínas dominantes negativas como inhibidores moleculares específicos para confirmar la entrada del TCRV 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 et al. 1998). Se realizaron infecciones con el TCRV 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) (Benmerah et al. 1999). Con este fin se transfectaron transientemente células CHO, TRVb y TRVb-1 con cada una de las construcciones y, a las 24 hs post transfección las células fueron infectadas con el TCRV 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 los antígenos virales. Como se observa en la figura 13, panel A, las células transfectadas con GFP-DIIIΔ2 mostraron un patrón de infección citoplasmático y puntillado, 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 el TCRV en células CHO y TRVb, proporcionando mas evidencia sobre la dependencia del camino de entrada dependiente de clatrina para la internalización del TCRV en esas líneas celulares. Como control del efecto de la mutante Eps-15 EH29 se transfectaron células con las proteína control o la dominante negativa y a las 24 hs post transfección se infectaron durante 60 min con el JUNV. Se analizó la infección del JUNV por IFI observando

una disminución de la infectividad en las tres líneas transfectadas con la construcción dominante negativa Eps-15 EH29.

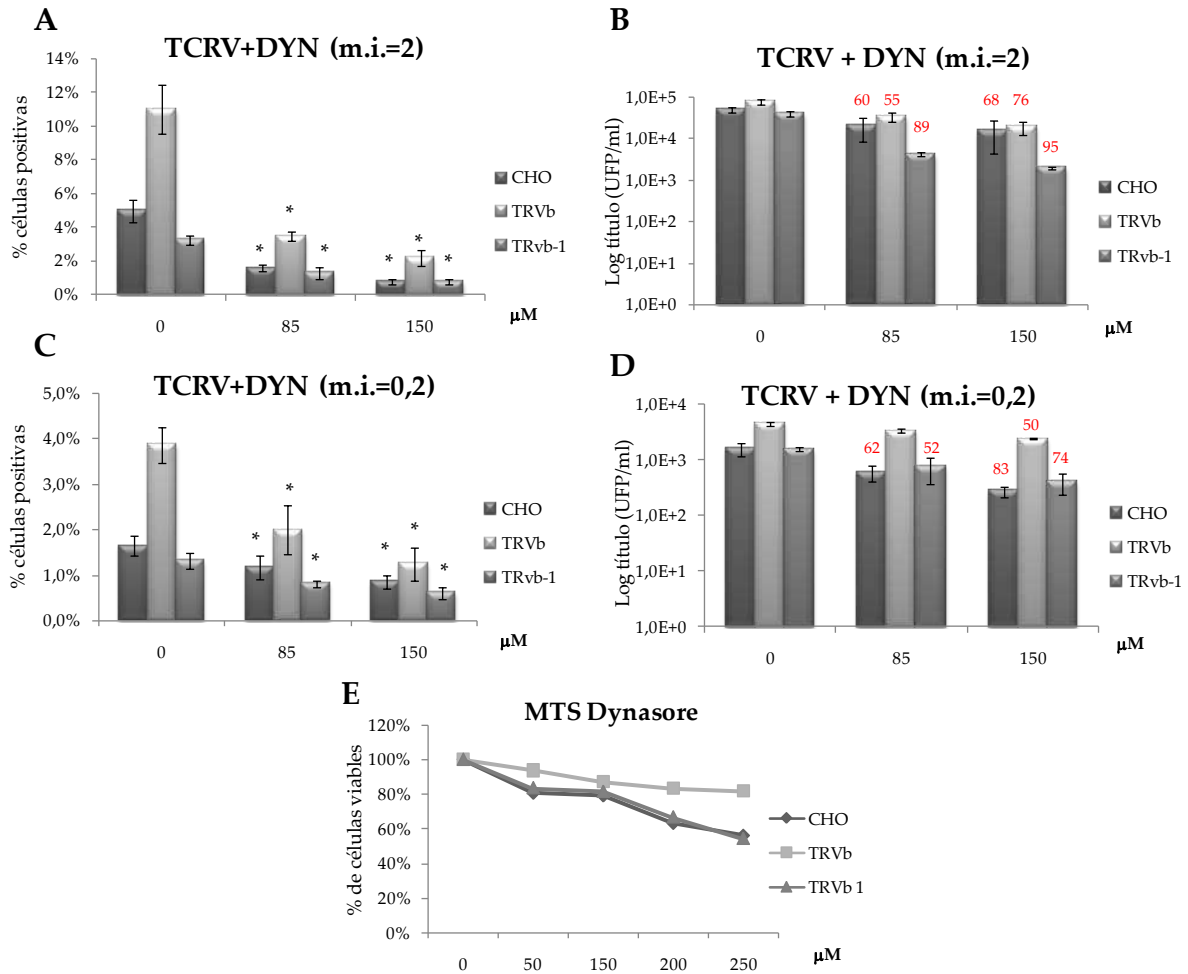


**Figura 13. Rol de la Eps-15 en la entrada del TCRV en células CHO, TRVb y TRVb-1.** Las células fueron transfectadas con la forma control de la Eps-15 (DIIIΔ2) o su mutante dominante negativa (EH29). 24 h post transfección, las células fueron infectadas con el TCRV. Luego de 24 hs las células fueron fijadas y la infección se analizó por inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo policlonal y un anticuerpo anti-conejo secundario conjugado a Alexa fluor-555 (rojo). La cuantificación de los datos se muestra en el gráfico. 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 (media normalizada  $\pm$  ES, \* $p < 0,05$ ).

## 4) Participación de la proteína dinamina en la entrada de TCRV

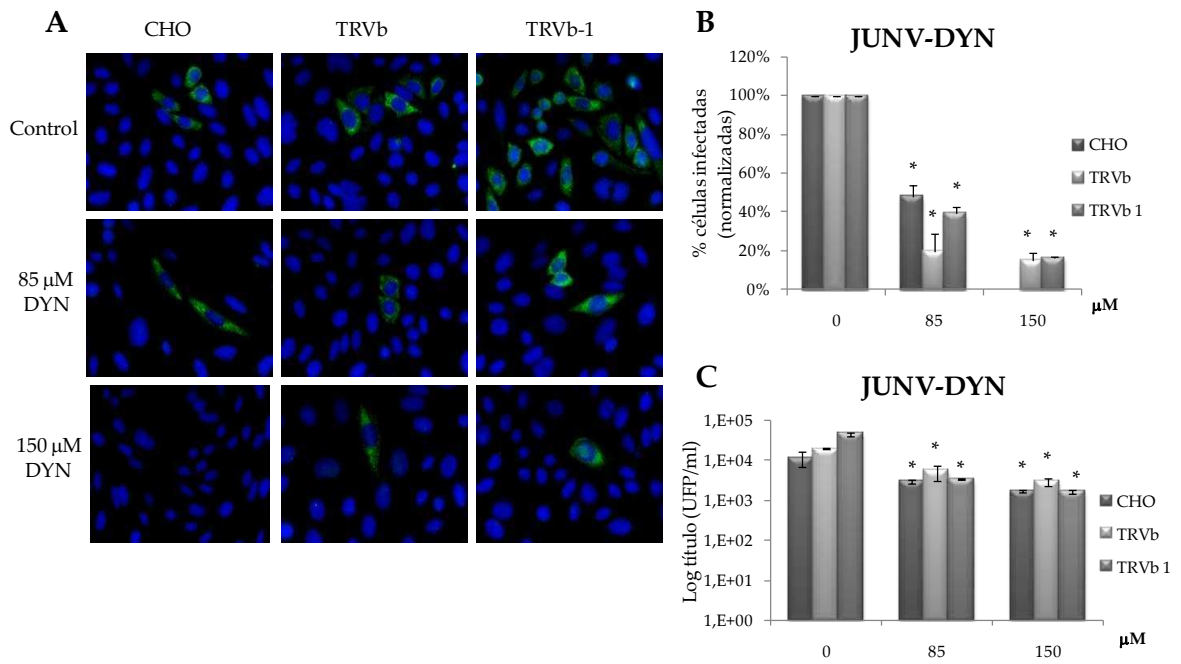
### 4.1. Inhibición farmacológica

Se continuó el estudio de las proteínas celulares involucradas en el proceso endocítico del TCRV, analizando la dependencia de la GTPasa celular dinamina II (Din II). Existen 3 genes en células de mamíferos que codifican para la Din I, II y Drp1 respectivamente (Kirchhausen 2009). 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 et al. 1994). Ha sido previamente demostrado que la Din I participaría de funciones neuronales específicas, como el reciclaje sináptico, mientras que Din II media la internalización convencional por clatrina y por caveolas (Gray et al. 2003; Henley et al. 1998), y Drp1 es la dinamina mitocondrial. Dynasores (DYN) es una molécula pequeña, permeable a la membrana celular que inhibe la actividad GTPasa de Din II en forma no competitiva bloqueando así, la endocitosis dependiente de dicha proteína. Células CHO, TRVb y TRVb-1 fueron tratadas con distintas concentraciones de dynasore en medio sin suero durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se infectó con el TCRV (m.i.= 0,2 y 2) en presencia de las mismas concentraciones del compuesto durante una hora. Transcurrido el tiempo de infección, se lavaron las células tres veces para sacar los restos de compuesto y virus no adsorbido y se incubaron a 37°C durante 24 hs, pasado ese tiempo se cosecharon los sobrenadantes y las células se fijaron como se detalla en materiales y métodos para IFI citoplasmática. En la figura 14 se observa que el compuesto inhibió la internalización del virus en los tres tipos celulares y a las 2 multiplicidades ensayadas, demostrando que la entrada del TCRV es dependiente de esta proteína.



**Figura 14.** DYN inhibe la entrada del TCRV en células CHO, TRVb y TRVb-1. Se trataron los cultivos con dynasore y se infectó con el TCRV en presencia del compuesto con 2 multiplicidades distintas. Las células se procesaron para IFI (A y C) y los sobrenadantes se titularon por el método de UFP como se detalla en materiales y métodos (B y D, en rojo se muestran los porcentajes de inhibición). En las IFIs se cuantificaron al menos 5 campos en el aumento 100x (media ± SE, \*p<0,05). La viabilidad celular se evaluó por el método de MTS realizando cada punto por triplicado (E).

Para corroborar que el efecto del dynasore es efectivamente el de inhibir la internalización dependiente de la proteína dinamina, se realizaron infecciones con el JUNV ya que está descrito que en diferentes cultivos celulares, la vía principal de entrada es dependiente de dicha proteína (Martinez et al. 2009). No se utilizó transferrina marcada como control ya que la línea TRVb carece de dicho receptor. La metodología empleada fue la misma que con el TCRV y se utilizó una m.i.=2. En la figura 15 se observa que en las tres líneas, dynasore inhibió significativamente tanto el porcentaje de células infectadas como el título viral.



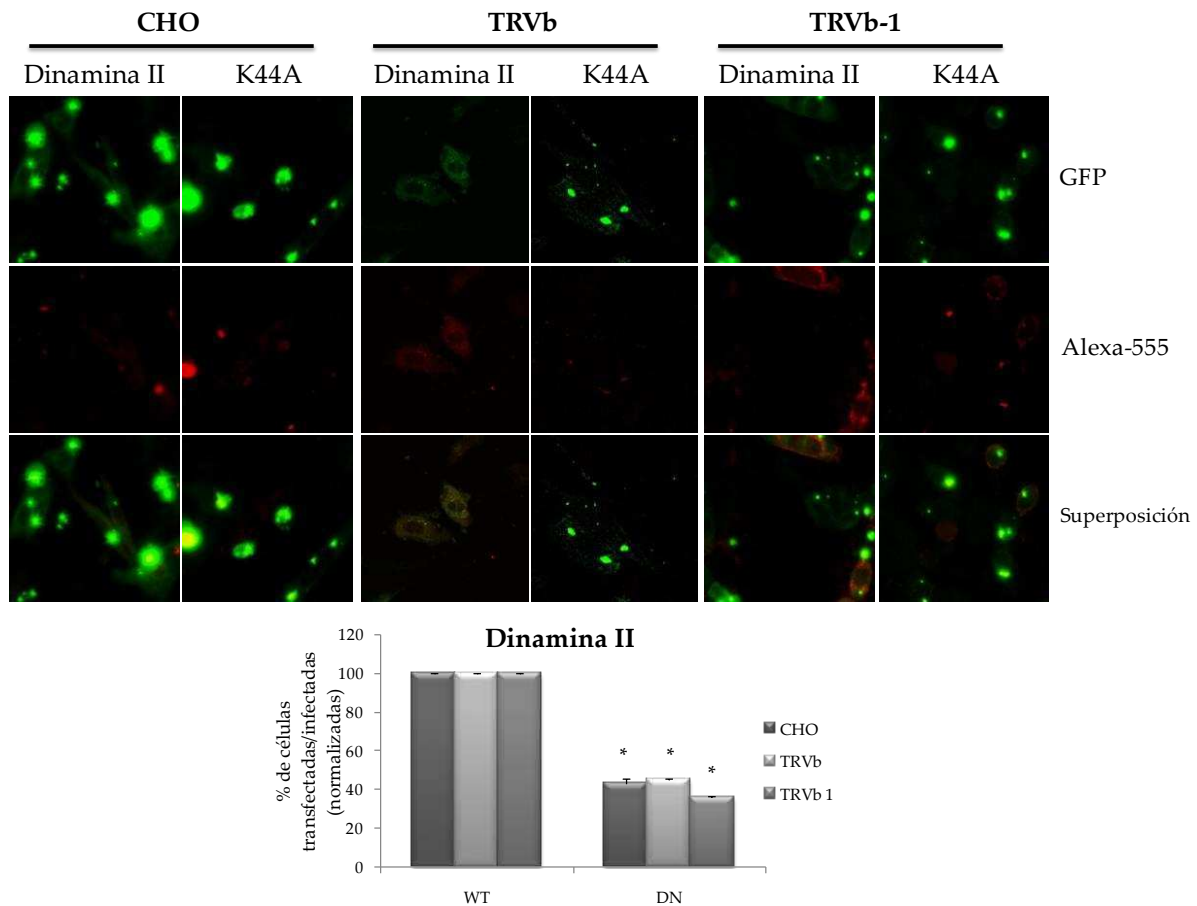
**Figura 15. DYN inhibe la entrada del JUNV.** Células CHO, TRVb y TRVb-1 fueron tratadas con DYN e infectadas con el JUNV. Se muestran imágenes representativas de la IFI (A, aumento: 400x) y su respectiva cuantificación normalizada con el control (B). Se cuantificaron al menos 10 campos para cada ensayo y se calculó el porcentaje de células positivas respecto del total. Los sobrenadantes se titularon por el método de UFP como se detalla en materiales y métodos (C) (media  $\pm$  SE, \* $p < 0,05$ ).

#### 4.2. Rol de la proteína celular dinamina-II en la entrada del TCRV

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 Blik et al. 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 para 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 dicha proteína (Damke et al. 1994). Se transfectaron células CHO, TRVb y TRVb-1 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 el TCRV, 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 los antígenos virales. Como se observa en la figura 16, las células transfectadas con Din II salvaje mostraron un patrón de infección citoplasmático 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 el TCRV, indicando la necesidad de esta proteína celular para la correcta internalización del virus. Como control del efecto de la mutante K44A se analizó la infección del JUNV en células transfectadas. El JUNV fue correctamente internalizado en las células transfectadas con el plásmido control de la dinamina, mientras que su infección se encuentra afectada en las células que expresan la proteína dominante negativa K44A.



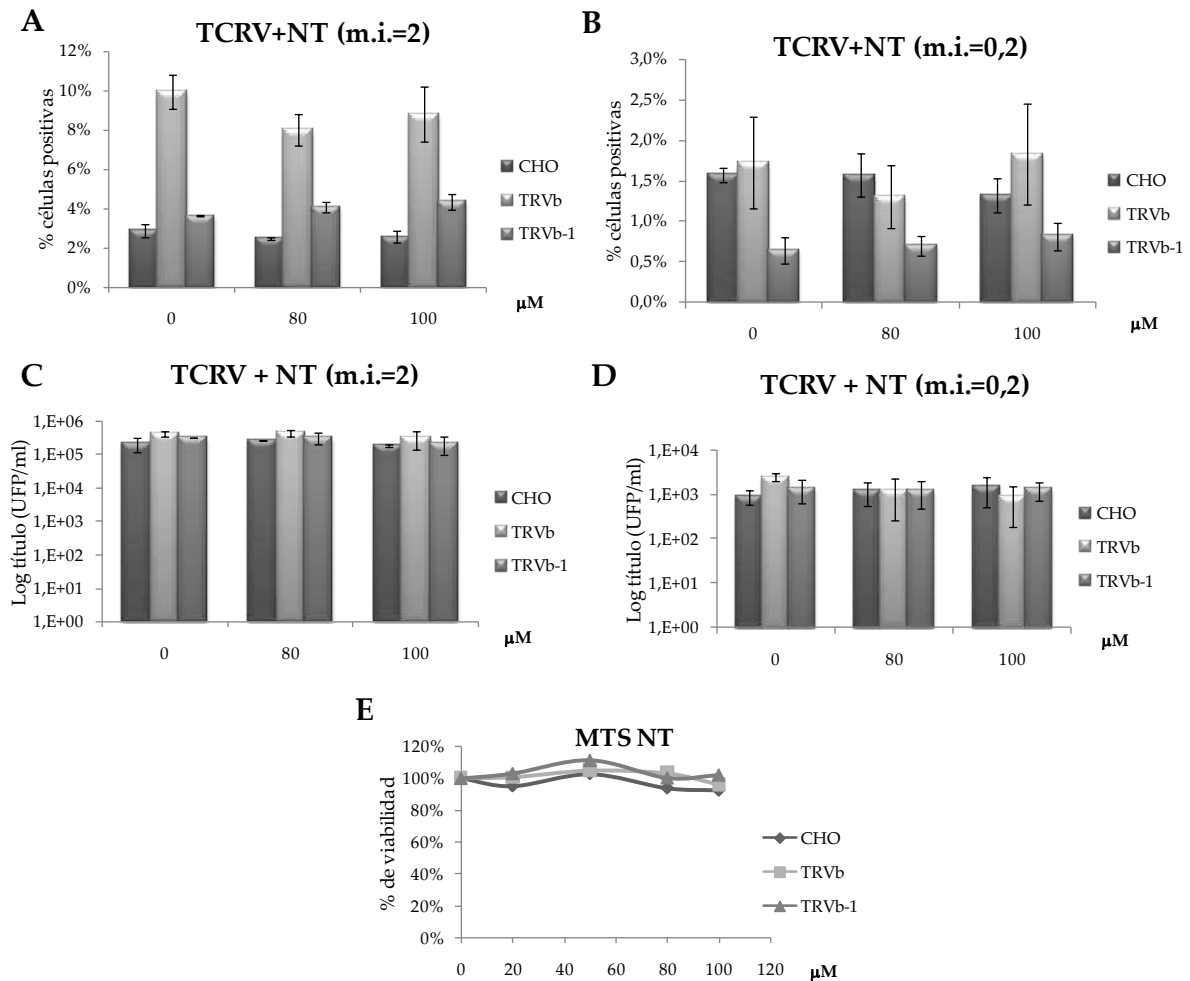
**Figura 16. Rol de la Dinamina II en la entrada del TCRV en células CHO, TRVb y TRVb-1.** Las células fueron transfectadas con la forma control de la Din II o su mutante dominante negativa K44A. 24 h post transfección, las células fueron infectadas con el TCRV. Luego de 24 hs las células fueron fijadas y la infección se analizó por inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo policlonal contra el TCRV y un anticuerpo anti-conejo secundario conjugado a Alexa fluor-555 (rojo). La cuantificación de los datos se muestra en el gráfico. 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 (media normalizada  $\pm$  SE).

## 5) Rol de la endocitosis dependiente de colesterol

Hay evidencia que algunos arenavirus tanto del viejo mundo como del nuevo mundo, requieren del colesterol en la membrana celular para poder entrar en la célula (Vela et al. 2007). Para determinar si el TCRV utiliza una vía dependiente de colesterol, se trataron las células CHO, TRVb y TRVb-1 con los compuestos nistatina (NT) y metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD). La NT es un antifúngico que se une al



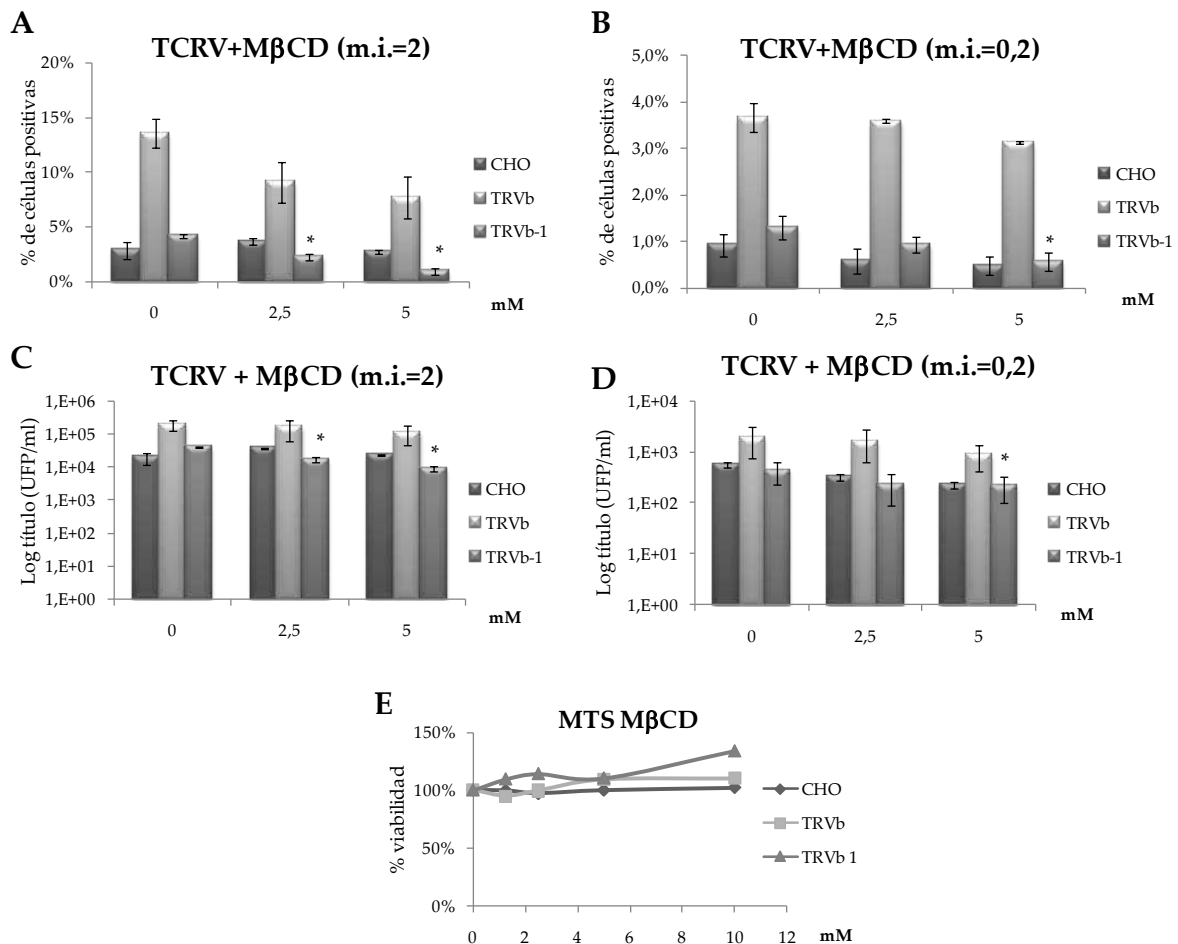
colesterol de la membrana plasmática formando complejos pero la cantidad de colesterol en la membrana no se modifica mientras que la M $\beta$ CD pertenece a una familia de compuestos que debido a la presencia de una cavidad relativamente hidrofóbica puede extraer el colesterol de la membrana celular (Chen et al. 2011; Zidovetzki y Levitan 2007). Células CHO, TRVb y TRVb-1 fueron lavadas con medio sin suero para luego ser incubadas con distintas concentraciones de NT diluido en medio sin suero durante 2 hs. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el inóculo y las células se lavaron 3 veces con medio sin suero para sacar el remanente de compuesto. Posteriormente se infectaron con el TCRV (m.i.=2 y 0,2) durante 1 hora, pasado ese tiempo se retiró el inóculo, se agregó medio fresco y se incubaron en estufa a 37°C durante 24 hs, momento en el cual se cosecharon los sobrenadantes para titularlos y las células se procesaron para IFI como se detalla en materiales y métodos. Como se muestra en la figura 17, ninguna de las concentraciones de NT tuvo efecto sobre la cantidad de células infectadas o sobre la producción viral en ninguna de las tres líneas ensayadas. Se muestra también el gráfico de viabilidad obtenido mediante la técnica de MTS para corroborar que las concentraciones ensayadas no son tóxicas.



**Figura 17. Efecto de la NT en las células CHO, TRVb y TRVb-1.** Se trataron los cultivos con NT y se infectó con el TCRV en ausencia del compuesto con 2 multiplicidades distintas. Las células se procesaron para IFI (A y B) y los sobrenadantes se titularon por el método de UFP como se detalla en materiales y métodos (C y D). En las IFIs se cuantificaron al menos 5 campos en el aumento 100x (media ± SE, \*p<0,05). El porcentaje de viabilidad se determinó por MTS y cada punto se realizó por triplicado (E).

La MβCD es un oligosacarido cíclico pequeño con un núcleo hidrofóbico que de manera selectiva y rápida extrae el colesterol de la membrana. De esta manera, bloquea la endocitosis dependiente de la presencia de colesterol, como lo es la entrada dependiente de caveola o *lipid-rafts* (Rodal et al. 1999). Células CHO, TRVb y TRVb-1 se lavaron con medio sin suero para poder incubarlas durante 30 min con distintas concentraciones de este compuesto. Debido a que la MβCD tiene actividad virucida, luego de la incubación las células fueron lavadas exhaustivamente 3 veces

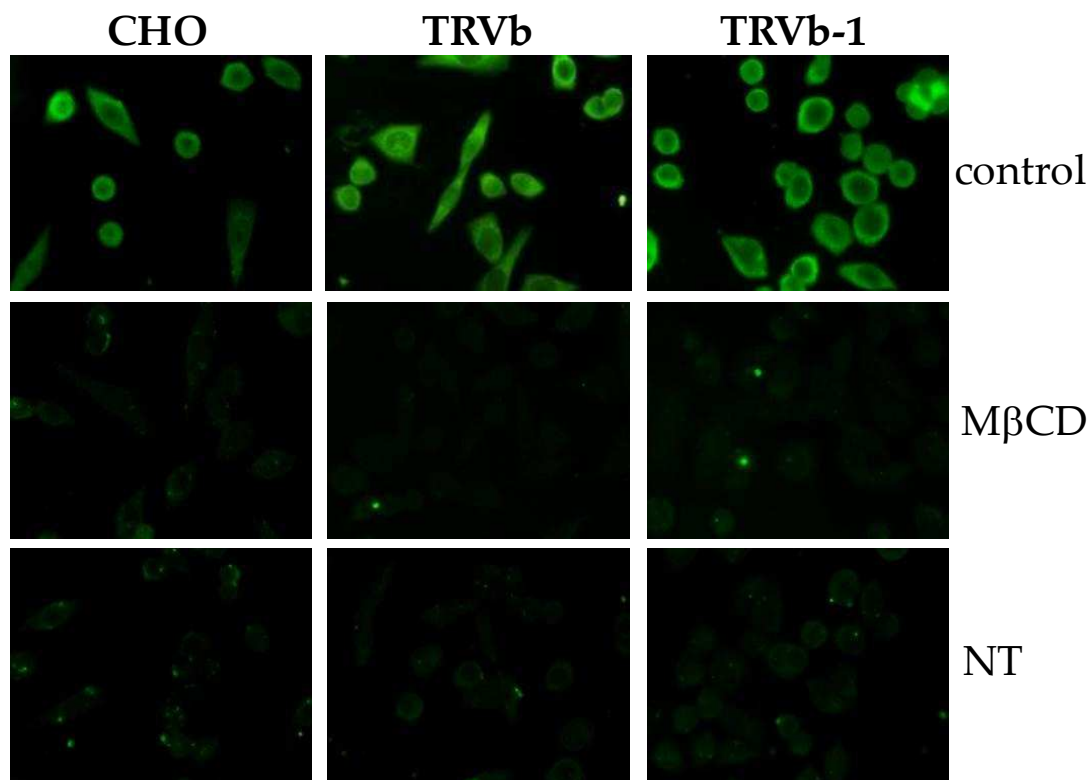
durante 5 minutos con medio sin suero y luego infectadas con el TCRV (m.i.=2 y 0,2). Luego de 1 hora de infección, se retiró el inóculo y se agregó medio fresco para incubar las células en estufa a 37°C durante 24 hs, momento en el cual se cosecharon los sobrenadantes para titularlos y se fijaron las células para inmunofluorescencia citoplasmática. En la figura 18 se observa que este compuesto produjo una inhibición significativa en el porcentaje de células positivas y producción viral solo en las células que expresan el receptor de transferrina 1 humano. Esto demuestra la dependencia del TCRV de la presencia de colesterol en esta línea celular. Se muestra también el porcentaje de viabilidad obtenido por MTS confirmando que las concentraciones utilizadas no resultaron tóxicas para las células.



**Figura 18. Efecto de la MβCD en las células CHO, TRVb y TRVb-1.** Se trataron los cultivos con MβCD y se infectó con el TCRV en ausencia del compuesto con 2 multiplicidades distintas. Las células se procesaron para IFI (A y B) y los sobrenadantes se titularon por el método de UFP como se detalla en materiales y métodos (C y D). En las IFIs se cuantificaron al menos 5 campos en aumento

100x (media  $\pm$  SE, \* $p < 0,05$ ). El porcentaje de viabilidad se determinó por MTS y cada punto se realizó por triplicado (E).

Para determinar la efectividad de los compuestos utilizados para bloquear la endocitosis dependiente de colesterol, se utilizó toxina colérica conjugada con FITC (Ctx-FITC) ya que su receptor, el gangliosido GM1, es endocitado por la vía dependiente de caveola (Merritt et al. 1994). Luego del pre-tratamiento con los compuestos, se incubaron las células con Ctx-FITC durante 1 hora a 37°C. Luego de este tiempo, las células se fijaron para inmunofluorescencia directa. Como se observa en la figura 19, las células control internalizaron la toxina mientras que las que fueron tratadas con NT o M $\beta$ CD prácticamente no internalizaron nada de la Ctx.



**Figura. 19. Efecto de la NT y la M $\beta$ CD en la internalización de la Ctx.** Células CHO, TRVb y TRVb-1 fueron lavadas 3 veces con medio sin suero y luego incubadas 2 hs con NT, 30 minutos con M $\beta$ CD y sus respectivos controles fueron células incubadas con MEM sin suero durante los mismos tiempos. Transcurrido ese tiempo, se lavaron las células 3 veces y se incubó con Ctx-FITC durante 1 hora en estufa a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se fijaron las células para inmunofluorescencia directa y se observaron en el microscopio (aumento 400x).

## 6) Rol de la macropinocitosis

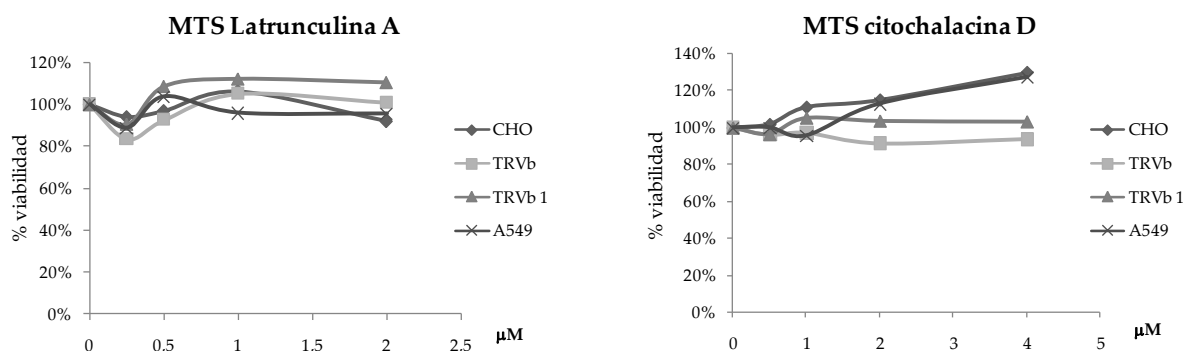
6.1. *Estudio de la interacción del TCRV con los Filamentos de Actina – Caracterización del sistema*

Si bien la fagocitosis y la macropinocitosis son procesos distintos, ambos son dependientes de la dinámica del citoesqueleto de actina, el cual regula la formación de las protuberancias de la membrana celular. Por este motivo, se decidió estudiar la participación de los microfilamentos en las etapas tempranas del ciclo de multiplicación del TCRV, mediante la desorganización de esta red de citoesqueleto utilizando los compuestos Citochalsina D (CITO D) o Latrunculina A (LAT A). El mecanismo de acción de cada uno de los compuestos, junto con la concentración final utilizada de cada uno, se observan en la tabla 1.

Blanco	Inhibidor	Conc. (µM)	Mecanismo de acción
Microfilamentos de actina corticales y citosólicos	Latrunculina A (Morton et al. 2000)	0,25 y 0,5	Se une a la G-actina y previene la polimerización
Microfilamentos de actina citosólicos	Citochalsina D (Brenner y Korn 1979)	1 y 2	Se une a la F-actina y previene la polimerización

**Tabla 1- Agentes que desorganizan el citoesqueleto de actina.** Modo de acción y concentración final utilizada.

Utilizamos cada uno de los inhibidores a la concentración final que mostró la mayor reducción de la infectividad del TCRV a las 24 hs p.i. con una mínima cantidad de muerte celular y una rápida recuperación, en los tiempos de tratamiento ensayados. La actividad metabólica de los cultivos se tomó como signo de viabilidad evaluándose por el método del MTS, bajo las condiciones de cada uno de los tratamientos (ver materiales y métodos) (Tabla 1). Al mismo tiempo, se observaron los cultivos al microscopio óptico durante todos los períodos de tratamiento en cada uno de los experimentos. Los cultivos fueron sembrados y crecidos en una microplaca de 96 pocillos. 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 figura 20 muestra los valores de viabilidad para las líneas celulares CHO, TRVb, TRVb-1 y A549 correspondientes a cada una de las concentraciones de cada uno de los compuestos ensayados.



**Figura 20. Efecto de la CITO D y LAT A sobre la viabilidad en células CHO, TRVb, TRVb-1 y A549.** Las células fueron crecidas en monocapas en microplacas de 96 pocillos y fueron tratadas durante 90 min con distintas concentraciones de los compuestos. Al finalizar el tratamiento se determinó la viabilidad por el método de MTS en un lector de ELISA a 490nm. El porcentaje se calculó con respecto a controles sin tratar.

## 6.2. Efecto de los compuestos sobre el citoesqueleto

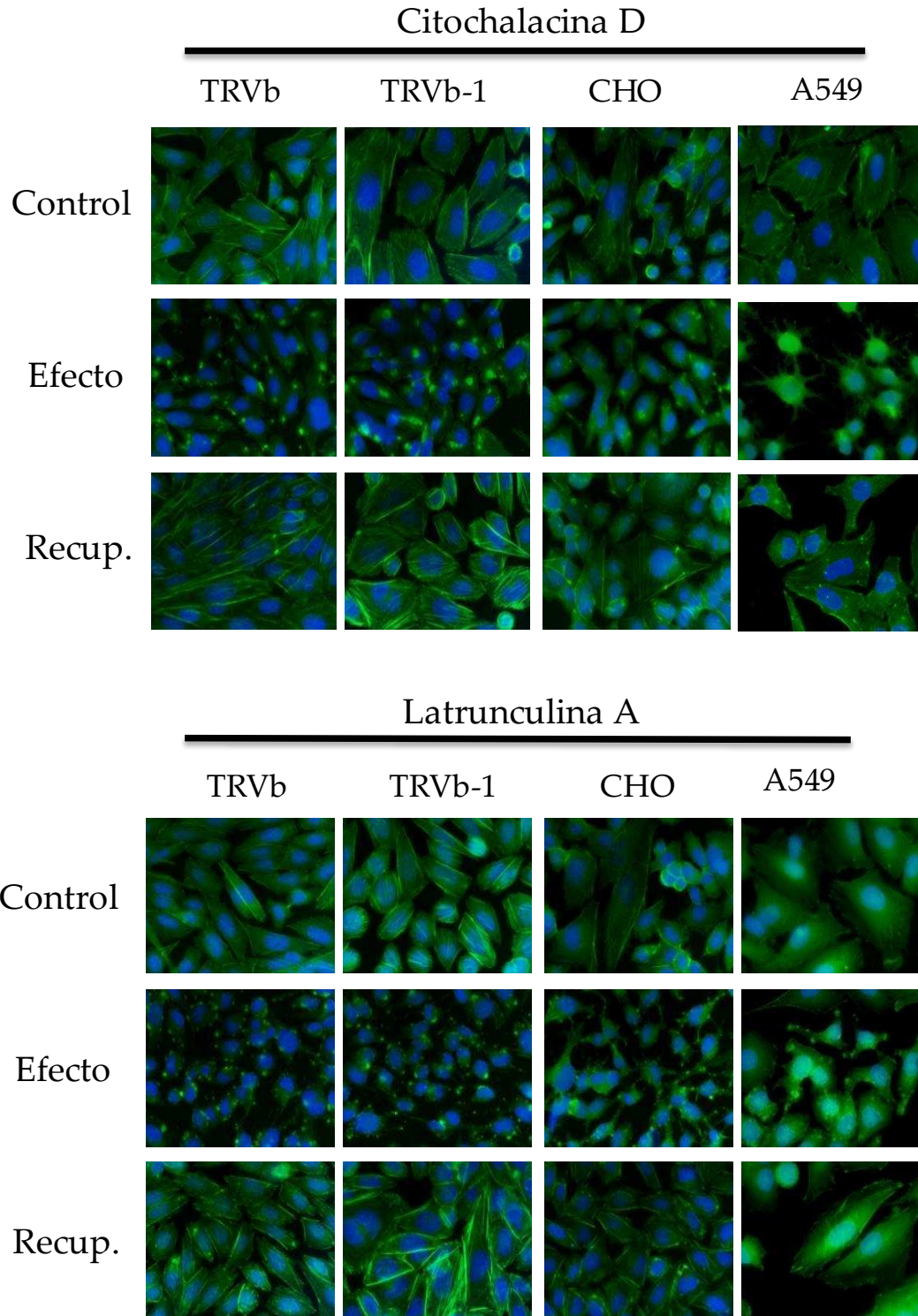
La acción de estos compuestos sobre los elementos del citoesqueleto se ha descrito en trabajos anteriores, sin embargo para corroborar y caracterizar su efecto

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 y fijados luego del tratamiento. Posteriormente fueron evidenciados los microfilamentos con el intercalante de actina, faloidina conjugada a FITC.

En la figura 21 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 las células comparable a los descritos para otros sistemas celulares (control). Cuando los cultivos se trataron con la CITO D el patrón de IFI se alteró completamente. La figura 21 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 CITO D no desorganiza totalmente los microfilamentos sino que como puede observarse los filamentos corticales quedan prácticamente intactos (Brenner y Korn 1979; Stossel 1989). Como estos filamentos son los más relacionados con la internalización del virus, se estudió otro compuesto, la LAT A, que posee propiedades depolimerizantes del citoesqueleto de actina, actuando principalmente sobre los filamentos corticales. Este 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 21, luego de 90 min de tratamiento con la LAT A tanto los filamentos corticales como citoplasmáticos desaparecieron y en su lugar se observaron los característicos cúmulos de actina.

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 y se incubaron con medio de mantenimiento. Las células fueron fijadas 90 minutos pasado el tratamiento y se realizaron las marcaciones correspondientes a cada componente del citoesqueleto. Como se observa en la figura 21, luego de 90 min con medio sin el compuesto, las células no solamente recuperaron la morfología sino también la red de filamentos, tanto en el caso de CITO D como en el caso de LAT A.

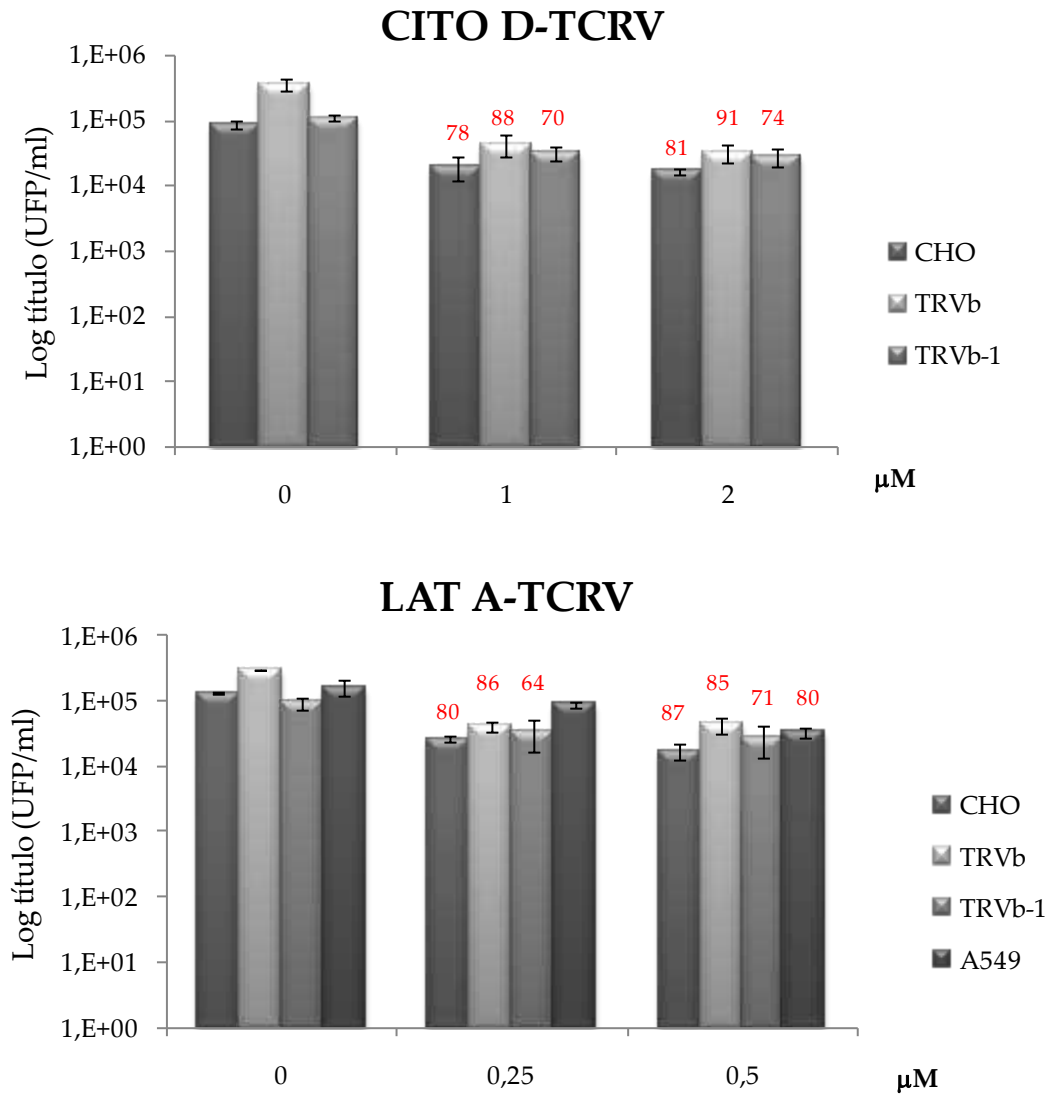




**Figura 21. Efecto de la CITO D y la LAT A en la red de actina.** Células CHO, TRVb, TRVb-1 y A549 fueron incubadas durante 90 min con 2  $\mu$ M de citochalasina D; 0,5  $\mu$ M de latrunculina A o en MM (control). Transcurrido ese tiempo, se lavaron las células 3 veces con PBS y las muestras utilizadas para observar el efecto se fijaron con formaldehído, el resto se incubó durante otros 90 minutos a 37°C en MM. Luego, se fijaron las células para ver la recuperación. La marcación del citoesqueleto de actina se realizó con faloidina acoplada a FITC y los núcleos se tiñeron con Hoestch (aumento 400x).

### 6.3. *Estudio de la interacción de TCRV con los Filamentos de Actina – Efecto 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. Los rangos de concentraciones utilizados variaron según el compuesto (tabla 1). Para determinar el efecto de la disrupción de los filamentos de actina sobre la producción viral, se trataron las monocapas con concentraciones crecientes de cada uno de los compuestos durante 30 min, y luego se infectaron con el TCRV (m.i.=2) 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. La figura 22 muestra el porcentaje de inhibición de la producción viral luego de 24 hs de los cultivos tratados con respecto a las monocapas infectadas y sin tratar. Como puede observarse, la infectividad fue inhibida más de un 80% en presencia de LAT A en todas las líneas, mientras que con la CITO D la inhibición llegó al 90% en las mayores concentraciones de los compuestos utilizadas, que además mantuvieron la viabilidad celular superior a un 90%.



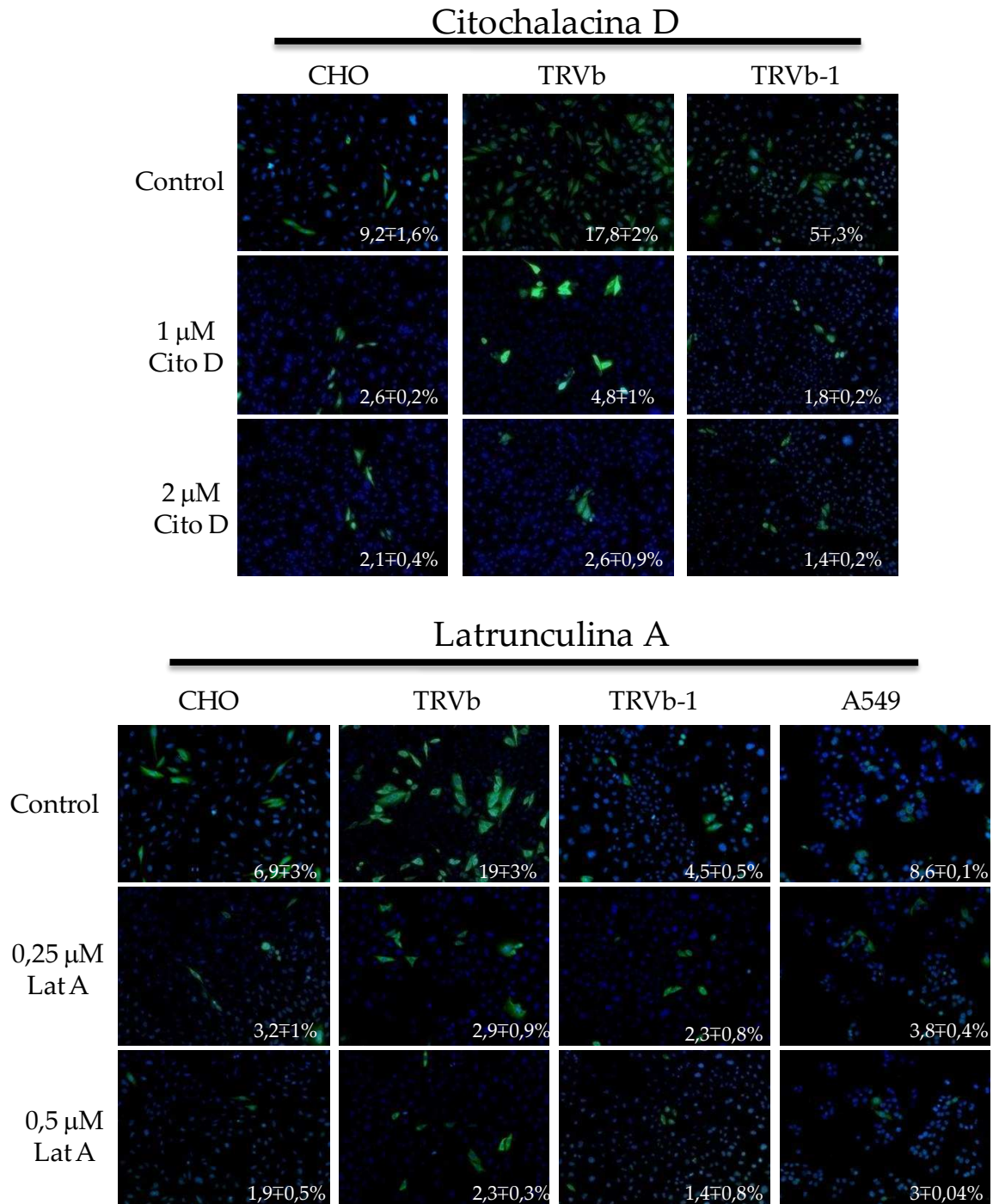
**Figura 22. Efecto de los compuestos que desorganizan el citoesqueleto de actina en la infectividad del TCRV.** Cultivos de células CHO, TRVb, TRVb-1 y A549 fueron incubados durante 30 min en presencia de los compuestos LAT A y CITO D. Luego se infectaron con el TCRV (m.i.=2) en presencia de la concentración 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. En rojo se muestra el porcentaje de inhibición.

#### 6.4. Estudio de la interacción de TCRV con los Filamentos de Actina – Efecto sobre la expresión de los antígenos virales

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 1, dado que son las que producen el mayor efecto inhibitorio sobre la producción viral. Esta inhibición resultó ser específica dado que, en estas condiciones, los valores de viabilidad siempre se mantuvieron por encima del 90%. 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 CITO D o LAT A. Luego de la infección, los compuestos y el inóculo fueron removidos, las células se lavaron con PBS y luego se incubaron con medio fresco a 37°C. A las 24 hs p.i. se fijaron las células y se examinó la expresión de proteínas virales por IFI. En las condiciones control las células mostraron el patrón de proteínas virales característico. Cuando los cultivos fueron tratados con los compuestos se observó una disminución en el número de células fluorescentes para el antígeno del TCRV. En la figura 23 se observa una disminución significativa de la expresión del antígeno viral tanto con LAT A (hasta un 87%) como con la CITO D (hasta un 90%) en todas las líneas evaluadas. Estos datos sugieren que los eventos tempranos del ciclo de replicación del TCRV dependen del citoesqueleto de actina intacto.

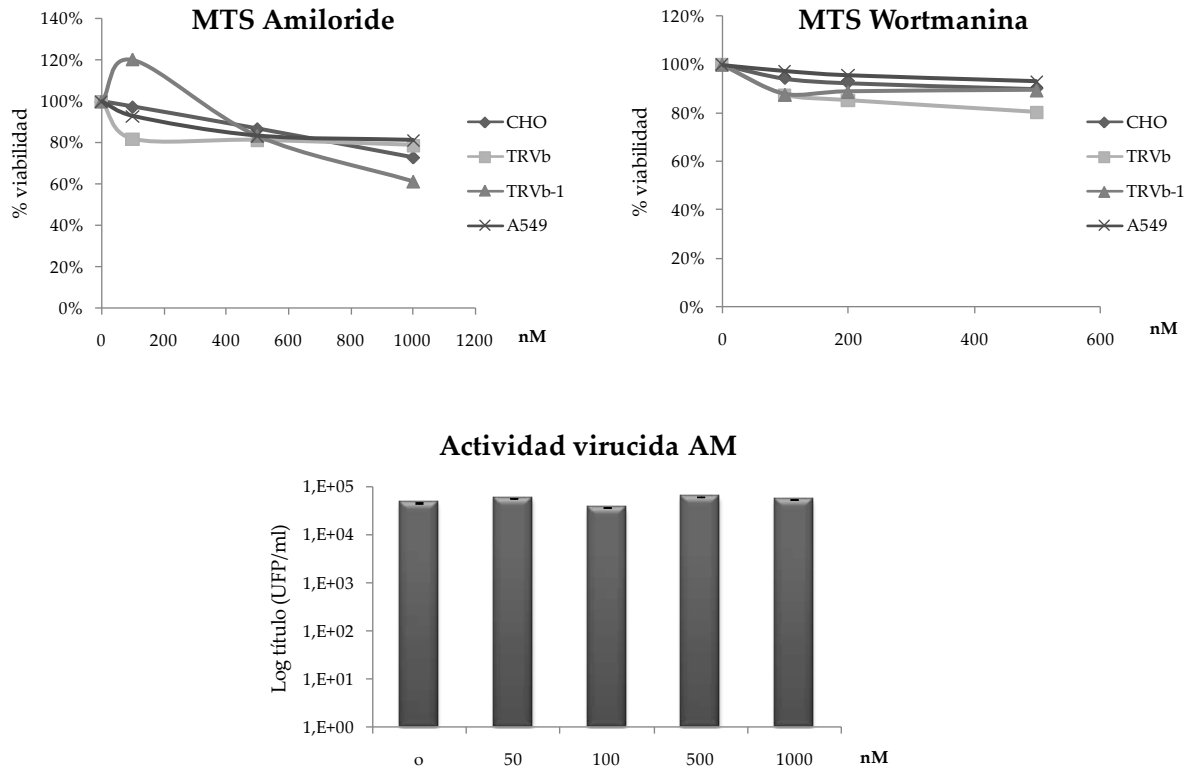


**Figura 23. Efecto de los compuestos que desorganizan el citoesqueleto de actina en la síntesis de antígenos virales.** Cultivos de células CHO, TRVb, TRVb-1 y A549 fueron incubados durante 30 min en ausencia o presencia de los compuestos CITO D (1 y 2 μM) y LAT A (0,25 y 0,5 μM). Luego se infectaron con el TCRV (m.i.=2) en presencia de la concentración adecuada del compuesto. Pasada la hora de infección los cultivos se lavaron con medio y se incubaron con medio fresco durante 24 hs. Luego las células fueron fijadas para IFI citoplasmática como se indica en materiales y métodos para medir la síntesis de proteínas del TCRV. Se muestran fotos representativas a un aumento de 100x (medio±ES).

### 6.5. *Inhibición de la macropinocitosis–controles*

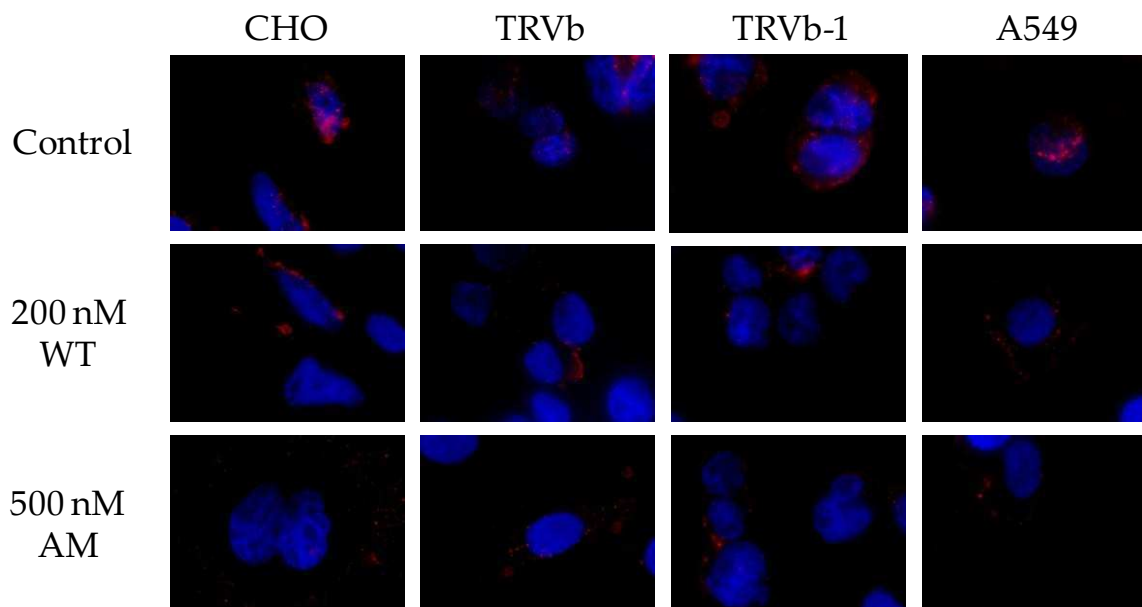
Para estudiar la participación de la macropinocitosis en la entrada del TCRV se utilizó el compuesto Amiloride (AM), un inhibidor de la bomba  $\text{Na}^{2+}/\text{H}^{+}$  y la wortmanina (WT), un inhibidor de las quinasas PI3K; ambos indispensables para la macropinocitosis (Swanson y Watts 1995; Mercer y Helenius 2009). El AM inhibe la macropinocitosis a través de la acidificación citoplasmática que se produce por la acumulación de  $\text{H}^{+}$  en la zona donde se forma el macropinosoma. A su vez, se observó que el compuesto presenta un fuerte efecto inhibitorio sobre la vía de señalización Rac1/Cdc42 (Koivusalo et al. 2010). La quinasa PI3K por otro lado, es una de las cascadas de señales que favorecen el rearreglo del citoesqueleto de actina para formar las prolongaciones de membrana celular (Amyere et al. 2000).

En primer lugar, no solo se realizó el control de viabilidad celular sino que para AM también fue ensayada la actividad virucida del mismo, ya que el efecto de dicho compuesto es reversible y es necesario que esté presente durante la hora de infección. En el caso de WT este control no fue realizado ya que el compuesto posee un efecto irreversible sobre la inhibición de las quinasas PI3K y no es necesario que el mismo esté presente durante la infección (Powis et al. 1994). En la figura 24 puede observarse que ninguna de las concentraciones de WT ensayadas alteran la viabilidad celular y que AM, si bien no presentó un efecto virucida a ninguna de las concentraciones ensayadas, a partir de 1000 nM se observa un efecto citotóxico en algunas de las líneas utilizadas. Por este motivo, los ensayos se hicieron utilizando una concentración de 500 nM.



**Figura 24. Viabilidad y actividad virucida.** Para el ensayo de viabilidad, células CHO, TRVb, TRVb-1 y A549 fueron crecidas en monocapas en microplacas de 96 pocillos y fueron tratadas durante 24 hs con AM y durante 1 hora con WT en presencia de las distintas concentraciones de los compuestos. Al finalizar el tratamiento se determinó la viabilidad por el método de MTS en un lector de ELISA a 490 nm. El porcentaje se calculó con respecto a controles sin tratar. Para el ensayo de actividad virucida, se incubaron  $10^5$  UFP del TCRV en presencia de las diferentes concentraciones de AM a 37°C durante 1 hs. Luego, se titularon dichos sobrenadantes por el método de formación de placa en células Vero.

Una vez evaluada la toxicidad y que se comprobó que el AM no tiene efecto virucida, se evaluó el efecto de los compuestos sobre la macropinocitosis. Para ello, se utilizó dextrano 70 KDa acoplado al fluoroforo rojo Texas (dx), un marcador de macropinocitosis (Lee y Knecht 2002), en presencia de aquellas concentraciones no tóxicas de los compuestos. Como puede observarse en la figura 25, ambos compuestos disminuyeron la internalización del dx, indicando que la vía está siendo eficientemente inhibida tanto por el AM como por la WT.



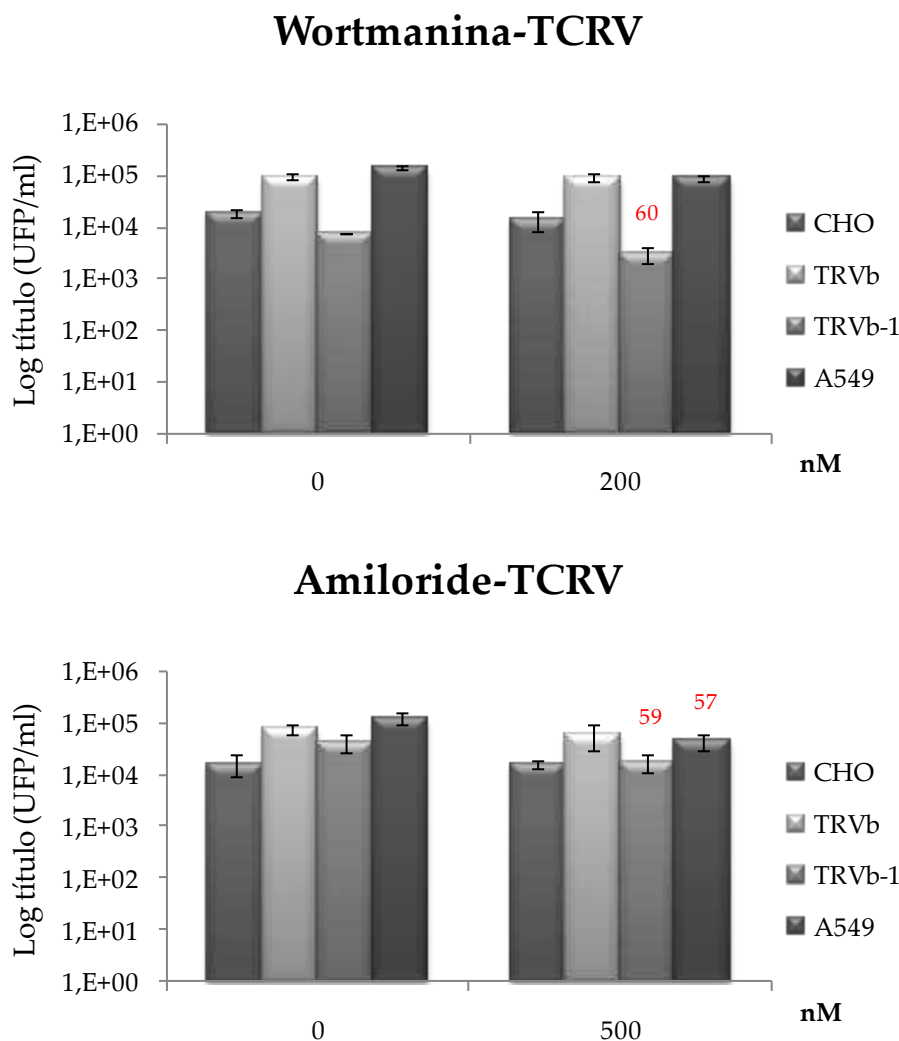
**Figura 25. WT y AM inhiben la macropinocitosis.** Células CHO, TRVb, TRVb-1 y A549 fueron tratadas con WT y AM durante 1 hora y 30 min respectivamente, momento en el cual se incorporó el dx en presencia o ausencia (control) de la misma concentración de los compuestos. Luego de incubarlo 1 hora a 37°C se fijaron con formaldehído. Las muestras se observaron al microscopio a un aumento de 1000x.

### 6.6. *Inhibición de la macropinocitosis—efecto sobre la producción de partículas infecciosas*

Una vez que comprobamos que tanto el AM como la WT inhiben la vía de la macropinocitosis, utilizamos aquellas concentraciones que no resultaron tóxicas para las células y que demostraron una inhibición en la internalización del dextrano marcado para evaluar su efecto sobre la entrada del TCRV. Para ello, se trataron las células con las concentraciones de los compuestos o con MEM sin suero (control) y se infectó en presencia o ausencia de AM y WT respectivamente (m.i.=2). En el caso del AM, el compuesto se mantuvo presente durante todo el ensayo hasta el momento en el que se cosecharon los sobrenadantes, es decir, 24 hs p.i. y fueron titulados por el método de UFP. Como puede verse en la figura 26, tanto la WT como el AM produjeron una inhibición del título viral en las células TRVb-1 (60% y 59 % respectivamente) mientras que en la línea A549 solo se observó una inhibición



marcada en las células tratadas con AM (57%). Debido a que ambas células expresan el hTfR, sería de esperar resultados similares, aunque probablemente la diferencia se deba a que una de ellas lo expresa endógenamente (A549) mientras la otra lo sobreexpresa debido a la inserción de un plásmido (TRVb-1). En el resto de las líneas estudiadas (CHO y TRVb) no se observó una inhibición del título viral lo cual podría indicar que la vía de la macropinocitosis no estaría involucrada en la entrada del TCRV.



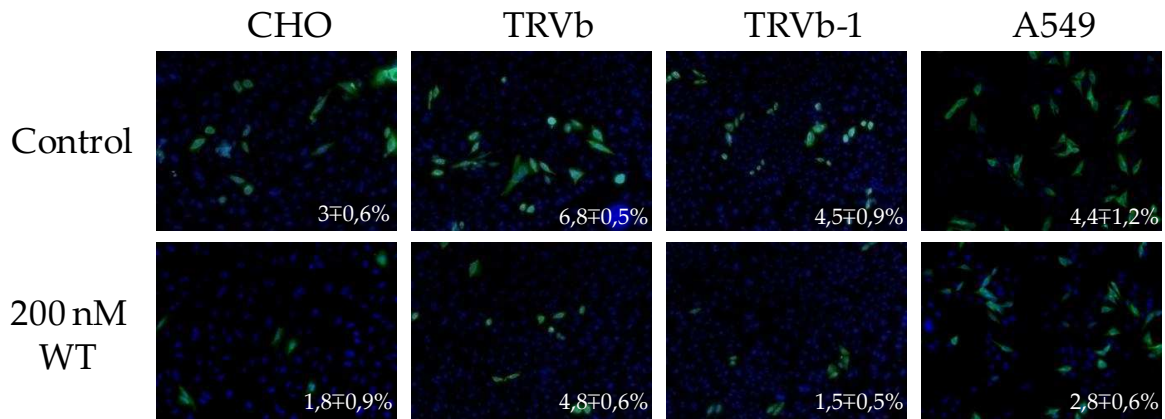
**Figura 26. Efecto de la wortmanina y el amiloride sobre la infectividad del TCRV.** Cultivos de células CHO, TRVb, TRVb-1 y A549 fueron incubados durante 1 hora y 30 min en presencia de los compuestos WT y AM respectivamente, preparadas en MEM sin suero. Luego se infectaron con el TCRV (m.i.=2) en ausencia (WT) o en presencia (AM) 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 (WT) o en medio fresco conteniendo la concentración de compuesto correspondiente (AM). Se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por el método de UFP. En rojo se muestra el porcentaje de inhibición.

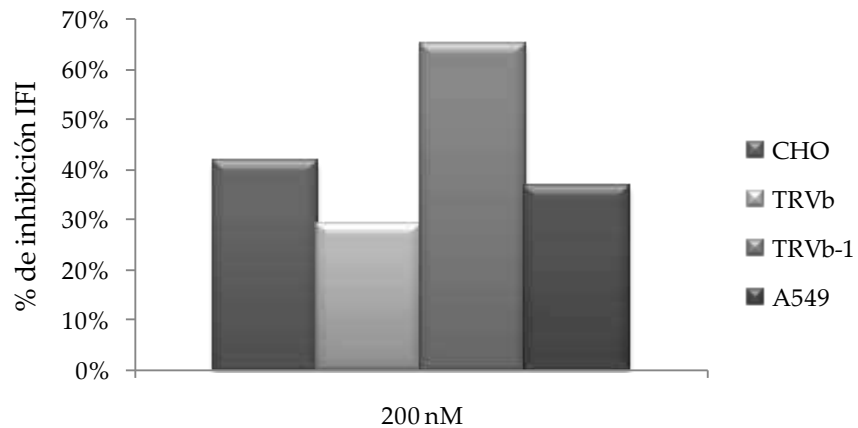
### **6.7. *Inhibición de la macropinocitosis – Efecto sobre la expresión de los antígenos virales***

Para continuar con el estudio del efecto inhibitorio de la macropinocitosis sobre la entrada del TCRV, se analizó la expresión de antígenos virales en células tratadas con los compuestos WT y AM e infectados (m.i.=2). Para ello se realizó IFI citoplasmática en todos los cultivos tratados durante 30 min y 1 hora respectivamente, previo a la infección. En el caso de AM, la infección se realizó en presencia del compuesto y el mismo se mantuvo hasta el momento de la fijación. En el caso de la WT, luego de la infección, los compuestos y el inóculo fueron removidos, las células se lavaron con medio fresco y luego se incubaron con medio fresco a 37°C. A las 24 hs p.i. se fijaron las células y se examinó la expresión de proteínas virales por IFI. En las figuras 27 y 28 puede observarse que en las condiciones control las células muestran el patrón de proteínas virales característico.

En la figura 27, cuando los cultivos fueron tratados con WT, se observó una disminución en el número de células fluorescentes para el antígeno del TCRV aunque dicha disminución solo es marcada en la línea TRVb-1. Estos datos sugieren que los eventos tempranos del ciclo de replicación del TCRV en dicha línea celular, depende de la activación de la vía de PI3K.

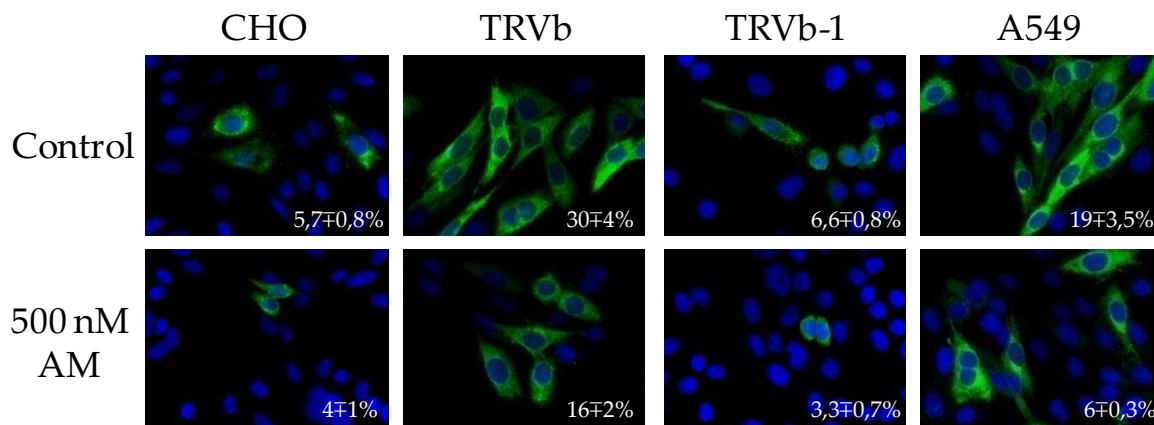


### Inhibición wortmanina

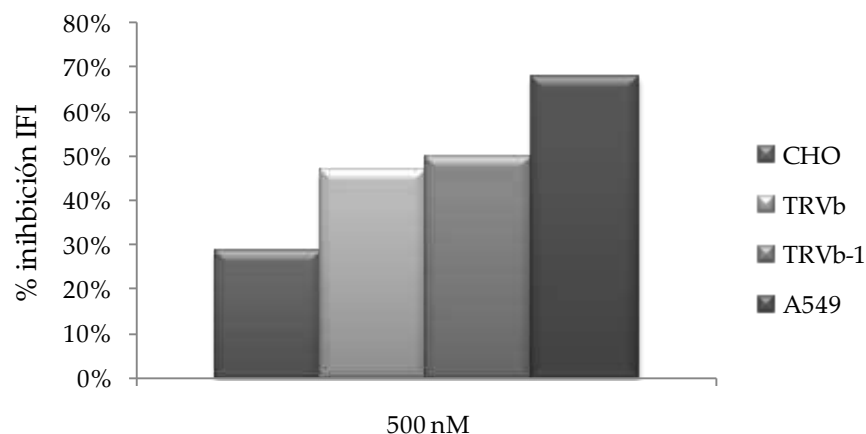


**Figura 27. Efecto de la wortmanina en la síntesis de antígenos virales.** Cultivos de células CHO, TRVb, TRVb-1 y A549 fueron incubados durante 30 min en presencia o ausencia (control) de WT (200 nM). Luego, se infectaron con el TCRV (m.i.=2) en ausencia de dicho compuesto. Pasada la hora de infección los cultivos se lavaron con medio y se incubaron con medio fresco durante 24 hs. Luego las células fueron fijadas para IFI citoplasmática como se indica en materiales y métodos para medir la síntesis de proteínas del TCRV. Se muestran imágenes representativas de cada línea (aumento 100x) y el gráfico del porcentaje de inhibición correspondiente.

En la figura 28 se muestran los cultivos tratados con amiloride. Como puede observarse, a diferencia de la WT pero en concordancia con los resultados hallados en las titulaciones, el AM inhibió el número de células fluorescentes tanto en la línea TRVb-1 como en la línea humana A549, lo cual indica que en ambas líneas celulares es necesaria la actividad de la bomba de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  para la entrada del TCRV.



### Inhibición amiloride

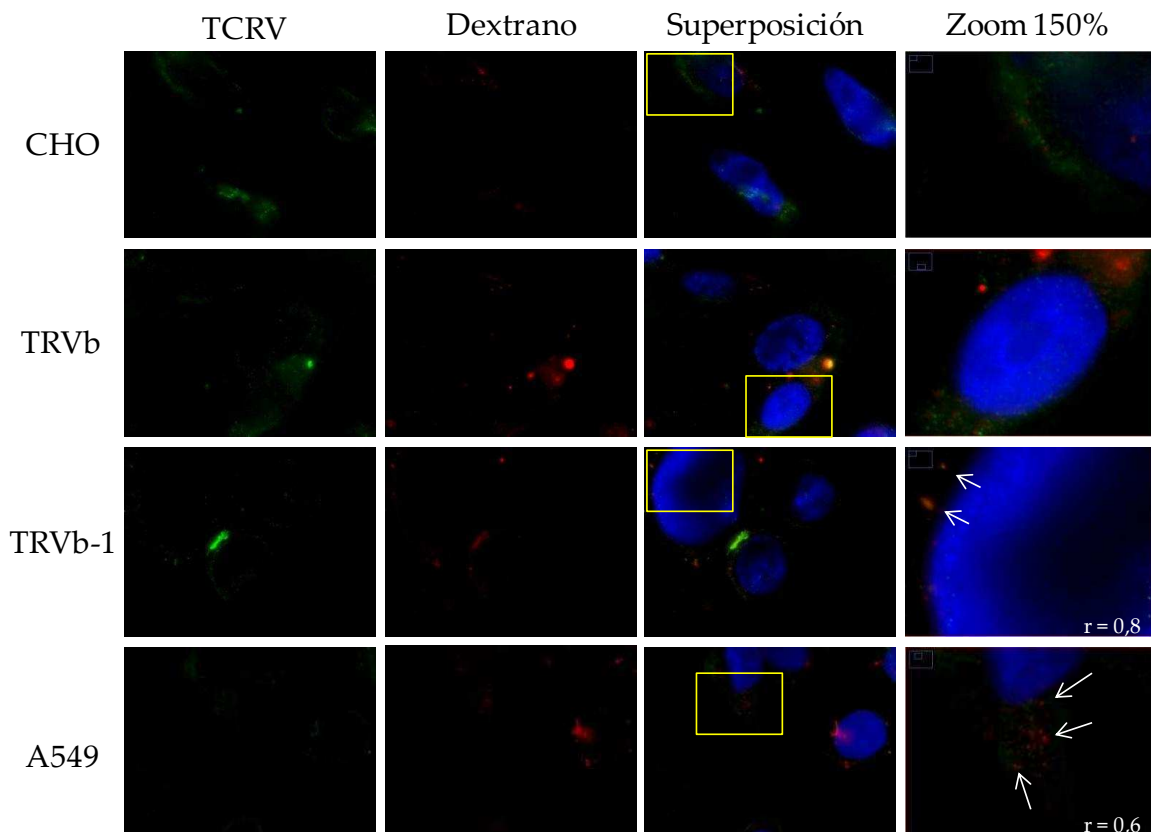


**Figura 28. Efecto del amiloride en la síntesis de antígenos virales.** Cultivos de células CHO, TRVb, TRVb-1 y A549 fueron incubados durante 30 min en presencia o ausencia (control) de AM (500nM). Luego, se infectaron con el TCRV (m.i.=2) en presencia de dicho compuesto. Pasada la hora de infección los cultivos se lavaron con medio y se incubaron con medio fresco conteniendo el AM durante 24 hs. Luego las células fueron fijadas para IFI citoplasmática como se indica en materiales y métodos para medir la síntesis de proteínas del TCRV. Se muestran imágenes representativas de cada línea (aumento 400x) y el gráfico del porcentaje de inhibición correspondiente.

#### 6.8. Inhibición de la macropinocitosis – co-localización de los antígenos virales con el marcador de macropinocitosis

Como se mencionó anteriormente, el dextrano es un marcador de la macropinocitosis. Por este motivo, si esta vía está involucrada en la entrada del TCRV, las partículas virales deberían co-localizar con las del dextrano, tal como se reportó en varios trabajos (Mulherkar et al. 2011a; Gimenez et al. 2015). Células

CHO, TRVb, TRVb-1 y A549 fueron incubadas con AM durante 30 min y luego infectadas en presencia del compuesto y de dx. Luego de la hora de infección las células fueron fijadas con formaldehído y permeabilizadas como se indica en materiales y métodos. Como puede observarse en la figura 29, solo en las líneas que expresan el hTfR se encontró co-localización calculada mediante el coeficiente de Pearson mientras que en las otras líneas no se encontró correlación.



**Figura 29. Co-localización del dx con el TCRV.** Células CHO, TRVb, TRVb-1 y A549 fueron tratadas con 500 nM de AM durante 30 min, momento en el cual se infectó con el TCRV (m.i.=5) en presencia del compuesto y de 1 mg/ml de dx. Luego de incubarlas 1 hora a 37°C se fijaron con formaldehído. Se realizó una IFI para detectar las partículas virales utilizando un anticuerpo secundario acoplado a FITC y las muestras se observaron al microscopio a un aumento de 1000x. Se calculó el coeficiente de Pearson con el programa ImageJ.

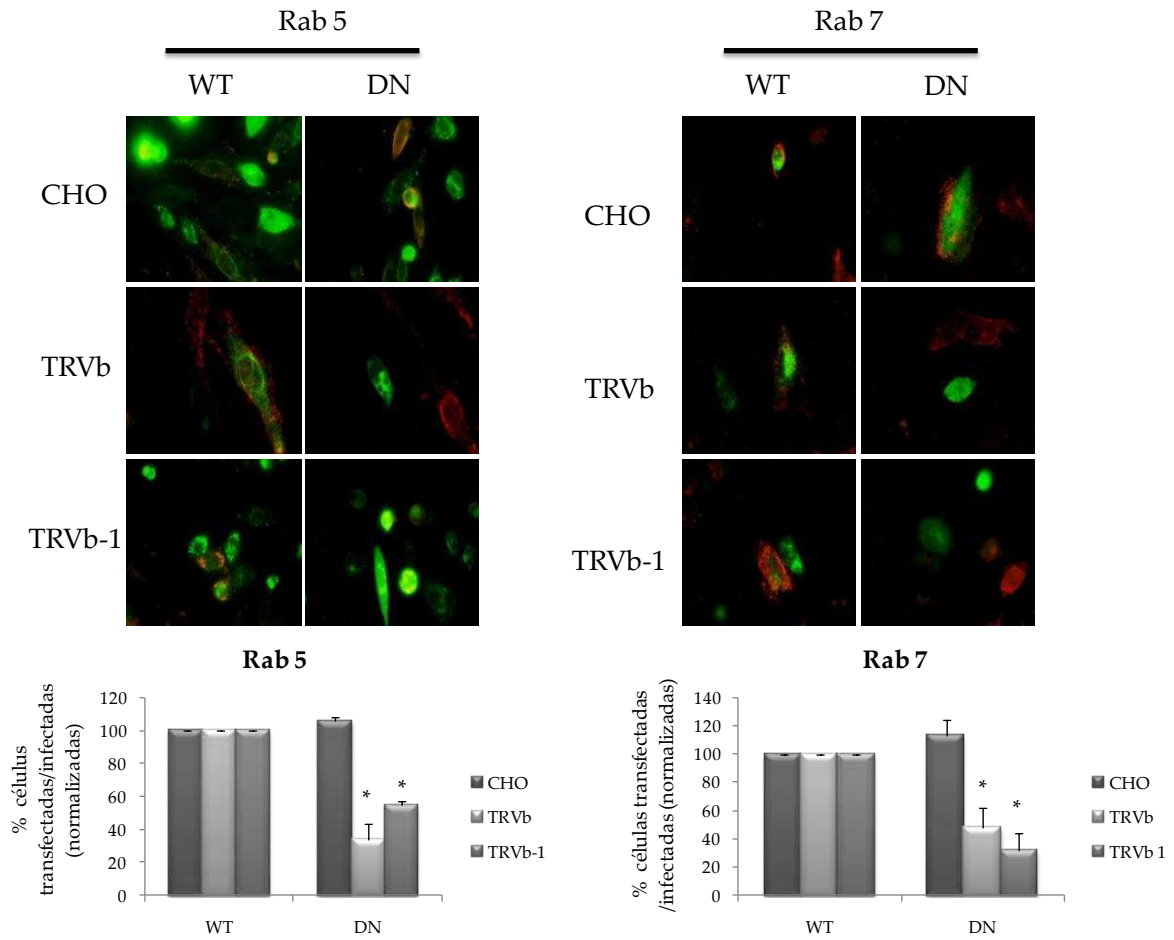
## 7) Participación de los endosomas tempranos y tardíos.

Se prosiguió con el estudio analizando el camino utilizado por el virus una vez internalizado. Estudios previos demostraron que el JUNV, una vez internalizado, utiliza la vía de los endosomas tempranos y tardíos ya que, basados en los requerimientos de pH para la fusión del JUNV, era esperado que la fusión con la membrana endosomal ocurra en los endosomas tardíos (Martinez et al. 2009). 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 et al. 2006; Maxfield y McGraw 2004). Estos endosomas son evidenciados por la presencia de las proteínas celulares Rab 5 y Rab 7 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 TCRV, se utilizaron mutantes de expresión dominantes negativas de las mismas. En el caso de Rab 5 se utilizó la mutante S34N-Rab 5, 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 Rab 5 inactiva a la proteína (Stenmark et al. 1995).

La GTPasa Rab 7 es otro miembro de esta familia, encontrada en endosomas tardíos (Méresse et al. 1995; Feng et al. 1995; Press et al. 1998; Zuk y Elferink 1999) y está implicada en el transporte desde los compartimentos endocíticos tempranos a los tardíos (Feng et al. 1995; Press et al. 1998; Mohrmann y van der Sluijs 1999; Ohashi et al. 1999). Además Rab 7 está presente en compartimentos conectados a los lisosomas (Méresse et al. 1995) y se ha postulado que esta proteína controlaría el agregado y fusión de endosomas tardíos/lisosomas (Bucci et al. 2000). Se utilizó la

mutante dominante negativa T22N-Rab 7, 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 et al. 1995).

Se transfectaron las células CHO, TRVb y TRVb-1 con los plásmidos correspondientes a la proteínas Rab 5 o 7 salvaje o su correspondiente dominantes negativas S34N-Rab 5 o T22N-Rab 7. A las 24 hs post-transfección se infectaron las células transfectadas con el TCRV, 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 los antígenos virales. Como se observa en la figura 30, las células transfectadas con las Rab 5 o 7 salvajes mostraron un patrón de infección citoplasmático y puntillado, 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 TRVb y TRVb-1 que expresan la proteína dominante negativa S34N-Rab 5 o T22N-Rab 7 mostraron una disminución significativa de la de infección por el TCRV, indicando la necesidad de la funcionalidad de estas proteínas celulares para la correcta internalización del virus. Esta disminución no se observó en las células CHO, indicando que probablemente, en esta línea celular, el virus continúe su infección por una vía alternativa hacia los lisosomas.



**Figura 30. Rol de los endosomas tempranos y tardíos en la infección del TCRV en células CHO, TRVb y TRVb-1.** Las células fueron transfectadas con la forma control de Rab 5 y Rab 7 o su mutante dominante negativa S34N-Rab 5 y T22N-Rab 7. 24 h post transfección, las células fueron infectadas con el TCRV. Luego de 24 hs las células fueron fijadas y la infección se analizó por inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo policlonal contra el TCRV y un anticuerpo anti-conejo secundario conjugado a Alexa fluor-555 (rojo). La cuantificación de los datos se muestra en el gráfico. 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 (media normalizada  $\pm$  SE).



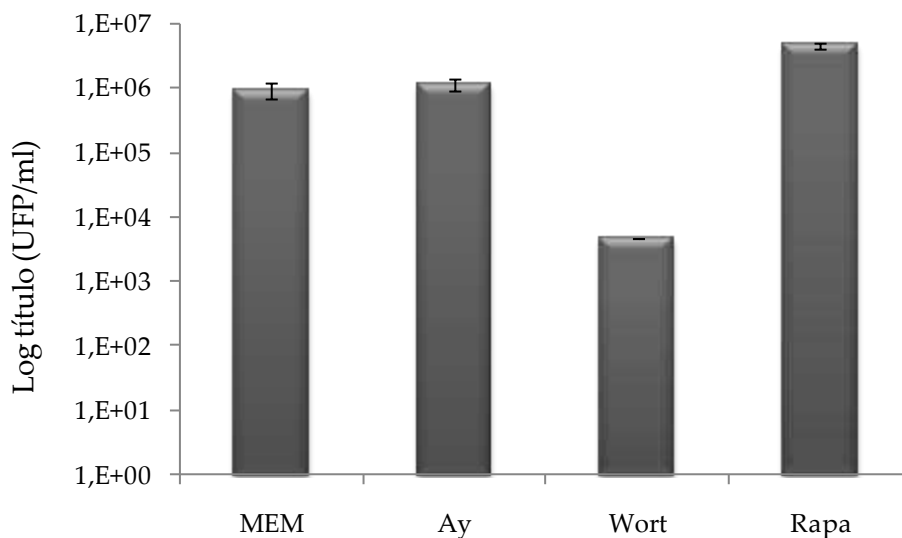
**PARTICIPACION DE LA AUTOFAGIA EN LA INFECCION DEL VIRUS JUNÍN****1) Efecto de la modulación de la autofagia sobre la producción de partículas infectivas**

Trabajos previos del laboratorio demostraron que el virus Junín (JUNV) entra en diferentes cultivos celulares utilizando la vía dependiente de clatrina y dinamina II para luego alcanzar los endosomas tempranos y tardíos (Martinez et al. 2007; Martinez et al. 2008; Martinez et al. 2009). También está reportado que la entrada del JUNV es dependiente de la acidificación endosomal (Castilla et al. 1994). La macroautofagia es un proceso catabólico altamente conservado en células eucariotas ya que tiene un rol central en el mantenimiento de la homeostasis celular. Este proceso es necesario tanto para la remoción efectiva de organelas dañadas y patógenos intracelulares como para obtener el aporte de energía en condiciones de ayuno (Yordy e Iwasaki 2011). Hasta el momento no existen datos en bibliografía sobre la participación de la autofagia en la infección del JUNV pero hay evidencia de virus con genoma a ARN que necesitan esta vía activa para llevar a cabo una infección eficiente. Por otro lado, dado que el JUNV utiliza la red endosomal, esto podría indicar de que el virus también está utilizando la vía de la autofagia (Ravikumar et al. 2008; Jäger et al. 2004).

Para evaluar si la vía de la autofagia está involucrada en la infección del JUNV, se utilizó la cepa IV<sub>4454</sub> de dicho virus y la línea humana A549, células provenientes de carcinoma de pulmón humano. Para modular la vía de la autofagia se utilizaron los compuestos rapamicina (RAPA) y wortmanina (WT). La RAPA es un potente inhibidor de la quinasa de serina/treonina mTOR y dicha inhibición activa la vía de la autofagia (ver introducción). La WT, por otro lado, es un inhibidor de las quinasas PI3K y dicha inhibición produce el bloqueo de la vía de la autofagia (ver

introducción). En cuanto al medio de ayuno (AY), es un estímulo que induce la activación de la autofagia como una respuesta fisiológica de la célula a la falta de nutrientes.

Células A549 fueron tratadas durante 2 hs en presencia de RAPA (100 nM), WT (100 nM), AY o MEM con 10% SFB como control. Luego de este tiempo se infectó con el JUNV durante una hora (m.i.=1) en ausencia de los compuestos y luego de dicha hora se retiró el inoculo. Las células fueron mantenidas a 37°C con medio fresco por 24 hs, momento en el cual se cosecharon los sobrenadantes y titularon por el método de UFP. En la figura 1 se observa que si bien el pre-tratamiento con medio de ayuno no modificó la producción de partículas infecciosas, se observó un aumento de 4 veces mayor título en el pre-tratamiento con RAPA mientras que la WT inhibió la producción viral 3 logaritmos.



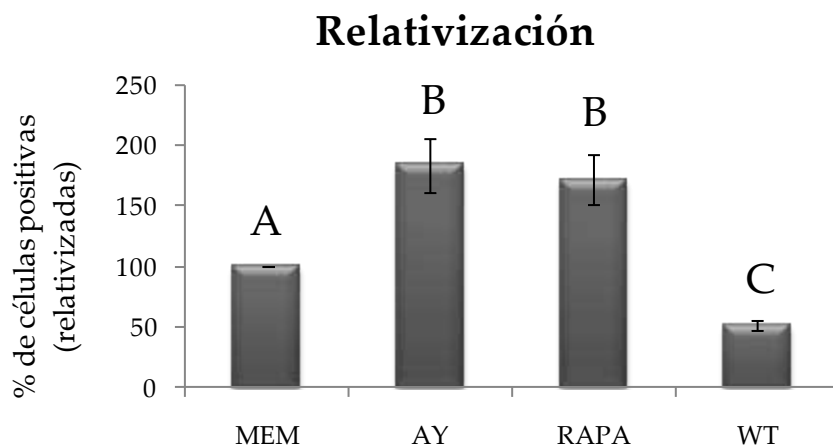
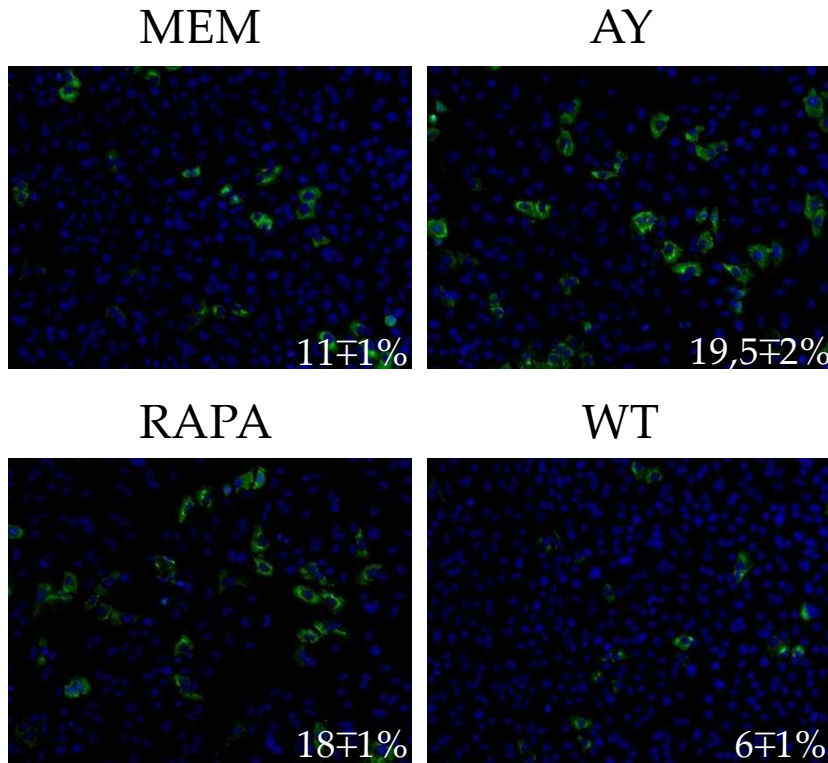
**Figura 1. Efecto de la activación o inhibición de la vía de la autofagia en la producción de partículas virales.** Cultivos de células A549 fueron incubados durante 2 horas en MEM 10% SFB (MEM), medio de ayuno (AY) o en presencia de los compuestos WT (100 nM) y RAPA (100 nM) preparados en MEM sin suero. Luego se infectaron con el JUNV (m.i.=1) en ausencia de los compuestos. Pasada la hora de infección los cultivos se lavaron con medio y se incubaron con medio fresco durante 24 hs. Luego se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por el método de UFP.

### 1) Efecto de la modulación de la autofagia sobre la producción de antígenos virales

La relación entre la autofagia y el ciclo celular ha sido ampliamente estudiada. Debido a que el proceso de crecimiento celular requiere altos niveles energéticos, en situaciones de stress o carencia de nutrientes dicho proceso tiene que ser bloqueado. Por lo tanto, la autofagia y el crecimiento celular son procesos opuestos donde mTOR tiene un rol fundamental (Edinger y Thompson 2002). Existen evidencias de que mTOR participa en la síntesis de proteínas mediante la activación de factores de iniciación y elongación de la traducción. De esta manera, mTOR tendría un efecto dual favoreciendo el crecimiento celular e inhibiendo la autofagia (Neufeld 2012). En situaciones de stress o escasas de nutrientes, mTOR es inhibido y así el ciclo celular se detiene. Se ha reportado también que la activación de la autofagia reduce la masa celular en diferentes modelos tanto *in vivo* como *in vitro* (Scott et al. 2007; Hosokawa et al. 2009; Lum et al. 2005).

Debido a la poca o nula diferencia encontrada entre el control, el tratamiento con RAPA y con medio de ayuno, se analizó la expresión del antígeno viral. Para ello, se realizaron los mismos tratamientos pero en células crecidas sobre cubreobjetos. Luego de 24 hs p.i., las células fueron fijadas con metanol frío como se indica en materiales y métodos y se procesaron para IFI para detección de la nucleoproteína viral. Como puede observarse en la figura 2, el porcentaje de células positivas en aquellas tratadas con medio de ayuno o RAPA es de aproximadamente el doble que en aquellas tratadas con MEM 10% SFB y dichas diferencias son significativas. Respecto al tratamiento con WT, el porcentaje de células infectadas es aproximadamente la mitad respecto al control y esta diferencia también es significativa respecto al control con MEM 10% SFB. La diferencia en cuanto a los resultados encontrados en la titulación y en las IFIs, podría deberse a la diferencia en la cantidad de células totales, lo cual concuerda con el hecho de que la autofagia

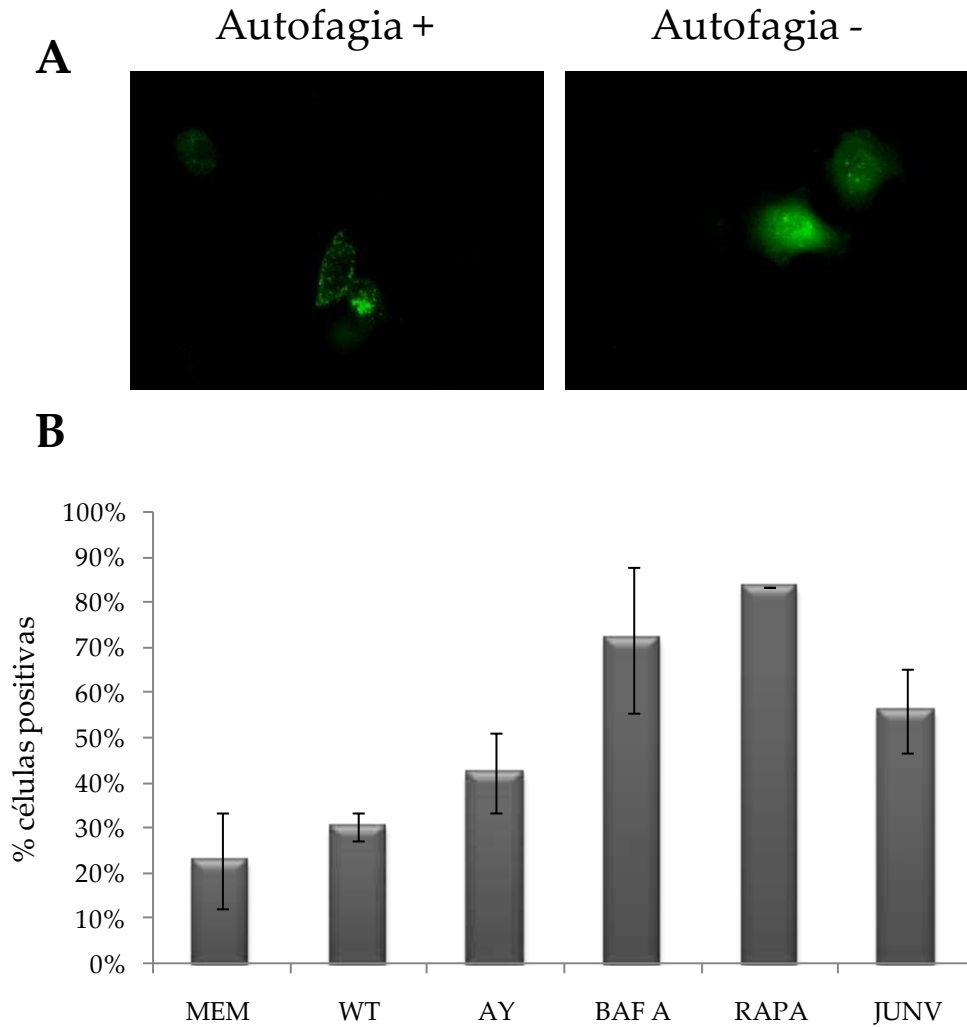
inhibe el crecimiento celular y estos resultados indicarían que la vía de la autofagia facilita la replicación del JUNV.



**Figura 2. Efecto de la modulación de la autofagia sobre el antígeno viral.** Células A549 fueron tratadas con MEM 10% SFB (MEM), medio de ayuno (AY), rapamicina (RAPA) o wortmanina (WT) durante 2 horas, momento en el cual se infectaron con JUNV (m.i.=1). Luego de 24 hs de incubación con medio fresco, se fijaron las células para IFI citoplasmática como se indica en materiales y métodos. Se muestran imágenes representativas de 5 ensayos (media ± ES), imágenes tomadas con un aumento de 100x. En el panel inferior se muestra la relativización de los datos (media ± ES). Letras diferentes representan diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

### 2) Medición de la activación de la autofagia - cuantificación

Para confirmar que el virus está efectivamente activando la vía de la autofagia y dicha activación se produce en los primeros pasos de la replicación, células A549 fueron transfectadas con plásmidos conteniendo la construcción LC3-EGFP. Debido a que LC3 es una proteína citosólica (LC3I) que al activarse la vía de la autofagia sufre un clivaje y la incorporación de un residuo forsfatidiletanolamina, asociándose de esa manera a la membrana del autofagosoma (LC3II), esta proteína es ampliamente utilizada como marcador de la vía (Jordan y Randall 2012). Por este motivo, aquellas células que no tengan esta vía activada presentarán un patrón de expresión de LC3 distribuido uniformemente en el citoplasma mientras que aquellas células que tengan la vía activada, el patrón observado será puntiforme (figura 3A). En paralelo se realizaron controles con un plásmido conteniendo solo EGFP. Transcurridas 24 hs luego de la transfección, se incubaron los cultivos durante 2 hs con RAPA, WT, Bafilomicina A (BAF A, es un inhibidor de la bomba de protones lisosomal lo que produce un freno en el flujo autofágico y la consecuente acumulación de autofagosomas), AY, MEM 10% o JUNV (m.i.=1). Luego de esas 2 hs, las células se lavaron y se fijaron para inmunofluorescencia directa. Se cuantificaron al menos 100 células por cada tratamiento y se consideraron positivas para autofagia aquellas células con más de 10 puntos verdes (figura 3A). En la figura 3B se observa que si bien con el tratamiento de ayuno hay mayor porcentaje de células positivas, el estímulo es mayor con BAF A o con RAPA y que la infección con el JUNV activa la vía a tiempos tempranos de la infección (2 hs).

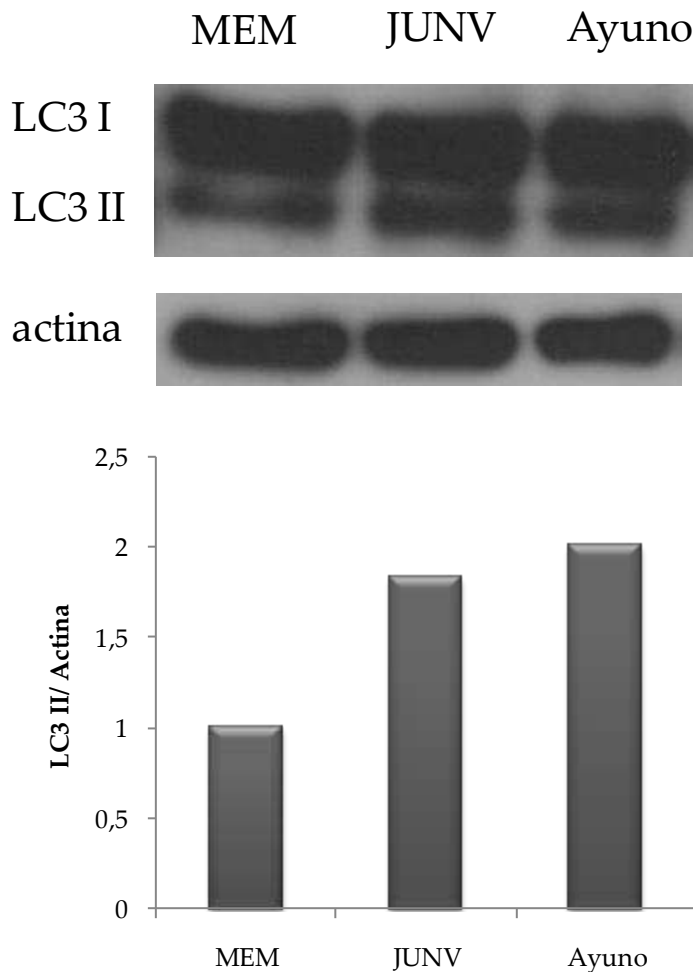


**Figura 3. La infección con el JUNV activa la autofagia.** Células A549 fueron transfectadas con el plásmido conteniendo la secuencia LC3-EGFP. 24 h post transfección, las células fueron tratadas o infectadas con el JUNV durante 2 hs, momento en el cual las células fueron fijadas y analizadas por inmunofluorescencia directa. Para la cuantificación (B) se tomaron 100 células con un nivel similar de expresión del transgen, determinado por intensidad de EGFP, y se cuantificaron las células positivas para autofagia (media normalizada  $\pm$  SD).

### 3) Medición de la activación de la autofagia – western blot

Con el fin de confirmar la activación de la vía autofágica producida por la infección con el JUNV, células A549 fueron transfectadas con la construcción LC3-EGFP y luego de 24 hs fueron tratadas durante 2 hs con MEM 10% SFB, medio de ayuno o infectadas con el virus (m.i.=1) y procesadas para western blot como figura

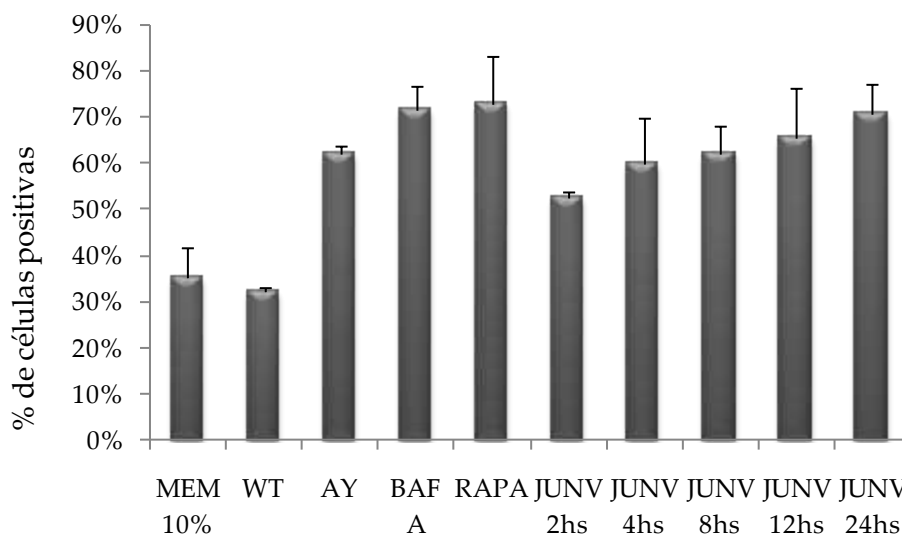
en materiales y métodos. Las proteínas presentes en las membranas fueron reveladas con un anticuerpo anti-GFP y se utilizó actina como control de carga. En la figura 4 se muestra el resultado del revelado radiográfico y la cuantificación de dichas bandas relativizada al control. Tanto la condición de ayuno como la infección presentaron un aumento de la banda correspondiente a LC3 II respecto al control, confirmando que la vía de la autofagia está activada en dichos tratamientos.



**Figura 4. La infección con el JUNV activa la autofagia.** Células A549 fueron tratadas o infectadas con el JUNV durante 2 hs, momento en el cual las células fueron lisadas para poder realizar el western blot. Una vez realizada la corrida electroforética se reveló la membrana con anticuerpo anti-GFP y se utilizó un anti-actina como control de carga. Para la cuantificación se utilizó el programa Gel-Pro Analyzer y se relativizaron los valores de LC3 II/actina al del tratamiento con MEM 10% SFB.

## 4) Cinética de la infección con el JUNV y la participación de la autofagia

Para determinar si esta activación ocurre solo a tiempos tempranos de la infección, células A549 fueron transfectadas con la construcción LC3-EGFP y 24 hs post-transfección fueron tratadas con MEM 10%, AY, BAF A, WT o RAPA durante 2hs, momento en el que fueron fijadas para inmunofluorescencia directa. En el caso de las células transfectadas e infectadas con el JUNV, las mismas fueron fijadas a distinto tiempo post-infección para inmunofluorescencia directa. Se cuantificó el porcentaje de células positivas para autofagia, tomando como positivas a aquellas células con más de 10 puntos verdes. En la figura 5 se observa que la activación de la vía no ocurre solo a tiempos tempranos de la infección sino que se mantiene activa hasta las 24 hs post infección.

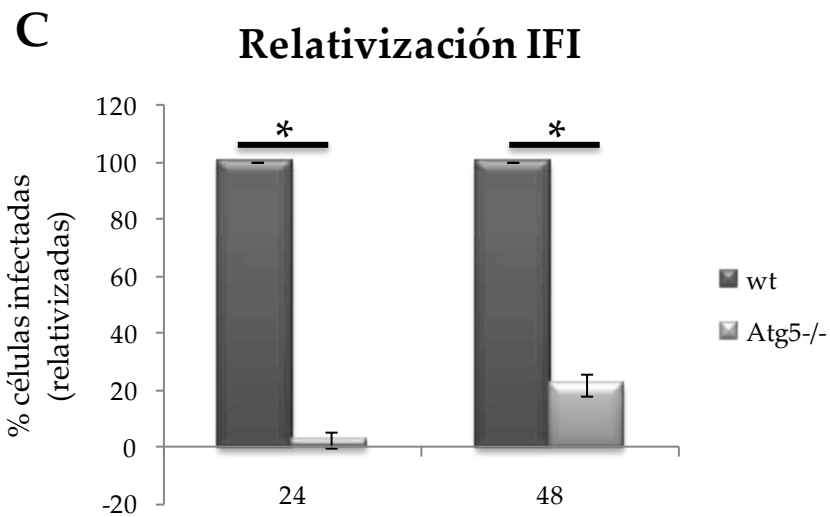
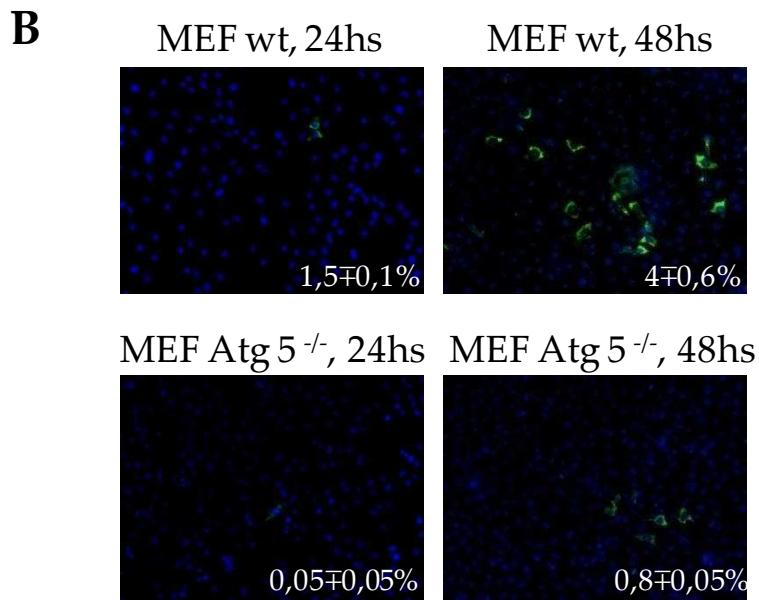
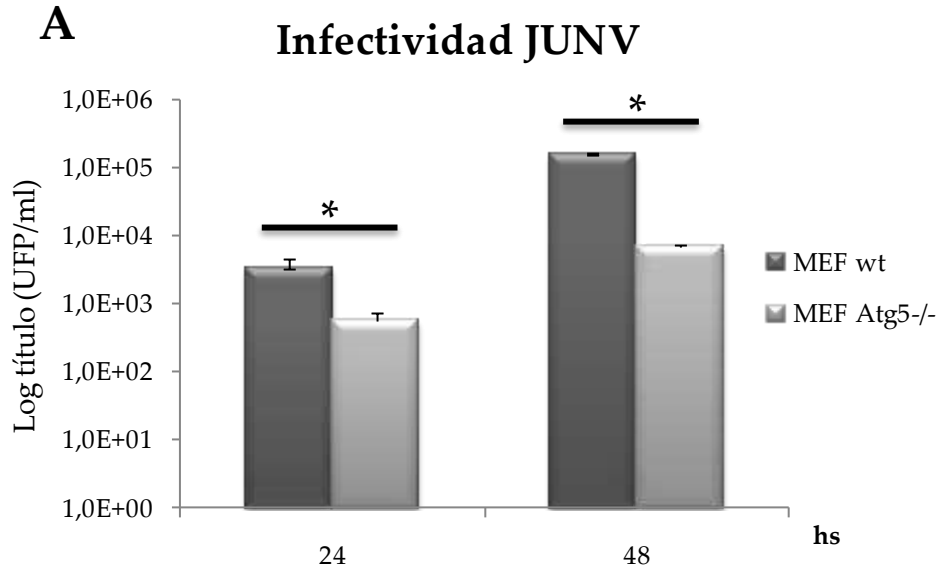


**Figura 5. La infección con el JUNV activa la autofagia durante todo el ciclo.** Células A549 fueron transfectadas con el plásmido conteniendo la secuencia LC3-EGFP. 24 h post transfección, las células fueron tratadas durante 2 hs, momento en el cual las células fueron fijadas y analizadas por inmunofluorescencia directa. Las células infectadas fueron fijadas a distintos tiempos post-infección y también fueron analizadas por inmunofluorescencia directa. Para la cuantificación se tomaron 100 células con un nivel similar de expresión del transgen, determinado por intensidad de EGFP, y se cuantificaron las células positivas para autofagia.



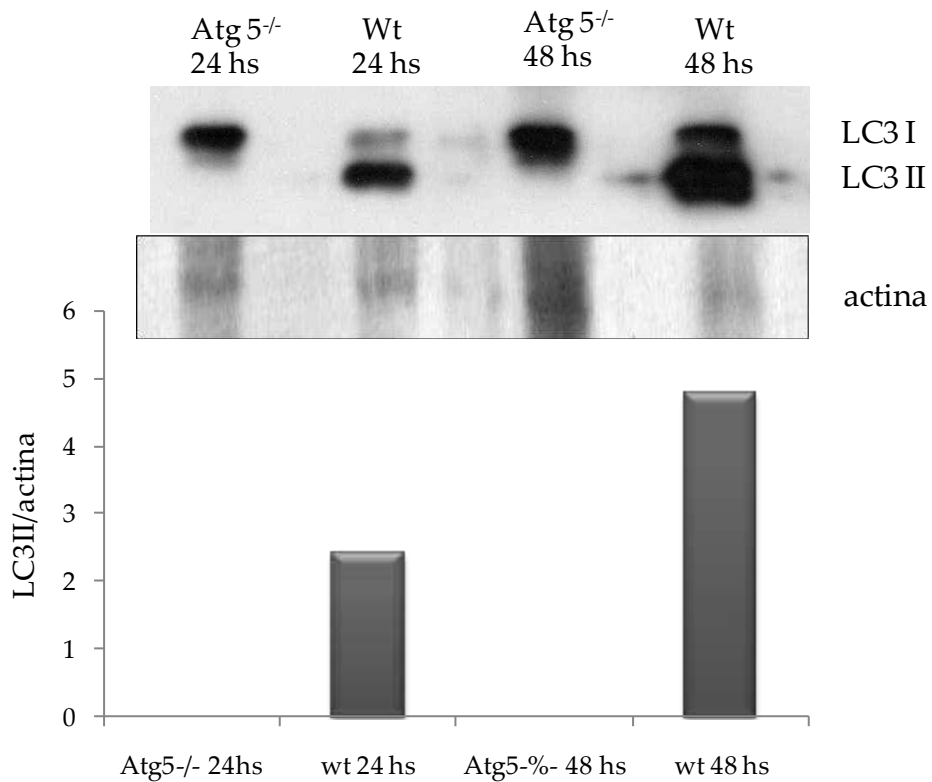
### 5) Rol del gen Atg5 en la replicación del JUNV

La biogénesis de las vesículas autofágicas es regulada por dos sistemas denominados UBL (ubiquitin like systems). El primer sistema conjuga Atg5 con Atg12, formando el complejo Atg5-Atg12. El segundo conjuga a LC3 I con fosfatidiletanolamina, esta modificación permite que LC3 se una a la membrana de los autofagosomas hasta que estos son degradados (Jordan y Randall 2012). Para estudiar si el JUNV utiliza el primer sistema, se infectaron células MEF wt y MEF Atg5<sup>-/-</sup> (m.i.=1). Estas últimas carecen del gen que codifica para la proteína Atg5 y por lo tanto no pueden activar la vía de la autofagia mediante el complejo Atg5-Atg12. Luego de la hora de infección, se retiró el inóculo y se agregó medio fresco para incubarlas a 37°C. Los sobrenadantes se cosecharon a las 24 y 48 hs para titular por el método de UFP y las células se fijaron para IFI citoplasmática. En la figura 6 se observa que tanto la producción de partículas infecciosas (panel A) como la detección de antígeno viral (panel B y normalización en el panel C) se vieron significativamente disminuidos en las células que carecen del gen Atg5 respecto a la línea salvaje. Estos resultados confirman que el JUNV necesita y/o utiliza la vía de la autofagia clásica para replicar de manera eficiente.



**Figura 6. La ausencia de Atg5 modifica la infección del JUNV.** Células MEF wt y MEF Atg5<sup>-/-</sup> fueron infectadas con el JUNV (m.i.=1) y luego de la hora de infección se retiró el inóculo y se agregó medio fresco para incubarlas en estufa hasta las 24 y 48 hs p.i. A esos tiempos se cosecharon los sobrenadantes para titularlos por el método de UFP (panel A) y las células se procesaron para IFI citoplasmática (panel B, aumento 100x, media $\pm$ ES). En el panel C se relativizaron los valores obtenidos en el análisis de las IFIs y se relativizaron al valor de las wt (media $\pm$ ES, \*p<0,05).

Para confirmar que la línea que carece del gen Atg5 no activa la vía de la autofagia y para ver la modulación de la misma producida por la infección con el JUNV, células Atg5<sup>-/-</sup> y wt fueron infectadas (m.i.=1) y procesadas a las 24 y 28 hs para analizarlas por la técnica de western blot (ver materiales y métodos). Las proteínas presentes en las membranas fueron reveladas con un anticuerpo anti-LC3B y se utilizó actina como control de carga. En la figura 6 se muestra el resultado del revelado radiográfico y la cuantificación de dichas bandas relativizadas al control de actina. En las células Atg5<sup>-/-</sup> puede observarse la ausencia de la banda correspondiente a LC3 II tanto a las 24 como a las 48 hs, confirmando que las mismas no pueden activar la vía de la autofagia. En la línea wt, por otro lado, se observa que la banda correspondiente a LC3 II está presente y es mucho mayor a las 48 hs p.i. Estos resultados sumados a los anteriores, corroboran que el virus utiliza y activa la vía de la autofagia durante su multiplicación.



**Figura 7. La ausencia de Atg5 modifica la infección del JUNV.** Células MEF wt y MEF Atg5<sup>-/-</sup> fueron infectadas con el JUNV (m.i.=1) y luego de la hora de infección se retiró el inóculo y se agregó medio fresco para incubarlas en estufa hasta las 24 y 48 hs p.i. A esos tiempos las células fueron lisadas para poder realizar el western blot. Una vez realizada la corrida electroforética se reveló la membrana con anticuerpo anti-LC3B y se utilizó un anti-actina como control de carga. Para la cuantificación de las bandas obtenidas se utilizó el programa Gel-Pro Analyzer y se relativizaron los valores de LC3 II respecto a la banda de actina.

# Conclusión



## *Capítulo I: Entrada del virus Tacaribe*

Gran parte de esta tesis se basó en el estudio de las vías endocíticas utilizadas por el virus Tacaribe (TCRV). Como se mencionó en la introducción, el TCRV pertenece al grupo de arenavirus del Nuevo Mundo donde se encuentra la mayoría de los arenavirus causantes de fiebre hemorrágica debido a la similitud de secuencias de su GPC y N (Charrel y de Lamballerie 2010; Michael D Bowen et al. 1997). A pesar de eso y de la gran similitud de la GPC del virus Junín (JUNV) y la del TCRV, este último no utiliza el receptor de transferrina humano (hTfR) salvo que el mismo posea una mutación en un residuo. De este modo, pequeños cambios en la GPC del virus o en el hTfR podría convertir este arenavirus no patógeno en uno patógeno para humanos (Abraham et al. 2009). Por otro lado, el TCRV es ampliamente utilizado como modelo de los arenavirus patógenos debido a que no es necesario un nivel de bioseguridad 4 para trabajar con el mismo y presenta una alta tasa de similitud con los virus patógenos (Sayler et al. 2014). Por estos motivos, es necesario el estudio de las diferentes etapas del ciclo de multiplicación del TCRV para poder determinar si es un buen modelo a utilizar. En este trabajo nos focalizamos en las primeras etapas del ciclo de replicación del TCRV analizando diferentes vías endocíticas mediante la inhibición farmacológica o por la utilización de proteínas dominantes negativas.

En primer lugar estudiamos el modelo utilizado: células CHO que expresan el receptor de transferrina (TfR) de hámster, células TRVb que no expresan ningún TfR y células TRVb-1 que expresan el TfR humano tipo 1; en relación a la infectividad del TCRV. Se pudo observar que no solo el patrón de infección medido a las 24 hs post infección (p.i.) varía con la presencia o ausencia del TfR sino también la vía endocítica que usa. Con la utilización de un virus no relacionado (VSV) se pudo determinar que la diferencia observada en el patrón de replicación es específica del TCRV ya que la producción de partículas virales de VSV fue la misma en las tres líneas estudiadas. Mediante el ensayo de cinética del TCRV se observó que el receptor humano fue el que mayor diferencia produjo en la replicación del virus, ya que a los tiempos ensayados presentó una curva tipo exponencial en lugar de la gausseana típica de una cinética de producción viral, mientras que en aquellas líneas que no expresan el TfR o expresan el de hámster (TRVb y CHO respectivamente) sí se obtuvo la típica

campana de gauss. Por otro lado, se pudo determinar que en aquellas células que expresan dicho receptor, el virus queda retenido en la membrana al menos hasta las 3 horas p.i. y también se observó una co-localización del virus con el receptor humano (figura 5). La co-localización con el receptor fue confirmada utilizando tanto el TCRV con el JUNV inactivado ya que la pre-incubación con los mismos aumentó la infectividad del TCRV sin inactivar. Por otro lado, la pre-incubación con el TCRV inactivado inhibió la infectividad del JUNV de igual manera que el anticuerpo reactivo contra el TfR humano. Estos datos, sumados a la similitud de secuencias entre las GPC indicarían que el TCRV puede unirse al TfR humano pero dicha unión no desencadena su internalización, sino por el contrario, impide la entrada del mismo.

Para iniciar el estudio de las vías endocíticas utilizadas, primero analizamos la dependencia de compartimentos intracelulares ácidos utilizando compuestos que aumentan el pH endosomal de las células: dansilcadaverina que al ser una base débil capta los  $H^+$  de los compartimentos ácidos y concanamycin A, que actúa inhibiendo la bomba  $H^+$ -ATPasa. Ambos compuestos inhibieron significativamente la replicación del TCRV en las tres líneas utilizadas y en las dos multiplicidades ensayadas. El hecho de haber utilizado dos multiplicidades diferentes se debe a que las infecciones a menores multiplicidades reflejan el uso de vías más específicas. Estos resultados confirman los reportados previamente respecto a la sensibilidad al pH endosomal (Bolken et al. 2006; York et al. 2008) y confirma que el TCRV internaliza en las tres líneas celulares estudiadas mediante una vía endocítica.

Se evaluó la vía endocítica dependiente de clatrina mediante la inhibición farmacológica utilizando el compuesto clorpromazina y mediante el uso de la proteína dominante negativa Eps-15, la cual es esencial en este tipo de endocitosis. Los resultados obtenidos muestran que la entrada del TCRV es dependiente de clatrina en aquellas líneas celulares que no expresan el TfR humano (CHO y TRVb) pero en aquellas células que sí lo expresan, en ninguna de las multiplicidades de infección ensayadas se encontró una inhibición significativa. Esto podría indicar que la presencia del TfR humano interferiría en la principal vía endocítica utilizada por el TCRV aportando evidencias de que la unión del virus a dicho receptor es una unión no productiva.

Para continuar caracterizando la entrada del TCRV se analizó la participación del colesterol celular. Para ello, se utilizaron compuestos que secuestran o extraen el colesterol, nistatina o metil- $\beta$ -ciclodextrina respectivamente. El tratamiento con estos compuestos se realizó solo previo a la infección ya que al ser un virus envuelto, los mismos poseen actividad virucida (Graham et al. 2003; Carro y Damonte 2013). Los resultados obtenidos demostraron que el secuestro del colesterol de membrana no afecta la entrada del TCRV en ninguna de las tres líneas utilizadas pero la extracción de colesterol inhibe significativamente la entrada en aquellas células que expresan el TfR humano. No se estudio la participación de las caveolas debido a que si las mismas estuviesen involucradas también se hubiera obtenido una diferencia significativa con el pre-tratamiento con la nistatina (Cantín et al. 2007; Moriyama et al. 2007; Zhu et al. 2011). Por otro lado, si bien se ha estudiado la participación del colesterol en la endocitosis dependiente de clatrina en especial el efecto de la extracción del colesterol por metil- $\beta$ -ciclodextrina (Rodal et al. 1999; Subtil et al. 1999), las concentraciones y tiempos utilizados en este trabajo son mucho mayores que los utilizados en nuestro trabajo. Dado que este compuesto posee muchos efectos pleiotrópicos, al disminuir la concentración y los tiempos de exposición se favorece la extracción del colesterol solo de la membrana plasmática (Zidovetzki y Levitan 2007), pero aún en estas condiciones se producen modificaciones como el aumento de la fluidez de la membrana y este puede ser uno de los factores que inhiben la entrada del TCRV (Pralle et al. 2000). Otro de los efectos relacionados con la extracción del colesterol de la membrana es la inhibición de la formación de prolongaciones y macropinosomas, por este motivo, también se evaluó esta vía en la entrada del TCRV (Grimmer et al. 2002).

Debido a que se confirmó que el TCRV utiliza la endocitosis para entrar en las líneas ensayadas, se estudió la participación de la proteína dinamina II. Esta proteína participa en el cierre de las vesículas endocíticas principalmente en las vías dependientes de clatrina y caveolinas (Marina-García et al. 2009; Chao y Kunz 2009; Bitoun et al. 2009; Cheng et al. 2012). Se utilizó el compuesto dynasore y la construcción dominante negativa de esta proteína para evaluar su participación en la entrada del TCRV. Por ambos métodos se pudo determinar que esta proteína es necesaria para la entrada del TCRV en las tres líneas celulares, ya que con las dos estrategias utilizadas las diferencias en infectividad y células



infectadas son significativas respecto al control sin tratar. Si bien estos resultados confirman que la vía utilizada por el TCRV en células CHO y TRVb es la dependiente de clatrina, en la línea que expresa el TfR humano la vía es dependiente de colesterol presente en la membrana y del cierre de la vesícula por la proteína dinamina II. Como se mencionó anteriormente, la dependencia de colesterol puede asociarse con la macropinocitosis mientras que la dependencia de dinamina II está frecuentemente asociada a los procesos clásicos de clatrina y caveolina. Sin embargo, hay evidencias de que esta proteína podría también participar en los procesos macropinocíticos y por ese motivo se decidió evaluar la participación de esta vía en la entrada del TCRV (Cao et al. 2007; Mulherkar et al. 2011b; Krieger et al. 2013).

Para analizar la participación de la macropinocitosis se utilizaron distintas estrategias. En primer lugar, se incorporó la línea humana A549 ya que ensayos preliminares en esta línea mostraron el mismo comportamiento que en la línea transformada que sobreexpresa en TfR humano (TRVb-1), es decir, que no se observó inhibición de la infectividad del TCRV con compuestos que inhiben la endocitosis de clatrina o que retienen el colesterol pero sí con la extracción del colesterol de membrana. De esta manera, se evaluó la participación de la integridad de los microfilamentos de actina ya que una de las características principales de esta vía es la formación de prolongaciones de la membrana celular dependiente de la modificación en la dinámica de los filamentos de actina (Mercer y Helenius 2009). Se utilizaron compuestos que desestabilizan dichos filamentos actuando con blancos de acción diferentes. Si bien la citochalasin D desorganiza los filamentos citosólicos mientras que la latrunculina A elimina los almacenamientos de actina-G y depolimeriza la actina tanto cortical como citoplasmática (Spector et al. 1999), observamos que la entrada del TCRV fue inhibida con ambos compuestos en las cuatro líneas evaluadas. Si bien esta metodología se utilizó para estudiar la vía macropinocítica, muchos reportes indican la participación de la actina tanto citosólica como cortical en la entrada por la vía dependiente de clatrina (Schafer 2002; Kaksonen et al. 2005; Yarar et al. 2005). Por este motivo, en células CHO y TRVb estos resultados seguirían aportando evidencias de que la vía principal de entrada es la dependiente de clatrina. En aquellas líneas que expresan el TfR

humano, estos resultados, sumados a los anteriores, podrían indicar que la vía de entrada utilizada es la de la macropinocitosis.

Para continuar el estudio, se utilizaron inhibidores de la vía de PI3K y de la bomba de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Si bien la quinasa PI3K está involucrada en diversos procesos, varios reportes demuestran que la misma es utilizada tanto para la entrada como para la salida de los arenavirus del Viejo y Nuevo Mundo. Particularmente, el JUNV activa la vía al momento de entrar en las células y dicha activación es producida por el TfR ya que favorece el reciclado del mismo (Linero & Scolaro 2009). En el caso del virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV, un arenavirus del Viejo Mundo), PI3K está involucrada en los procesos tardíos del ciclo, especialmente en el proceso de brotación del virus (Urata y Yasuda 2012). Nuestros resultados indican que esta vía solo participa en la entrada de la línea celular que sobreexpresa el TfR humano pero no en la línea humana A549. Si bien habría que analizar más en detalle el comportamiento del TCRV en la línea humana, los resultados se condicen con los descriptos previamente, es decir que el TCRV se estaría uniendo al TfR humano activando la vía PI3K aunque dicha activación no sería suficiente para desencadenar su endocitosis. En el resto de las líneas, la entrada sería mediante un receptor aun no descripto pero el mismo no tendría relación con esta quinasa. Por otro lado, la activación de la PI3K también podría ocurrir por la activación de la macropinocitosis ya que dicha quinasa es necesaria en la membrana plasmática para el remodelado del citoesqueleto que ocurre durante este proceso (Lindmo y Stenmark, 2006). Esto se confirmó utilizando el compuesto amiloride, el cual inhibe la bomba de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  generando así una acumulación de protones en la cercanía de la membrana plasmática que promueve la polimerización de la actina durante la macropinocitosis (Koivusalo et al. 2010). Se ha descripto que esta bomba también está presente en los endosomas y participa en la regulación del pH endosomal además de la clásica bomba de  $\text{H}^+$ -ATPasa. Se demostró que el efecto de muchos de los análogos estructurales del amiloride (principalmente EIPA y HOE694), ejercen su efecto sobre la membrana citoplasmática mediante la basificación de los endosomas tempranos mientras que el amiloride ejerce el efecto directo sobre la membrana plasmática debido a su baja lipofilidad (Gekle et al. 1999). Nuestros resultados muestran que este compuesto inhibió la entrada del TCRV más del 50% solo en las líneas que expresan el TfR humano y solo en estas

líneas se encontró co-localización con el marcador de macropinocitosis, el dextrano (figura 29).

Por lo tanto, estos datos indican que el TCRV posee varias vías de entrada y las mismas dependen de la expresión del TfR humano. Este no es el único caso en el cual se describe más de una vía de entrada para un virus. Varios trabajos demostraron que el virus influenza utiliza tanto la vía dependiente de clatrina como la macropinocitosis y una vía independiente de clatrina y caveolas (Wang y Jiang 2009; de Vries et al. 2011; Siczekarski y Whittaker 2002). Otro ejemplo es el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el cual se ha demostrado que puede entrar tanto por medio de la fusión con la membrana plasmática como por un mecanismo endocítico, ya sea dependiente de *lipid rafts* como dependiente de clatrina y por macropinocitosis (Stein et al. 1987; Carter et al. 2009; Maréchal et al. 2001). Por último, un trabajo publicado recientemente demostró que la macropinocitosis está involucrada en la entrada del LCMV en células A549 y BHK-21 así como también está involucrada en la entrada del JUNV en células BHK-21 (Iwasaki et al. 2014), confirmando la posibilidad que la macropinocitosis pueda estar involucrada en la entrada de los arenavirus y que la utilización de esta vía dependa de la línea celular.

Para continuar con el estudio de la endocitosis del TCRV se analizó la participación de los endosomas tempranos y tardíos utilizando construcciones dominantes negativas de marcadores específicos de cada tipo de endosoma. Los resultados obtenidos confirman que para la línea que no expresa ningún tipo de receptor de transferrina (la línea TRVb), el TCRV ingresa principalmente por la vía de clatrina siguiendo el camino clásico por los endosomas tempranos y tardíos, la misma vía de entrada reportada para el JUNV (Martinez et al. 2007; Martinez et al. 2008; Martinez et al. 2009). Está descrito que en la vía de la macropinositosis, una vez formada la vesícula, la misma continúa hacia los endosomas temprano y posteriormente los tardíos hasta su degradación por fusión con los lisosomas (Mercer y Helenius 2009) por lo tanto, las evidencias demostradas en esta tesis indicarían que la principal vía de entrada utilizada por el TCRV en la línea que sobreexpresa el TfR humano (la línea TRVb-1) es la macropinocitosis. En la línea humana utilizada como control (A549), habría que ampliar los ensayos realizados hasta el momento para confirmar si la vía principal es la macropinocitosis. De esta manera se comprobaría que el TfR humano es el

que induce esta vía de entrada alternativa. En el caso de la línea que expresa el TfR de hámster (la línea CHO), si bien la vía principal de entrada es la dependiente de clatrina, una vez internalizado no seguiría la ruta clásica endosomal. Éste no es el único caso en el cual el virus sigue una ruta diferente, existen reportes de arenavirus del Viejo Mundo que internalizan utilizando una vía alternativa (Pasqual, et al. 2011).

Los resultados obtenidos en esta primera parte del trabajo permiten ampliar los conocimientos sobre los mecanismos de entrada del TCRV aportando evidencia de que los arenavirus del Nuevo Mundo pueden utilizar múltiples vías de entrada, dependiendo de los receptores presentes en la célula blanco.

### *Capítulo II: Estudio de la autofagia durante la infección con el virus Junín*

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado en el cual se produce un reciclado de proteínas y hasta organelas en diferentes situaciones de stress. A su vez, esta vía está ligada al sistema inmune ya que el procesamiento de los patógenos intracelulares por esta vía lleva a la presentación antigénica por el complejo de histocompatibilidad de clase II (Puleston y Simon, 2014). Aún así, muchos virus con genoma ARN utilizan y regulan esta vía para su propio beneficio (Jordan y Randall, 2011).

El virus Junín (JUNV) es el agente etiológico de la fiebre hemorrágica Argentina (FHA) y hasta el momento no existen terapias antivirales efectivas por lo cual el estudio de los mecanismos moleculares y celulares resulta imprescindible para el desarrollo de blancos efectivos. Hasta el momento se ha descrito que el JUNV utiliza el TfR humano para entrar en las células mediante una vía dependiente de clatrina y activa la vía PI3K/Akt. Posteriormente sigue la ruta endocítica clásica pasando por los endosomas tempranos y tardíos (Martinez y col., 2007-2009).

En este trabajo nos propusimos estudiar la relación entre el JUNV y la vía de la autofagia y para ello utilizamos la línea humana A549. En primer lugar, analizamos si la activación o inhibición de la vía de la autofagia previa a la infección afectaba de alguna

manera al virus. Si bien la inhibición produjo una disminución tanto en los valores de infectividad como en el porcentaje de células infectadas, la activación de la vía tanto mediante el medio de ayuno como la activación farmacológica solo incrementó el porcentaje de células infectadas. Esto puede deberse al balance entre el ciclo celular y la autofagia. Cuando la vía se activa, el ciclo celular se frena ya que dicha activación indica una situación de stress de carencia de nutrientes (Neufeld, 2012). Esto lo observamos al ver las células al microscopio, aquellas muestras donde se indujo la autofagia previo a la infección presentaban menos cantidad de células totales por campo. Por este motivo el título viral no fue mayor al control sin tratar, simplemente en ese control había más células totales.

Ese resultado se confirmó transfectando las células con un plásmido conteniendo el marcador de autofagia LC3 acoplado a la proteína verde fluorescente EGFP. Este marcador en condiciones normales presenta un patrón citoplasmático y al activarse la vía de la autofagia el patrón cambia a puntiforme ya que la misma se asocia a los autofagosomas. Esas células transfectadas fueron tratadas con activadores e inhibidores de la autofagia o infectadas con el JUNV para posteriormente cuantificar el número de células positivas para autofagia. Los resultados demostraron que los cultivos infectados, a las 2 horas post infección, presentaban valores de células con la vía activada similares a las células tratadas con los activadores, confirmando que el virus activa la vía en etapas tempranas del ciclo. Estos resultados se confirmaron mediante la técnica de western blot, donde se observó que las células infectadas presentan cantidades relativas de la proteína LC3 asociada a autofagosomas similares a las células ayunadas. Se confirmó que el JUNV mantiene la vía activada durante todo el ciclo realizando una curva en el tiempo de las células transfectadas e infectadas, por lo tanto el virus no necesitaría inhibirla en ningún momento, como ocurre con otros virus como el virus dengue, el cual activa la vía en etapas tempranas de la infección pero inhibe la última etapa de la autofagia para evitar su degradación (Panyasrivanit et al. 2009). Esto mismo ocurre con el virus de la inmunodeficiencia humana en macrófagos (Kyei et al. 2009) mientras que en el caso del virus polio la etapa final de la vía, la fusión con los lisosomas, es importante para la maduración del virus (Richards y Jackson 2012).

Si bien no pudimos determinar cuál es la función específica de esta vía en la replicación del JUNV, utilizando una línea de fibroblastos de ratón pudimos determinar que el gen *Atg5* es necesario para la replicación del virus ya que tanto los valores de infectividad como el porcentaje de células infectadas fue significativamente menor en las células que carecen de la expresión de este gen. *Atg5* es una proteína que frente a la activación de la autofagia se conjuga con *Atg12*. El complejo *Atg5-Atg12* favorece la formación del autofosoma mediante la conjugación de *Atg8* con la fosfatidiletanolamina (PE). Esta última conjugación es esencial para que la proteína LC3 se una a los autofosomas (Hanada et al. 2007). Estos resultados se confirmaron mediante la técnica de western blot, donde se observó que en la línea que carece de dicho gen, solo se observó la presencia de la proteína LC3 citoplasmática mientras que las células salvajes presentan tanto la LC3 citoplasmática como la asociada a autofosomas, siendo esta última la que está presente en mayor proporción (figura 7).

Los resultados obtenidos en esta parte permiten ampliar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la replicación del JUNV, demostrando que el virus modula la vía de la autofagia utilizándola para su beneficio. Por este motivo, podríamos postular a la autofagia como un posible blanco para nuevas terapias antivirales contra la fiebre hemorrágica Argentina.

# **Bibliografía**



- Abraham, J. et al., 2009. Host-species transferrin receptor 1 orthologs are cellular receptors for nonpathogenic new world clade B arenaviruses. *PLoS pathogens*, 5(4), p.e1000358.
- Acosta, E.G., Castilla, V. & Damonte, E.B., 2011. Infectious dengue-1 virus entry into mosquito C6/36 cells. *Virus research*, 160(1), pp.173–179.
- Ambrosio, A.M. et al., 2006. La producción nacional de vacuna a virus Junin vivo atenuado (Candid #1) anti-fiebre hemorrágica argentina. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 40, pp.5–17.
- Amstutz, B. et al., 2008. Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. *The EMBO journal*, 27(7), pp.956–969.
- Amyere, M. et al., 2000. Constitutive Macropinocytosis in Oncogene-transformed Fibroblasts Depends on Sequential Permanent Activation of Phosphoinositide 3-Kinase and Phospholipase C. *Molecular Biology of the Cell*, 11 (10), pp.3453–3467.
- Armstrong, C. & Lillie, R.D., 1934. Public Health Rep. *Washington*, 49, pp.1019–1027.
- Auperin, D.D. et al., 1984. Sequencing studies of pichinde arenavirus S RNA indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S RNA. *Journal of virology*, 52(3), pp.897–904.
- Barth, J.M.I. & Köhler, K., 2014. How to take autophagy and endocytosis up a notch. *BioMed research international*, 2014.
- Benmerah, A. et al., 1998. AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. *The Journal of cell biology*, 140(5), pp.1055–1062.
- Benmerah, A. et al., 1999. Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *Journal of Cell Science*, 112(9), pp.1303–1311.
- Bissig, C. & Gruenberg, J., 2013. Lipid sorting and multivesicular endosome biogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(10), p.a016816.
- Bitoun, M. et al., 2009. Dynamin 2 mutations associated with human diseases impair clathrin-mediated receptor endocytosis. *Human Mutation*, 30(10), pp.1419–1427.
- Van der Blik, A.M. et al., 1993. Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *The Journal of cell biology*, 122(3), pp.553–563.
- Blommaart, E.F.C. et al., 1997. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *European Journal of Biochemistry*, 243(1-2), pp.240–246.
- Bolken, T.C. et al., 2006. Identification and characterization of potent small molecule inhibitor of hemorrhagic fever New World arenaviruses. *Antiviral research*, 69(2), pp.86–97.
- Borio, L. et al., 2002. Hemorrhagic fever viruses as biological weapons: medical and public health management. *Jama*, 287(18), pp.2391–2405.



- Borrow, P. & Oldstone, M.B., 1992. Characterization of lymphocytic choriomeningitis virus-binding protein (s): a candidate cellular receptor for the virus. *Journal of virology*, 66(12), pp.7270–7281.
- Bowen, M.D., Peters, C.J. & Nichol, S.T., 1997. Phylogenetic analysis of the Arenaviridae: patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent hosts. *Molecular phylogenetics and evolution*, 8(3), pp.301–16.
- Bowen, M.D., Peters, C.J. & Nichol, S.T., 1997. Phylogenetic Analysis of the Arenaviridae: Patterns of Virus Evolution and Evidence for Cospeciation between Arenaviruses and Their Rodent Hosts. *Molecular phylogenetics and evolution*, 8(3), pp.301–316.
- BOWEN, M.D., PETERS, C.J. & NICHOL, S.T., 1996. The phylogeny of New World (Tacaribe complex) arenaviruses. *Virology*, 219(1), pp.285–290.
- Brenner, S.L. & Korn, E.D., 1979. Substoichiometric concentrations of cytochalasin D inhibit actin polymerization. Additional evidence for an F-actin treadmill. *Journal of Biological Chemistry*, 254(20), pp.9982–9985.
- Bucci, C. et al., 2000. Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Molecular biology of the cell*, 11(2), pp.467–480.
- Buchmeier, M.J. et al., 1981. Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis and pichinde viruses: generation, characterization, and cross-reactivity with other arenaviruses. *Virology*, 113(1), pp.73–85.
- Buckingham, E.M. et al., 2014. Autophagy and the Effects of Its Inhibition on Varicella-Zoster Virus Glycoprotein Biosynthesis and Infectivity. *Journal of Virology*, 88(2), pp.890–902.
- Cantín, C. et al., 2007. Newcastle disease virus may enter cells by caveolae-mediated endocytosis. *Journal of General Virology*, 88 (2), pp.559–569.
- Cao, H. et al., 2007. Dynamin 2 mediates fluid-phase micropinocytosis in epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 120 (23), pp.4167–4177.
- Cao, W. et al., 1998. Identification of  $\alpha$ -dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science*, 282(5396), pp.2079–2081.
- Carro, A.C. & Damonte, E.B., 2013. Requirement of cholesterol in the viral envelope for dengue virus infection. *Virus research*, 174(1-2), pp.78–87.
- Carter, G.C. et al., 2009. HIV entry in macrophages is dependent on intact lipid rafts. *Virology*, 386(1), pp.192–202.
- Castilla, V. et al., 1994. The entry of Junin virus into Vero cells. *Archives of virology*, 136(3-4), pp.363–374.
- Castilla, V., Palermo, L.M. & Coto, C.E., 2001. Involvement of vacuolar proton ATPase in Junin virus multiplication. *Archives of virology*, 146(2), pp.251–263.

- Chao, W.-T. & Kunz, J., 2009. Focal adhesion disassembly requires clathrin-dependent endocytosis of integrins. *FEBS letters*, 583(8), pp.1337–43.
- Charrel, R.N. & de Lamballerie, X., 2010. Zoonotic aspects of arenavirus infections. *Veterinary microbiology*, 140(3-4), pp.213–20.
- Chaumorcel, M. et al., 2012. The Human Cytomegalovirus Protein TRS1 Inhibits Autophagy via Its Interaction with Beclin 1. *Journal of Virology*, 86(5), pp.2571–2584.
- Chen, Y. et al., 2011. Cholesterol sequestration by nystatin enhances the uptake and activity of endostatin in endothelium via regulating distinct endocytic pathways. *Blood*, 117(23), pp.6392–6403.
- Cheng, C.Y. et al., 2012. Bovine Ephemeral Fever Virus Uses a Clathrin-Mediated and Dynamin 2-Dependent Endocytosis Pathway That Requires Rab5 and Rab7 as Well as Microtubules. *Journal of Virology*, 86 (24 ), pp.13653–13661.
- Clement, C. et al., 2006. A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *The Journal of cell biology*, 174(7), pp.1009–1021.
- Contigiani, M.S. & Sabattini, M.S., 1977. Virulencia diferencial de cepas de virus Junin por marcadores biológicos en ratones y cobayos. *Medicina (B Aires)*, 37(Supl 3), pp.244–251.
- Cook, T.A., Urrutia, R. & McNiven, M.A., 1994. Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(2), pp.644–648.
- Cuervo, A.M., 2004. Autophagy: in sickness and in health. *Trends in cell biology*, 14(2), pp.70–77.
- Cuevas, C.D. et al., 2011. Junin virus infects mouse cells and induces innate immune responses. *Journal of virology*, 85(21), pp.11058–11068.
- Dahlberg, J.E., 1974. Quantitative electron microscopic analysis of the penetration of VSV into L cells. *Virology*, 58(1), pp.250–262.
- Dales, S., 1973. Early events in cell-animal virus interactions. *Bacteriological reviews*, 37(2), p.103.
- Dales, S. et al., 1965. Electron microscopic study of the formation of poliovirus. *Virology*, 26(3), pp.379–389.
- Damke, H. et al., 1994. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *The Journal of cell biology*, 127(4), pp.915–934.
- Devadas, D. et al., 2014. Herpes Simplex Virus Internalization into Epithelial Cells Requires Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchangers and p21-Activated Kinases but neither Clathrin-nor Caveolin-Mediated Endocytosis. *Journal of virology*, 88(22), pp.13378–13395.
- Dinkins, C., Pilli, M. & Kehrl, J.H., 2015. Roles of autophagy in HIV infection. *Immunol Cell Biol*, 93(1), pp.11–17.

- Downs, W.G. et al., 1963. Tacaribe virus, a new agent isolated from Artibeus bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies. *Am J Trop Med Hyg*, 12(4), pp.640–646.
- Dreux, M. et al., 2009. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), pp.14046–51.
- Dunn, K.W., McGraw, T.E. & Maxfield, F.R., 1989. Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *The Journal of Cell Biology*, 109(6), pp.3303–3314.
- Edinger, A.L. & Thompson, C.B., 2002. Akt Maintains Cell Size and Survival by Increasing mTOR-dependent Nutrient Uptake M. Raff, ed. *Molecular Biology of the Cell*, 13(7), pp.2276–2288.
- Enria, D.A., Briggiler, A.M. & Sánchez, Z., 2008. Treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral research*, 78(1), pp.132–139.
- Fader, C.M. & Colombo, M.I., 2008. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ*, 16(1), pp.70–78.
- Fan, L., Briese, T. & Lipkin, W.I., 2010. Z proteins of New World arenaviruses bind RIG-I and interfere with type I interferon induction. *Journal of virology*, 84(4), pp.1785–1791.
- Feng, Y., Press, B. & Wandinger-Ness, A., 1995. Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *The Journal of cell biology*, 131(6), pp.1435–1452.
- Finkelshtein, D. et al., 2013. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(18), pp.7306–7311.
- Forzan, M., Marsh, M. & Roy, P., 2007. Bluetongue virus entry into cells. *Journal of virology*, 81(9), pp.4819–4827.
- Franze-Fernandez, M.-T. et al., 1987. Molecular structure and early events in the replication of Tacaribe arenavirus S RNA. *Virus research*, 7(4), pp.309–324.
- Fröhlich, E. & Roblegg, E., 2012. Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. *Toxicology*, 291(1-3), pp.10–17.
- Gekle, M. et al., 1999. Inhibition of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange impairs receptor-mediated albumin endocytosis in renal proximal tubule-derived epithelial cells from opossum. *The Journal of physiology*, 520(3), pp.709–721.
- Ghazal, P. et al., 2000. Viruses: hostages to the cell. *Virology*, 275(2), pp.233–237.
- Ghigo, E., 2009. A dilemma for viruses and giant viruses: which endocytic pathway to use to enter cells? *Intervirology*, 53(5), pp.274–283.
- Gimenez, M.C. et al., 2015. Infectious Bursal Disease Virus uptake Involves Macropinocytosis and Trafficking to Early Endosomes in a Rab5-dependent Manner. *Cellular Microbiology*, p.n/a–n/a.

- Godlee, C. & Kaksonen, M., 2013. From uncertain beginnings: Initiation mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *The Journal of cell biology*, 203(5), pp.717–725.
- González-Gaitán, M. & Stenmark, H., 2003. Endocytosis and signaling: a relationship under development. *Cell*, 115(5), pp.513–521.
- Gorvel, J.-P. et al., 1991. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell*, 64(5), pp.915–925.
- Graham, D.R.M. et al., 2003. Cholesterol Depletion of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Simian Immunodeficiency Virus with  $\beta$ -Cyclodextrin Inactivates and Permeabilizes the Virions: Evidence for Virion-Associated Lipid Rafts. *Journal of Virology*, 77 (15), pp.8237–8248.
- Gray, N.W. et al., 2003. Dynamin 3 is a component of the postsynapse, where it interacts with mGluR5 and Homer. *Current biology*, 13(6), pp.510–515.
- Grimmer, S., van Deurs, B. & Sandvig, K., 2002. Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol. *Journal of cell science*, 115(14), pp.2953–2962.
- Grosshans, B.L., Ortiz, D. & Novick, P., 2006. Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(32), pp.11821–11827.
- Gruenberg, J., Griffiths, G. & Howell, K.E., 1989. Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *The Journal of Cell Biology*, 108(4), pp.1301–1316.
- Guiducci, C. et al., 2006. Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *The Journal of experimental medicine*, 203(8), pp.1999–2008.
- Hanada, T. et al., 2007. The Atg12-Atg5 Conjugate Has a Novel E3-like Activity for Protein Lipidation in Autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (52), pp.37298–37302.
- Henley, J.R. et al., 1998. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *The Journal of cell biology*, 141(1), pp.85–99.
- Hosokawa, N. et al., 2009. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy. *Molecular biology of the cell*, 20(7), pp.1981–1991.
- Howard, C.R., 1986. *Arenaviruses.*, Elsevier Science Publishers BV.
- Huang, S.-C. et al., 2009. Enterovirus 71-induced autophagy detected in vitro and in vivo promotes viral replication. *Journal of Medical Virology*, 81(7), pp.1241–1252.
- Hyttinen, J.M.T. et al., 2013. Maturation of autophagosomes and endosomes: a key role for Rab7. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(3), pp.503–510.
- Iwasaki, M., Ngo, N. & de la Torre, J.C., 2014. Sodium hydrogen exchangers contribute to arenavirus cell entry. *Journal of virology*, 88(1), pp.643–54.

- Jäger, S. et al., 2004. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of Cell Science*, 117 (20), pp.4837–4848.
- Jordan, T.X. & Randall, G., 2012. Manipulation or capitulation: virus interactions with autophagy. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 14(2), pp.126–139.
- Jovic, M. et al., 2010. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histology and histopathology*, 25(1), pp.99–112.
- Jung, C.H. et al., 2010. mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters*, 584(7), pp.1287–1295.
- Kabeya, Y. et al., 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal*, 19(21), pp.5720–5728.
- Kaksonen, M., Toret, C.P. & Drubin, D.G., 2005. A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell*, 123(2), pp.305–20.
- Kälin, S. et al., 2010. Macropinocytotic uptake and infection of human epithelial cells with species B2 adenovirus type 35. *Journal of virology*, 84(10), pp.5336–5350.
- Ke, P.-Y. & Chen, S.S.-L., 2011. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(1), pp.37–56.
- Kerr, M.C. & Teasdale, R.D., 2009. Defining macropinocytosis. *Traffic*, 10(4), pp.364–371.
- Kirchhausen, T., 2009. Imaging endocytic clathrin structures in living cells. *Trends in cell biology*, 19(11), pp.596–605.
- Kirkegaard, K., Taylor, M.P. & Jackson, W.T., 2004. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 2(4), pp.301–314.
- Klionsky, D.J. et al., 2010. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes. *Autophagy*, 6(4), pp.438–448.
- Koivusalo, M. et al., 2010. Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *The Journal of Cell Biology*, 188(4), pp.547–563.
- Krieger, S.E. et al., 2013. Echovirus 1 Entry into Polarized Caco-2 Cells Depends on Dynamin, Cholesterol, and Cellular Factors Associated with Macropinocytosis. *Journal of Virology*, 87 (16), pp.8884–8895.
- Krzyzaniak, M.A. et al., 2013. Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein. *PLoS pathogens*, 9(4), p.e1003309.
- Kyei, G.B. et al., 2009. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *The Journal of cell biology*, 186(2), pp.255–68.
- Laakkonen, J.P. et al., 2009. Clathrin-independent entry of baculovirus triggers uptake of E. coli in non-phagocytic human cells. *PLoS One*, 4(4), p.e5093.

- Lafourcade, C. et al., 2008. Regulation of the V-ATPase along the Endocytic Pathway Occurs through Reversible Subunit Association and Membrane Localization. E. Joly, ed. *PLoS ONE*, 3(7), p.e2758.
- Lee, E. & Knecht, D.A., 2002. Visualization of Actin Dynamics During Macropinocytosis and Exocytosis. *Traffic*, 3(3), pp.186–192.
- Lee, Y.-R. et al., 2013. Dengue virus infection induces autophagy: an in vivo study. *J Biomed Sci*, 20, p.65.
- Lehmann-Grube, F., 1973. Lymphocytic choriomeningitis virus and other arenaviruses.
- Levine, B. & Klionsky, D.J., 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell*, 6(4), pp.463–477.
- Li, L., Chen, Y. & Gibson, S.B., 2013. Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cellular signalling*, 25(1), pp.50–65.
- Liang, X.H. et al., 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402(6762), pp.672–676.
- Lin, Y.-C. et al., 2012. Regulation of Inflammatory Response by 3-Methyladenine Involves the Coordinative Actions on Akt and Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Rather than Autophagy. *The Journal of Immunology*, 189 (8), pp.4154–4164.
- Linero, F.N. & Scolaro, L.A., 2009. Participation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in Junin virus replication in vitro. *Virus research*, 145(1), pp.166–170.
- Lum, J.J. et al., 2005. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 120(2), pp.237–248.
- Magadán, J.G. et al., 2006. Rab22a regulates the sorting of transferrin to recycling endosomes. *Molecular and cellular biology*, 26(7), pp.2595–2614.
- Maréchal, V. et al., 2001. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry into Macrophages Mediated by Macropinocytosis. *Journal of Virology*, 75 (22), pp.11166–11177.
- Marina-García, N. et al., 2009. Clathrin- and Dynamin-Dependent Endocytic Pathway Regulates Muramyl Dipeptide Internalization and NOD2 Activation. *The Journal of Immunology*, 182 (7), pp.4321–4327.
- Marino, G. & Lopez-Otin, C., 2004. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(12), pp.1439–1454.
- 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(1), pp.95–103.
- Martinez, M.G., Cordo, S.M. & Candurra, N. a, 2007. Characterization of Junin arenavirus cell entry. *The Journal of general virology*, 88(Pt 6), pp.1776–84.

- Martinez, M.G., Cordo, S.M. & Candurra, N.A., 2008. Involvement of cytoskeleton in Junin virus entry. *Virus research*, 138(1), pp.17–25.
- Martinez, M.G., Forlenza, M.B. & Candurra, N.A., 2009. Involvement of cellular proteins in Junin arenavirus entry. *Biotechnology journal*, 4(6), pp.866–870.
- Matsunaga, K. et al., 2010. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *The Journal of Cell Biology*, 190(4), pp.511–521.
- Maxfield, F.R. & McGraw, T.E., 2004. Endocytic recycling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(2), pp.121–132.
- Mayor, S., Presley, J.F. & Maxfield, F.R., 1993. Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *Journal of Cell Biology*, 121(6), pp.1257–1269.
- McGraw, T.E., Greenfield, L. & Maxfield, F.R., 1987. Functional expression of the human transferrin receptor cDNA in Chinese hamster ovary cells deficient in endogenous transferrin receptor. *The Journal of cell biology*, 105(1), pp.207–214.
- Meijer, A.J. & Codogno, P., 2004. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(12), pp.2445–2462.
- Mercer, J. & Helenius, A., 2009. Virus entry by macropinocytosis. *Nature cell biology*, 11(5), pp.510–20.
- Mercer, J., Schelhaas, M. & Helenius, A., 2010. Virus entry by endocytosis. *Annual review of biochemistry*, 79(79), pp.803–833.
- Méresse, S., Gorvel, J.-P. & Chavrier, P., 1995. The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. *Journal of Cell Science*, 108(11), pp.3349–3358.
- Merritt, E.A. et al., 1994. Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. *Protein Science*, 3(2), pp.166–175.
- Mohrmann, K. & van der Sluijs, P., 1999. Regulation of membrane transport through the endocytic pathway by rabGTPases. *Molecular membrane biology*, 16(1), pp.81–87.
- Moriyama, T. et al., 2007. Caveolar Endocytosis Is Critical for BK Virus Infection of Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *Journal of Virology*, 81(16), pp.8552–8562.
- Morton, W.M., Ayscough, K.R. & McLaughlin, P.J., 2000. Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nature cell biology*, 2(6), pp.376–378.
- Mulcahy, L.A., Pink, R.C. & Carter, D.R.F., 2014. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of extracellular vesicles*, 3.
- Mulherkar, N. et al., 2011a. The Ebola virus glycoprotein mediates entry via a non-classical dynamin-dependent macropinocytic pathway. *Virology*, 419(2), pp.72–83.

- Mulherkar, N. et al., 2011b. The Ebola virus glycoprotein mediates entry via a non-classical dynamin-dependent macropinocytic pathway. *Virology*, 419(2), pp.72–83.
- Mullock, B.M. et al., 1998. Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *The Journal of cell biology*, 140(3), pp.591–601.
- Muroi, M. et al., 1993. Folimycin (concanamycin A), a specific inhibitor of V-ATPase, blocks intracellular translocation of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus before arrival to the Golgi apparatus. *Cell structure and function*, 18(3), pp.139–149.
- Murray, J.T. et al., 2002. Role of Rab5 in the Recruitment of hVps34/p150 to the Early Endosome. *Traffic*, 3(6), pp.416–427.
- Nabi, I.R. & Le, P.U., 2003. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *The Journal of cell biology*, 161(4), pp.673–677.
- Neufeld, T.P., 2012. Autophagy and cell growth—the yin and yang of nutrient responses. *Journal of cell science*, 125(Pt 10), pp.2359–68.
- O'Donnell, V., LaRocco, M. & Baxt, B., 2008. Heparan sulfate-binding foot-and-mouth disease virus enters cells via caveola-mediated endocytosis. *Journal of virology*, 82(18), pp.9075–9085.
- Oh, P. & Schnitzer, J.E., 2001. Segregation of Heterotrimeric G Proteins in Cell Surface Microdomains Gq Binds Caveolin to Concentrate in Caveolae, whereas Gi and Gs Target Lipid Rafts by Default. *Molecular Biology of the Cell*, 12(3), pp.685–698.
- Ohashi, M. et al., 1999. An arrested late endosome-lysosome intermediate aggregate observed in a Chinese hamster ovary cell mutant isolated by novel three-step screening. *Journal of cell science*, 112(8), pp.1125–1138.
- Oldenburg, J. et al., 2007. Differences in tropism and pH dependence for glycoproteins from the clade B1 arenaviruses: implications for receptor usage and pathogenicity. *Virology*, 364(1), pp.132–139.
- Orsi, A., Polson, H.E.J. & Tooze, S.A., 2010. Membrane trafficking events that partake in autophagy. *Current opinion in cell biology*, 22(2), pp.150–6.
- Orvedahl, A. & Levine, B., 2008. Autophagy and viral neurovirulence. *Cellular microbiology*, 10(9), pp.1747–1756.
- Otto, G.P. & Nichols, B.J., 2011. The roles of flotillin microdomains—endocytosis and beyond. *Journal of cell science*, 124(23), pp.3933–3940.
- Palecek, S.P. et al., 1997. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*, 385(6616), pp.537–540.
- Palmgren, M.G., 1991. Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: mechanism and limitations. *Analytical biochemistry*, 192(2), pp.316–321.



- Panyasrivanit, M. et al., 2009. Co-localization of constituents of the dengue virus translation and replication machinery with amphisomes. *The Journal of general virology*, 90(Pt 2), pp.448–56.
- Parodi, A.S. et al., 1958. Sobre la etiología del brote epidémico de Junín. *Día Médico*, 30, pp.2300–2301.
- Pasqual, G., Rojek, J.M., et al., 2011. Old World Arenaviruses Enter the Host Cell via the Multivesicular Body and Depend on the Endosomal Sorting Complex Required for Transport. *PLoS Pathog*, 7(9), p.e1002232.
- Pasqual, G., Rojek, J.M., et al., 2011. Old world arenaviruses enter the host cell via the multivesicular body and depend on the endosomal sorting complex required for transport. *PLoS Pathogens*, 7(9), p.e1002232.
- Pelkmans, L., Püntener, D. & Helenius, A., 2002. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science*, 296(5567), pp.535–539.
- Pérez, L. & Carrasco, L., 1993. Entry of poliovirus into cells does not require a low-pH step. *Journal of virology*, 67(8), pp.4543–8.
- Piccinotti, S., Kirchhausen, T. & Whelan, S.P.J., 2013. Uptake of rabies virus into epithelial cells by clathrin-mediated endocytosis depends upon actin. *Journal of virology*, 87(21), pp.11637–11647.
- Pietiäinen, V. et al., 2004. Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Molecular biology of the cell*, 15(11), pp.4911–4925.
- Popova, N. V., Deyev, I.E. & Petrenko, A.G., 2013. Clathrin-mediated endocytosis and adaptor proteins. *Acta naturae*, 5(3), p.62.
- Powis, G. et al., 1994. Wortmannin, a Potent and Selective Inhibitor of Phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Research*, 54 (9), pp.2419–2423.
- Pralle, A. et al., 2000. Sphingolipid–Cholesterol Rafts Diffuse as Small Entities in the Plasma Membrane of Mammalian Cells. *The Journal of Cell Biology*, 148(5), pp.997–1008.
- Press, B. et al., 1998. Mutant Rab7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6–phosphate receptor in an early endocytic compartment. *The Journal of cell biology*, 140(5), pp.1075–1089.
- Rasmussen, I. & Vilhardt, F., 2015. Macropinocytosis Is the Entry Mechanism of Amphotropic Murine Leukemia Virus. *Journal of virology*, 89(3), pp.1851–1866.
- Raught, B., Gingras, A.-C. & Sonenberg, N., 2001. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13), pp.7037–7044.
- Ravikumar, B. et al., 2008. Rab5 modulates aggregation and toxicity of mutant huntingtin through macroautophagy in cell and fly models of Huntington disease. *Journal of cell science*, 121(10), pp.1649–1660.

- Rawls, W.E., Chan, M.A. & Gee, S.R., 1981. Mechanisms of persistence in arenavirus infections: a brief review. *Canadian journal of microbiology*, 27(6), pp.568–574.
- Richards, A.L. & Jackson, W.T., 2012. Intracellular Vesicle Acidification Promotes Maturation of Infectious Poliovirus Particles. *PLoS Pathog*, 8(11), p.e1003046.
- Richetta, C. et al., 2013. Sustained Autophagy Contributes to Measles Virus Infectivity V. Deretic, ed. *PLoS Pathogens*, 9(9), p.e1003599.
- Rink, J. et al., 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122(5), pp.735–749.
- Rodal, S.K. et al., 1999. Extraction of cholesterol with methyl- $\beta$ -cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Molecular biology of the cell*, 10(4), pp.961–974.
- Rojek, J.M. et al., 2008. Different mechanisms of cell entry by human-pathogenic Old World and New World arenaviruses. *Journal of virology*, 82(15), pp.7677–7687.
- Sanchez, A. et al., 1989. Junin virus monoclonal antibodies: characterization and cross-reactivity with other arenaviruses. *Journal of General Virology*, 70(5), pp.1125–1132.
- Sayler, K. a et al., 2014. Isolation of Tacaribe Virus, a Caribbean Arenavirus, from Host-Seeking *Amblyomma americanum* Ticks in Florida. *PloS one*, 9(12), p.e115769.
- Schafer, D.A., 2002. Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(1), pp.76–81.
- Schelhaas, M. et al., 2012. Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin-and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS pathogens*, 8(4), p.e1002657.
- Schmid, D. & Münz, C., 2007. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity*, 27(1), pp.11–21.
- Scolaro, L.A., Mersich, S.E. & Damonte, E.B., 1990. A mouse attenuated mutant of Junin virus with an altered envelope glycoprotein. *Archives of virology*, 111(3-4), pp.257–262.
- Scott, R.C., Juhász, G. & Neufeld, T.P., 2007. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Current Biology*, 17(1), pp.1–11.
- Sheff, D.R. et al., 1999. The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *The Journal of cell biology*, 145(1), pp.123–139.
- Sieczkarski, S.B. & Whittaker, G.R., 2002. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology*, 76(20), pp.10455–10464.
- Simonsen, A. et al., 2001. The role of phosphoinositides in membrane transport. *Current opinion in cell biology*, 13(4), pp.485–492.
- Smart, E.J. et al., 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Molecular and cellular biology*, 19(11), pp.7289–7304.

- Smelt, S.C. et al., 2001. Differences in Affinity of Binding of Lymphocytic Choriomeningitis Virus Strains to the Cellular Receptor  $\alpha$ -Dystroglycan Correlate with Viral Tropism and Disease Kinetics *J. Virol.*, 75(1), pp.448–457.
- Sodeik, B., 2000. Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends in microbiology*, 8(10), pp.465–472.
- Spector, I. et al., 1999. New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microscopy research and technique*, 47(1), pp.18–37.
- Stan, R. V., 2005. Structure of caveolae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1746(3), pp.334–348.
- Stark, G.R. et al., 1998. How cells respond to interferons. *Annual review of biochemistry*, 67(1), pp.227–264.
- Stein, B.S. et al., 1987. pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell*, 49(5), pp.659–668.
- Stenmark, H. et al., 1995. Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell*, 83(3), pp.423–432.
- Stossel, T.P., 1989. From signal to pseudopod. How cells control cytoplasmic actin assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 264 (31), pp.18261–18264.
- Subauste, C.S., 2009. Autophagy as an antimicrobial strategy.
- Subtil, A. et al., 1999. Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12), pp.6775–6780.
- Swanson, J.A. & Watts, C., 1995. Macropinocytosis. *Trends in Cell Biology*, 5(11), pp.424–428.
- Tallóczy, Z., Virgin Herbert, I. V & Levine, B., 2006. PKR-dependent xenophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy*, 2(1), pp.24–29.
- Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E., 2004. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(12), pp.2503–18.
- Teissier, É. & Pécheur, E.-I., 2007. Lipids as modulators of membrane fusion mediated by viral fusion proteins. *European Biophysics Journal*, 36(8), pp.887–899.
- Tooze, S.A. & Razi, M., 2009. The essential role of early endosomes in autophagy is revealed by loss of COPI function. *Autophagy*, 5(6), pp.874–875.
- Traub, E., 1935. A filterable virus recovered from white mice. *Science*, 81(2099), pp.298–299.
- Urata, S. & Yasuda, J., 2012. Molecular mechanism of arenavirus assembly and budding. *Viruses*, 4(10), pp.2049–79.

- Vela, E.M. et al., 2007. Arenavirus entry occurs through a cholesterol-dependent, non-caveolar, clathrin-mediated endocytic mechanism. *Virology*, 369(1), pp.1–11.
- De Vries, E. et al., 2011. Dissection of the Influenza A Virus Endocytic Routes Reveals Macropinocytosis as an Alternative Entry Pathway A. Pekosz, ed. *PLoS Pathogens*, 7(3), p.e1001329.
- Wang, H. & Jiang, C., 2009. Influenza A virus H5N1 entry into host cells is through clathrin-dependent endocytosis. *Science in China Series C: Life Sciences*, 52(5), pp.464–469.
- 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. *The Journal of cell biology*, 123(5), pp.1107–1117.
- Ward, E.S. et al., 2005. From sorting endosomes to exocytosis: association of Rab4 and Rab11 GTPases with the Fc receptor, FcRn, during recycling. *Molecular biology of the cell*, 16(4), pp.2028–2038.
- Whittaker, G.R. & Helenius, A., 1998. Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology*, 246(1), pp.1–23.
- Wu, Y.-T. et al., 2010. Dual Role of 3-Methyladenine in Modulation of Autophagy via Different Temporal Patterns of Inhibition on Class I and III Phosphoinositide 3-Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(14), pp.10850–10861.
- Wulff, H. et al., 1977. Isolation of an arenavirus closely related to Lassa virus from *Mastomys natalensis* in south-east Africa. *Bulletin of the World Health Organization*, 55(4), p.441.
- Yarar, D., Waterman-Storer, C.M. & Schmid, S.L., 2005. A Dynamic Actin Cytoskeleton Functions at Multiple Stages of Clathrin-mediated Endocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 16(2), pp.964–975.
- Yordy, B. & Iwasaki, A., 2011. Autophagy in the control and pathogenesis of viral infection. *Current opinion in virology*, 1(3), pp.196–203.
- York, J. et al., 2008. pH-Induced Activation of Arenavirus Membrane Fusion Is Antagonized by Small-Molecule Inhibitors. *Journal of Virology*, 82(21), pp.10932–10939.
- York, J. et al., 2004. The signal peptide of the Junin arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex. *Journal of virology*, 78(19), pp.10783–10792.
- Yousuf, M.A. et al., 2013. Caveolin-1 associated adenovirus entry into human corneal cells. *PLoS one*, 8(10), p.e77462.
- Zaas, D.W. et al., 2009. The expanding roles of caveolin proteins in microbial pathogenesis. *Communicative & integrative biology*, 2(6), pp.535–537.
- Zhang, R. et al., 2014. The Regulation of Autophagy by Influenza A Virus. *BioMed Research International*, 2014, p.498083.

- Zhao, J. et al., 2013. Manipulation of autophagy by HCMV infection is involved in mTOR and influences the replication of virus. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* , 45 (11 ), pp.979–981.
- Zhu, X.-D. et al., 2011. Caveolae-dependent Endocytosis Is Required for Class A Macrophage Scavenger Receptor-mediated Apoptosis in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry* , 286 (10 ), pp.8231–8239.
- Zhu, Y.-Z. et al., 2012. Japanese encephalitis virus enters rat neuroblastoma cells via a pH-dependent, dynamin and caveola-mediated endocytosis pathway. *Journal of virology*, 86(24), pp.13407–13422.
- Zidovetzki, R. & Levitan, I., 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et biophysica acta*, 1768(6), pp.1311–1324.
- Zuk, P.A. & Elferink, L.A., 1999. Rab15 mediates an early endocytic event in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274(32), pp.22303–22312.