Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Eventos tempranos del ciclo de replicación del virus Junín: interacción del virus con lectinas del tipo C

Forlenza, María Belén

2016-03-15

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Forlenza, María Belén. (2016-03-15). Eventos tempranos del ciclo de replicación del virus Junín: interacción del virus con lectinas del tipo C. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Forlenza, María Belén. "Eventos tempranos del ciclo de replicación del virus Junín: interacción del virus con lectinas del tipo C". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-15.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

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

"Eventos tempranos del ciclo de replicación del virus Junín: interacción del virus con lectinas de tipo C"

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

Lic. María Belén Forlenza

Directora de tesis: Nélida A. Candurra
Consejera de estudios: Cybele García

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

Buenos Aires, 15 de Marzo de 2016

Resumen

El virus Junín (JUNV) es el agente etiológico de la fiebre hemorrágica argentina (FHA), una enfermedad zoonótica que afecta el área central de la Pampa húmeda de la República Argentina. Distintos mecanismos de endocitosis son utilizados en las infecciones virales. En la línea celular Vero, el complejo glicoproteico presente en los viriones es el responsable de las interacciones iniciales con el receptor celular de transferrina 1 (TfR1) y la entrada a la célula es por endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina. En varias familias de virus envueltos, su entrada y diseminación pueden estar mediadas por lectinas de tipo C. Las mismas son proteínas transmembrana tipo 2, constituyen una amplia familia de receptores que reconocen estructuras específicas de carbohidratos presentes en patógenos y se encuentra presente principalmente en células dendríticas inmaduras, macrófagos y células endoteliales. Una de ellas, DC-SIGN posee un rol importante en los estadios iniciales de la respuesta inmune, reconoce estructuras internas ramificadas de manosas y posee funciones de receptor para varios virus. DC-SIGN se compone por un dominio extracelular de reconocimiento a carbohidratos (DRC) que une residuos con carbohidratos de alta manosa y una cola citoplasmática con motivos conservados de dileucinas (LL) y un cluster triacídico (EEE). Debido a que JUNV presenta proteínas altamente glicosiladas, y que en los estadíos de la infección temprana interactuaría con células dendríticas y otras del sistema inmune, en este trabajo se estudió la interacción de JUNV con DC-SIGN y el mecanismo endocítico asociado a la misma. Los resultados demuestran que DC-SIGN actúa como un auténtico receptor para JUNV en las células que la expresan y que la entrada a las mismas es a través de endocitosis utilizando vesículas recubiertas de clatrina con dependencia de colesterol y filamentos de actina corticales intactos.

Palabras Claves: Arenavirus, Virus Junín, lectinas tipo C, DC-SIGN, endocitosis

"Early Events in Junin Virus Replication Cycle: Virus Interaction with C-type Lectins"

Junin Virus (JUNV) is a member of the *Arenaviridae* family and the etiologic agent of Argentine Hemorrhagic fever (AHF), a zoonotic illness affecting the farming land of Argentina. Several endocytic pathways are used during viral infections. In Vero cell line, the glycoprotein complex present in virions is responsible of interaction with Transferrin receptor type I (TfR1) and internalization is clathrin mediated. Entry and dissemination of several envelope viruses are mediated by C-type lectins. These are transmembrane proteins that are expressed in immature dendritic, macrophages and endothelial cells, integrating a family of receptors which recognize specific carbohydrates present in pathogens. One of them, Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin (DC-SIGN) has an important role during the initial stages of the immune response, recognizes high mannose residues and is considered as a receptor for several viruses. DC-SIGN is composed by an extracellular carbohydrate recognition domain (CRD) and a cytoplasmic tail containing conserved motives as dileucine (LL) and triacidic cluster (EEE). As JUNV presents highly glycosylated proteins and that during initial steps of the infection, JUNV would interact with dendritic cells and others belonging to the immune system, in this work we studied the interaction between JUNV and DC-SIGN and the entry pathway associated with this. Taken together our results demonstrate that DC-SIGN is a real receptor for JUNV and that the main entry pathway involved is clathrin mediated endocytosis and it depends on cholesterol and intact cortical actin filaments.

Key words: Arenavirus, Junin Virus, C-type lectins, DC-SIGN, virus entry

Con esta tesis culminan ocho años de trabajo en el laboratorio de virología del Departamento de Química Biológica de la FCEyN. En todo ese tiempo, afortunadamente me he cruzado con muchas personas que, en distintas formas, permitieron la realización de esta tesis doctoral, y no puedo dejar de reconocerlos y agradecerles.

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Elsa Damonte, directora del Laboratorio de Virología por permitir formar parte de este grupo, por ser tan amable y cálida. Gracias por confiar en mí para las actividades del laboratorio.

Especialmente quiero expresar mi reconocimiento, admiración y agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Nélida Candurra, quien desde un principio me abrió las puertas de este lugar y me formó en el área de virología desde que era estudiante. Quiero agradecerle la eterna paciencia, el estar a mi lado corrigiéndome y acompañándome, por la confianza y por generar un clima afectuoso, familiar y divertido que hizo que QB20 se convirtiera en mi segundo hogar. Muchas gracias Nellu, han sido 8 años maravillosos y que recordaré por siempre con mucho cariño.

Luego, no puedo de dejar de agradecer eternamente a la Dra. Guadalupe Martínez, mi codirectora extra-oficial, quien también me instruyó en las metodologías de la virología, quien en todo momento me asesoró (aun estando lejos) y se preocupó en aconsejarme para que no me "estanque" y pueda lograr mejores antecedentes en el área. Gracias por la paciencia y la buena onda Guada!

Asimismo, quiero agradecerle a la Dra. Sandra Cordo por la ayuda permanente que se intensificó en este último tiempo. Por las discusiones de resultados y la planificación de experimentos a la par, por la confianza, por creer en mí para considerarme en sus proyectos y ayudarme a mejorar mi formación y mi CV. Gracias San por tu aliento y tu ayuda!

No puedo dejar de mencionar a mis compañeros de escritorio y de experimentos. Ellos también contribuyeron a que el laboratorio sea mi lugar de pertenencia y mucho de este trabajo lo pude realizar gracias a su ayuda. A la Dra. Julieta Roldán, por su enorme ayuda. July me faltan palabras para agradecerte la ayuda, por acompañarme y alentarme,

por ser una gran compañera. Voy a extrañar los momentos compartidos en QB20. Además, en este último año tuve el agrado de compartir los estudios de DC-SIGN con Ariel Strazza, un gran compañero y una gran persona. Gracias Ari por tu ayuda y por hacer todo más divertido.

Fue fundamental para mí el apoyo y la ayuda de mi consejera de estudios, la Dra. Cybel García. Su optimismo me levantó en todo momento, me facilitó lo que se hacía difícil y me abrió las puertas a la continuidad en este campo. Gracias Cybe por la ayuda, por tu aliento y por tu cariño.

En este tiempo en el laboratorio he encontrado buenos compañeros y los mejores amigos. Quiero agradecer en particular a mi amiga del alma Maru Dávola, un ejemplo de becaria y la persona más buena del mundo. Gracias amiga por ayudarme tanto, por las meriendas y por estar a mi lado. Sos un gran ejemplo de persona y de científico. También quiero agradecer particularmente a mis otros compañeros con los que puedo hablar "sin filtros": José, Fede, Lili. Son los mejores amigos que puede existir, gracias por tanta ayuda en todo momento, por aguantarme, por preocuparse por mí, por enseñarme y por pasar los mejores momentos "intra" y "extra lab". Voy a extrañar trabajar a su lado.

A todo el laboratorio (el viro team), especialmente a Vivi, Josefina, Erina, Flavia, Carlitos B, Clau, Andre, Luis, Laura, Carlos P, Guille, Susan. También a los otros integrantes del grupo "*Viro viridae":* Euge, Vero, Ema, Maxi, Nieves, Nadia, Laura, Majo y Luana. Todos han sido muy amables y atentos conmigo, y han contribuido a la realización de esta tesis. Agradezco los consejos, las palabras de aliento, los préstamos, los regalos, la paciencia y tanta cordialidad. Pasé excelentes momentos con ustedes que atesoraré en mi corazón siempre.

También quiero agradecerles a las personas del Departamento que han sido muy atentas conmigo, especialmente a la Dra. Sandra Ruzal, que me ha tenido siempre en cuenta; a mis compañeros de pasillos y algunas meriendas, especialmente a Manu, Estefi y Dani P.

Finalmente, y no menos importante a toda mi familia. A mis padres por educarme y fomentarme a estudiar y a superarme cada día, por apoyarme a realizar esta carrera y creer en mí. Por estar conmigo en mis triunfos y sostenerme en momentos no gratos. Son mi gran ejemplo de que las cosas se pueden hacer bien con esfuerzo, calidad y honestidad. Les estaré agradecida toda la vida. A mis hermanos, los mejores compañeros de la vida, que me han aguantado tanto y me han acompañado siempre, especialmente en este última etapa de tesis. Son la mejor familia que existe, los amo con el corazón. A mi esposo, mi gran compañero y pilar fundamental en los últimos 14 años, por su amor, por apoyarme en mis decisiones, por la eterna paciencia, por la ayuda con la tecnología y con todo, por comprender algunas cosas inentendibles de la vida de un becario doctoral.

A todos mis amigos y familiares que han comprendido los aplazamientos de encuentros por mi trabajo y me han alentado en mi formación profesional que es tan importante y apasionante para mí.

Soy una persona muy afortunada porque estoy rodeada de grandes personas: eternamente gracias!!!

"A mi esposo, mis padres y hermanos:

grandes pilares de mi vida"

"Un Científico en su laboratorio no es simplemente técnico:

también es un niño frente a los fenómenos naturales que lo impresionan

como si fueran cuentos de hadas"

Marie Curie

(1867- 1934)

ABREVIATURAS…… 11

INTRODUCCIÓN…… 15

I- LA FAMILIA ARENAVIRIDAE…… 16

II- FIEBRE HEMORRÁGICA ARGENTINA …… 23

III. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LA FHA …… 25

IV. EL VIRUS JUNIN: ESTRUCTURA MOLECULAR …… 28

V. CICLO DE REPLICACIÓN …… 31

VI. INTERACCIÓN VIRUS- CÉLULA …… 36

VII. VÍAS DE ENTRADA …… 39

VII.1 Endocitosis mediada por vesículas recubiertas con clatrina …… 42

VII. 2 Otras vías endocíticas …… 44

VIII. LOS LÍPIDOS EN LOS PROCESOS ENDOCÍTICOS …… 46

VIV. RED ENDOSOMAL …… 47

X. CITOESQUELETO CELULAR …… 49

XI. LECTINAS TIPO C: DC-SIGN …… 50

XI.1 Estructura de DC-SIGN …… 51

XI.2 Rol de DC-SIGN en la entrada viral …… 53

XI.3 Interacción de DC-SIGN con arenavirus …… 55

OBJETIVOS …… 57

MATERIALES Y MÉTODOS …… 59

1. CULTIVOS CELULARES …… 60

1.1 Línea celular Vero (ATCC CCL 81) …… 60

1.2 Línea NIH 3T3 (ATCC CCL 1658) …… 60

1.3 Línea NIH 3T3-DC-SIGN …… 60

1.4 Línea TRVb …… 61

1.5 Línea THP-1 (ATCC TIB-202) …… 61

1.6 Línea Raji-DC-SIGN …… 61

2. VIRUS …… .61

3. COMPUESTOS UTILIZADOS …… 62

4. REACTIVOS Y COMPUESTOS UTILIZADOS 63

5. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR 64

5.1 Método MTS 64

5.2 Método de exclusión de Trypan Blue 64

6. TITULACIÓN DE LA INFECTIVIDAD VIRAL 64

7. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN VIRAL 65

8. ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS A DISTINTOS TIEMPOS 65

8.1 Pre-tratamiento 66

8.2 Tratamiento posterior a la infección 66

9. ENSAYO DE EFECTO BLOQUEANTE POR LECTINAS SOLUBLES 66

10. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS 67

10.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI) 67

10.2 Ensayos de adsorción 68

10.3 Fluorescencia directa (IF) 68

10. 4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y western blot (WB) 69

11. EFECTO DE LOS COMPUESTOS EN LA SÍNTESIS DEL RNA VIRAL 70

11.1 Extracción del RNA 70

11.2 Preparación del cDNA 71

11.3 Amplificación por PCR en tiempo real 71

12. TINCIÓN DE CÉLULAS VIVAS CON NARANJA DE ACRIDINA 73

13. PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES 73

14. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES 73

15. PLÁSMIDOS 74

15.1 GPC-FC 74

15.2 Mutantes de DC-SIGN 74

15.3 Dominantes negativas 74

16. TRANSFECCIÓN DE CULTIVOS CELULARES 74

17. TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE MANOSIDASA 76

18. CO- INMUNOPRECIPITACIÓN 76

19. EXTRACCIÓN DE COLESTEROL 77

20. ANÁLISIS DE DATOS 78

RESULTADOS 79

CAPÍTULO I. INTERACCIÓN DEL VIRUS JUNÍN CON LA LECTINA DC-SIGN..... 80

1.1 Variación de la suceptibilidad de la infección en presencia de DC-SIGN 81
1.2 Especificidad de DC-SIGN para el aumento de la infección por JUNV 84
1.3 Características relevantes de la glicoproteína viral para la interacción con DC-SIGN..... 86
1.4 Interacción directa de JUNV y GPC1-FC con DC-SIGN 92
1.5 Estudio de la internalización de JUNV por DC-SIGN 98

CAPÍTULO II. ESTUDIO DE LA ENTRADA DE JUNV A TRAVÉS DE DC-SIGN 102

2.1 Análisis del efecto del pH en la entrada de JUNV por DC-SIGN 102
2.2 Dependencia de dinamina en la entrada de JUNV a las células 3T3-DC-SIGN 109
2.3 Determinación de la vía endocítica involucrada en la entrada de JUNV por DC-SIGN 115
2.4 Rol del colesterol en la entrada de JUNV a las células que expresan la lectina humana 122
2.5 Utilización de endosomas tempranos y tardíos 128
2.6 Rol del citoesqueleto en la entrada de JUNV por DC-SIGN 132
2.7 Estudio de la producción viral de JUNV en células poco permisivas 3T3 140

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES 146

Interacción de JUNV con DC-SIGN 147

Efecto de la glicosilación en la interacción de JUNV con DC-SIGN 149

Rol de DC-SIGN en la infección por JUNV..... 150

Entrada dependiente de clatrina 151

Rol de la actina en la entrada por endocitosis dependiente de clatrina..... 152

Uso de colesterol en la entrada dependiente de clatrina 153

Uso del colesterol en la entrada de DC-SIGN 154

Infección en células 3T3 155

Modelo propuesto para la infección de JUNV en células 3T3-DC-SIGN 156

BIBLIOGRAFÍA..... 158

Abreviaturas

ΔEEE: dominio triacídico mutado.

ΔLL: dominio de dileucinas mutado

ATP: adenosina tri-fosfato

CC: Control celular

CD: células dendríticas

CDR: Dominio de reconocimiento a carbohidrato.

CitD: Citochalasina D

Col.: colaboradores

ConcA: Conacanamicina A

CPZ: Clorpromazina

Ctx: toxina colérica

CV: control de virus sin tratar

DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

DENV: virus Dengue

Din I, II y III: dinamina I, II y III

DMEM: medio esencial modificado por Dulbecco

DMN: 1-deoxy-mannojirimicina

DN: dominante negativa

DS: desvío estándar

DYN: Dynasore

EE: endosomas tempranos

EEE: dominio triacídico

Fc: fragmento cristalizable

FHA: fiebre hemorrágica Argentina

GFP: *green fluorescent protein*

GFRT: Griffithsin

GP1/GP2: glicoproteína de envoltura 1 y 2 respectivamente

GPC: precursor glicoprotéico

HIV: virus de la Inmunodeficiencia Adquirida

hs: horas

hTfR1: receptor de transferrina tipo 1 humano

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IgG: inmunoglobulina G

IP: inmunoprecipitado

JUNV: virus Junín

LASV: virus de Lassa

LatA: Latrunculina A

LCMV: virus de la coriomningitis linfocitaria

LE: endosomas tardíos

LL: dominio de dileucinas

L-SIGN: Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin

m.i.: multiplicidad de infección

mARN: ácido ribonucléico mensajero

ME: microscopía electrónica de transmisión

MEM: medio mínimo esencial

min: minutos

MM: medio de mantenimiento

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

MβCD: Metil-β-cilcodextrina

Noc: Nocodazol

NP: nucleoproteína

NT: Nistatina

p.i.: post infección

Pac: Paclitaxel

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PI3K: quinasa de fosfoinositol 3

RNA: ácido ribonucleico

RNP: ribonucleoproteína viral

SFB: suero fetal bovino

SSP: péptido señal asociado

ST: suero de ternera

TCRV: virus Tacaribe

Tfr: tansferrina

TLR2: receptor tipo *toll* 2

Tx-100: Tritón-100

UFP: unidad formadora de placas

VSV: virus de la estomatitis vesicular

WB: Western Blot

WT: *wild type* o tipo salvaje

Introducción

I- LA FAMILIA *ARENAVIRIDAE*

La familia *Arenaviridae* está constituida por un grupo de virus envueltos con genoma RNA segmentado y forma esférica o pleomórfica, con un tamaño que abarca desde los 50 a 300 nm de diámetro.

Las propiedades morfológicas, fisicoquímicas y serológicas de estos virus se convirtieron en las bases para la formación del grupo arenavirus con el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM) como el virus prototipo. El taxón arenavirus fue aprobado por el Comité Internacional de Nomenclatura de Virus (ICTV) en 1971. De acuerdo al último (9°) reporte de la ICTV, los parámetros para definir un arenavirus son: 1) viriones envueltos; esférico o pleomórficos. 2) genoma RNA bisegmentado de cadena simple sin residuos de poliA en el extremo 3´terminal. 3) Secuencias terminales 5´ y 3´complementarias. 4) Secuencia nucleotídica que pueda formar uno o más configuraciones de orquilla dentro de las regiones intergénicas de ambos genomas de RNA. 5) Presencia de mensajeros virales con CAP pero sin poliadenilar. 6) Inducción de una infección persistente y frecuentemente asintomática en la especie reservoria, en el cual ocurra viremia y viruria crónica (Radoshitzky y col., 2015).

En 1956 en Trinidad y en 1958 en Argentina, se aislaron dos nuevos virus. El primero de ellos fue llamado virus Tacaribe (Downs y col., 1963), mientras que el segundo, con características patogénicas, fue llamado virus Junín (Parodi y col., 1958). LCMV, descubierto en 1933 (Amstrong y col., 1934; Traub y col., 1935), hasta ese momento no había sido incluido en ninguna familia y recién en 1963 se incorporó a la misma familia de estos dos agentes infecciosos, ya que los resultados de estudios serológicos mostraron características comunes entre los mismos (Mettler y col., 1963). Es así como rápidamente comenzaron a incluirse en este grupo otros virus de similares características, entre ellos, el virus Lassa, causante de la fiebre hemorrágica en África (Speir y col., 1970).

En el año 1969 Bergold y col. mostraron por primera vez un arenavirus en el microscopio electrónico: observaron partículas pleomórficas con espículas proyectadas hacia el exterior que poseían gránulos electrodensos en su interior (Figura 1). Es por esta

última característica, debida a la incorporación de ribosomas en los viriones, que se los nombró "arenavirus".

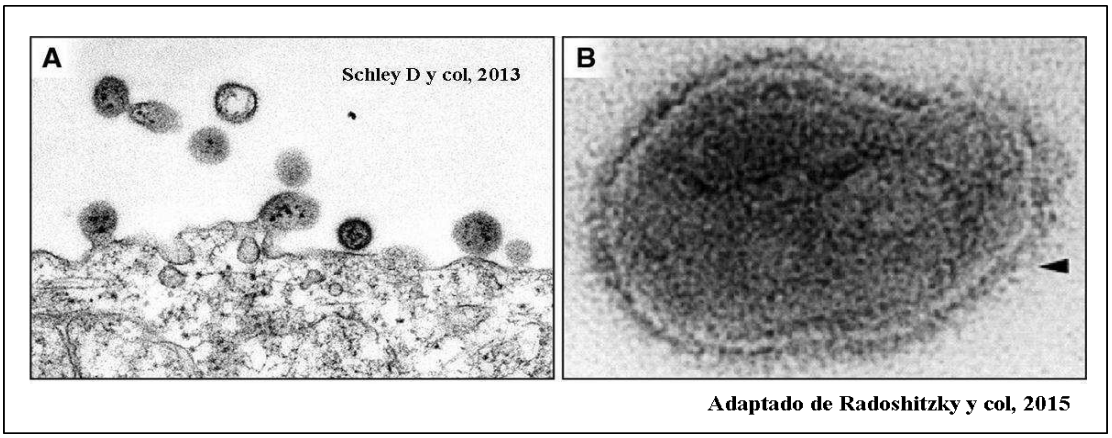

Figura 1: Microfotografía electrónica de partículas virales pertenecientes a la familia *Arenaviridae*. a) microfotografía electrónica de partículas de arenavirus emergiendo de una célula infectada (Schley y col., 2013). **b)** Partícula de arenavirus purificada de un gradiente de sacarosa y procesada por tinción negativa.

En los últimos años, ha crecido ampliamente el número de secuencias completas analizadas de patógenos virales. Las nuevas técnicas de secuenciación denominadas "Secuenciación de generación próxima" (NGS) permitieron la rápida adquisición de miles de millones de lecturas cortas de secuenciación de una única muestra y prevén posibilidades sin precedentes para la secuenciación a gran escala de los genomas virales. Estos avances permitieron aumentar los conocimientos de los genomas de los arenavirus, principalmente debido a que son genomas relativamente pequeños. Además, estas técnicas de NGS permiten secuenciar genomas directamente de muestras clínicas (metagenómica viral) y evitan la manipulación y adaptación frecuentemente asociada con el desarrollo de cultivos antes de la realización de métodos basados en PCR.

Hasta enero de 2014, se conocía a la familia de arenavirus como un grupo monogenérico, con integrantes que se pensaba infectan solamente roedores murinos, o en el caso del virus Tacaribe (TCRV) murciélagos frugívoros. Este paradigma cambió repentinamente cuando se publicó, de manera simultánea por distintos grupos, los aislamientos de arenavirus en serpientes en cautiverio.

Estos arenavirus descubiertos en serpientes difieren de los arenavirus ya conocidos en los siguientes aspectos: infectan serpientes en vez de mamíferos, sus genomas no se correlacionan con las alineaciones de secuencias del Viejo Mundo o del Nuevo Mundo, pero juntos forman un grupo monofilético hermano a estos; los genes de GPC codifican una GP2 similar a la del virus Ébola, la proteína Z no posee glicinas pero si posee dominios transmembrana en el N terminal y no posee motivos de brotación; se encuentran posibles dominios tardíos de brotación en la proteína NP (Stenglein y col., 2012).

Los estudios de los genomas de arenavirus a través del método de "comparación de secuencia pareadas" (PASC) y junto a las diferencias aminoacídicas de la nucleoproteína NP, ha llevado al Grupo de Estudio de Arenavirus, perteneciente al ICTV a reorganizar la familia *Arenaviridae* para acomodar los arenavirus de reptiles y agregar dos nuevos arenavirus de mamíferos recientemente descubiertos.

Es por esto, que la familia *Arenaviridae* queda dividida en dos géneros: mammarenavirus y reptarenavirus. La primera hace referencia a los arenavirus del Viejo y Nuevo Mundo, que infectan mamíferos y está compuesta por 27 especies aprobadas por el ICTV. Los mammarenavirus del Nuevo Mundo están subdivididos en tres o cuatro grupos filogenéticos A, B, C y posiblemente D. El grupo A incluye los virus: Allpahuayo, Flexal, Paraná, y Pirital, de Sudamérica. El grupo B contiene los virus patógenos para humanos: Chapare, Guanarito, Junín, Machupo y Sabiá, así como también, los no patogénicos Amapari, Cupixi y Tacaribe. El grupo C está compuesto de los virus Latino y Oliveros.

Los genes de la NP y la GPC de los virus de Norteamérica Bear Canyon, Tamiami, y Whitewater Arroyo, tienen historias filogenéticas distintas. Estos datos sugieren que la recombinación puede haber influenciado la evolución de algunos arenavirus. La secuenciación completa de la secuencia de aminoácidos revela que las NPs de estos virus están relacionadas a las del grupo A del Nuevo Mundo, mientras que las GPCs son más cercanas al grupo B. Es por eso, que estos virus se proponen actualmente como un grupo D tentativo para los mammarenavirus del Nuevo Mundo.

Los mammarenavirus del viejo mundo forman un solo grupo monofilético profundamente enraizado a tres de los cuatro arenavirus del nuevo mundo. De los

arenavirus del viejo mundo: los virus Lassa, Mobala y Mopeia son monofiléticos, mientras que Ippy y LCM están relacionados más distantemente. Lujo está más relacionado a los mammarenavirus del viejo mundo, pero contiene secuencias de GPC presentes en los mammarenavirus del Nuevo mundo. Recientemente se han agregado a este grupo los virus Lunk y Merino.

El género reptarenavirus está compuesto por tres especies de virus que infectan serpientes, los mismos fueron denominados, repatrenavirus Alethinophid 1, reptarenavirus Alethinophid 2 y reptarenavirus Alethinophid 3 (Steglein y col., 2012).

En la tablas 1, 2 y 3 se indica la distribución actual de la familia *Arenaviridae* con los miembros de cada grupo. Asimismo, en la figura 2 se puede apreciar la distribución mundial de las principales especies de mammarenavirus, en el cual se puede observar la distribución ubicua de LCM y la diferenciación de las especies del Nuevo y Viejo Mundo.

GÉNERO	GRUPO	Especie (ABREVIACIÓN)	RESERVORIO NATURAL	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
MMAMMARENAVIRUS	VIEJO MUNDO	*Ippy virus* (IPPYV)	*Arvicanthis* spp; *Praomys* spp.	República Central de África
		Lassa virus (LASV)	*Mástomys natalensis*	Africa Occidental
		LCMV virus (LCMV)	*Mus musculus*, *Apodemus sylvaticus*	Mundial
		Lujo virus (LUJV)	Desconocido	Zambia
		Luna virus (LUNV)	*Mastomys natalensis*	Sudáfrica, Zambia
		Lunk virus (LNKV)	*Myotomys unisulcatus*	Zambia
		Merino Walk virus (MRWV)	*Nannomys minutoide*	Sudáfrica
		Mobala virus (MOBV)	*Praomys* spp.	República Central de África
		Mopeia virus (MOPV)	*Mástomys natalensis*	Mozambique, Zimbabwe

Tabla 1: Miembros integrantes de los mammarenavirus del Viejo Mundo. Se indican las especies integrantes y entre paréntesis la abreviatura de los nombres de sus integrantes, junto con sus respectivos huéspedes y áreas de incidencia. Cuadro adaptado de Radoshitzky y col., 2015.

GENERO	GRUPO		ESPECIE (ABREVIATURA)	RESERVORIO NATURAL	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
Mammarenavirus	Nuevo Mundo	Clado A	*Allpahuayo virus* (ALLV)	*Oecomys bicolor, Oecomys sparicola*	Perú
			flexal virus (FLEV)	*Oryzomy sp*	Brasil
			Paraná virus (PARV)	*Oryzomy sangouya*	Paraguay
			Pichinde virus (PICV)	*Oryzomy salbigularis*	Colombia
			Pirital virus (PIRV)	*Sigmomy salstoni, zygodontomy sbrevicauda*	Venezuela
		Clado B	*Amapari virus* (AMAV)	*Neacomys guianeae*	Brasil
			Chapare virus (CHPV)	desconocido	Bolivia
			Cupixi virus (CPXV)	*Oryzomys megacephalus*	Brasil
			Guaranito virus (GTOV)	*Sigmomys alstoni, zygodontomys brevicauda*	Venezuela
			Junin virus (JUNV)	*Calomys musculinus, C. laucha, Akodon azarae*	Argentina
			Machupo virus (MACV)	*Calomys callosus*	Bolivia
			Sabiá virus (SABV)	desconocido	Brasil
			Tacaribe virus (TCRV)	*Artibeus jamaicensis*	Trinidad
		Clado C	*Latino virus* (LATV)	*Calomys callosus*	Bolivia
			Oliveros virus (OLVV)	*Necromys benefactus*	Argentina
		Clado D (tentativo)	Bear Canyon virus (BCNV)	*Neotoma macrotis, Sigmomys alstoni*	USA
			Tamiami virus (TAMV)	*Sygmomys alstoni, Oryzomys palustris*	USA
			Whitewater Arroyo virus (WWAV)	*Neotoma abigula, N. mexicana, N. micropus*	USA

Tabla 2: Mamarenavirus del Nuevo Mundo. Se indican las especies integrantes del grupo. Entre paréntesis se indican los miembros de cada una con su nombre abreviado. Asimismo, se indica el reservorio y la distribución geográfica. Adaptado de Radoshitzky y col., 2015.

GÉNERO	GRUPO	VIRUS (ABREVIACIÓN)	RESERVORIO NATURAL	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
REPTARENAVIRUS		*Golden Gate virus* (GOGV)	*Boa constrictor*	mundial?
		ROUT virus (ROUTV), *University of Helsinki virus* (UHV)	*Boa constrictor* *Corallus annulatus* *Corallus hortulanus*	mundial?
		CAS virus (CASV)	*Corallus annulatus*	mundial?

Tabla 3: Miembros integrantes de los reptarenavirus. Se indican las especies del nuevo género de arenavirus con los nombres de sus integrantes abreviados entre paréntesis, sus respectivos huéspedes y áreas de incidencia. Cuadro adaptado de Radoshitzky y col., 2015.

Varios miembros de la familia *Arenaviridae* son causantes de fiebres hemorrágicas en humanos. En el grupo del Viejo Mundo, el virus Lassa y recientemente descubierto, el virus Lujo (Urata y col., 2015) son responsable de este tipo de enfermedad, mientras que en el Nuevo Mundo cinco especies dentro de las reconocidas por el ICTV producen fiebres hemorrágicas en humanos y todas se encuentran dentro del linaje B (Figura 3). Evolutivamente este hecho podría indicar que el fenotipo hemorrágico surgió al menos por dos vías independientes en esta familia. Sin embargo, y debido a que aún se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales estos virus producen una patología hemorrágica en humanos, no puede descartarse completamente el hecho de que algún otro miembro de la familia posea esta capacidad aún no dilucidada.

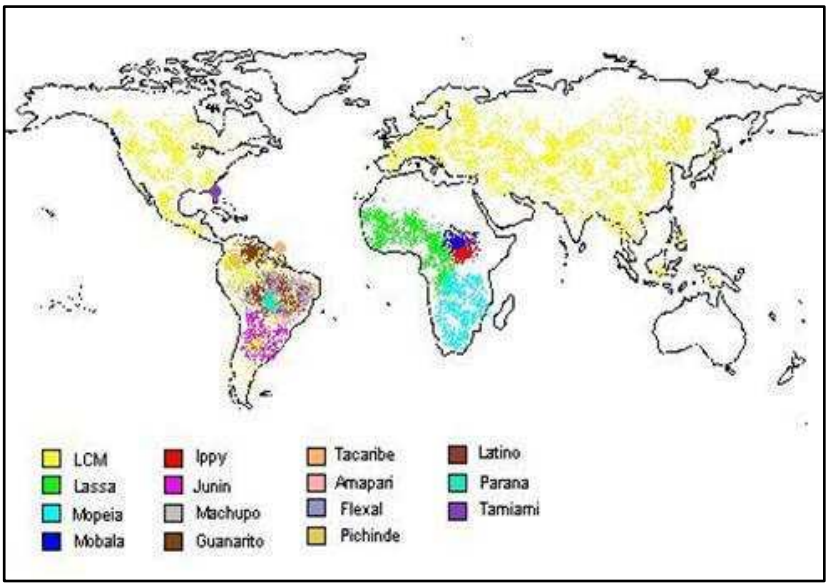

Figura 2: Distribución geográfica de los principales miembros del género de mammarenavirus. Figura adaptada de Clegg y col., 2000.

Actualmente, los arenavirus son de particular interés dado el uso potencial de los miembros causantes de fiebres hemorrágicas de la familia, como agentes de bioterrorismo, categorizados como patógenos prioritarios A por el CDC (Centro de Control de Enfermedades, Atlanta, USA).

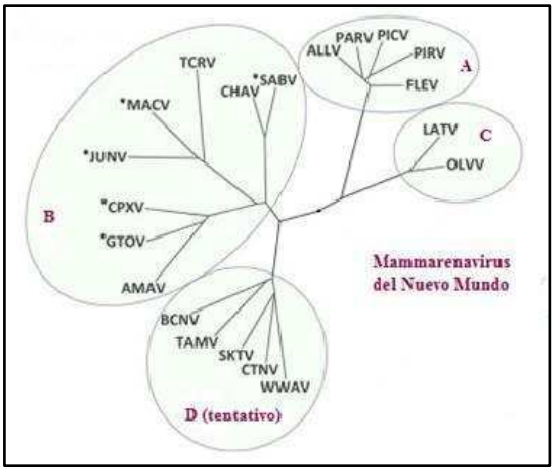

Figura 3: Relación filogenética entre los mammarenavirus del Nuevo Mundo. Los mammarenavirus marcados con asterisco son los miembros patogénicos del linaje B. Figura adaptada de Urata y col., 2012.

II. FIEBRE HEMORRÁGICA ARGENTINA

En las últimas décadas, el estudio de las fiebres hemorrágicas ha sido de gran interés. De todos modos, hasta el momento se conocen muy pocas características de la patogenia producida por los arenavirus. El virus ingresa al organismo por inhalación y en la mayoría de los casos se deposita en los bronquiolos. Al alcanzar el sistema linfático se esparce sistémicamente sin dejar un foco neumónico aparente (Kenyon y col., 1992). Estudios realizados en cobayos infectados con una variante del virus Pichinde mostraron la activación de moléculas mediadoras de *shock* tales como leucotrienos y endorfinas, las cuales aumentan en respuesta a los valores altos de TNF-α encontrados en dichos animales (Peters y col., 1997; Aronson y col., 1995).

El sangrado profuso, visto a menudo en la patología hemorrágica, es presumiblemente consecuencia del daño vascular ocasionado por el aumento de citoquinas y virus combinado con una marcada trombocitopenia (Molinas y col., 198). De todos modos, la severidad del cuadro puede variar de paciente en paciente, involucrando factores del huésped aún no conocidos en la recuperación de la enfermedad.

La fiebre hemorrágica argentina (FHA), causada por el virus Junín, es endémica en cuatro provincias de la pampa húmeda de la Argentina: Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba y La Pampa. Esta región es un área densamente poblada y coincide geográficamente con el mayor complejo agroindustrial cerealero de exportación del país (Figura 4). A pesar de que se pueden observar casos de FHA durante todos los meses, hay anualmente brotes estacionales que se producen en el otoño y el invierno con un pico en el mes de mayo (Enria y col., 1998).

La FHA es una enfermedad aguda que comienza como una gripe vulgar y termina progresando hasta el deceso en 1 a 2 semanas en el 30% de los casos de pacientes infectados y sin tratar, bajando al 1% en aquello pacientes tratados a tiempo con plasma inmune. El tiempo de incubación de esta enfermedades es entre 10 a 12 días, apareciendo luego los primeros síntomas inespecíficos: fiebre, dolor de cabeza, debilidad, desgano, dolores articulares y oculares y/o pérdida de apetito. Al contrario de una gripe donde el paciente mejora al quinto día, en la FHA se intensifican los síntomas en menos de una

semana, produciéndose síntomas cada vez más fuertes de alteraciones vasculares, renales, hematológicas y/o neurológicas, por un período no mayor a veinte días.

Los estudios patológicos de casos fatales muestran que la mayoría de las lesiones consisten en una vasocongestión generalizada con múltiples hemorragias en diferentes órganos. La ruptura de capilares es la responsable de las hemorragias observadas, produciendo el colapso del sistema vascular y el consiguiente *shock* hipotenso. Aunque la replicación viral en el tejido vascular no ha sido demostrada hasta el momento, se ha encontrado que principalmente linfocitos y monocitos de sangre periférica constituyen el sitio primario de replicación del virus (Laguens y col., 1984; Ambrosio y col., 1986). Alternativamente en algunos pacientes la respuesta inmune resulta muy efectiva en la eliminación del virus, cursando la enfermedad con los síntomas más leves.

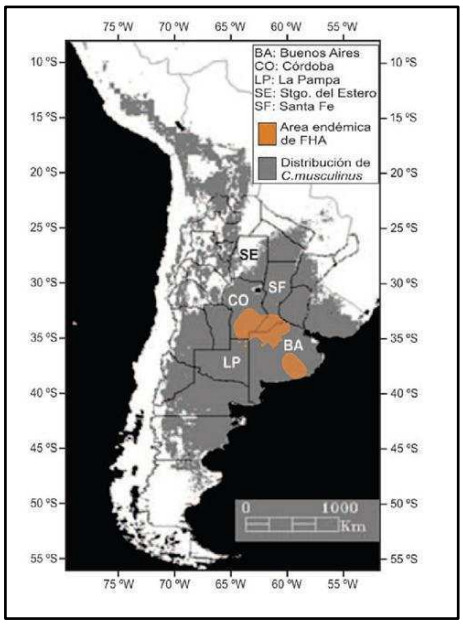

Figura 4: Área endémica actual de fiebre hemorrágica argentina dentro de la zona de distribución estimada de *C. musculinus*. Fuente: Programa Nacional de Control de la Fiebre Hemorrágica Argentina. Figura adaptada de Briggiler y col., 2014.

La infección al humano se produce a través de contacto con la piel (con excoriaciones), en mucosas (ojos) o inhalación de partículas portando el virus. La transmisión interhumana, si bien es infrecuente, puede ocurrir. La población que reside,

visita, o trabaja en el medio rural es principalmente propensa a la infección. De la misma, el 80% de los infectados son hombres entre 15 y 60 años.

En el último informe para la XXIX Reunión Anual del Programa Nacional de Control de la Fiebre Hemorrágica Argentina, realizada en septiembre de 2015, junto con el Reporte Epidemiológico de la Provincia de Córdoba, publicado el 28 de diciembre de 2015, reportaron la existencia de 24 casos notificados de FHA para el año 2014 con la confirmación positiva de 6 de ellos, mientras que para el 2015, hasta la semana epidemiológica 46, se notificaron 31 casos de FHA con 14 confirmados.

III- TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LA FHA

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

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

Análisis estructurales de Abraham y col., (2010) permiten detallar que existe un bolsillo en GP1 que acepta una tirosina en la cadena B del dominio apical del receptor de transferrina, el cual es esencial para el sitio de unión al receptor. El éxito en la neutralización de JUNV con plasma reside en que el sitio de neutralización en la GP1 está más accesible estructuralmente que en las glicoproteínas de otros arenavirus; y además presenta otros anticuerpos neutralizantes con epítopes fuera de la zona estudiada

(Mathmutovic y col., 2015). Esta información podría ser de utilidad para adaptar este tratamiento basado en la mímica de receptor, a la neutralización de FHA y de otras fiebres hemorrágicas causadas por mammarenavirus del Nuevo Mundo, que reconocen dicho receptor.

La única droga antiviral conocida actualmente en uso para los arenavirus es la ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida), un análogo de guanosina que mostró inhibición contra los arenavirus, tanto *in vitro* como en modelos animales (Weissenbacher y col., 1986). Si bien la administración de ribavirina es el método seleccionado para el tratamiento de la fiebre de Lassa (Mc Cormick y col., 1986), se ha demostrado que la ribavirina inhibe *in vitro* la replicación de JUNV pero no reduce la mortalidad en casos avanzados de FHA (Enria y col., 1994). Por lo tanto, aunque es la única terapia utilizada actualmente para el tratamiento de fiebres hemorrágicas, su acción en humanos no es específica y presenta grandes desventajas en el uso terapéutico.

La FHA es una zoonosis no erradicable debido a que su reservorio, *Calomys musculinus* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Es por ello que desde los inicios de la enfermedad muchos de los esfuerzos estuvieron dirigidos al desarrollo de una vacuna. Un proyecto de colaboración científica internacional entre los gobiernos de EE.UU. y Argentina, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y el Programa de Desarrollo de las Naciones Unidas (PDNU) permitió el desarrollo de la vacuna a virus Junín vivo atenuado Candid#1. Entre 1988 y 1990 se realizó un estudio que estableció la eficacia de la vacuna en 95% (Maiztegui y col., 1998).

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

A partir de 2007 Candid#1 es incorporada al calendario nacional de inmunizaciones y desde entonces está disponible para toda la población mayor de 15 años en las cuatro provincias del área endémica. Desde la implementación de la vacuna Candid#1 contra la enfermedad se logró una importante reducción de la incidencia. Todos los años se registran entre 25 y 50 casos de FHA. Como es esperable, se han presentado casos en vacunados, siendo todos formas leves de la enfermedad, que en su mayoría han evolucionado favorablemente sin tratamiento específico. Luego del inicio de la vacunación se modificaron también los patrones de riesgo. Entre los casos confirmados se viene observando un incremento en el porcentaje de mujeres, que se vacunan en menor proporción y de niños menores de 15 años. También disminuyó la proporción de enfermos entre personas que realizan trabajo rural y han aumentado las cifras de casos confirmados en personas que desarrollan otras actividades económicas, no asociadas necesariamente con el campo y residentes en áreas urbanas (Sinchi y col., 2012). Entre los años 2011 y 2012 se realizó un estudio colaborativo multicéntrico en el cual se definieron tres escenarios de transmisión de la FHA (Briggiler y col., 2014):

- Escenario clásico: abarca el área endémica y coincide geográficamente con el complejo agroindustrial cerealero de exportación del país (zona núcleo). El lugar de contagio y de residencia de los casos se ubica en este territorio.
- Escenario emergente-reemergente: paisajes donde acontecieron cambios en la organización social de la producción que lo hacen compatible con el escenario clásico.
    - Emergente: los casos residen y se contagian fuera del área endémica pero que no viajaron en las tres semanas previas a enfermar. Áreas nuevas de transmisión.
    - Reemergente: los casos residen en áreas históricas de transmisión donde no se habían notificado casos en los diez años previos.
- Escenario viajero: los casos transitaron por un escenario clásico o emergente-reemergente, pero no residen en ellos. En este escenario se unen viajeros y trabajadores que migran estacionalmente o transitan eventualmente para emplearse en tareas asociadas al complejo agroindustrial (Enria y col., 2010; Mastrangelo y col., 2014). Este último

escenario ha cobrado mayor relevancia en los últimos años debido a la disminución en la incidencia del escenario clásico.

IV- EL VIRUS JUNÍN: ESTRUCTURA MOLECULAR

Las partículas virales están compuestas por una envoltura lipídica y en su interior se encuentra el genoma el cual consiste de dos moléculas de RNA ambisentido de simple cadena designadas L (*large*) y S (*small*). Los extremos 5´ y 3´ de ambos segmentos de RNA contienen regiones no codificantes y no traducibles denominadas (UTR´s) y contiene secuencias conservadas de 19 a 30 nucleótidos, de complementariedad reversa, el cual se prevé que puede formar estructuras tipo horquillas a través del apareamiento de bases (Figura 5).

El 3´UTR de cada segmento contiene el promotor genómico arenaviral, que dirige la replicación del RNA y la transcripción de genes. Cada segmento genómico codifica para dos proteínas diferentes en dos marcos de lectura abiertos (ORF´s) de polaridades opuestas, que no se solapan. Esto es denominado arreglo de codificación ambisentido.

El segmento L de aproximadamente 7.200 nucleótidos codifica una RNA polimerasa viral dependiente de RNA (L) y una proteína de matriz con unión a zinc (Z). El segmento S de aproximadamente 3.500 nucleótidos, codifica una nucleoproteína (NP) y un precursor de glicoproteína de envoltura (GPC). Ambos ORF´s en cada segmento están separados por una región intergénica no codificante que podrían formar estructuras de tipo horquilla. Esta región posee funciones en la terminación de la transcripción, en la formación de la partícula viral y la brotación. Los fragmentos L y S no se encuentran presentes en cantidades equimolares, ni en el virión, ni en la célula infectada. El fragmento S siempre se ha encontrado como el mayoritario (Romanowski y col., 1983; Southern y col., 1987), no excediendo la relación L:S la proporción 2:5. Las moléculas de RNA se encuentran conformando un complejo ribonucleoproteico o nucleocápside en el interior del virión, constituido principalmente por el RNA correspondiente y la nucleoproteína NP, la proteína mayoritaria (Martínez Segovia y col., 1977). En menor medida L se encuentra asociada a las nucleocápsides.

Los mensajeros de los mammarenavirus poseen CAP y no están poliadenilados. El extremo 5´del mRNA viral posee varias bases no apareada, así como el virus Influenza A y Bunyavirus.

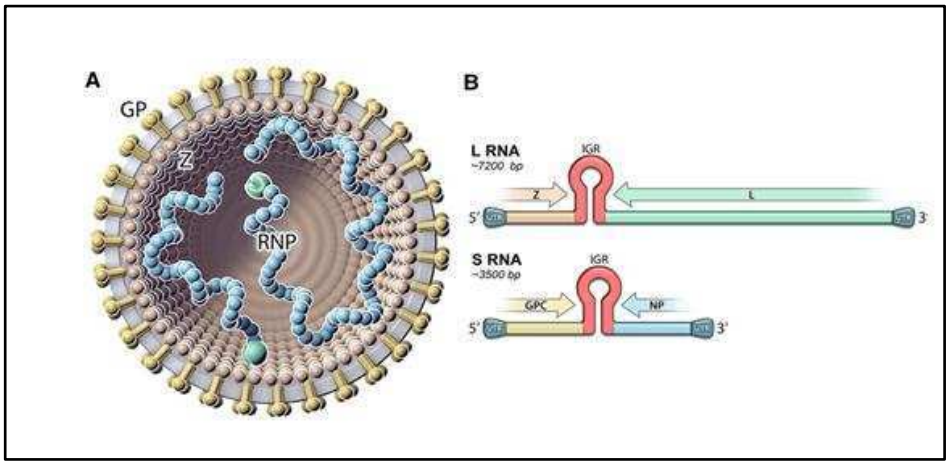

Figura 5: Esquema de una partícula viral y sus principales componentes (Adaptado de Radoshitzky y col., 2015). **A)** Estructura del virión. RNP: ribonucleoproteína, formada por la nucleoproteína NP y los RNAs. GP: complejo glicoproteico formado por GP1 y GP2 y PS. Z: proteína de matriz Z. **B)** Estructura del genoma viral (L y S) y los componentes que codifica. L: polimerasa viral. IGR: región intergénica no codificante.

Estudios realizados con LCMV indican que la nucleoproteína NP de este virus es requerida en *trans* para la síntesis de RNA (Lee y col., 2000), y se le han atribuido funciones como anti-terminadora de la replicación in vivo (Tortorici y col., 2001) y funciones regulatorias en el mantenimiento de cultivos persistentemente infectados (Ellenberg y col., 2007). Cuando se procesan cultivos de células Vero infectados con JUNV, esta proteína puede visualizarse por radioinmunoprecipitación o WB con anticuerpos monoclonales específicos (Sánchez y col., 1989) como una banda de aproximadamente 60 kDa. En las mismas preparaciones es frecuente encontrar dos productos de 45 y 25 kDa respectivamente.

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

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

El complejo glicoproteico GPC presenta un peso estimado por secuenciación de 52 kDa. Sin embargo, debido a la presencia de 8 sitios potenciales de glicosilación (Buchmeier y col., 1987), este precursor muestra una movilidad de 66-72 kDa aproximadamente en SDS-PAGE. La proteína GP1 (38 kDa) demostró estar expuesta en la superficie de los viriones de JUNV, contener residuos ricos en manosas (Mersich y col., 1988; Castilla y col., 1992) y es la responsable de la producción de anticuerpos neutralizantes, indicando su participación directa en el reconocimiento virus-célula. Por otro lado GP2, una glicoproteína integral de membrana, posee la capacidad fusogénica requerida para el ingreso de las nucleocápsides al citoplasma. Dado que las glicoproteínas se encuentran en cantidades equimolares en el virión, Burns y col. (1991) proponen un modelo para los arenavirus donde GP1 y GP2 formarían trímeros mediante interacciones iónicas. En conjunto formarían la estructura glicoproteica observada en preparaciones al microscopio electrónico como imágenes claviformes de 5-10 nm de longitud (Agnihothram y col., 2007).

La proteína L es la RNA polimerasa RNA dependiente. La misma lleva a cabo dos procesos diferentes: replicación y transcripción. Esta proteína codificada en el extremo 3´ del segmento de RNA L es un polipéptido no glicosilado con un peso aproximado de 250 kDa. La concentración intracelular de L aumenta dramáticamente durante el curso de una infección aguda con LCMV sin embargo, la actividad polimerasa disminuye con el tiempo de infección (Fuller-Pace y col., 1989). Estos hallazgos proponen una función regulatoria de L en tiempos tardíos de infección que podría afectar el balance entre transcripción y replicación (Southern y col., 1987). Lee y col. (2000) demuestran en su trabajo que L junto con NP son los factores mínimos necesarios para la replicación del RNA. Estos autores también comprobaron que la iniciación de la transcripción involucra el clivaje de los CAPs y

de las bases por una actividad endonucleasa asociada a la polimerasa L.

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

V- CICLO DE REPLICACIÓN

El complejo glicoproteico presente en los viriones es el responsable de las interacciones iniciales con el receptor celular. Existe una diferencia entre los receptores que utilizan los mamarenavirus del Viejo y del Nuevo Mundo. En el primero de los casos junto con el clado C de los mamarenavirus del Nuevo Mundo, utilizan como receptor el α-distroglicano (Cao y col., 1998). Los miembros patogénicos del clado B del Nuevo Mundo utilizan el receptor de transferrina 1 (TfR1) de su huésped natural y el humano (hTfR1), mientras que 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. Estudios de Roldán y col. (2015) demostraron que en células que expresan el hTfR1, la internalización de TCRV depende de la presencia de colesterol, dinamina y pH vesicular ácido, pero que en líneas que no lo expresan, la entrada sería la vía clásica de endocitosis dependiente de clatrina.

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. Estas hipótesis son avaladas con diversos estudios que demostraron que ciertas cepas del LCMV utilizan tanto las vías dependientes como las

independientes de α-distroglicano (Smelt y col., 2001). Además, se comprobó que a pesar de que JUNV no utiliza el TfR1 murino (mTfR1), puede infectar cultivos primarios de ratón tanto como líneas celulares de esa especie a través de un receptor aún no reconocido (Martinez y col., 2007; Cuevas y col., 2011).

En la figura 6 se puede apreciar un esquema de las diferencias en el ciclo de multiplicación de los mammarenavirus del Viejo Mundo, como prototipo el virus LCM y de JUNV como modelo de mammarenavirus del Nuevo Mundo.

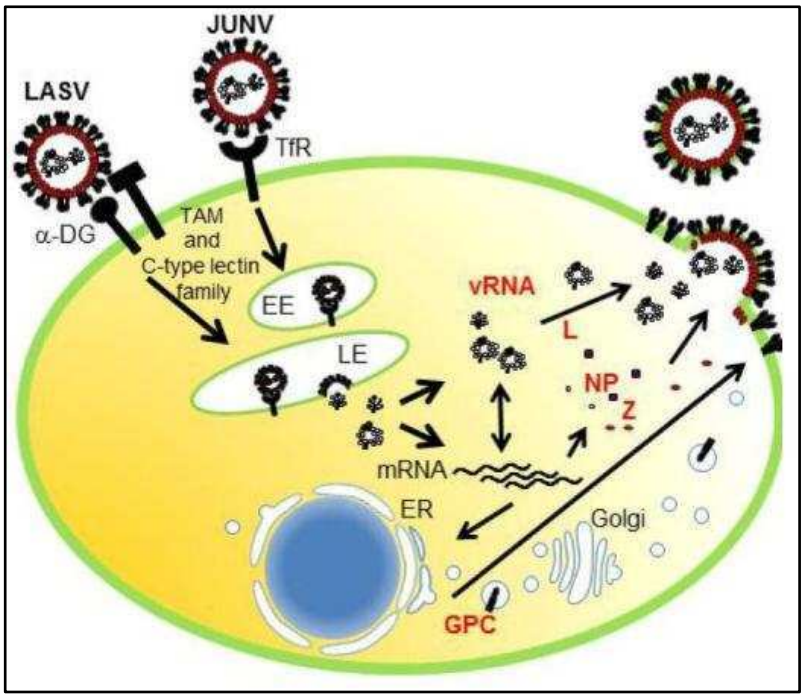

Figura 6. Esquema del ciclo de replicación de los arenavirus Lassa y Junín. Se indican los receptores principales utilizados por cada uno junto a los compartimentos celulares en los cuales se cumplen los distintos pasos del ciclo de multiplicación. (Adaptado de Urata y col., 2012).

La vía de entrada de los virus del Viejo Mundo LCMV y Lassa (LASV) es a través de una forma no convencional de endocitosis, en el cual existe cierta dependencia del colesterol de la membrana, pero es independiente de clatrina y caveolina (Rojek y col., 2008).

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 para el cierre de dichas vesículas (Martínez y col., 2007). La entrada de

JUNV es inhibida por agentes lisosomotrópicos y representó uno de los elementos de prueba del ingreso dependiente de pH de los viriones al interior de la células (Castilla y col., 1991). Estudios con otros arenavirus han demostrado además el efecto irreversible del pH sobre la estructura conformacional de GP1 y su estabilidad en la envoltura viral (Di Simone y col., 1994).

Ensayos de microscopía electrónica de transmisión (Martínez y col., 2007) mostraron partículas de JUNV con un diámetro entre 60 y 100 nm en depresiones electrodensas de la membrana y partículas virales dentro de invaginaciones de la membrana que muestran similitud con aquellas que median la endocitosis dependiente de clatrina (Figura 7).

Por otro lado, se ha comprobado que la entrada de los arenavirus requiere la integridad del citoesqueleto de actina (Martínez y col., 2007) y la dinámica de los microtúbulos. Asimismo, los arenavirus requieren de la actividad de la kinasa PI3K. (Linero y col., 2009; Pasqual y col., 2011).

El mecanismo de tránsito citoplasmático difiere entre los dos grupos de mammarenavirus: mientras que LASV y el LCMV invaden la célula huésped a través de cuerpos multivesiculares (endosomas tardíos) donde realizarán la fusión (Pasqual y col., 2011); JUNV utiliza endosomas tempranos marcados con Rab5 para fusionar en endosomas tardíos marcados con Rab7 (Martínez y col., 2009).

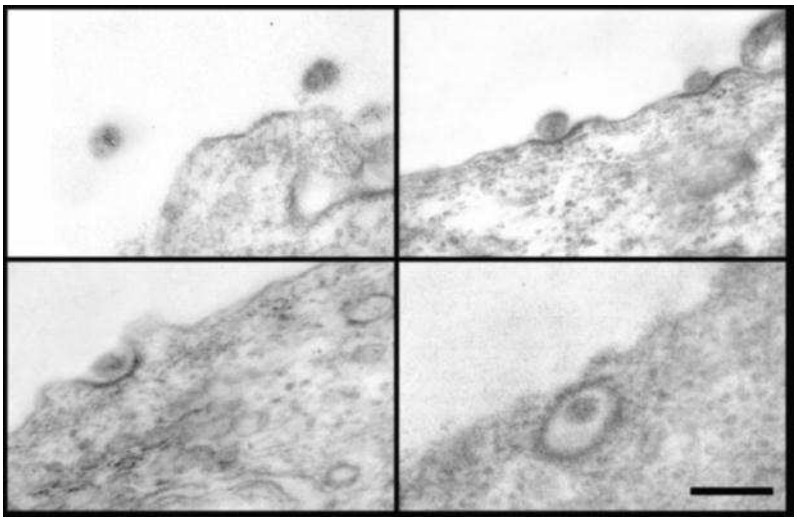

Figura 7: Entrada de JUNV a células Vero por endocitosis dependiente de clatrina. La barra indica la escala que corresponde a 200 nm (Adaptado de Martínez y col., 2007).

Como se mencionó anteriormente, la estrategia de replicación de los arenavirus es ambisentido, en la cual cada molécula de RNA 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.

La replicación viral comienza en los extremos 3´ con la transcripción de los genes np y l del RNA S y RNA 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 antigenómicos completos permite la replicación del genoma para la nueva progenie así como también para la síntesis de mRNAs 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-Fernández y col., 1987).

La proteína Z sería 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 RNA. Una vez que Z alcanza altas concentraciones, su unión a la ribonucleoproteína (RNP) inhibe la transcripción y replicación.

El transporte de Z a la membrana celular no es muy conocido. Estudios con TCRV esquematizados en la figura 8 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. Luego del transporte de Z al lugar de brotación junto con la RNP, interactúa con la membrana plasmática a través de su miristilación y puede sufrir un cambio conformacional que le permite la multimerización y la unión a la proteína Tsg101, componente del complejo endosomal de clasificación necesario para el transporte (*endosomal sorting complex required for transportation*, ESCRT).

Por otro lado, su miristilación también permite su interacción con el PS de la GP. 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 complejo de Golgi puede ser incorporada al virión. Aún se desconoce cómo 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 col., 2012), adquiriendo la envoltura lipídica de su célula hospedadora. Cordo y col. (2013) determinaron que la GPC migra a la superficie en dominios ricos en colesterol denominados *rafts* lipídicos, y que la depleción del colesterol de membrana reduce la expresión de glicoproteínas virales y la brotación de los viriones. Al alcanzar el medio extracelular la progenie posee la capacidad necesaria para la infección de una célula blanco y el inicio de un nuevo ciclo de replicación.

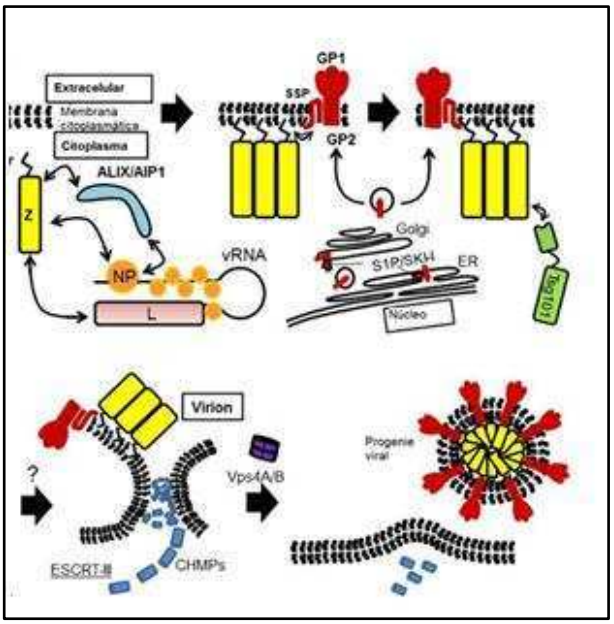

Figura 8: Modelo propuesto de ensamblado y brotación de arenavirus. Se indica el mecanismo propuesto en cinco pasos delimitados por las flechas y las proteínas involucradas en la formación de la partícula viral (Adaptado de Urata y col., 2012).

VI. INTERACCIÓN VIRUS- CÉLULA

Considerando que un virus es incapaz de replicarse por sí mismo, la entrada a una célula y el uso de su maquinaria y energía, en mayor o menor medida, resulta indispensable para su subsistencia y persistencia en la naturaleza. Ghazal y col. (2000) proponen dos grandes barreras que un virus debe sortear a la hora de efectivizar su ciclo de multiplicación. La primera hace referencia a la respuesta inmune innata y adaptativa y la segunda hace referencia a la barrera a nivel celular. Esta dependencia completa de los virus por los factores celulares los hace imprescindibles para la regulación de la infección viral.

Al estudiar la multiplicación viral, se evalúa la interacción entre las distintas estructuras y proteínas virales con la célula hospedadora. El conocimiento de los mecanismos por los cuales un virus puede infectar una célula determinada, multiplicarse eficazmente y producir su progenie permite describir en detalle el ciclo de multiplicación viral. A partir del conocimiento del mismo y de su interacción con el sistema inmunológico

del individuo infectado, es que se pueden plantear estrategias antivirales que permitan combatir la replicación viral, así como también prevenirla.

Además, la caracterización de las distintas interacciones entre el virus y la célula hospedadora permite la mejor comprensión de los daños citopáticos, de las patologías producidas por los virus en los distintos órganos infectados y su manifestación como una enfermedad con características definidas y propias.

Por otro lado, los sistemas virales han cobrado gran importancia como herramientas para el estudio y caracterización de los procesos básicos desarrollados en una célula eucariota. Los sistemas de cultivos de células son la principal herramienta para el estudio de las interacciones virus-célula. Su desarrollo y caracterización resultan indispensables para el uso de los mismos como un sistema experimental altamente controlable y reproducible.

El tropismo de los virus depende de la especificidad de interacción entre las proteínas de la envoltura viral y la membrana citoplasmática celular, que permitirá o no el comienzo de la infección.

Las moléculas de la superficie celular que permiten la unión de virus componen un amplio espectro de proteínas, lípidos y glicanos (Figura 9). Algunos factores de adhesión usados por los virus, simplemente ayudan a concentrar las partículas virales a la superficie celular. Otros poseen funciones de verdaderos receptores, que además de permitir la unión, desencadenan la endocitosis, median los cambios conformacionales en el virión y originan cadenas de señalizaciones que permiten el desarrollo de la infección.

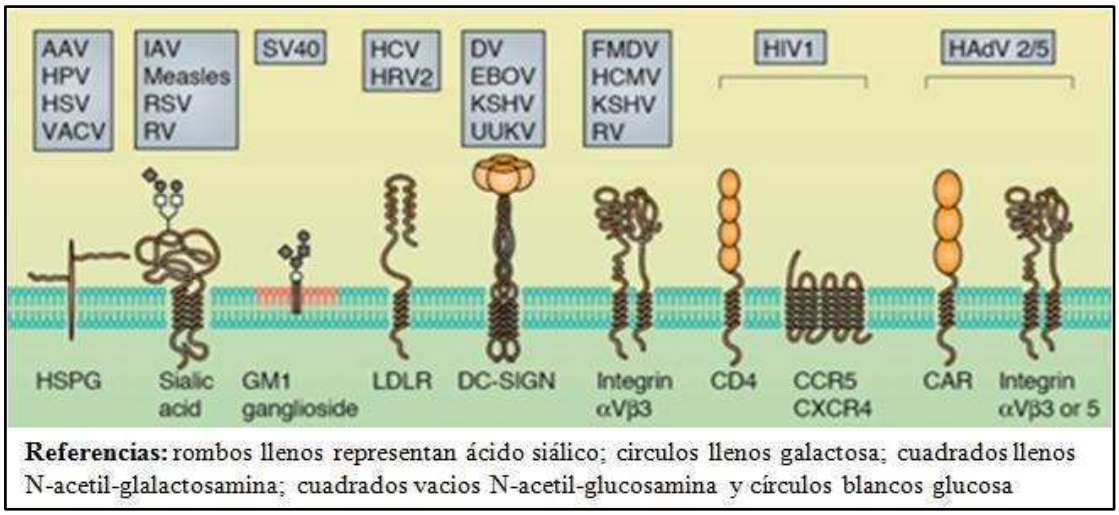

Figura 9: Factores de adhesión, receptores y correceptores para distintos virus. Se indican los residuos de carbohidratos presentes en cada estructura transmembrana, según lo indicado por las referencias. En los cuadros se nombran algunos virus que utilizan los mismos. Adaptado de Yamahuchi y col., 2013.

Los puntos de contacto individuales entre el virus y el receptor son altamente específicos pero de baja afinidad (Skehel y col., 2000). De todos modos, al ser multivalentes, los virus pueden unirse a múltiples receptores, aumentando la fuerza de unión y la formación de microdominios de membrana que permiten desencadenar las vías de señalización mencionadas para los procesos de endocitosis. El receptor acompaña frecuentemente al virus dentro de la célula en el proceso de internalización (Helenius y col., 2007).

Una vez dentro de la célula los procesos de replicación y traducción de sus proteínas son llevados a cabo en su mayoría por la maquinaria celular. La producción de las nuevas partículas infectivas es posible gracias a los eventos de maduración y transporte en las etapas tardías del ciclo celular.

Por el contrario, existen muchos virus con propiedades de producir infecciones persistentes en sus células hospedadoras. Esto se refiere a la posibilidad de multiplicarse sin producir la muerte celular o un efecto citopático dañino sobre sus estructuras. De esta forma se explica la propiedad de los arenavirus y otros, en generar infecciones crónicas en las especies reservorias. (Howard y col., 1986; Lehmann- Grube y col., 1972).

En particular para el virus Junín, se ha comprobado que el mismo es capaz de multiplicarse en distintas líneas celulares. En general la replicación es poco eficiente y no se observa citopatogenicidad, sin embargo en sistemas celulares como Vero y MRC-5 se observa un efecto citopático característico (Weissenbacher y col., 1983). La infección de monocapas con JUNV presenta dos etapas diferentes. La etapa aguda o inicial es aquella en la cual los niveles de producción viral son máximos y la destrucción celular marcada. Entre el tercer y quinto día se observa el efecto citopático acentuándose los focos de células redondeadas que con su posterior desprendimiento originarán placas en presencia de medio semisólido (Tkaczenski y col., 1970). En la segunda etapa de persistencia, a partir de los 8-10 días p.i., las células sobrevivientes comienzan a repoblar el cultivo estableciéndose una acción moderada del virus sobre éstas.

VII. VÍAS DE ENTRADA

Para entrar a la célula hospedadora, luego de la interacción con el receptor, la mayoría de los virus utilizan los mecanismos de endocitosis celulares y son transportados en vesículas endocíticas u otras estructuras citoplasmáticas antes de liberar su material genético al citoplasma. Se han realizado muchos estudios al respecto y el mapa de entrada de los virus animales se ha dilucidado ampliamente. Se puede resumir la entrada de los virus en cinco grandes procesos: adsorción, unión, señalización, endocitosis, penetración y desnudamiento. Las mismas están esquematizadas en la figura 10.

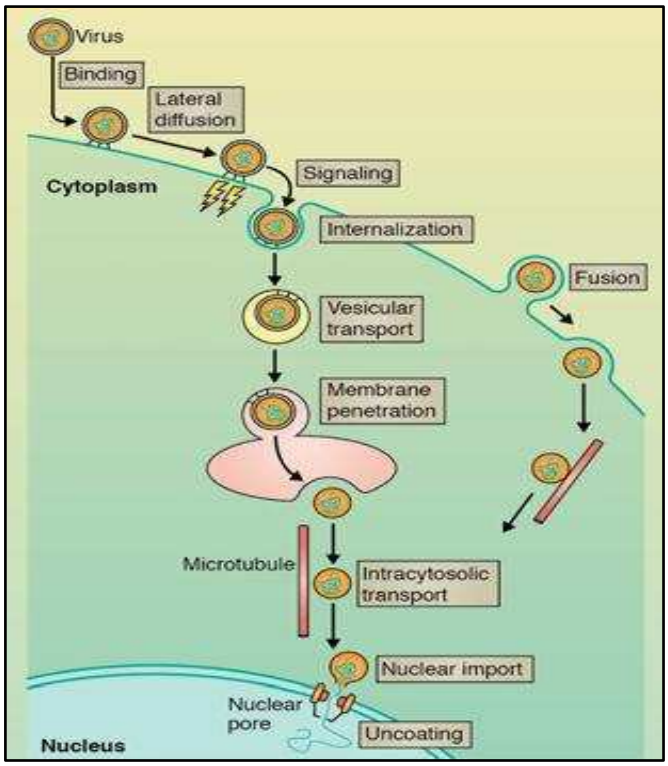

Figura 10: Pasos en la entrada de algunos virus a la célula hospedadora. Distintos procesos pueden ocurrir para distintos virus, en grandes rasgos estos son: unión, difusión lateral, desencadenamiento de vías de señalización, internalización, transporte vesicular, penetración en membrana, transporte intracelular, importación al núcleo y/o liberación de su material genético a nivel de las distintas estructuras mencionadas según corresponda. Para otros virus, puede ocurrir la fusión a nivel de la membrana plasmática. Figura adaptada de Marsh y col., 2006.

En la figura 11, se puede observar la esquematización de los distintos mecanismos de entrada descubiertos para una cantidad abundante de virus, y en la misma, se puede apreciar la amplia diversidad de vías de entrada existentes. En la figura mencionada, se indican seis puntos (cuadros rojos numerados del 1 al 6) en los cuales un virus puede fusionar y liberar su material genético al citoplasma. Estos pueden ser a nivel de la membrana plasmática (1), endosomas tempranos (2), endosomas en maduración (3) y tardíos (4), macropinosoma (5) y retículo endoplasmático (6). Algunos virus pueden usar más de una vía, dependiendo la interacción con diferentes receptores. A pesar de la complejidad de las interacciones de los virus con la superficie celular y el número amplio de vías de internalización, en su mayoría se tratan de mecanismos endocíticos. Los pasos

subsecuentes al tránsito intracitoplasmático involucran organelas celulares claves en la incorporación de los ligandos endógenos de dichos receptores.

Solamente pocos virus son capaces de penetrar directamente a través de la superficie celular fusionando su membrana con la membrana plasmática. Luego de la unión a la superficie celular, muchos virus pueden moverse lateralmente antes de la internalización. Esta puede ser al azar o dirigida por filopodios de actina.

Muchos virus activan cascadas de señalizaciones para entrar a las células (Greber y col., 2002). Estas vías están mejor detallados para virus que utilizan la macropinocitos para su entrada como Vaccinia y Ébola entre otros. Este proceso involucra la activación del receptor de tirosina kinasa, integrinas y receptores fosfatidilserinas de receptores de la familia TIM y TAM que desencadenan la activación de canales de sodio y potasio, RAC, PAK, PKC, fusión y fisión de membranas, así como también la modificación del citoesqueleto de actina para la internalización de la partícula viral (Mercer y col., 2012).

Por otro lado, la entrada de SV40 por caveolas y *rafts* lipídicos en células humanas HeLa está regulado por más de 40 kinasas, entre las que se destacan la kinasa de adhesión focal FAK y AKT1 (Pelkmans y col., 2005).

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

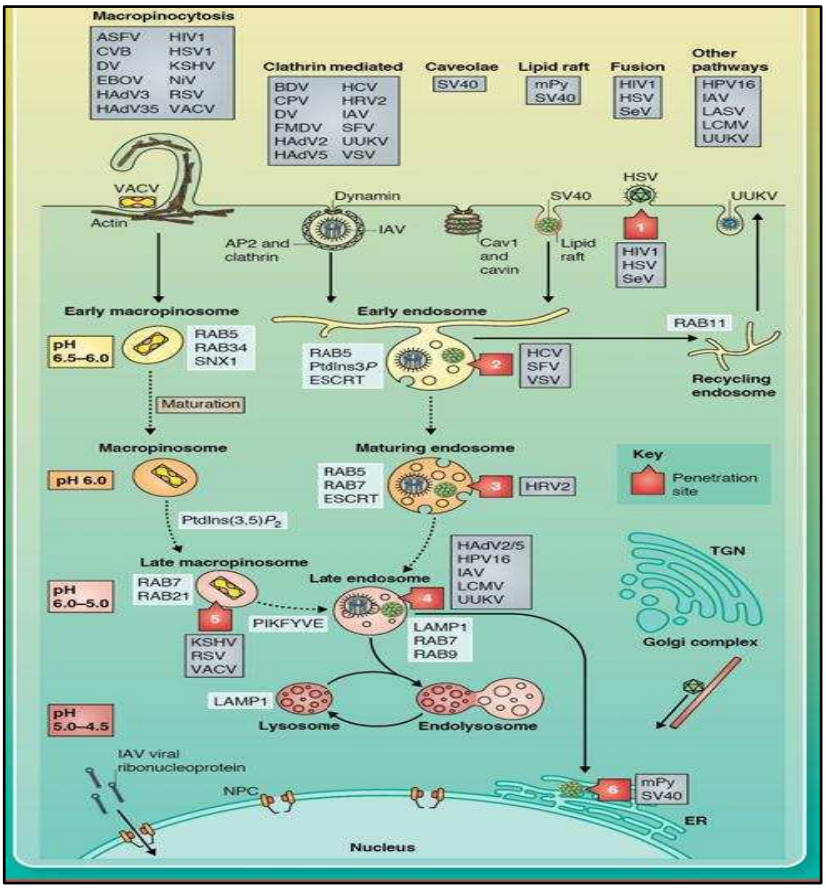

Figura 11: **Esquemas de las vías de entrada de distintos virus**. En los cuadros se indican algunos de los virus que utilizan las vías de entrada mencionadas para infectar a las células, y las proteínas celulares involucradas en cada paso (Yamahuchi y col., 2013).

VII.1- Endocitosis mediada por vesículas recubiertas con clatrina

Las moléculas de clatrina median la principal ruta de internalización endocítica en las células (Brodsky y col., 2001). En respuesta a una señal de internalización presente en el receptor que involucra una secuencia YXX o di-leucina en su cola citoplasmática, las moléculas de clatrina se ensamblan en la cara interna de la membrana plasmática para formar las invaginaciones característica que van a dar lugar a las vesículas recubiertas con clatrina (Figura 12A).

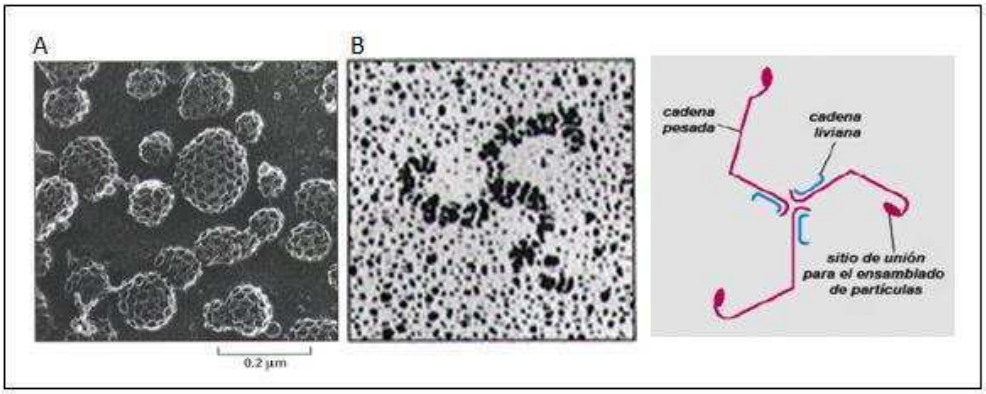

Figura 12. Vesículas recubiertas de clatrina. A) visualizadas con microscopía electrónica de barrido. **B)** Estructura del "triskelion" de clatrina y microscopía electrónica del triskelion de clatrina. Figura adaptada de Brodsky y col. (2001).

Estas vesículas se forman por reclutamiento de moléculas de clatrina, cuyo monómero está formado por tres cadenas pesadas y tres cadenas livianas dispuestas en una estructura llamada "triskelion" (Figura 12B), sobre regiones de membrana en las que se concentran proteínas adaptadoras y proteínas accesorias. Sobre estas superficies polimerizan formando estructuras planas con una disposición hexagonal. De esta forma, la composición de las vesículas de clatrina es mayoritariamente clatrina y proteínas adaptadoras y accesorias como Eps 15 y AP-2, las cuales son esenciales para el ensamblaje de la canasta de clatrina y la selección del ligando. A su vez, interactúa con la GTPasa dinamina que se ensambla alrededor del cuello de la vesícula con clatrina y produce su fisión, proceso que requiere de la hidrólisis del GTP.

El complejo AP-2, uno de los componentes identificados junto con la clatrina, juega un rol esencial tanto en la organización como en la función de las membranas recubiertas con clatrina. Ha sido demostrado que AP-2 esta constitutivamente asociado a Eps-15 (Benmerah y col., 1995, 1996). Eps-15 es una proteína altamente conservada, organizada en tres dominios estructurales: un dominio N-terminal (DI), un dominio central de Eps-15 (DII) que está involucrado en la homodimerización de Eps-15 y el domino C-terminal (DIII) que se caracteriza por la presencia de repeticiones de la secuencia DPF y contiene el sitio de unión a AP-2 (Benmerah y col., 1996).

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

Al jugar un rol tan importante en la endocitosis muchos virus utilizan esta vía de entrada para su internalización, incluyendo influenza y el virus de la estomatitis vesicular (VSV), los cuales se observaron por microscopía electrónica, dentro de vesículas electrodensas (Marsh y col., 1980; Matlin y col., 1981, 1982).

Uno de los eventos que estabiliza la estructura, es la carga del ligando al receptor. Estudios recientes sugieren que el ligando difunde lateralmente al azar por la membrana hasta encontrar una zona enriquecida en clatrina. Estas zonas se presentan como parches de actina y colesterol que podrían participar en la formación de las vesículas (Earlich y col., 2004; Nuñez y col., 2011). Es por eso que distintos factores que alteren la movilidad del receptor pueden afectar a la maduración de las canastas de clatrina. Se ha demostrado que proteínas que contienen glicanos en su estructura presentan movilidad lateral reducida y eso favorece el proceso endocítico (Dennis y col., 2009; Torreno- Pina y col., 2014).

VII.2 Otras vías endocíticas

Al igual que la endocitosis dependiente de clatrina, otra de las formas clásicas y bien estudiadas de entrada es la endocitosis dependiente de caveolas. Las caveolas son pequeñas invaginaciones de aproximadamente 60 a 80 nm y están conformadas principalmente por la proteína caveolina, concentrada en regiones de la membrana plasmática ricas en colesterol, esfingolípidos, lipoesfingolípidos y ácidos grasos

insaturados. Esta vía es dependiente de cascadas de señales mediadas por tirosina kinasas, GTPasas Rho y dinamina (Henley y col., 1998). Entre los virus que utilizan esta vía de entrada se encuentran los poliomavirus SV40 y BK (Zaas y col., 2009), el virus de la encefalitis japonesa (Zhu y col., 2012) y el adenovirus tipo 37 (Yousuf y col., 2013), entre otros.

La fagocitosis es un proceso restringido a células eucariotas especializadas como macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. Este es un proceso activo que involucra la cascada de señalización mediada por Rho, la cual permite el ensamblado de fibras de actina induciendo la formación de proyecciones de la membrana que envuelven a la molécula blanco y se cierran incorporándola a un fagosoma. En este último proceso también está involucrada la GTPasa dinamina. Si bien es la vía para incorporar patógenos de gran tamaño, se ha demostrado que Herpes Simplex tipo 1 y el baculovirus Autographa califórnica, pueden entrar por esta vía en células no fagocíticas (Clement y col., 2006; Laakkonen y col., 2009).

La macropinocitosis también está caracterizada por la formación de proyecciones por rearreglos del citoesqueleto de actina, pero a diferencia de la anterior, las mismas no adquieren la forma de la partícula que endocitan, sino que colapsan sobre la membrana plasmática y originan vesículas de tamaños diversos (Kerr y col., 2009). Algunos virus que la utilizan como vía de entrada son el virus respiratorio sincicial (Krzyzaniak y col., 2013), el vírus Ebola (Muhlherkar y col., 2011) y el virus papiloma tipo 16 (Schelhaas y col., 2012), entre otros.

Además de las mencionadas, existe un amplio grupo de rutas de entrada que no involucran clatrina o caveolas. Los mismos se caracterizan por la falta de cubierta detectable por microscopía electrónica y la falta de dependencia de las proteínas clatrina y caveolina. Sin embargo, las claras diferencias estructurales y funcionales sugieren que esta definición cruda abarca a más de un tipo de mecanismo endocítico. Basándose en la evidencia experimental varios autores han subdividido estos mecanismos de manera operacional, según su requerimiento de colesterol, y ciertas proteínas celulares como kinasas, pequeñas proteínas G o dinamina.

Se ha demostrado para rotavirus (cepa RRV), así como para el virus murino norovirus-1 la utilización de una vía de internalización independiente de clatrina y caveolas pero dependiente de dinamina y *rafts* lipídicos en células endoteliales y macrófagos, respectivamente (Sánchez-San Martín y col., 2004). Por otra parte, el virus coxsackie A9 es internalizado en células A549 por una vía independiente de clatrina, caveolas y *rafts* lipídicos pero dependiente de dinamina (Heikkilä y col., 2010), al igual que el virus de la peritonitis infecciosa felina en células monocíticas (Van Hamme y col., 2008). Además, otros estudios sugieren que el virus del papiloma humano tipo 16 (HPV-16) y el virus porcino circovirus-2 pueden ser internalizados por una vía independiente de clatrina, caveolas, dinamina y *rafts* lipídicos (Misinzo y col., 2009; Spoden y col., 2008).

VIII. LOS LÍPIDOS EN LOS PROCESOS ENDOCÍTICOS

Los lípidos cumplen un rol muy importante en los mecanismos endocíticos. Los *rafts* lipídicos, son microdominios dentro de la membrana plasmática que presentan abundantes receptores proteicos y esfingolípidos, funcionando como un centro organizador para el ensamblado de moléculas de señalización y median el tránsito de proteínas de membrana, entre otros (Teissier y col., 2007). Se sabe que estos dominios contribuyen a la entrada de ciertas partículas virales. Se ha demostrado que la depleción de colesterol no solamente inhibe la formación de las vesículas recubiertas en caveolinas que se encuentran en los *rafts* lipídicos, sino que también se ha observado que la falta del mismo inhibe la formación de las canastas de clatrina (Rodal y col., 1999).

En el caso de la entrada del virus de la fiebre africana del cerdo (ASFV) se ha demostrado que el mecanismo de entrada es una endocitosis dependiente de vesículas recubiertas de clatrina y que la presencia de colesterol en las membranas celulares es esencial para producir su internalización (Galindo y col., 2015). Del mismo modo, dependencias similares se observan en la entrada del virus de la Hepatitis E en células hepáticas (Holla y col., 2015).

VIV. RED ENDOSOMAL Y TRANSPORTE INTRACELULAR

Una vez que la molécula ha sido endocitada en la membrana plasmática, será enviada a un endosoma que la dirigirá nuevamente a la membrana, a la red trans-Golgi (TG) o será direccionada a un lisosoma para su degradación. Por lo tanto, el sistema endosomal comprende un gran número de compartimentos distintos y el tráfico que los une permite que el sistema endocítico sea un continuo, en el cual la localización de las moléculas es transitoria en un compartimento particular, antes de ser dirigida a su destino final. Los mismos se clasifican según su relación espacio/temporal con la membrana plasmática.

Se denomina endosomas tempranos (EE por early endosomes) a aquellos que se generan por fusión de las vesículas endocíticas y se encuentran usualmente dispersos en el citoplasma. Los endosomas tardíos (LE por *late endosomes)* son lo que pasaron ya por varios eventos de tráfico y se removieron las moléculas que estaban destinada al TG o a ser recicladas a la membrana plasmática. Estos LE terminarán fusionándose con los lisosomas, que son el eslabón final de la cadena de endosomas. Es por esto, que se encuentran concentrados en la región perinuclear.

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

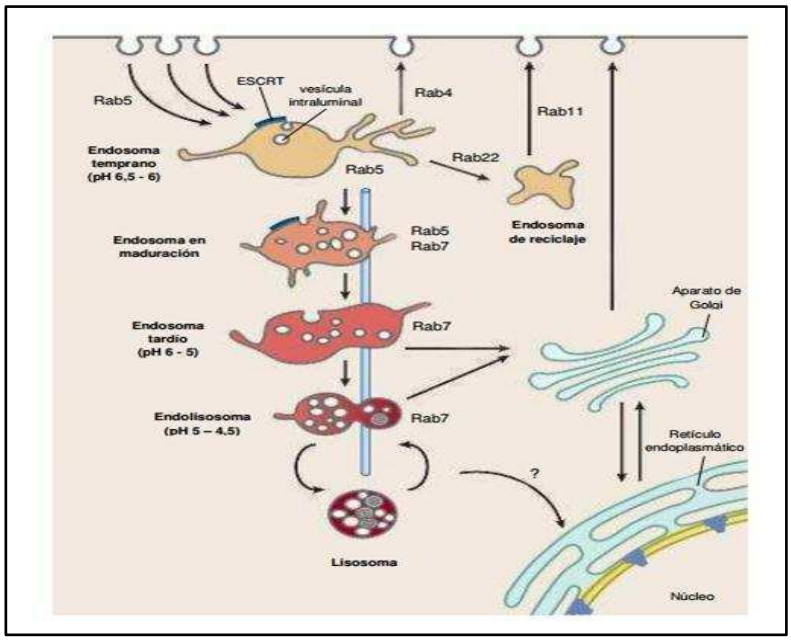

Figura 13: Red endosomal y tránsito vesicular. Se indica para cada tipo de vesícula la proteína Rab que la caracteriza y el destino de cada una. (Adaptado de tesis doctoral de Acosta, 2011).

Trabajos previos implican a las pequeñas GTPasas de la familia Rab como proteínas reguladoras clave del tráfico intracelular (Pfeffer y col., 1992). Su localización en distintos compartimentos intracelulares, enfatizó su rol en el mantenimiento de la especificidad del transporte vesicular. Como otras pequeñas GTPasas, las proteínas Rab actúan como moléculas regulatorias que reconocen a las proteínas blancos a través de un cambio conformacional dependiente de la unión al nucleótido GTP (Bourne y col., 1991). Las proteínas Rab activas son reclutadas a compartimentos unidos a la membrana donde regulan el tráfico vesicular, incluyendo la formación, liberación y fusión de las vesículas (Zerial y col., 2001). En particular, la proteína Rab5 se encuentra en endosomas tempranos, mientras que Rab7 colocaliza con endosomas tardíos. La figura 13 esquematiza el tránsito citoplasmático con las vesículas y sus marcadores proteicos que las caracterizan. Muchos virus utilizan los endosomas tempranos Rab5 positivos como VSV, SFV y el virus Influenza. De estos casos, solamente el virus Influenza utiliza los endosomas tardíos marcados con Rab7 (Sieczkarski y col., 2003). Asimismo, los estudios con distintos serotipos de DENV han demostrado la posibilidad o no de utilizar endosomas tardíos (Acosta y col., 2012),

mientras que JUNV en la línea celular Vero utiliza ambos tipos de compartimentos endosomales (Martinez y col., 2009).

X. CITOESQUELETO CELULAR

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

Los microtúbulos (MT) son filamentos del citoesqueleto que se caracterizan por estar construidos a partir de tubulina, proteína dimérica (subunidades alfa y beta) que se autoensambla para formar los microtúbulos en un proceso dependiente de GTP. Estos se originan en los centros organizadores de microtúbulos (principalmente centrosomas), adoptando una organización radial en las células interfásicas. Una de las principales funciones que cumplen los MT es la localización intracelular específica de las organelas. Los MT son responsables del sostén interno y funcionamiento de cilios y flagelos. Por último otra función de gran importancia es la participación de los MT en la división celular: forman parte del huso mitótico y participan activamente en la segregación de los cromosomas duplicados.

Los microfilamentos (MF) están formados a partir de una proteína globular denominada actina, que forma polímeros de alrededor de 5 a 6 nm de diámetro. Están presentes en las células animales mostrando una organización de haces paralelos en dominios subcorticales y citoplasmáticos de la célula. Los filamentos de actina poseen gran importancia en todos los procesos de desplazamiento y adhesión celular (emisión de pseudópodos). También juegan un rol importantísimo en la división celular, pues forman el

anillo de contracción que permite el estrangulamiento celular durante la citocinesis. Se ha propuesto que la red de actina juega un papel importante en el destino de las vesículas que salen del TG a la membrana apical en células polarizadas (Tilney, 1983).

Los filamentos intermedios cumplen la función principal de aportar resistencia. Los mismos están constituidos por una gran variedad de proteínas relacionadas tales como vimentina, laminina o queratina, a diferencia de los MT y MF que están altamente conservados en la evolución de los eucariontes.

La interacción de los virus con los componentes del citoesqueleto se ha encontrado en varios pasos de ciclo de replicación (Rey y col., 1996; Moyer y col., 1986; Galindo y col., 2015). En particular para la entrada viral se ha demostrado que además de JUNV en las células Vero, HCV, Adenovirus y HSV requieren de la dinámica de los microtúbulos para la entrada de los mismos (Mabit y col., 2002). Mientras que HIV, VSV y HPV entre otros requiere la estabilidad de los filamentos de actina para su entrada, ya sea para la concentración del correceptor o para permitir el movimiento lateral de las partículas virales en la membrana (Taylor y col., 2011).

Para el caso de los arenavirus, se observó que JUNV necesita de los microfilamentos de actina y la dinámica de los microtúbulos para su endocitosis (Martínez y col., 2007) y de la integridad de estos FI en un paso posterior a la internalización, pero antes de la expresión de la NP (Candurra y col., 1999; Cordo y col., 2003).

XI. LECTINAS DE TIPO C: DC-SIGN

Las lectinas de tipo C (calcio dependiente) constituyen una amplia familia de receptores que reconocen estructuras específicas de carbohidratos presentes en patógenos. Su función principal es mediar la endocitosis de antígenos y su presentación posterior a través de moléculas de clase I o II del complejo mayor de histocompatibilidad. Estas lectinas son expresadas en su mayoría por células dendríticas (CD) inmaduras, macrófagos y células endoteliales. DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin) (CD209) pertenece a la familia de las lectinas de tipo C y juega un rol esencial en

los pasos iniciales de la respuesta inmune y la migración de las CD, ya que media la interacción de las mismas con los linfocitos T y células endoteliales a través de su interacción con ICAM-2 e ICAM-3 (Geijtenbeek y col., 2000).

Más allá de su función en la endocitosis de antígenos, algunas de estas proteínas son empleadas por ciertos virus como receptores para infectar células y favorecer su diseminación.

XI.1. Estructura de DC-SIGN

DC-SIGN es una proteína integral de membrana tipo II, con un dominio citoplasmático N-terminal, uno transmembrana y una zona extracelular que cuenta con un dominio *neck* (con siete repeticiones completas y una parcial) y un dominio C-terminal de reconocimiento de carbohidratos (DRC) de alta manosa. Dentro del DRC existen secuencias altamente conservadas EPN o QPD esenciales en el reconocimiento de estructuras conteniendo manosa o galactosa respectivamente, dependiente de la unión de calcio.

El DRC de DC-SIGN es una estructura globular que consiste en 12 cadenas β, dos hélices α y tres puentes disulfuro. Un lazo protruye de la superficie de la proteína y forma parte de dos sitios de unión al catión de calcio. Uno de los sitios de unión al calcio es esencial para la conformación del CDR, mientras que el otro lo es para dirigir la coordinación de la estructura de carbohidratos. Cuatro aminoácidos (Glu347, Asn349, Glu354 y Asn365) interactúan con el catión de calcio en este sitio y dictan el reconocimiento de estructuras específicas de carbohidratos. El aminoácido Val351 en el CDR de DC-SIGN está involucrado en el reconocimiento de algunos ligandos, pero no todos, indicando que los mismos tienen sitios de unión diferentes pero superpuestos.

DC-SIGN presenta un sitio de N-glicosilación en el primer dominio de la región transmembrana que, junto con el dominio *neck,* facilitan la multimerización de la lectina para formar tetrámeros. La agrupación de esta proteína permite la unión a ligandos ricos en manosas (Serrano-Gómez y col., 2008; Bernhard y col., 2004).

En su cara citoplasmática, esta lectina posee tres dominios conservados: el dominio rico en tirosina (Y), dominio de dileucinas (LL) y el dominio triacídico (EEE), los cuales están involucrados en la señalización de receptores para favorecer la unión, la internalización y el tránsito citoplasmático de los ligandos respectivamente (Figura 14).

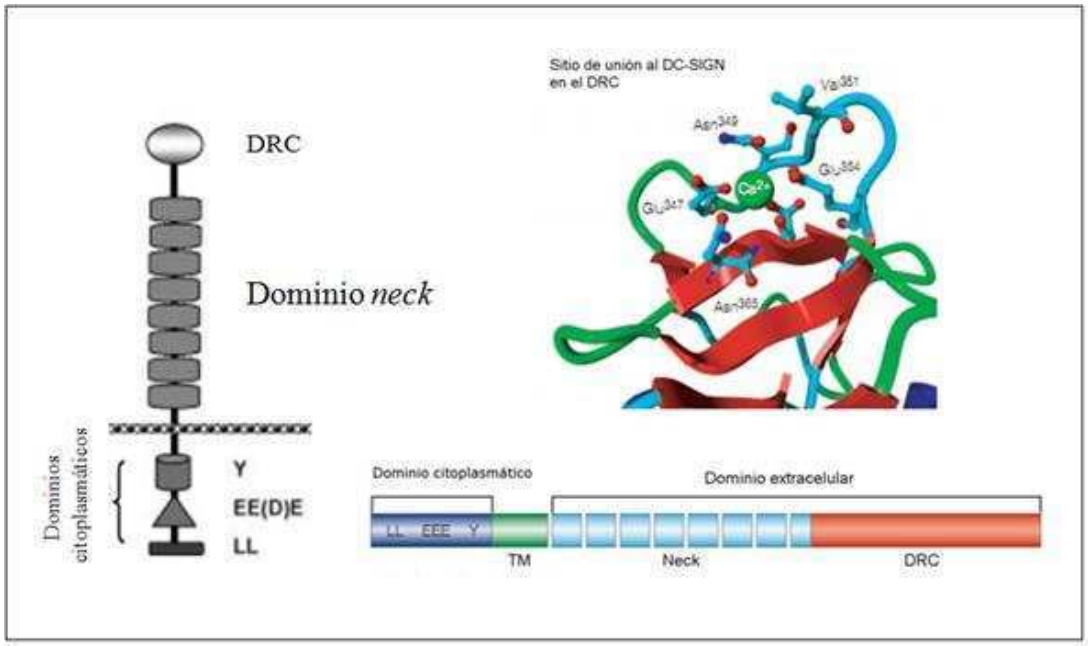

Figura 14: Estructura de DC-SIGN. Se indica en detalle la estructura aminoacídica del dominio de reconocimiento a carbohidratos (DRC) y la composición aminoacídica de los dominios citoplasmáticos. Adaptado de Van Kooyk y col., 2003.

DC-SIGN puede formar microdominios en la membrana plasmática en un entorno de *rafts* lipídicos, y esto determina la capacidad de reconocer e incorporar la partícula ligando por endocitosis. Esta lectina en células dendríticas maduras, está distribuida homogéneamente y apenas se une a partículas del tamaño viral, mientras que en células inmaduras, está bien definida en dominios y accesible a la interacción con virus. En ambos tipos de células la unión de ligando a DC-SIGN es comparable, pero la diferencia reside en que la unión del virus a la lectina ocurre mucho más productivamente cuando DC-SIGN se presenta dentro de dominios ricos en colesterol (Cambi y col., 2004).

A través de estudios inmunológicos y ensayos bioquímicos, así como también microscopía confocal y electrónica, Cambi y col. (2009) demostraron que DC-SIGN

internaliza antígenos solubles a través de una endocitosis dependiente de clatrina y esto mismo está relacionado con la entrada de HIV en células dendríticas. Para esta vía de entrada tanto dinamina como colesterol son necesarios (Figura 15).

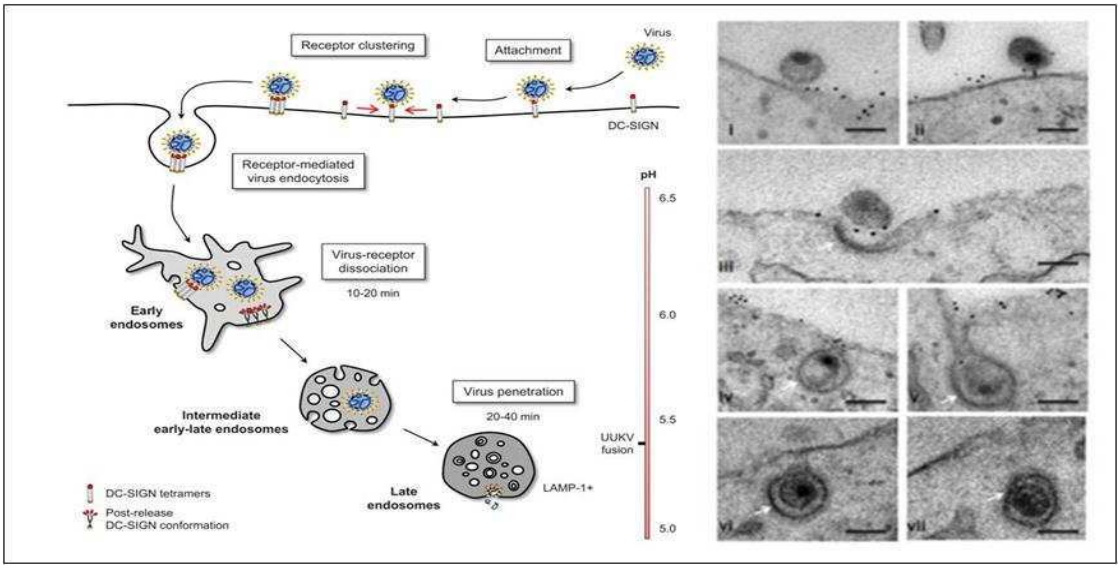

Figura 15: Entrada de HIV y UUKV a las células que expresan DC-SIGN. Esquema y microfotografía de microscopía confocal con inmunomarcación para DC-SIGN de HIV entrando a la célula por endocitosis dependiente de clatrina. Adaptado de Cambi y col. (2009) y Lozach y col., (2011).

La unión del ligando a DC-SIGN induce la cascada de señales de la fosforilación de ERK1/2 y AKT sin activación de p38 MAPK. También desencadena la fosforilación de fosfolipasa C y el aumento transitorio de calcio en células dendríticas que llevan a su maduración, despertando una respuesta inmune de tipo TH2. Se ha propuesto que los patógenos utilizan DC-SIGN para favorecer el *clearance* de los mismos y establecer infecciones crónicas (Caparrós y col., 2006).

XI.2. Rol de DC-SIGN en la entrada viral

En los estudios de interacción de DC-SIGN con distintos virus, se ha encontrado diversidad en el mecanismo en que esta lectina, en el caso que lo haga, permite la infección

a las células que la expresan. Algunos autores proponen que DC-SIGN posee funciones de receptor para varios virus como DENV, HCV, CMV y HIV, mientras que otros autores proponen que estas lectinas concentran el virus, facilitando la interacción en *cis* con los receptores requeridos, asumiendo un rol de factor de adhesión. A su vez, también se presentan los casos de algunos virus que expresan glicoproteínas altamente glicosiladas en la superficie de sus membranas como VSV, pero que no interactúan con DC-SIGN, indicando un grado de especificidad en la unión (Regan y col., 2008; Lozach y col., 2003; Klimstra y col., 2003).

Azad y col. (2008) realizaron construcciones plasmídicas de DC-SIGN con mutaciones sitio dirigidas en los dominios citoplasmáticos para determinar el rol de estos dominios en la entrada de la glicoproteína GP120 de HIV, demostrando que la mutación en los dominios de dileucinas y triacídico causa la retención intracelular de la lectina en la membrana y resulta en la incompleta endocitosis de la glicoproteína viral. Utilizando este tipo de construcciones Lozach y col. (2011) demostraron que varios miembros de la familia *Bunyaviridae* utilizan DC-SIGN como verdadero receptor para infectar células dendríticas y otras que expresen la lectina.

Estudios de glicosilación diferencial mostraron que, el virus Sinbis producido en células de mosquito presenta más eficiencia para unirse a DC-SIGN, que aquel producido en mamíferos. 1-deoxy-mannojirimicin (DMN) es un inhibidor de la enzima manosidasa de Golgi que actúa uniéndose a la región C-terminal que está ubicado en el fondo del sitio catalítico y altera el procesamiento de $Man_9GlcNac_2$ (figura 16), estructura a la cual se une DC-SIGN más fuertemente de lo que hace a un residuo de manosa, produciendo mayor infección de este virus a células que expresan esta lectina. Así mismo, esta característica fue encontrada para Hepatitis C e Influenza A. (Londrigan y col., 2010; Tai y col., 2011; Morisono y col., 2010).

La afinidad de las lectinas de tipo C por las glicoproteína retrovirales y el patrón de distribución de las mismas en las células del sistema inmune entre otros tejidos, llevaron al estudio de su rol como factor de unión e internalización para los arenavirus y en particular para JUNV.

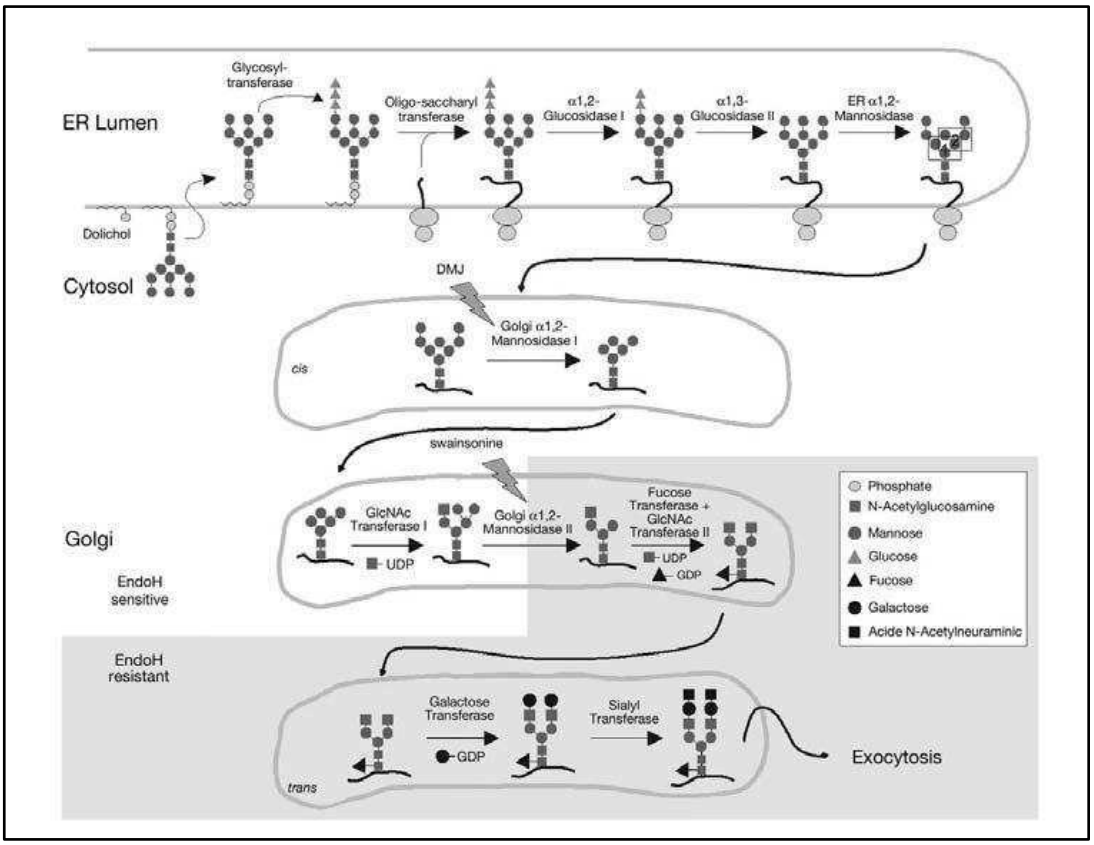

Figura 16: Camino de glicosilación de proteínas de mamíferos. En la misma se indican los residuos de azúcares agregados o removidos a la proteína en la ruta secretoria. Adaptado de Rojek y col. (2008).

XI.3 Interacción de DC-SIGN con arenavirus.

Los estudios con mamarenavirus del Viejo Mundo demostraron que el virus Lassa y el virus LCMV aumentan su multiplicación en células que expresan DC-SIGN independientemente del receptor principal, pero si están ambos presentes lo hace preferencialmente al receptor α-distroglicano, cumpliendo la lectina un rol de receptor alternativo (Shimojima y col., 2011 y 2012).

Por otro lado, en el caso de los mamarenavirus del Nuevo Mundo se comprobó que la expresión de DC-SIGN o su homólogo L-SIGN aumentan la infección por JUNV en células susceptibles Vero transfectadas con estas lectinas.

Además, se observó un aumento marcado de la susceptibilidad de infección a cultivos murinos no susceptibles cuando la misma está presente (Martínez y col., 2013). Si bien queda comprobado que la presencia de esta lectina en los cultivos aumenta la infección por JUNV, el rol de DC-SIGN ya sea como factor de adhesión o como verdadero receptor de endocitosis, junto con la caracterización completa de la interacción con JUNV, aún no han sido determinadas.

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la interacción del virus Junín con la lectina de tipo C DC-SIGN y determinar los componentes celulares y virales involucrados en las etapas tempranas de la infección en este sistema celular.

Los objetivos específicos son:

1) Describir la interacción del virus Junín con la proteína de membrana DC-SIGN.
2) Describir el mecanismo de entrada utilizado por el virus Junín en cultivos celulares que expresan la lectina humana DC-SIGN y analizar las características de la infección por JUNV en células no permisivas 3T3.

Para el primer objetivo, se determinó y caracterizó la unión de JUNV a DC-SIGN a través de la utilización de compuestos que interfieren en la unión, asi como también técnicas que demuestran la colocalización del virus y la lectina. Además se utilizaron construcciones mutantes de la lectina para determinar el rol de la misma en la infección por JUNV en ese sistema celular.

En relación con el segundo objetivo se analizaron diferentes vías endocíticas para determinar la vía de entrada utilizadas por JUNV a través de DC-SIGN. Específicamente se analizó la participación de las vías dependientes de clatrina, caveolas y colesterol enfocando también en el estudio de la participación de las proteínas dinamina-II, Eps15, Cav1 y marcadores de endosomas como las proteínas Rab5 y 7.

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 para JUNV.

Materiales y Métodos

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. Línea celular Vero (ATCC CCL 81)

Esta línea proviene de riñón de mono verde africano (C*ercopithecus aethiops).* Los cultivos se crecieron en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado con 5% de suero de ternera (ST) y 50 µg/ml de gentamicina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente y luego de alcanzada la confluencia se mantuvieron en MEM suplementado con 1,5% de ST (MM). En el caso de los ensayos de titulación viral, los cultivos se incubaron con medio semisólido (partes iguales de MEM 2X, 4% de ST, 100 µg/ml de gentamicina y metilcelulosa 1,4%) en estufa a 37°C con 4% de CO_2.

1.2 Línea NIH 3T3 (ATCC CCL 1658)

Esta línea fue cedida gentilmente por el NIH (National Insititute of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos). Estos cultivos provienen de embrión de ratón (*Mus musculus)*. Los cultivos se crecieron en MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) 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 a 37°C en estufa con 4% de CO_2.

1.3. Línea NIH 3T3 DC-SIGN

Estas células fueron cedidas gentilmente por el NIH (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos), son cultivos derivados de las NIH 3T3 que expresan establemente la lectina DC-SIGN. Los plásmidos que expresan esta lectina no cuentan con ningún tipo de selección por antibióticos sino que fueron seleccionados por citometría de flujo. Una vez descongeladas estas células no se utilizaron por más de 10 subcultivos. Los cultivos se crecieron en MEM suplementado con 10% de SFB inactivado y 50 µg/ml de gentamicina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente. Los cultivos se mantuvieron en estufa con 4% de CO_2. Se corroboró periódicamente la expresión del receptor por inmunofluorescencia indirecta (IFI).

1.4. Línea TRVb

Esta línea fue cedida gentilmente por el Dr. Collin Parrish, (Baker'sInstitute, Cornell University, Ithaca, New York). La línea TRVb es un cultivo derivado de células CHO deficiente en la producción del receptor de transferrina endógeno. Los cultivos se crecieron y propagaron en medio Ham's F12 suplementado con 10% de SFB y 50 µg/ml de gentamicina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente y se incubaron en estufa a 37°C con 4% de CO_2.

1.5. Línea THP-1 (ATCC TIB-202)

Estas células fueron cedidas gentilmente por el laboratorio de Inmunofarmacología de la FCEyN, UBA. Esta línea es un cultivo de células humanas de monocitos de sangre periférica crecidas en suspensión. Las mismas fueron diferenciadas a macrófagos con ácido forbol mirístico (PMA) 60 nM, adquiriendo la característica de adherencia. Estas células diferenciadas se crecieron en medio RPMI 10% SFB suplementado con PMA 60 nM y se subcultivaron periódicamente a 37°C en estufa con 4% de CO_2.

1.6. Línea Raji-DC-SIGN

Esta línea fue cedida gentilmente por el NIH (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos). Línea linfocítica humana crecidas en suspensión con medio RPMI 20% SFB Estas células provienen de la línea Raji, la cual fue transducida con el vector MLV MX-DC-SIGN y las poblaciones positivas para la lectina fueron seleccionadas por FACS. Las células se subcultivaron periódicamente y se incubaron en estufa a 37°C con 4% de CO_2 hasta 10 subcultivos.

2. VIRUS

Se utilizó la cepa atenuada IV4454 del virus Junín (JUNV) aislada a partir de un caso leve de fiebre hemorrágica argentina (Contigiani y col., 1977). El stock de trabajo se preparó infectando células Vero con una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,1 UFP/célula. Luego de 1 hora de adsorción a 37°C, se incubó con 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 -80ºC.

3. COMPUESTOS UTILIZADOS

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Las soluciones madres preparadas a partir de los compuestos se fraccionaron y almacenaron a –80ºC según las siguientes concentraciones:

Metil-β-ciclodextrina: 500 mM en agua.

Nistatina: 50 mM en DMSO.

Clorpromacina: 10 mM en etanol.

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

Mannan: 50 mM en agua

EGTA: 66.6 mM en agua pH:8,8

Griffithsin: 1uM en PBS

1-deoxymannojirimycin: 50 mM en agua

Todas las soluciones fueron esterilizadas por filtración a través de una membrana Millipore con un tamaño de poro de 0,2 µm.

4. REACTIVOS Y ANTICUERPOS UTILIZADOS

Anticuerpos monoclonales reactivos contra NP: IC06-BE10 para IFI y NA05-AG12 para western blot (WB), y reactivos contra la GP1: GB03-BE08 y GD01-AG12 (Sánchez y col., 1989).

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

Anticuerpos monoclonales anti-tubulina clon B512,suero anti-IgG de ratón desarrollado en cabra conjugado con Alexa fluor-488, faloidina-FICT, toxina colérica subunidad A- FICT, MTS (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxyfenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium), anticuerpo anti-ratón producidos en cabra para WB, anticuerpo anti-GAPDH desarrollado en ratón obtenido en Sigma- Aldrich fueron obtenidos en (Sigma-Aldrich).

Los 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.

Anticuerpo monoclonal anti-hDC-SIGN producido en conejo fue obtenido en Cell Signalling.

Anticuerpo monoclonal anti-DC/L-SIGN producido en ratón fue gentilmente cedido por el NIH (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos).

Anticuerpo anti-conejo desarrollado en cabra para WB obtenido de Amersham. Anticuerpo anti-Fc humano acoplado a HRP producido en conejo para WB obtenido en DAKO.

5. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

5.1 Método de MTS

Para determinar el rango de concentraciones de los compuestos que no resulte tóxico para las células se utilizó el método colorimétrico descrito por Markovic y col. (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 µl 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 cuatriplicado.

5.2 Método de exclusión de Trypan Blue

Para comprobar la toxicidad del compuesto 1-deoxymannojirimycin se incubaron los cultivos con la dilución 1mM del mismo en MM por 48 hs. Luego, se trataron las células con tripsina, se resuspendieron en MM, se mezclaron en volúmenes iguales con el compuesto Trypan Blue al 4%, el cual solo tiñe las células muertas y se contaron el número de células azules sobre las refringentes (vivas) en cámara de Neubauer. A partir de esos valores, se determinó el porcentaje de células viables del total y se comparó este porcentaje con el control.

6. 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_2 durante 7 días para el JUNV y 2 días para 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 a través de la siguiente fórmula:

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

7. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN VIRAL

Se crecieron monocapas de células 3T3 y 3T3-DC-SIGN en microplacas de 24 cavidades, se infectaron con JUNV (m.i.:0,1) y luego de 1 hora de adsorción se retiró el inóculo. Al tiempo adecuado las células fueron tratadas, siempre por duplicado, con distintas concentraciones del compuesto a evaluar. Luego de la infección se mantuvieron en MM 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:

% de inhibición= 100 x [1- (Título Sn tratado/ Título Sn control)]

8. ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS A DISTINTOS TIEMPOS

1 x 10^5 células de las líneas 3T3 y 3T3-DC-SIGN 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.

8.1 Pre-tratamiento

Para el caso de pre-tratamientos, se incubaron los cultivos con las diluciones correspondientes por el tiempo necesario para cada compuesto, luego se retiró el mismo y se realizó la adsorción y entrada de JUNV en presencia o ausencia de las distintas concentraciones de compuesto según corresponda. En el caso de infectar en ausencia de los compuestos, se realizaron tres lavados con PBS previos a la infección. Finalmente se retiró el inóculo, se cubrieron las monocapas con medio MM fresco y se cosecharon los sobrenadantes correspondientes a las 24 horas p.i. para ser titulados por el método de UFP.

8.2. Tratamiento posterior a la infección

En el caso de los tratamientos posteriores a la infección, los cultivos se infectaron con JUNV por una hora y luego de retirar el inóculo se incubaron por dos horas con MM a 37°C. Transcurrido dicho tiempo, se cambió el medio por uno conteniendo la dilución del compuesto a ensayar, se lo dejó el tiempo indicado para cada uno y se reemplazó nuevamente el medio por MM fresco. Los sobrenadantes se cosecharon para ser titulados por el método de UFP.

9. ENSAYO DE EFECTO BLOQUEANTE POR LECTINAS SOLUBLES

Para ensayar la actividad bloqueante de la lectina Griffithsin se realizó un ensayo virucida del mismo, incubando suspensiones de 10^7 UFP/ml de JUNV en presencia de diferentes concentraciones finales del compuesto (0.1, 1, 10 y 100 nM) o MEM (control) a 37°C durante 90 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, las suspensiones se titularon mediante el método de UFP en células Vero, y por otro lado, se incubaron en células 3T3 o 3T3-DC-SIGN por una hora a 37°C. Luego se retiró el inóculo y se cubrió con medio de mantenimiento por 24 hs. Los sobrenadantes se titularon por el método de UFP y para determinar la expresión de la nucleoproteína, las células se procesaron para IFI.

10. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

10.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Se crecieron 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 los cultivos fueron infectados con JUNV (m.i.:0,1) 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. Pasado ese tiempo, 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 formaldehido a temperatura ambiente y se permeabilizó con Tritón X-100 0,2%. Para los ensayos de IFI de membrana solo se fijaron con formaldehído 4% por 20 minutos Luego de la fijación y/o permeabilización, se realizan tres lavados con PBS y los cultivos se bloquearon con BSA 3% en PBS (PBS-BSA) durante una hora a 37°C.

Para revelar el antígeno viral (NP o GP1) se utilizaron anticuerpos monoclonales reactivos contra JUNV en una dilución 1:300 en PBS-BSA por una hora a 37°C. Para IFI de DC-SIGN se incubaron con el anticuerpo monoclonal a una dilución 1:300 por una hora a 37°C o con el anticuerpo preparado en conejo a una dilución 1:200 toda la noche a 4°C ambos en PBS-BSA. Para visualizar los microtúbulos se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-tubulina en una dilución 1:200 en PBS-BSA por una hora a 37°C. Transcurridos los tiempos de incubación, se realizaron tres lavados con PBS Tween 20 0,1%. Por último se realizó una incubación con suero anti-IgG de conejo o ratón según corresponda, conjugados con fluoresceína, Alexa fluor-488 o Alexa fluor-555, por 1 hora a 37°C en una dilución 1:300 en el primer caso o 1:500 para los últimos, en PBS-BSA. En todos los casos luego de tres lavados con PBS Tween 20 0,1% se realizó un lavado final con agua destilada. En los casos en los cuales fueron teñidos los núcleos, esto se realizó con Hoestch, DAPI o Azul de Evans, y finalmente los preparados fueron montados en una solución tamponada de glicerol conteniendo 2,5 % de DABCO (1,4-diazabiciclo 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.

10.2. Ensayo de adsorción

Se crecieron células sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades. Una vez que las células se adhirieron fueron infectadas con JUNV a una m.i.:5. Luego de la hora de adsorción a 4°C, se retiró el inóculo y se incubaron con una dilución de una mezcla de anticuerpos anti DC-SIGN hecho en conejo 1:100 y anti GPC 1:100 en PBS-BSA a 4°C durante 1 hora. Luego, las células se lavaron 3 veces con PBS frío y se fijaron con formaldehído 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, se realizaron tres lavados en PBS Tween 20 0,1% y se incubaron con BSA 3% en PBS por una hora a 37°C. Luego, se repitieron los lavados y finalmente se incubó por una hora con la mezcla de anticuerpos IgG anti-conejo acoplado a Alexa-555 en dilución 1:500 y IgG anti-ratón acoplado a Alexa.488 en la misma dilución, en PBS-BSA. Los preparados fueron montados en una solución tamponada de glicerol con 1,5% de DABCO.

Finalmente las muestras se observaron en el microscopio confocal Olympus FV 1000.

10.3. Fluorescencia directa

Se crecieron 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 utilizando formaldehído 4% y tritón X-100 para la permeabilización. Se repitieron tres lavados previos a la incubación de una hora con faloidina-FITC en una dilución 1:20 en PBS. Al cabo de este tiempo se retiró el compuesto y se realizaron lavados durante 45 minutos con agitación y en oscuridad.

En los casos en que se usó 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 de 20 µg/ml en PBS. Luego se incubaron las células con esta concentración durante 20 minutos a 37°C. Pasado este tiempo se fijaron las células con metanol durante 10 minutos a -20°C.

Para el caso de 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 µg/ml de Ctx preparada en MEM sin suero, durante 1 hora a 37°C y en oscuridad. Al cabo de este tiempo se realizaron tres lavados con PBS y se fijaron con metanol durante 10 minutos a -20°C.

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

10.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y western blot (WB)

Las muestras que se utilizaron para este estudio fueron células TRVb, 3T3 y 3T3-DC-SIGN infectadas con el JUNV o transfectadas 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%, β-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,005%, SDS 10%). Antes de ser sembradas, las muestras fueron hervidas durante 5 minutos. Para la resolución de las proteínas, se realizó la 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 80 V utilizando como buffer de corrida: Tris-HCl 0,025 M en agua pH 8,3, glicina 0,192 M, SDS 0,1%. Luego se transfirió durante 60 minutos sobre membranas de PVDF (Polyscreen, Perkin Elmer 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% en PBS-Tween 20 0,1% (solución de bloqueo) durante 1 hora a 37°C para luego ser incubadas con el monoclonal para DC-SIGN (1:1000), monoclonal para NP (1:500), monoclonal para GAPDH (1:500) o policlonal para FC humano acoplado a peroxidasa (1:500), toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a lavar las membranas 5 veces durante 5 minutos con PBS-Tween 20 0,1%, para incubarlas (para los tres primeros casos) nuevamente con un anticuerpo anti IgG 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 PBS-Tween 20 0,1%. Las membranas se revelaron con un sistema de detección quimioluminicente (ECL) durante unos minutos, para ser finalmente reveladas con autoradiografías. Los tiempos de exposición variaron según la intensidad de la luminiscencia.

11. EFECTO DE LOS COMPUESTOS EN LA SÍNTESIS DEL RNA VIRAL

Monocapas de 1,5 x 10^5 células 3T3 y 3T3-DC-SIGN crecidas en microplacas de 6 cavidades fueron tratadas con los compuestos en distintas concentraciones en MEM sin suero o MEM 1,5% ST según corresponda. Luego se infectaron con JUNV (m.i.:5) por 1 hora a 4°C y luego a 37°C por una hora más. Se retiró el inóculo y se cubrió con MM y se incubó a 37°C por cuatro horas. Las células se trataron con proteinasa K (1 mg/ml) a 37ºC y la acción de la enzima fue inactivada con PMSF 2 mM en PBS-BSA 3%. Las células cosechadas se centrifugaron a 200 g y se lavaron 3 veces con PBS-BSA 0.3%. Finalmente, las células se resuspendieron con Trizol (Life Technologies).

11.1. Extracción del RNA

Las muestras celulares en Trizol, fueron incubadas con cloroformo y centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a 4ºC. Se tomó el sobrenadante y para la precipitación del RNA se

incubó con isopropanol por 10 minutos a -70ºC. Luego de centrifugar las muestras por 10 minutos a 4ºC a 12000 g, se lavaron los pellets con etanol 70% (dos veces) y se centrifugó a 7500 g por 5 minutos a 4ªC. Finalmente, se retiró el sobrenadante, se secó el pellet antes de su resuspensión en agua libre de RNAsas y se calentó a 60ºC por 15 minutos. La concentración y el grado de pureza del RNA extraído de cada muestra fueron cuantificados por medición de absorbancia a 260 nm en un Nanodrop.

11.2. Preparación de cDNA

Para la síntesis del cDNA se tomaron 2 µg de cada muestra de RNA y se llevó a un volumen de 8 µl. Luego se agregaron 2 µl de *"randomprimers"* en una concentración 10 µM y 4 µl de buffer 5X para la transcriptasa reversa (RT) de AMV (virus de la myeloblastosis aviar), la retrotranscriptasa (4 unidades), 1 µl de RNAsin (Promega, USA) y 3 µl de H_2O libre de RNAsas. El volumen final de cada reacción fue de 20 µl. Esta reacción fue incubada a 42°C durante 2 horas.Este cDNA sintetizado con *"random primers"* fue empleado como molde en reacciones de PCR en tiempo real.

11.3. Amplificación por PCR en tiempo real

A partir de las muestras de cDNA como moldes, se realizaron reacciones de PCR en tiempo real. En esta reacción el volumen final fue de 25 µl y fue llevada a cabo en presencia de buffer de reacción Master Mix 2x SYBR (Applied Biosystems, USA) y primers 1 µM. Los cálculos iniciales del número de copias de RNAm en cada muestra se hicieron en base al método CT ("cyclethreshold"). El CT es el número de ciclos mínimos de PCR (amplificaciones) necesarias para que el producto de amplificación sea detectado por el equipo. Es decir, que a menor valor de CT, mayor es la concentración de sustrato con el que se inicia la reacción. Los valores de CT fueron normalizados usando la amplificación del gen celular GAPDH como control interno. Se realizó un análisis de disociación de los productos de PCR para confirmar la especificidad de la reacción. El CT de cada muestra fue calculado en el límite de fluorescencia (Rn) determinado automáticamente al utilizar el 5.700 SDS software (PerkinElmer). Para ambos pares de *primers* la linealidad de la señal de fluorescencia de la amplificación fue determinada por un amplio rango de diluciones seriadas de cDNA de referencia que cubre el rango de concentraciones en el cual espera

encontrarse la muestra. Se encontró una clara correlación entre la cantidad de cDNA y el CT por lo menos por la duración de 40 ciclos de RT-PCR. La expresión del gen blanco NP se normalizó contra la expresión del gen control GAPDH. Los resultados se expresan como cantidades relativas (QR) para comparación entre las distintas muestras. Las UA se definen como los niveles de expresión relativos de las células tratadas respecto al de las células control.

CT: n ciclos de PCR

ΔCT: es la diferencia entre el promedio de los valores de CT de las muestras de interés (NP) y los valores de CT de los controles internos (GAPDH) (ΔCT= CTNP - CT GAPDH)

ΔΔCT: es la diferencia entre los promedios de ΔCT para el gen de interés entre la condición control (células infectadas, no tratadas) y el promedio de los valores CT de cada muestra tratada (ΔΔCT=ΔCT NP de células controles -ΔCT NP de células tratadas con los compuestos).

QR (cantidad relativa): 2 – ΔΔCT

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

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

Primer complementario a las secuencias del RNAm viral y RNA S antigenómica ubicadas en el extremo 5'del RNAm de NP.

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

Primer complementario a las secuencias ubicadas en los extremos 3' del RNA S genómico y 5' del RNA S anti-genómico de la mayoría de los arenavirus.

-GAPDH F: 5' GTTGCCATCAATGACCCCTTCATTG 3'.

-GAPDH R: 5' CAGCCTTCTCCATGGTGGTG 3'.

Los resultados de las amplificaciones fueron validados basados en las curvas de disociación generados al final del ciclado de la PCR, barriendo temperaturas de 60°C a 95°C mientras continúa la colección de los datos de fluorescencia.

12. TINCIÓN DE CÉLULAS VIVAS CON NARANJA DE ACRIDINA

Para corroborar el efecto de la concanamicina A y el cloruro de amonio sobre el pH de las vesículas ácidas intracelulares, se realizaron tinciones de las células con el colorante naranja de acridina. Células 3T3 y 3T3-DC-SIGN fueron crecidas en cubreobjetos y tratadas con concanamicina A o cloruro de amonio durante 30 minutos y luego incubadas con 1 ug/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. Finalmente, 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.

13. PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

En 100 ml de medio LB se inoculó 3 ml del precultivo toda la noche de *E. coli*DH5α y se incubó a 37ºC con agitación hasta alcanzar una DO de 0,5. Una vez alcanzada dicha densidad óptica, se centrifugó 10 minutos a 3220 g. Se resuspendió el precipitado y se agregaron 30 ml de $CaCl_2$ 0.1 M en frío. Todos los pasos siguientes se realizaron a 4ºC. Se centrifugó a 10000 g y se resuspendió nuevamente en 30 ml de $CaCl_2$ 0.1 M incubando por 60 minutos. Pasado dicho tiempo, se repitió la centrifugación y el precipitado se resuspendió en 1 ml de $CaCl_2$ 0.1 M con 10% de glicerol en frío.

14. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES.

Se mantuvieron en hielo 50 µl de bacterias competentes por 15 minutos. Se agregaron 5 µl del plásmido y se dejaron incubar por 30 minutos más en hielo. Luego se incubaron por 2 minutos a 42ºC y se pasó rápidamente a hielo, donde se las dejó permanecer allí por 5 minutos. Finalmente se agregó 500 µl de medio LB con el antibiótico correspondiente a la resistencia codificada por el plásmido y se recuperaron incubando a 37ºC con agitación por 1 hora si posee ampicilina (concentración final 0.5 µg/ml) o 2 horas si posee kanamicina (concentración final 50 µg/ml).

15. PLÁSMIDOS

15.1 GP1-FC

Producido por la Dra Guadalupe Martínez, esta construcción está contenida en el vector de expresión pCEP4, con resistencia a ampicilina, y expresa la glicoproteína GP1 de JUNV acoplada a un FC de un IgG humano, lo que permite la secreción de la misma al sobrenadante.

15.2 Mutantes del DC-SIGN

Fueron utilizadas las construcciones de los plásmidos que codifican las proteínas salvajes de DC- SIGN y los mutantes simples LL y EEE, provistos por Abul K. Azad, del Departamento de medicina interna de la Universidad de Ohio. Dichos mutantes se crearon por mutación sitio-dirigida en cada dominio citoplasmático por sustituciones de alanina. Los mismos están construidos con el vector de expresión pSec-Tag2 con resistencia a ampicilina.

15.3 Dominantes negativas

Construcciones salvaje y dominantes negativas de Eps 15 (Benmerah y col, 1998), Din II (Van der Bliek y col, 1993), Rab5 (Stenmark y col, 1994), Rab7 (Feng y col, 1995) y Cav 1 (gentilmente cedida por el Dr JM Bergelson de la Universidad de Pennsylvania, USA) se encuentran clonadas en el vector de expresión pEGFP-C1, que codifica una variante de GFP para su detección y posee resistencia a kanamicina.

16. TRANSFECCIÓN DE CULTIVOS CELULARES

Cultivos de células 3T3, 3T3-DC-SIGN, Raji-DC-SIGN y THP-1 diferenciadas con PMA 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 para la construcción de la glicoproteína GP1-Fc.

Las células 3T3 fueron transfectadas con las construcciones de plásmidos que codifican para hDC-SIGN salvaje y las mutantes y a las 24 hs infectadas con JUNV (m.i.:0,1) durante el mismo período de tiempo

Las células 3T3-DC-SIGN fueron transfectadas con construcciones de las proteínas salvajes o mutantes dominantes negativas de Eps15, Dyn II, Rab5 o Rab7, fusionadas a la proteína verde fluorescente (GFP).

Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las indicaciones del proveedor: 1µg de cada preparación de los plásmidos, obtenida utilizando el kit de extracción de DNA plasmídico de Promega, fue diluida en 50 µl de OptiMEM y se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al mismo tiempo se diluyó 1 µl del reactivo Lipofectamina en 50 µl de OptiMEM. Pasados los 10 minutos de incubación se preparó la mezcla de transfección combinando los 50 µl de la solución conteniendo el DNA con los 50 µl de la solución conteniendo la Lipofectamina. Esta se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de DNA-Lipofectamina. Durante el período de las incubaciones se reemplazó el medio de cultivo de las células por 300µl de OptiMEM. Pasados los 20 minutos de incubación los 100 µl de mezcla de transfección conteniendo los complejos DNA-Lipofectamina fueron agregados a cada 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 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%, o con formaldehído 4% durante 20 minutos para IFI de membrana. Se realizó la IFI como se indicó anteriormente para JUNV, pero en el caso de las construcciones dominantes negativas, 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.

Para los ensayos de adsorción, el inóculo viral se dejó una hora a 4°C, y se incubó con el anticuerpo anti DC-SIGN o una mezcla del anticuerpo anti DC-SIGN y anti GPC según corresponda, se lavaron tres veces con PBS frío y finalmente se fijaron con formaldehido 4% a temperatura ambiente por 20 minutos. Los cultivos se analizaron por microscopía confocal utilizando el microscopio Olympus FV 1000.

17. TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE MANOSIDASA

Cultivos de células Vero fueron infectadas con JUNV (m.i.:1) durante 1 hora a 37°C y luego se retiró el inóculo y se cubrieron las células con MM en el caso del control o con MM conteniendo 1 mM del compuesto 1-deoxymannojirimycin (DMN) (Silver y col., 1993). Los sobrenadantes de 48 hs de infección tratados y control, fueron recolectados y utilizados para infectar células Vero, 3T3 y 3T3-DC-SIGN. A las 24 horas post infección, se cosecharon los sobrenadantes para su titulación por la técnica de UFP y los cultivos se fijaron para estudios de expresión de la nucleoproteína por IFI.

18. CO- INMUNOPRECIPITACIÓN

Cultivos de células 3T3 y 3T3-DC-SIGN fueron crecidos en microplacas de 24 cavidades y transfectados con la construcción del plásmido que codifica para la glicoproteína de JUNV acoplada a un Fc de anticuerpo IgG humano, lo que permite la secreción de la misma. Luego de 24 hs de transfección, las células se lavaron con PBS tres veces, y se levantaron con 75 ul por cavidad del buffer estéril TBS suplementado con 1% de CHAPS, cloruro de calcio y PMSF 0,4 mM, y fueron colectadas en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Las células se sometieron a la secuencia de congelado a -80°C y descongelado tres veces. Luego se centrifugaron durante 10 minutos a 350 g y se reservaron los sobrenadantes, a los

cuales se los incubaron con 30 ul de proteína A-agarosa (previamente lavada con buffer) durante 30 minutos a 37°C con agitación. Finalmente se pasaron a 4°C por 90 minutos con agitación, se centrifugaron los tubos nuevamente a 350 g por 10 minutos y en este caso, el pellet fue reservado y lavado tres veces con buffer de lisis con inhibidor de proteasas. Por último se retiró el sobrenadante, se agregaron 50 ul de PAGE 1X con β-mercaptoetanol y se calentaron por 5 minutos a 100°C. Los tubos se centrifugaron nuevamente y los sobrenadantes se reservaron para ensayos de WB contra la lectina DC-SIGN. Como control positivo de células totales sin inmunoprecipitar (input), se resuspendieron cultivos de ambas líneas con el buffer de lisis y se agregaron 50 uL de β-mercaptoetanol para los ensayos de WB contra la lectina. Además, tanto para las muestras inmunoprecipitadas como para las muestras input, se realizó WB contra la porción Fc.

19. EXTRACCIÓN DE COLESTEROL

Para la determinación de colesterol remanente a distintos tiempos en los tratamientos con Metil-β-ciclodextrina y Nistatina, se utilizó el kit comercial Amplex Red™ de Thermo Fisher Scientific, según las especificaciones del proveedor. Cultivos de células 3T3 y 3T3-DC-SIGN fueron crecidos hasta alcanzar la confluencia y fueron tratados con los compuestos por 30 minutos y 2 hs respectivamente. En paralelo se trataron, como control de tratamiento, cultivos con MEM sin suero por los mismos tiempos. Luego de dichos tiempos, los cultivos se levantaron para los ensayos de extracción y duplicados de dichos tratamientos se infectaron con JUNV (m.i.:0,1) por una hora a 37°C, y luego se cubrieron con MM por 24 hs. Transcurrido dicho tiempo, las células tratadas y duplicados sin tratar se cosecharon para el ensayo de medición de colesterol.

Las células se cosecharon con PBS y se centrifugaron a 350 g por 5 minutos, y el pellet se resuspendió en buffer de reacción (RB) 1X. En una microplaca de 96 cavidades para determinaciones en fluorímetro se sembraron partes iguales de las muestras en buffer RB y de la solución de trabajo. Esta solución está compuesta por el reactivo Amplex Red$_{TM}$, la enzima HRP, la enzima Colesterol oxidasa y la enzima Colesterol esterasa en buffer RB. Las suspensiones fueron incubadas a 37ªC en oscuridad por 30 minutos y se midió la

fluorescencia a 544 nm como longitud de onda de excitación. Al mismo tiempo, se midió la fluorescencia del buffer RB solo como blanco, y se realizó el mismo procedimiento con estándares de colesterol, para la realización de una curva de calibración de los valores de las muestras.

20. 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 desvíos estándar para cada punto. Se utilizó el programa GraphPad Prism 5 para analizar las medias aritméticas. Para comparaciones de dos muestras se utilizó la Prueba t de Student, mientras que para para comparaciones de más de dos muestras se utilizó un análisis de ANOVA de dos factores con contraste de Bonferroni. La diferencia significativa se definió como $p<0,05$.

Resultados

1. Interacción del virus Junín con la lectina DC-SIGN

A lo largo de los últimos años han surgido muchos estudios sobre la interacción de DC-SIGN con distintos virus y la diversidad en el mecanismo de la misma, ya sea como receptor o como factor de adhesión favoreciendo el aumento de infección. Asimismo, existen casos de virus envueltos con proteínas de espícula altamente glisosiladas que no son reconocidas por dicha lectina, haciendo referencia a cierta especificidad en el patrón de azúcares reconocido. En el grupo de mammarenavirus del Nuevo Mundo se comprobó que la presencia de la lectina aumenta la infección por JUNV, pero su interacción no ha sido completamente caracterizada, ni se ha definido un rol de dicha lectina en la infección por este virus.

JUNV presenta en su envoltura proteínas glisosiladas y, por otro lado, las primeras células en encontrarse durante las etapas tempranas de la infección podrían ser células del sistema inmune que expresan DC-SIGN. Es por esto, que resulta de interés evaluar la posible asociación de JUNV con DC-SIGN y poder describir las características de dicha interacción pudiendo designar un rol a la misma en la infección por JUNV.

1.1 Variación de la susceptibilidad de infección en presencia de DC-SIGN

Martínez y col. (2013) demostraron que la expresión de las lectinas humanas DC-SIGN y L-SIGN aumentan la infección por JUNV en las células permisivas Vero, y que incrementan la susceptibilidad a la infección por JUNV de la línea murina 3T3, cuando las mismas están presentes. A su vez, se observó un aumento de la producción viral y de la expresión de la nucleoproteína viral (NP) en aquellas células que expresan la lectina. A su vez, se realizaron ensayos con construcciones de pseudotipos del complejo glicoproteico de JUNV GPC, observando mayores niveles de transducción en aquellas células que expresan DC-SIGN. Este aumento observado se impide cuando se infecta en presencia de Mannan, un manano comercial que es reconocido por DC-SIGN debido a su composición de manosas, o de anticuerpos específicos contra DC o L-SIGN.

Si bien estos resultados evidencian la interacción de JUNV con DC-SIGN y se observa un aumento de la infección relacionada con esa interacción, las características de la unión entre el virión y la proteína y el rol que cumplen estas lectinas en el aumento de la infección aún no han sido determinadas.

Para cumplir con el primer objetivo propuesto en este trabajo y profundizar el entendimiento de este fenómeno, se utilizó como sistema de estudio la línea celular 3T3 y la misma establemente transfectada con la lectina humana DC-SIGN (3T3-DC-SIGN). Se ha comprobado en estudios *in vitro* que JUNV reconoce el receptor de transferrina humano, pero no así el murino y que existe una infección basal en líneas de ese origen, pero hasta el momento se desconoce el receptor involucrado. Es por este motivo el interés para estudiar en ambas líneas la existencia de una infección diferencial por la presencia de la lectina humana.

Para corroborar la expresión diferencial de DC-SIGN en ambas líneas, se crecieron cultivos de las células 3T3 y 3T3-DC-SIGN durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, los cultivos se fijaron para analizar la expresión de la lectina humana en membrana por IFI. En la figura 17 (a y b) se observa que la línea murina establemente transfectada expresa correctamente la lectina humana y no sí la línea salvaje. Por otro lado, para agregar una mejor caracterización de la localización de la lectina en membrana, se crecieron cultivos de la línea que expresa DC-SIGN y a las 24 hs de siembra se incubaron por una hora a 4°C con un anticuerpo que reconoce específicamente DC-SIGN. Luego de dicho tiempo, se lavaron los cultivos, se fijaron con formaldehído al 4% a temperatura ambiente y se incubaron con un anticuerpo anti-conejo acoplado a Alexa-Fluor 555. Los preparados se analizaron por microscopía confocal, observando sobre la membrana un patrón de expresión de DC-SIGN (Fig 17c).

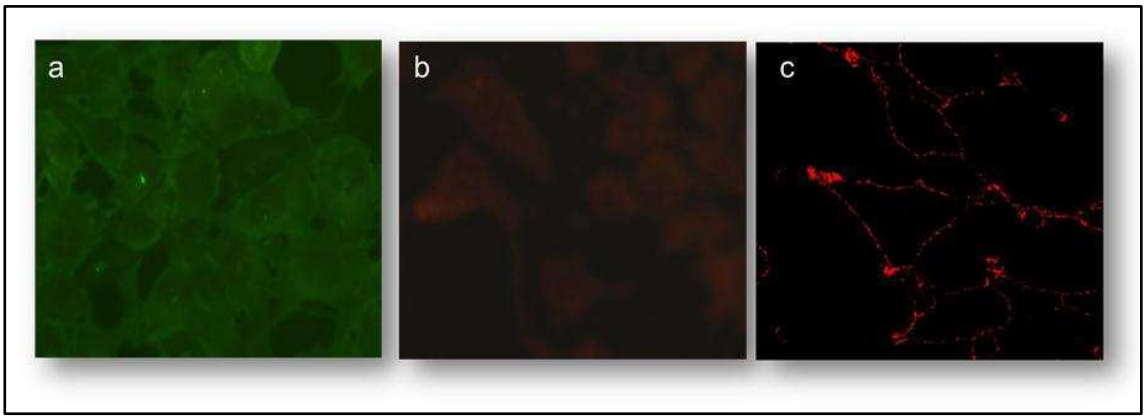

Figura 17: Expresión de membrana de DC-SIGN en las líneas 3T3 y 3T3-DC-SIGN. a y b) Cultivos de las células 3T3-DC-SIGN **(a)** y 3T3 **(b)** se fijaron a las 24 hs de sembrados y se procesaron por IFI para evaluar la expresión de DC-SIGN. A su vez se realizó una tinción con azul de Evans para la detección de núcleos y fueron analizados por microscopía de fluorescencia. Aumento 400X **c)** Células 3T3-DC-SIGN se incubaron con el anticuerpo anti-DC-SIGN por 1 hora a 4ºC y luego se fijaron y se procesaron por IFI para evaluar la expresión de DC-SIGN en la membrana por microscopía confocal. Aumento 600x + zoom 2,5X.

Para continuar con la caracterización de la infección de JUNV en el sistema propuesto, se infectaron los cultivos de ambas líneas con JUNV (m.i.:0,1). A partir de la hora post infección (p.i.), se retiró el inóculo y se continuó la incubación con MM por 24 hs. Transcurrido dicho lapso de tiempo, se cosecharon los sobrenadantes para ensayos de producción viral y los cultivos se fijaron y permeabilizaron para evaluar la expresión de la proteína NP por IFI.

Los análisis de la producción viral en ambas líneas a las 24 horas p.i muestran un aumento de dos órdenes de magnitud en aquellas células que expresan la lectina humana DC-SIGN, y que esta diferencia es estadísticamente significativa con un $p < 0,05$ (Fig 18a).

A partir de los mismos cultivos, se analizó el efecto de la expresión de la proteína NP en las líneas murinas transfectadas y sin transfectar. Los mismos fueron fijados con formaldehído, permeabilizados con Tx-100 e incubados con el monoclonal que reconoce la nucleoproteína de JUNV. Se observa un 85% de aumento en la expresión de NP en la línea 3T3-DC-SIGN comparada a la línea 3T3 (Fig 18b).

El patrón de aumento observado en la expresión de la proteína NP así como en los ensayos de producción viral, concuerda con los resultados presentados anteriormente por Martínez y col. (2013).

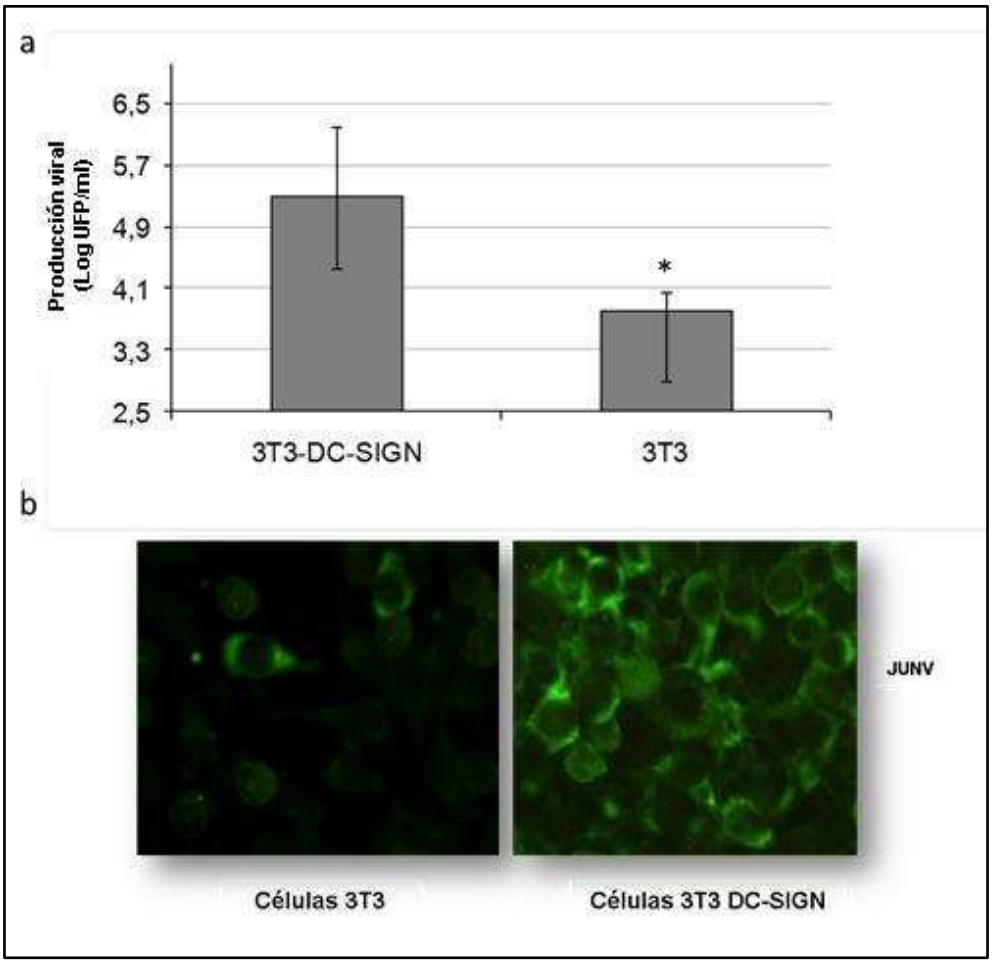

Figura 18: Producción de JUNV y expresión de la nucleoproteína a las 24 hs p.i. en las líneas 3T3 y 3T3-DC-SIGN. Cultivos de ambas líneas murinas fueron crecidos e infectados con JUNV (m.i.:0,1). **a)** A las 24 hs p.i. se tomaron los sobrenadantes para titularlos por el método de UFP. El asterisco indica diferencia significativa ($p < 0,05$). **b)** Los cultivos se fijaron y procesaron para la detección de la nucleoproteína por IFI que corresponde al 85% de aumento en 3T3-DC-SIGN. Aumento: 400X.

1.2 Especificidad de DC-SIGN para el aumento de la infección por JUNV

Para confirmar que el aumento de la infección observado en la línea que expresa la lectina humana es específico de la presencia de DC-SIGN, se repitieron los ensayos de producción viral a través de la técnica de unidades formadoras de placas (UFP) y expresión de nucleoproteína por IFI en presencia de Mannan. Los cultivos de ambas líneas se trataron por 2 hs con Mannan, y luego se realizó la infección en presencia del mismo. Al retirar el inóculo, se lavaron y cubrieron los cultivos con MM por 24 hs. Finalmente, los sobrenadantes fueron cosechados, las células se fijaron y permeabilizaron para los ensayos nombrados anteriormente (Fig 19).

En la figura se puede observar que en presencia del manano hay una inhibición de la infección de más del 90% respecto al control sin tratar. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores de nuestro laboratorio indicando que Mannan, junto al anticuerpo específico anti- DC-SIGN, evitan el aumento observado de la infección por JUNV en este sistema. Por el contrario, los tratamientos de células que no expresan la lectina no mostraron diferencias significativas con o sin el manano. Este bloqueo de la interacción del virus con la lectina por la unión con Mannan hace referencia a la especificidad del aumento observado en las células que expresan DC-SIGN, y que esta unión sería a través de residuos de manosas de la glicoproteína viral.

La interacción de la lectina y sus ligandos se realiza a través del sitio extracelular DRC, y esta interacción es dependiente de calcio. Para profundizar en el entendimiento de la interacción de JUNV con DC-SIGN y si dichos iones son esenciales en esta unión, se utilizó el compuesto EGTA, un quelante específico de calcio y se estudió si la ausencia de calcio en el cultivo afecta la infección por JUNV en ambas líneas. Para ello, se realizaron ensayos de viabilidad celular a través de la técnica MTS como se explica en Materiales y Métodos para determinar la concentración máxima del compuesto a poder utilizar. Una vez determinada la misma, se trataron los cultivos por 30 minutos con el compuesto, y luego se infectaron con JUNV en presencia del mismo. A las 24 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes para su titulación. Los cultivos se fijaron y permeabilizaron para IFI para analizar la variación de la expresión de NP.

Los resultados mostrados en la figura 19 indican que en presencia del quelante de calcio EGTA, la producción viral y la expresión de la nucleoproteína de JUNV en la línea 3T3-DC-SIGN es significativamente menor, disminuyendo un 80% aproximadamente en comparación al control sin tratar. Por otro lado, en la línea 3T3 no se observó diferencia significativa con respecto al control sin tratar. Estos resultados comprueban que la unión de JUNV con la lectina es dependiente de calcio.

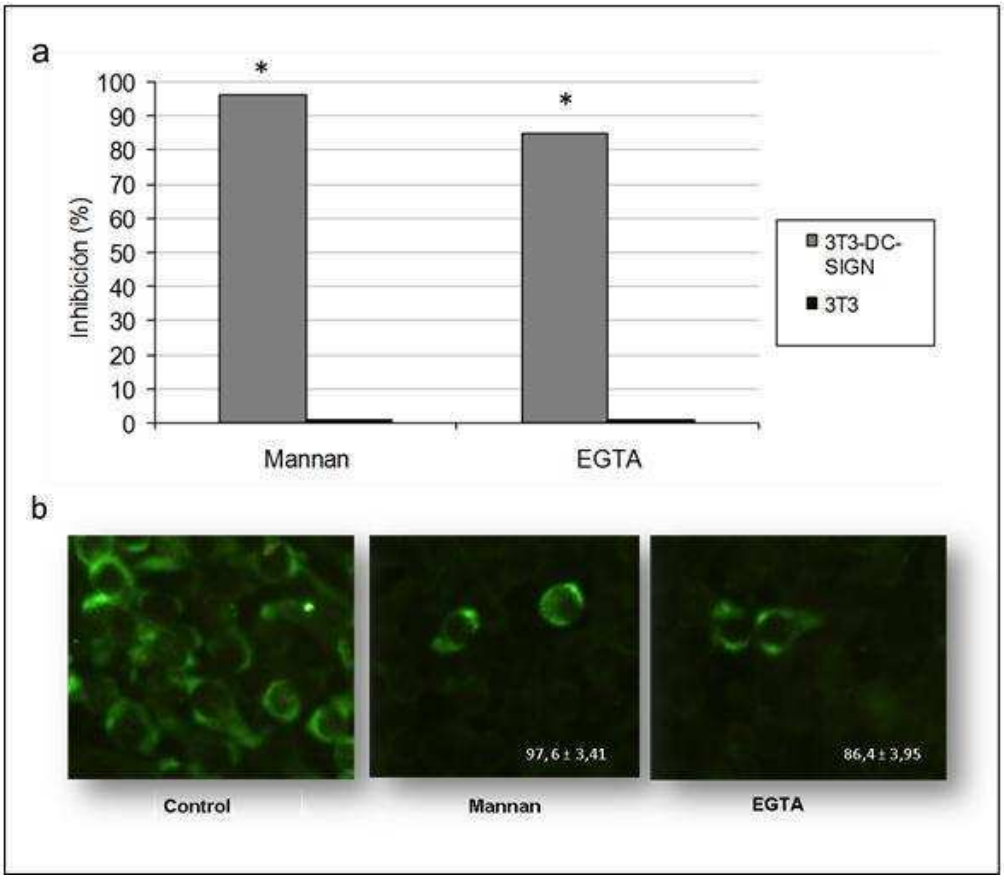

Figura 19: Efecto de compuestos que bloquean o modifican el sitio de unión de ligando de DC-SIGN en la infección de JUNV en las células 3T3 y 3T3-DC-SIGN. Cultivos de ambas líneas fueron tratados con Mannan por 2 hs y con EGTA por media hora y luego infectados con JUNV (m.i.:0,1) en presencia de los compuestos. **a)** Los sobrenadantes de 24 hs p.i. fueron titulados por el método de UFP. Los asteriscos indican diferencias significativas entre ambas líneas ($p<0,01$). **b)** Los cultivos de células 3T3-DC-SIGN se fijaron y se realizó una IFI para detectar la expresión de NP a las 24 hs p.i. Se indica el porcentaje de inhibición ± desvío estándar. Ambas diferencias resultaron significativas $p< 0,05$. Aumento: 400X.

1.3 Características relevantes de la glicoproteína viral para la interacción con DC-SIGN

Hasta el momento, no se conocen estudios que expliquen en detalle el patrón de glicosilación de GP1 de JUNV. Castilla y col. (1992) demostraron que JUNV presenta residuos ricos en manosas en esta glicoproteína. Para profundizar la caracterización del tipo de azúcar presente en la glicoproteína viral que es reconocido por la lectina, se probó cómo influye en la infección, en ambas líneas en estudio, la variación de los residuos de azúcares presentes en la glicoproteína GP1 de JUNV.

Existen distintos inhibidores de enzimas responsables de la glicosilación de proteínas de secreción en la vía de Golgi y retículo endoplasmático. En particular, el compuesto 1-deoxy-mannojirimicina (DMN) es un inhibidor de la manosidasa de Golgi. Esta enzima es la encargada de quitar residuos ricos en manosas durante el procesamiento de las glicoproteínas. Silver y col. (1993) no encontraron diferencias en la infección *in vitro* de células Vero tratados con dicho compuesto, indicando que la unión al receptor en dicha línea no es dependiente de manosas.

En este caso se utilizó este inhibidor para producir *stocks* de JUNV en cultivos con la función enzimática de demanosilación disminuida, para determinar si el incremento en manosas así generado afecta la unión a DC-SIGN.

Se produjeron *stocks* virales en células Vero tratados con DMN. Para ello, en primer lugar se determinó la viabilidad celular a las 48 hs de tratamiento con la concentración 1 mM de DMN por la técnica de exclusión de Trypan Blue, no observando variaciones en la misma. Esta concentración de compuesto también fue utilizada por Silver y col. (2013) en la misma línea celular sin reportar toxicidad para los cultivos. Como control en paralelo se realizó un stock viral en las mismas condiciones pero sin tratar con el compuesto. Los sobrenadantes de los tratamientos y el control de 48 hs de infección se utilizaron para infectar células 3T3-DC-SIGN y por otro lado 3T3 y Vero como control. Los cultivos se trataron con los sobrenadantes por una hora a 4ºC y luego a 37ºC por una hora más. Finalmente se retiró el inóculo y los cultivos se incubaron 24 hs con MM. Transcurrido

dicho tiempo, se cosecharon los sobrenadantes para su titulación por la técnica de UFP y los cultivos se fijaron y permeabilizaron para la detección de la nucleoproteína por IFI.

Los resultados de la figura 20 indican que a nivel de la producción viral, no existen diferencias significativas en las líneas Vero y 3T3 que fueron tratadas con los *stocks* virales control y tratados con DMN. Sin embargo, se observa una diferencia significativa en la línea que expresa DC-SIGN. En la misma se observa que los tratamientos con el *stock* demanosilado permiten aumentar la producción viral en más del 50% respecto al control. Asimismo, en la figura 21 se puede evidenciar la misma relación en la expresión de NP ya sea en la línea productora Vero, como en las líneas tratadas con los sobrenadantes control o DMN.

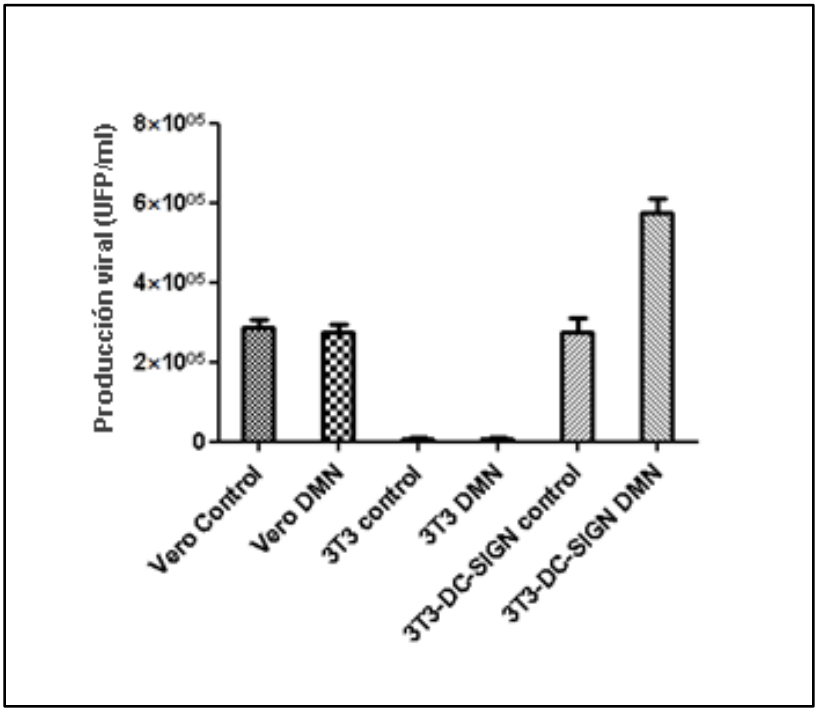

Figura 20: Efecto de la alteración del patrón de glicosilación de GP1 en la interacción entre JUNV y DC-SIGN. Cultivos de células Vero fueron infectados con JUNV (m.i.:1) y luego de la hora p.i. tratados con DMN o MM. A las 48 hs p.i. los sobrenadantes se colectaron y se utilizaron para infectar células 3T3-DC-SIGN o células 3T3 y Vero como control. Ensayos de producción viral a 24 hs p.i. para las tres líneas. Los errores se expresaron como el desvío estándar de la media.

Estos resultados confirman la dependencia de los residuos manosilados de la glicoproteína viral para la interacción con la lectina humana DC-SIGN.

Al igual que JUNV, se ha demostrado que HIV, DENV y otros virus envueltos interaccionan con DC-SIGN. Esta unión ha sido exhaustivamente estudiada con particular interés en entender los mecanismos tempranos de la infección por DENV (Lei y col., 2015) y HIV (Emau y col., 2007; Hoorelbeke y col., 2013), con el propósito de poder producir antivirales efectivos.

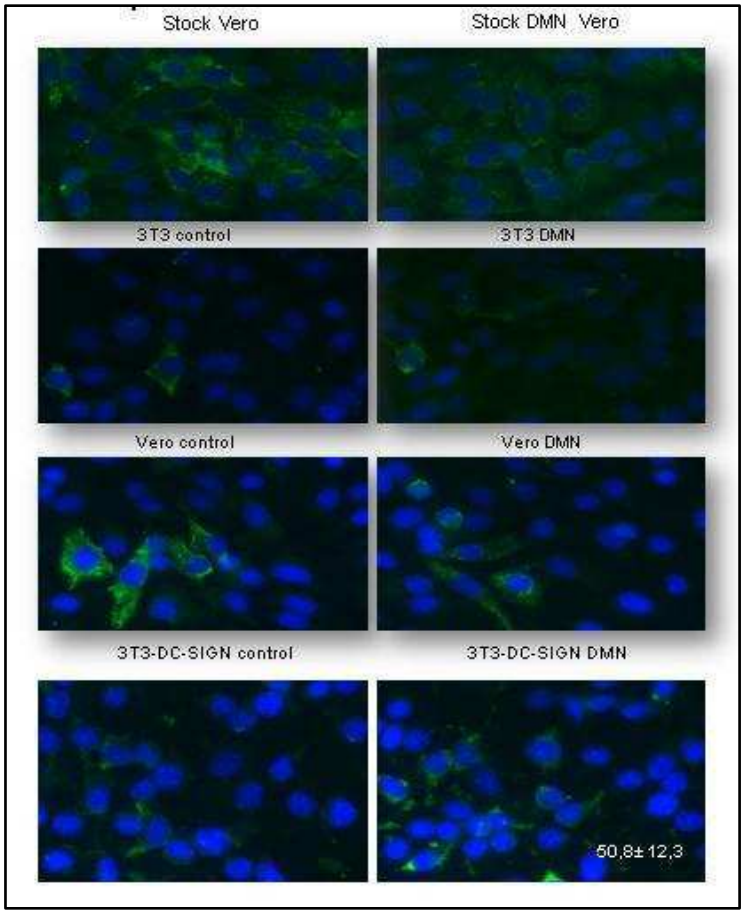

Figura 21: Estudio de la expresión de la nucleoproteína viral de JUNV por IFI en la línea de generación del stock DMN y en las tratadas con los sobrenadantes. Los cultivos productores de *stock*, junto con los tratados con los sobrenadantes fueron fijados 48 o 24 hs p.i. según corresponda y se procesaron para IFI para la detección de la expresión de NP. En los casos correspondientes, se indica el porcentaje de aumento con respecto al control ± desvío estándar, en el caso que se presente el mismo. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Aumento: 400X

Se ha descrito que la lectina soluble Griffithsin (GFRT) reconoce la GPC de HIV generando un efecto bloqueante para la interacción de receptores en un amplio rango de concentraciones (Emau y col., 2007). Con el objetivo de determinar el comportamiento de la GP1 de JUNV en presencia de este compuesto se estudió el efecto de esta lectina sobre la multiplicación de JUNV. Para ello, se determinó el porcentaje de viabilidad celular para todas las concentraciones, entre el rango de 0,1 y 100 nM por la técnica de MTS. No se encontró reducción significativa en la viabilidad de los cultivos 3T3 y 3T3-DC-SIGN en ninguna de las mismas.

Para probar la unión de GFRT con JUNV se realizaron ensayos de adsorción con el compuesto en las concentraciones 0.1, 1, 10 y 100 nM. Para ello 2 x 10^5 UFP de JUNV se incubaron con igual volumen del compuesto para obtener las concentraciones finales mencionadas. Se incubaron a 37ºC durante 90 minutos y luego se utilizaron para infectar cultivos de las células 3T3 y 3T3-DC-SIGN. A las 24 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes para ensayos de producción viral (Fig 22) y los cultivos se fijaron y permeabilizaron para el análisis por IFI (Fig 23 y 24).

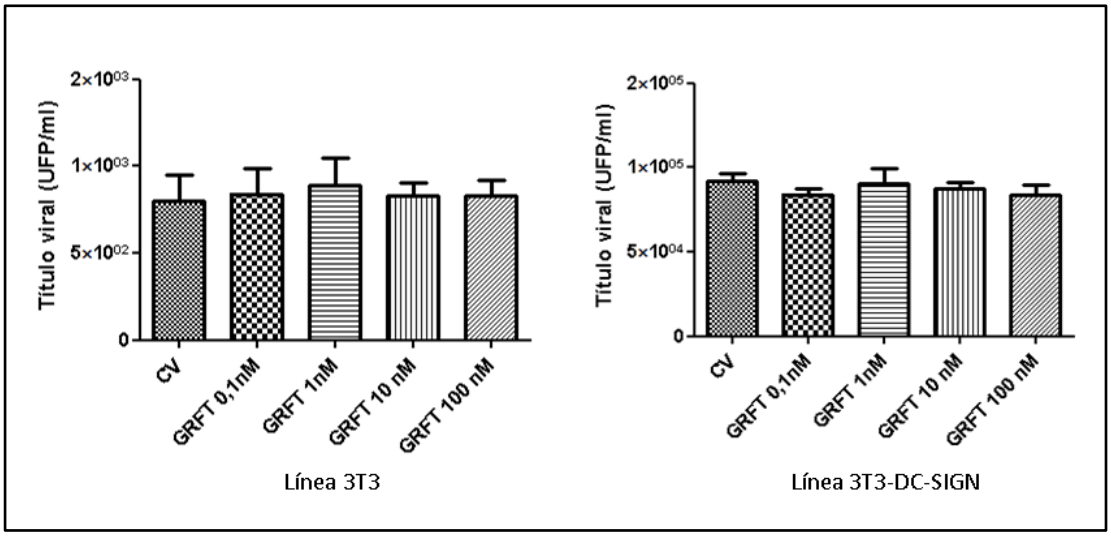

Figura 22: Unión de JUNV a la lectina soluble GFRT e infección en células 3T3 y 3T3-DC-SIGN. Cultivos de ambas líneas fueron infectadas con JUNV pre incubado por 90 minutos con MM o distintas concentraciones de GRFT. Luego de 24 hs p.i. los sobrenadantes se cosecharon para evaluar la producción viral.

En la figura 22 se observa que los tratamientos con GRFT no afectan la unión del virus a las células y su posterior multiplicación. Los resultados de las figuras 23 y 24, tampoco mostraron inhibición significativa en la expresión de NP con las distintas concentraciones de GRFT utilizadas. Estos resultados, que difieren con los encontrados para HIV hacen referencia a la especificidad de unión entre las lectinas a distintos patrones de glicosilación de las proteínas virales.

Los ensayos realizados anteriormente y diseñados a partir de las características de la estructura molecular de la lectina y de sus ligandos, tienen como objetivo bloquear o alterar el sitio extracelular de reconocimiento de ligandos DRC de DC-SIGN. En ellos se observa que únicamente en los cultivos celulares que expresan esta lectina se ve aumentada la replicación de JUNV y la expresión de proteínas tempranas como NP, y que dichas perturbaciones evitan el aumento de la infección, específico de la interacción con DC-SIGN.

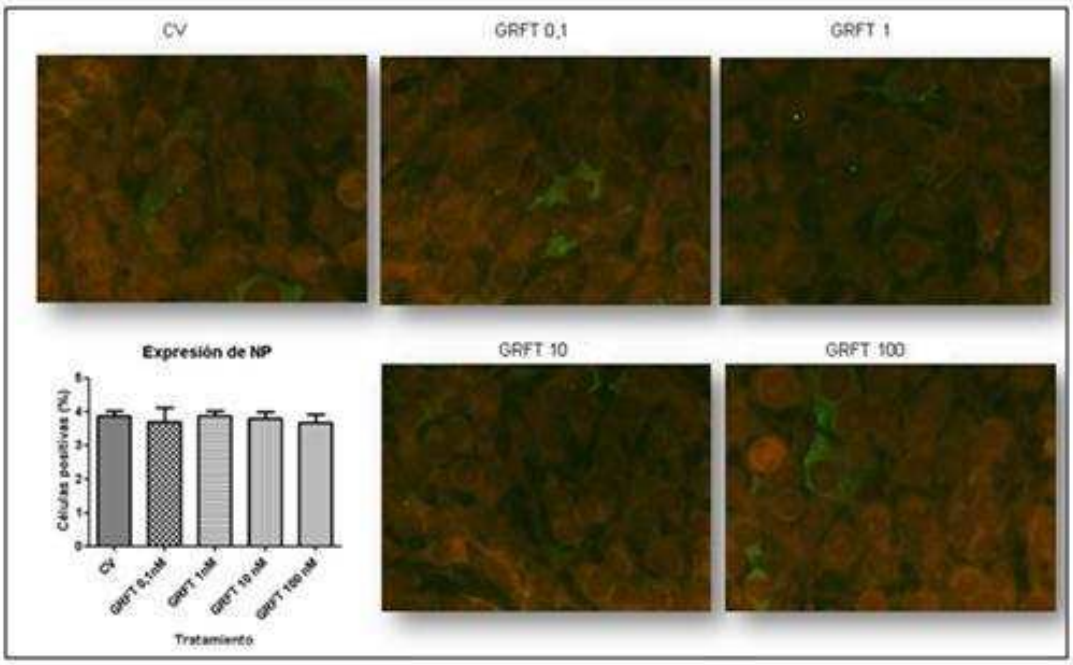

Figura 23: Efecto de GFRT sobre la expresión de la nucleoproteína de JUNV. Cultivos de células 3T3 se infectaron con JUNV previamente incubado por 90 min con MM o GRFT (nM). A las 24 hs p.i.

se procesaron las células para ensayos de IFI para la detección de NP. En el gráfico se indica el porcentaje de células infectadas. Aumento 400x.

A partir de los resultados presentados hasta el momento, también podemos observar que si bien la línea murina 3T3 es poco permisiva, ya que no expresa el receptor de transferrina que es utilizado por JUNV, existe una infección basal a la cual aún no se le ha atribuido un receptor conocido (Cuevas y col., 2011). De todos modos, podemos interpretar que aquella infección observada no sería dependiente de calcio, y que la unión no dependería de la interacción con residuos de manosas de la glicoproteína de JUNV.

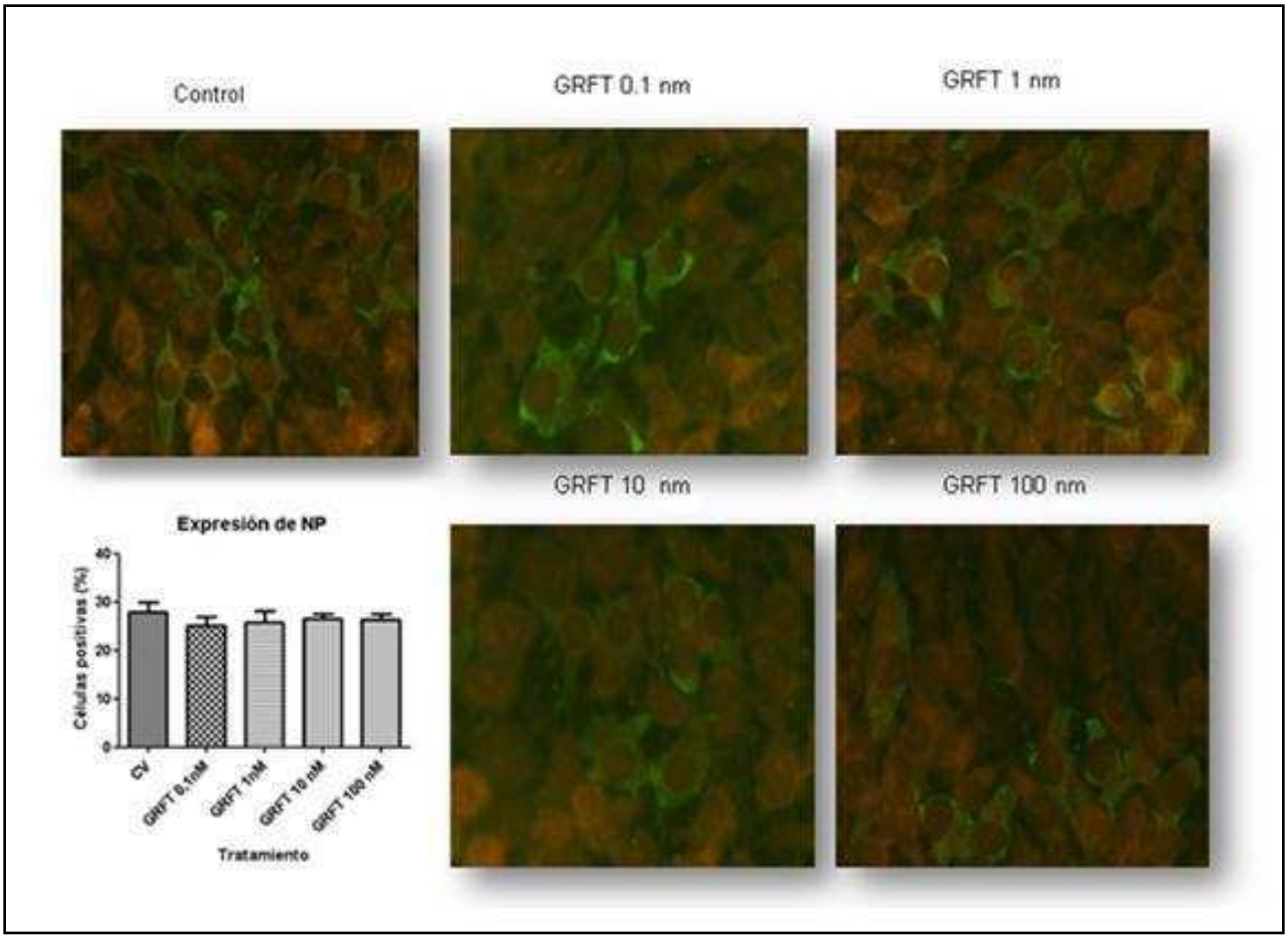

Figura 24: Efecto de GRFT sobre la expresión de NP en células que expresan DC-SIGN. Cultivos de células 3T3-DC-SIGN se infectaron con JUNV previamente incubado con MM o GRFT en distintas concentraciones. Se indica el porcentaje de células infectadas. Aumento 400X.

1.4 Interacción directa de JUNV y GP1-FC con DC-SIGN

Utilizando pseudotipos virales que contienen la construcción de la glicoproteína viral se puede inferir, como es de esperar por las características de unión a los receptores de los virus envueltos, que la glicoproteína GP1 es la responsable de la unión con la lectina (Martínez y col., 2013). Para continuar con el análisis específico de la glicoproteína, utilizamos además como herramienta un plásmido GP1-FC que codifica la glicoproteína GP1 de JUNV y está acoplado a la región Fc. Esta construcción permite que la glicoproteína viral sea secretada al sobrenadante y que pueda interactuar con receptores en la misma célula u otras del cultivo. Resulta de interés estudiar en particular el comportamiento de la misma en cultivos que expresan DC-SIGN.

Si bien los resultados publicados hasta el momento y los presentados en este trabajo demuestran que la presencia de DC-SIGN provoca un aumento específico en la infección de JUNV, es necesario comprobar de manera directa la interacción virus-lectina. Para ello se analizaron dos técnicas que permiten inferir la co-localización. En primera instancia se realizaron ensayos de adsorción a 4°C y se analizaron por microscopía confocal distintas líneas celulares que expresan la lectina humana y una construcción de la glicoproteína GP1 de JUNV acoplada a la región Fc de una IgG o el virus nativo.

Se estudió la posibilidad de interacción de la glicoproteína con la lectina DC-SIGN en la línea celular TRVb, que es una línea derivada de la línea CHO (Mc Graw y col., 1987). El interés de la misma se debe por un lado, a la falta de expresión del receptor de transferrina endógeno, y por el otro, la posibilidad técnica de obtener imágenes de microscopía confocal adecuadas debido a la naturaleza de los anticuerpos existentes para la detección de los componentes virales.

Cultivos de la línea mencionada se transfectaron con las construcciones plasmídicas que codifican tanto para DC-SIGN como para la construcción de la glicoproteína viral, que al estar acoplada a la región Fc de un anticuerpo IgG le permite ser secretada al sobrenadante. Se realizaron ensayos para corroborar la expresión de cada proteína en este sistema celular por la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida e inmunoblot como se describe en Materiales y Métodos. En la figura 25a, los resultados del WB demuestran que no hay

expresión endógena de la lectina en este sistema de células y sí se observan niveles apreciables de la misma a las 24 hs de transfección. El inmunoblot fue revelado con anticuerpo específico anti-DC-SIGN y Gapdh como control de carga.

Por otro lado, se observó en el microscopio de fluorescencia la expresión de la lectina en los cultivos transfectados por 24 hs. En la figura 25b se puede observar que la lectina se expresa de manera homogénea en la membrana.

Para analizar la interacción entre ambas proteínas, se transfectaron los cultivos con ambas construcciones plasmídicas por 24 hs y luego se realizó una marcación con los anticuerpos primarios previamente a la fijación como se describe en Materiales y Métodos. Estas células fueron procesadas para IFI de GP1 y DC-SIGN y se observaron al microscopio confocal (Figura 25c). En las imágenes se observa la presencia tanto de la glicoproteína GP1 como de la lectina en la membrana, con un patrón puntillado para cada una. En las regiones indicadas con las flechas se observan puntos amarillos que corresponden a las zonas de co-localización entre la glicoproteína viral (verde) y DC-SIGN (rojo).

Por otro lado, se realizaron los mismos estudios en distintas líneas celulares, en esta oportunidad con JUNV. En este caso se utilizaron células humanas de sistema inmune con el objetivo de utilizar un sistema que se asemeje más a la realidad de la infección de JUNV en la FHA y además porque muchas veces los ensayos de transfecciones transitorias pueden desencadenar cascadas de transducción de señales que activan la vía del interferón y generalmente no son óptimos para las infecciones *in vitro* para algunos virus.

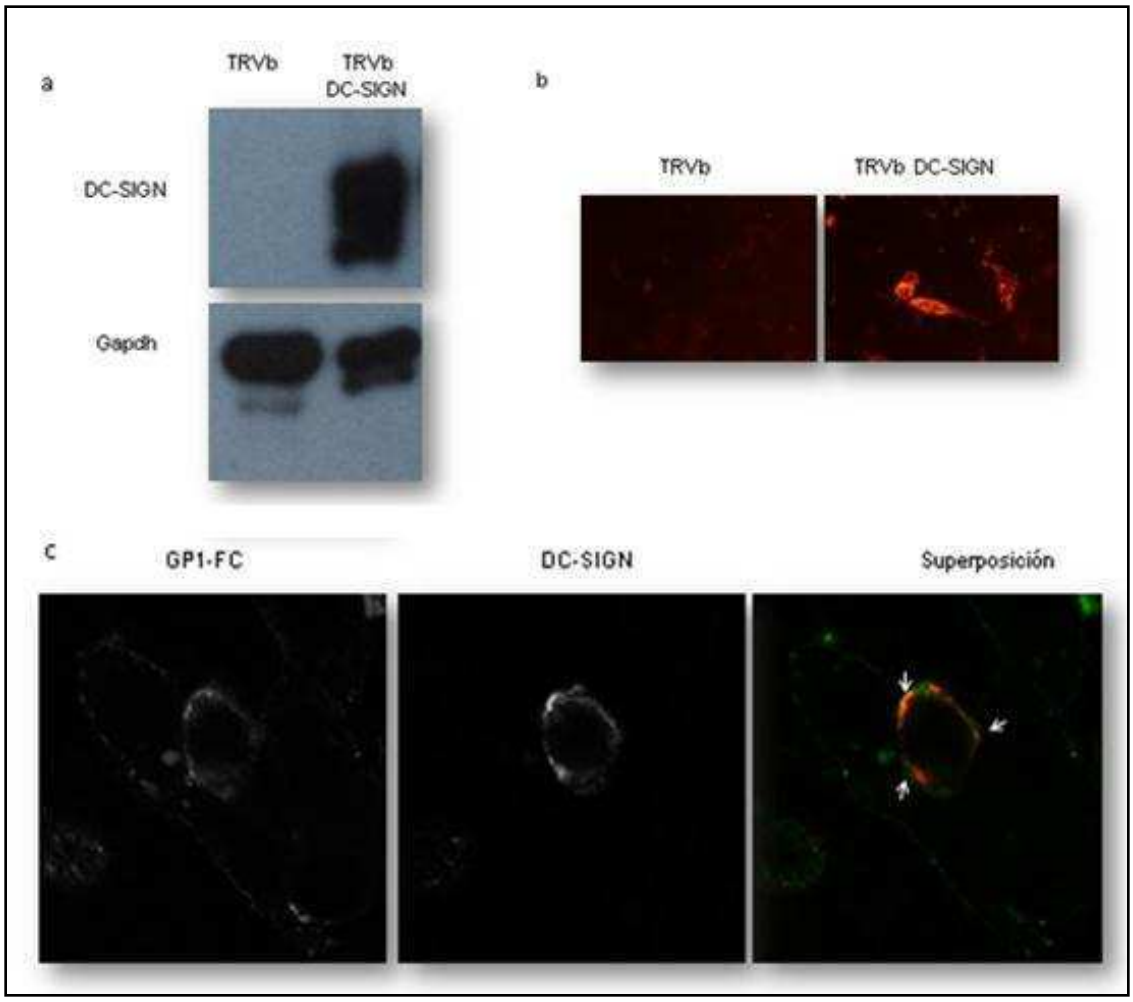

Figura 25: Estudio de la expresión de la glicoproteína viral y la interacción con DC-SIGN en células TRVb, que carecen del receptor de transferrina endógeno. **a)** Cultivos de células TRVb fueron transfectados por 24 hs con la lectina DC-SIGN, las células se cosecharon y procesaron para WB revelando la lectina y GAPDH como control de carga. **b)** Cultivos de células TRVb y TRVb transfectadas con DC-SIGN por 24 hs fueron fijadas y procesadas por IFI para evaluar la expresión de DC-SIGN en membrana. **c)** Células TRVb se transfectaron con las construcciones de DC-SIGN y GP1-FC por 24 hs y luego marcaron con la mezcla de anticuerpos primarios anti-lectina y anti-glicoproteína viral, y se fijaron para analizar la co-localización por microscopía confocal. Se indican con flechas los puntos correspondientes a la co-localización entre los mismos. Aumento 600x + zoom 5x.

Con este propósito se estudió la interacción de JUNV con DC-SIGN en la línea Raji-DC-SIGN y THP-1 diferenciada a macrófagos.

Considerando que las líneas utilizadas son humanas, se realizaron tratamientos de una hora con el anticuerpo anti-transferrina y posteriormente se infectó en presencia del mismo con el propósito de bloquear este receptor humano que sí es utilizado por JUNV. El protocolo de bloqueo es explicado detalladamente en Materiales y Métodos.

Un millón de células Raji-DC-SIGN fueron incubadas con 0,5 x 10^6 UFP de JUNV y mantenidas a 4°C durante una hora con agitación. Luego, se incubaron con una mezcla de anticuerpos anti-JUNV y anti-DC-SIGN por una hora más y fijaron para IFI de membrana. Los cultivos se analizaron por microscopía confocal, (Fig 26a) observando un patrón puntillado de expresión de DC-SIGN mas localizado en algunas regiones que en otras. En las zonas indicadas por flechas, se observan puntos que concuerdan con la co-localización entre JUNV y DC-SIGN.

El mismo protocolo se realizó en la línea THP-1 diferenciada a macrófagos. En este caso, las células en suspensión, al ser diferenciada a macrófagos con PMA, adquieren la capacidad de ser adherentes y expresan niveles detectables de DC-SIGN endógena. Al analizar las imágenes de microscopía confocal de estos cultivos (Fig 26b), se observa la expresión de DC-SIGN con el mismo patrón puntillado en membrana, pero que no está homogéneamente distribuido a lo largo de la membrana plasmática, existiendo zonas preferenciales de localización de la lectina. A su vez, se observa que existen zonas verdes correspondiente a la adsorción de JUNV y regiones de co-localización indicados por las flechas.

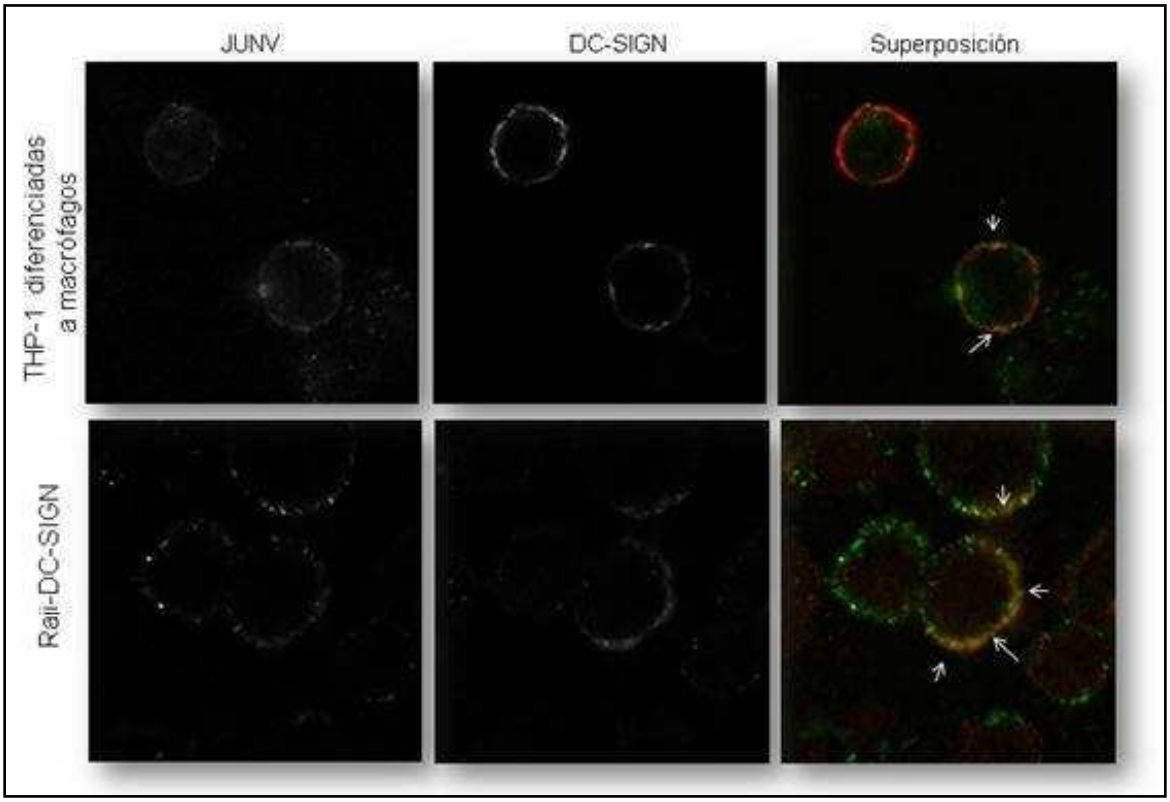

Figura 26: Interacción de JUNV con DC-SIGN en células humanas Raji establemente transfectadas con DC-SIGN y THP-1 diferenciadas a macrófagos. Cultivos de células Raji-DC-SIGN **(a)** y THP-1 diferenciadas a macrófagos **(b)** fueron incubadas por una hora con el anticuerpo anti-transferrina bloqueante, luego con JUNV (m.i.:5) en presencia de la solución de bloqueo durante 1 hora a 4°C y finalmente incubados 1 hora a 4ºC con una mezcla de anticuerpos primarios anti-DC-SIGN, anti-glicoproteína de JUNV y anticuerpo anti-transferrina. Los cultivos se procesaron por IFI y se analizaron por microscopía confocal. Las zonas de co-localización se indican con flechas. Aumento: 600x + zoom 5X.

Para continuar con la determinación de la interacción directa del virus con la lectina, se desarrolló la técnica de co-inmunoprecipitación. Esta técnica permite detectar la interacción molecular entre los mismos y es la evidencia más sólida al respecto. Cultivos de las líneas 3T3 y 3T3-DC-SIGN fueron transfectados con la construcción plasmídica que codifica para GP1 mencionada anteriormente. Luego de 24 hs pos-transfección, ambos cultivos fueron lavados y las células resuspendidas con buffer TBS-CHAPS suplementado con cloruro de calcio para mantener la interacción dependiente de iones de calcio. Luego de varios pasos de congelamiento y descongelamiento, como se explica en Materiales y

Métodos, las suspensiones celulares se incubaron con la proteína A-agarosa, que se une al Fc de la glicoproteína de interés. Finalmente, se corrieron las muestras desnaturalizadas en geles de poliacrilamida y se realizó un WB anti-DC-SIGN. Como controles se corrieron muestras de cada cultivo sin el proceso de inmunoprecipitación explicado, mencionadas en la figura 25 como "input". Además se realizó un inmunoblot anti Fc como control positivo.

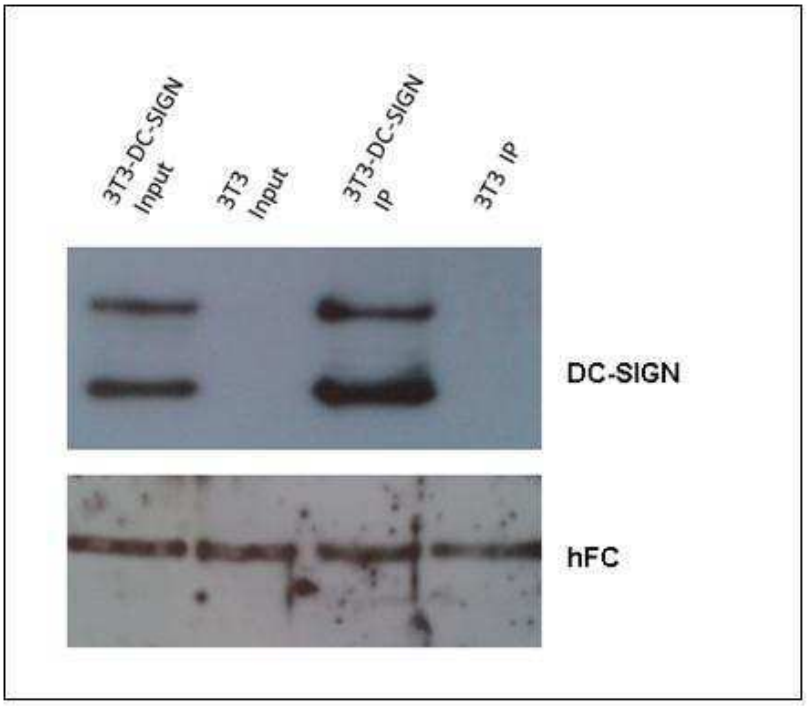

Figura 27: Co-inmunoprecipitación de GP1 con DC-SIGN. Cultivos de las líneas 3T3 y 3T3-DC-SIGN fueron transfectados por 24 hs con el plásmido de GP1-FC, luego las células fueron cosechadas con buffer TBS-CHAPS suplementado con cloruro de calcio. Las muestras de ambas líneas fueron procesadas para WB y reveladas con anti-DC-SIGN (3T3-DC-SIGN input y 3T3 input), muestras de ambas líneas transfectadas se inmunoprecipitaron con Proteína A-agarosa y se procesaron como las anteriores. (3T3-DC-SIGN IP y 3T3 IP). Se presentan los resultados de WB revelado anti-Fc como control.

En la figura 27, se puede observar en las dos primeras calles (de izq. a der.) el inmunoblot para los cultivos no inmunoprecipitados, denominados input 3T3 e input 3T3-DC-SIGN. Los mismos se prepararon cosechando las células de cada línea transfectada y procesados para WB de proteínas totales. Se observa una banda correspondiente a 50 kDa

compatible con DC-SIGN solamente en las células que la expresan. En las últimas dos calles, que corresponde a las muestras inmunoprecipitadas con la proteína A-agarosa de cada línea, se observa una banda de las mismas características en la línea 3T3-DC-SIGN y claramente está ausente en la línea 3T3. Considerando que la interacción de la proteína A es exclusivamente con el Fc, y al revelar contra DC-SIGN encontramos señal positiva en las líneas que lo expresan, estos resultados demuestran que efectivamente hay una interacción molecular entre el virus y esta lectina.

Como control de carga, se realizó para las mismas muestras un inmunoblot anti el Fc humano. En el mismo se observó en todas las calles la señal correspondiente, ya que todas las células fueron transfectadas y eran productoras de la glicoproteína viral.

1.5 ESTUDIO DE LA INTERNALIZACIÓN DE JUNV POR DC-SIGN

La capacidad de internalización y tránsito intracitoplasmático de los ligandos de DC-SIGN están regulados por los dominios citoplasmáticos de dileucina y dominio triacídico. Para evaluar la capacidad de DC-SIGN de endocitar las partículas de JUNV se estudiaron construcciones plasmídicas que presentan mutaciones puntuales en estos dominios, y se las comparó con la proteína salvaje.

Para ello cultivos de células 3T3 se transfectaron por 20 hs con las tres construcciones y luego se infectaron con JUNV (m.i.:5). Pasadas las 24 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes para los ensayos de producción viral y los cultivos se procesaron para IFI.

Para evaluar que las diferencias encontradas no se deban a una diferencia en la expresión de cada proteína en los cultivos, se transfectaron los cultivos por 20 hs y luego se fijaron para evaluar la expresión de DC-SIGN en membrana por IFI. Así mismo, cultivos transfectados por el mismo tiempo se procesaron para analizar las cantidades totales de DC-SIGN por WB.

En la figura 28a se puede observar que tanto los cultivos que expresan transitoriamente la lectina salvaje como aquellos que expresan las mutantes para el dominio LL y EEE, presentan niveles similares de la proteína total, en comparación con el control de carga de la proteína Gapdh. Así mismo, en la figura 28b también se puede observar una expresión de DC-SIGN de membrana homogénea.

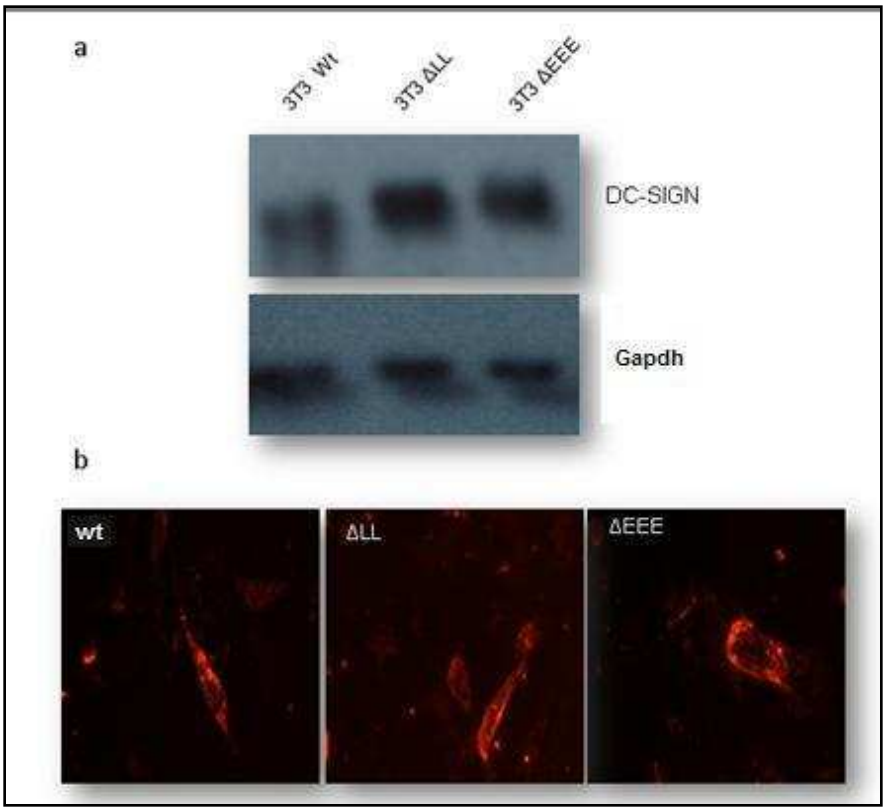

Figura 28: Expresión de DC-SIGN en las construcciones mutantes y salvaje. **a)** Cultivos de células 3T3 transfectados por 24 hs con las construcciones salvaje y mutante de DC-SIGN se procesaron por Inmunoblot para evaluar los niveles de expresión de la lectina. Se utilizó la proteína celular Gapdh como control de carga. **b)** Cultivos de células 3T3 transfectadas con dichas construcciones por 24 hs se fijaron y procesaron para IFI de membrana para determinar el patrón de expresión de la misma. Aumento: 400x.

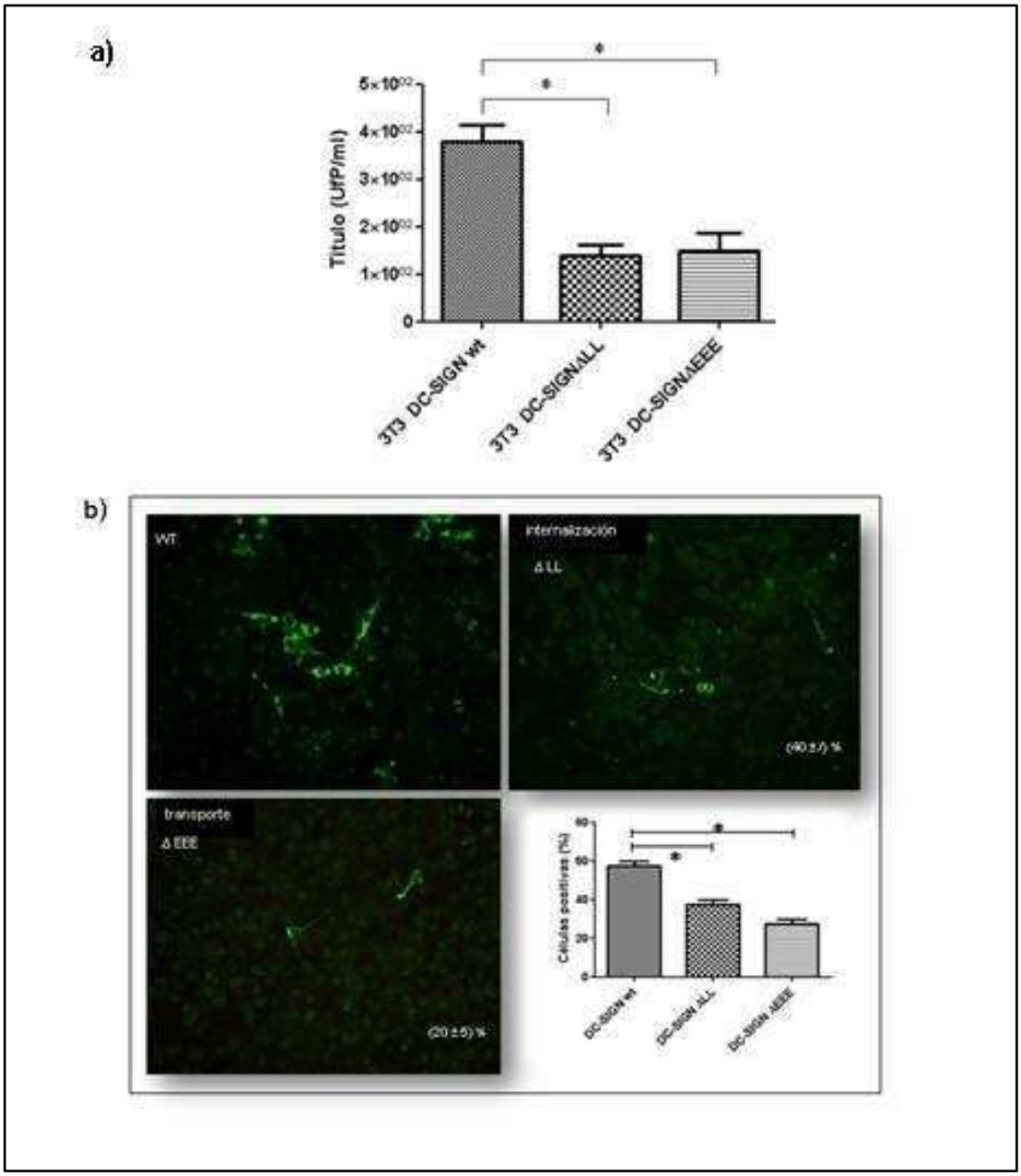

Figura 29: Rol de los dominios citoplasmáticos en la entrada de JUNV. **a)** Células transfectadas con las distintas construcciones de mutantes de DC-SIGN se infectaron con JUNV (m.i.:5) y a las 24 hs los sobrenadantes se cosecharon para ensayos de producción viral. * $p<0,05$. **b)** Los cultivos transfectados e infectados como en a se procesaron para evaluar la expresión de NP. Se expresa la media de células positivas para NP ± desvío estándar.

Una vez establecido el sistema y considerando que no existen diferencias en la expresión de cada construcción, se evaluó el efecto de la expresión de las mutantes de DC-

SIGN en la internalización de JUNV. Para ello, los cultivos de 24 hs de transfección se infectaron con JUNV (m.i.:5) y a las 24 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes para ensayos de producción viral y los cultivos se procesaron para IFI para evaluar la diferencia en la expresión de NP.

En la figura 29 se observa que en los resultados de producción viral existe una inhibición de aproximadamente el 50% del título viral en los cultivos que expresan las mutantes. Así mismo, la expresión de la NP también se reduce en la misma proporción, determinando que los dominios citoplasmáticos son esenciales para la entrada de JUNV y que este virus utiliza a DC-SIGN como receptor de entrada.

2. Estudio de la entrada de JUNV a través de DC-SIGN

Para cumplir con el segundo objetivo, y considerando que la lectina humana DC-SIGN tiene función de receptor para el virus Junín, se evaluó el mecanismo endocítico involucrado en la entrada de JUNV a través de DC-SIGN. Asimismo, se determinaron los componentes celulares involucrados en las etapas tempranas de la infección en el sistema de estudio de células 3T3-DCSIGN que expresan establemente esta lectina.

Por otro lado, y considerando que existe un nivel basal de infección no relacionado a esta lectina, estudiamos en paralelo la entrada de JUNV en estas células murinas en ausencia del receptor DC-SIGN y se presentan al final del capítulo.

Para caracterizar esta vía se abordó el estudio utilizando inhibidores farmacológicos que se conocen alteran distintos mecanismos endocíticos, así como también inhibidores moleculares como construcciones dominantes negativas de componentes celulares relacionados en las vías de entrada de ligandos, que al sobre-expresarlas enmascaran el funcionamiento de la proteína endógena.

2.1 Análisis del efecto del pH en la entrada de JUNV por DC-SIGN.

Si bien el mecanismo más utilizado para las infecciones virales es la endocitosis con incorporación de los viriones a vesículas endocíticas donde luego luego su material genético será liberado, algunos virus pueden fusionar directamente a nivel de la membrana plasmática.

Trabajos previos indican que la replicación del JUNV en la línea celular Vero es dependiente de la acidificación endosomal y mediante ensayos de fusión se demostró que el pH 5 sería el óptimo para mediar el desnudamiento a nivel del endosoma (Castilla y col., 1994). En este caso evaluamos si este mecanismo también se mantiene en la línea murina 3T3-DC-SIGN, o la entrada a la célula es a través de un proceso de fusión a nivel de membrana plasmática independiente de pH ácido. Para ello se utilizaron dos compuestos que aumentan el pH citoplasmático: cloruro de amonio que es una base lisosomotrópica débil (Castilla y col., 1994) y Concanamicina A (ConcA) un inhibidor de la ATPasa vacuolar

(Wood y col., 1992). Para ambos compuestos se determinó la toxicidad celular por la técnica de MTS, determinando las concentraciones óptimas de ambas drogas para utilizarlos en la infección de las líneas celulares.

Para el compuesto cloruro de amonio, se probaron las concentraciones que abarcan desde los 10 a los 50 μM por 90 minutos, que es el tiempo en el cual la droga estaría presente en los cultivos para los ensayos de entrada. En los resultados de la figura 30a se puede observar que con respecto al control sin tratar, el metabolismo celular no se vio alterado en presencia del cloruro de amonio. Se eligieron las concentraciones 10 y 20 μM para los ensayos de inhibición de la multiplicación de JUNV, ya que las mismas resultaron ser las máximas no citotóxicas.

Para determinar que efectivamente, en el rango de concentraciones elegidas, el compuesto estuviera ejerciendo su efecto basificador del pH endosomal, se estudió la variación de pH citoplasmático utilizando el compuesto Naranja de acridina el cual, en presencia de pH básico, vira del color naranja al verde (Palmgren y col., 1991). Para ello, se trataron los cultivos 3T3-DC-SIGN con el compuesto por 30 minutos y luego se incubaron con Naranja de acridina 1ug/ml por 15 minutos a 37ºC. En la figura 28b se observa en los cultivos control los compartimentos ácidos teñidos de color naranja intenso por la acumulación de Naranja de acridina, mientras que los cultivos tratados con cloruro de amonio muestran una menor presencia de compartimentos ácidos. El efecto detallado de este compuesto se observó en los tratamientos con ambas concentraciones resultando ser dosis dependiente, aunque solo se presentan los resultados de la concentración máxima utilizada.

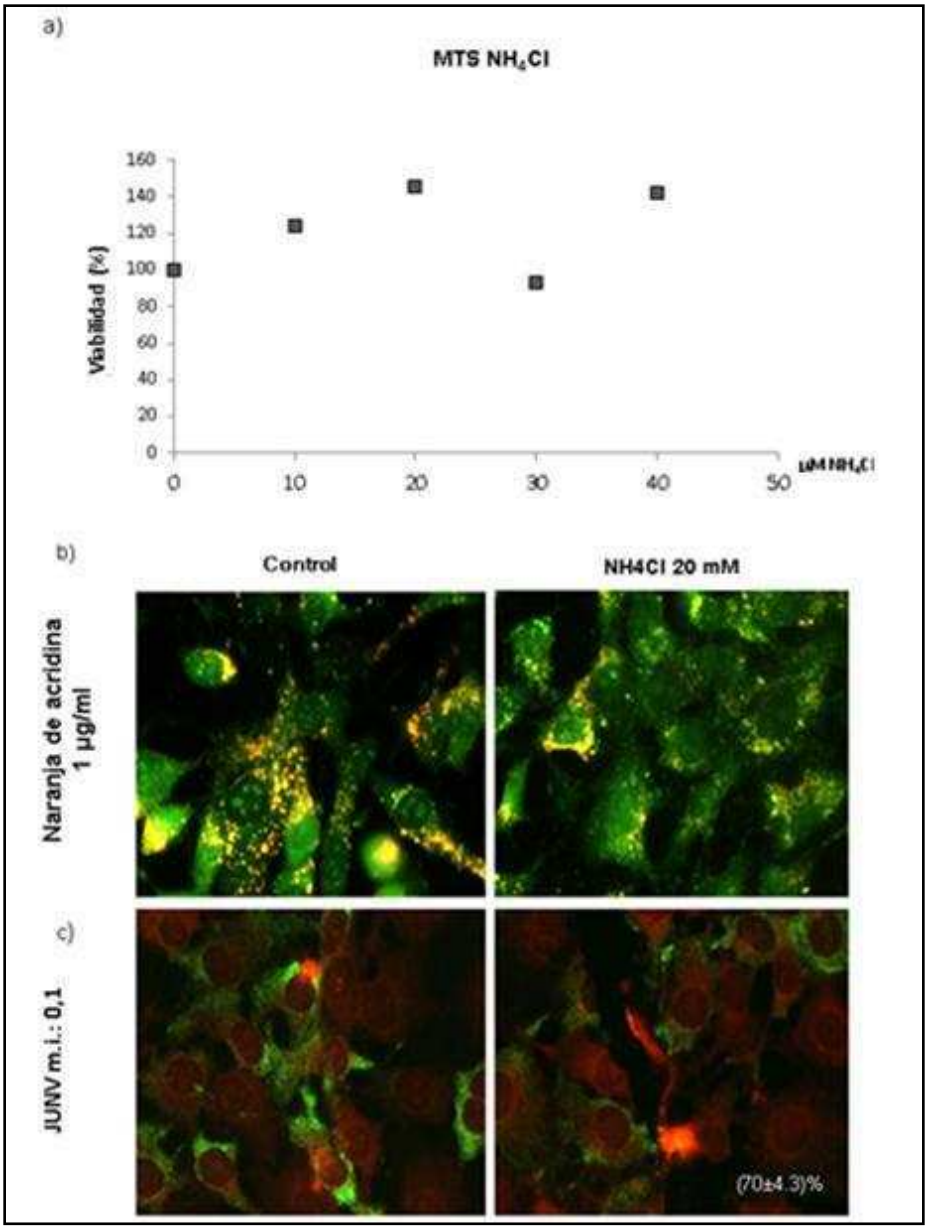

Figura 30: Efecto del cloruro de amonio en la viabilidad celular y en la expresión de NP. a) Cultivos celulares fueron incubados con distintas concentraciones del compuesto y se determinó la viabilidad por la técnica de MTS. **b)** Los cultivos se pretrataron con el compuesto o MM y se incubaron con Naranja de acridina 1ug/ml. **c)** Los cultivos se trataron con el compuesto y se infectó con JUNV (m.i: 0,1). A las 24 hs p.i. se fijaron las células y se procesaron por IFI para detectar la expresión de NP: Se indica la media del porcentaje de inhibición ± desvío estándar. Aumento: 400x.

A partir de estos resultados, se evaluó el efecto de esta base débil sobre los pasos iniciales de la infección por medio de un ensayo de inhibición de la producción viral. Para

ello, los cultivos fueron tratados por 30 minutos con ambas diluciones del compuesto y se dejaron absorbiendo con JUNV (m.i.:0,1) en presencia del compuesto o MM según corresponda por una hora a 4°C. Luego se incubaron a 37°C para permitir su internalización. A su vez, células infectadas con JUNV e incubadas por 20 minutos a 37°C fueron tratadas a partir de ese tiempo con cloruro de amonio por 90 minutos. Los sobrenadantes de 24 horas posteriores a la infección se cosecharon para ensayos de producción viral por la técnica de unidades formadoras de placa (UFP) en células Vero.

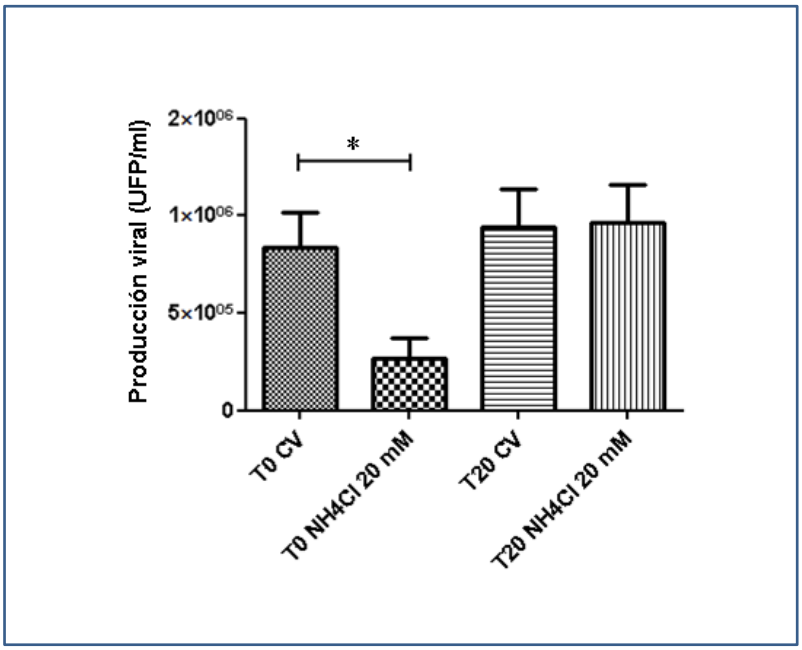

Figura 31: Efecto del cloruro de amonio en la producción viral. Cultivos de células 3T3-DC-SIGN se trataron con cloruro de amonio antes y durante la infección, o a los 20 minutos posteriores a la infección con JUNV (m.i.:0,1). Los sobrenadantes de 24 hs p.i. se titularon por la técnica de UFP/ml. * $p < 0,05$.

Por otra parte, se verificó la acción inhibitoria de esta droga sobre los momentos iniciales del ciclo de replicación por medio de un ensayo de IFI para detectar la proteína NP en cultivos infectados y fijados a las 24 hs p.i. (Fig 30c).

Los resultados de titulación de sobrenadantes de los tratamientos con cloruro de amonio agregados antes o después de la infección demuestran que, al aumentar el pH antes

y durante los primeros 10 minutos del proceso de entrada de JUNV, la producción viral se ve disminuida en un 70,6% con respecto al control sin tratar. Estas diferencias fueron significativas en los tratamientos previos a la infección y en presencia del mismo, y esta inhibición no se observa cuando el compuesto es agregado después de los veinte minutos de infección de JUNV (Fig 31). Estos resultados se relacionan con el tiempo en que JUNV realiza el proceso de fusión de membranas a nivel de endosomas, liberando el material genético. Para el caso de la expresión de NP, se observó un 70% de inhibición con respecto al control no tratado. Las diferencias son estadísticamente significativas con $p<0,05$.

Por otro lado, se estudió el efecto de la Concanamicina A, un compuesto con un efecto más específico que el anterior. Éste es un macrólido inhibidor selectivo de la bomba H^+-ATPasa vacuolar, que provoca la basificación de los compartimentos ácidos (Muroi y col., 1993). Del mismo modo que con el cloruro de amonio, se realizaron los ensayos de viabilidad celular por MTS correspondientes en concentraciones que abarcan el rango de 1 y 10μM (Fig 32a). Para las concentraciones 5 y 10 μM se observó más del 80% de viabilidad y fueron las seleccionadas para los ensayos de inhibición del rendimiento viral y los controles de acidez con Naranja de acridina.

En los ensayos con Naranja de acridina se observó un efecto más marcado del aumento del pH en comparación con los tratamientos de cloruro de amonio. En la figura 30b se observa que los compartimentos ácidos marcados en color naranja en el caso de los cultivos controles no están presentes en los cultivos tratados con ConcA.

Se evaluó el efecto de ConcA en la entrada de JUNV. Cultivos de células 3T3-DC-SIGN fueron tratados por 30 minutos con ambas concentraciones de ConcA o MM para el control. Luego, los cultivos se infectaron con JUNV (m.i.:0,1) y a las 24 hs p.i. se evaluó la producción viral de los sobrenadantes por la técnica de UFP. Por otro parte, los cultivos se fijaron y permeabilizaron para analizar la expresión de NP por IFI. En la figura 30c se observa que los tratamientos con ConcA reducen en más del 97% la expresión de NP de JUNV y en la figura 33a también se encuentra una reducción significativa de la multiplicación de JUNV.

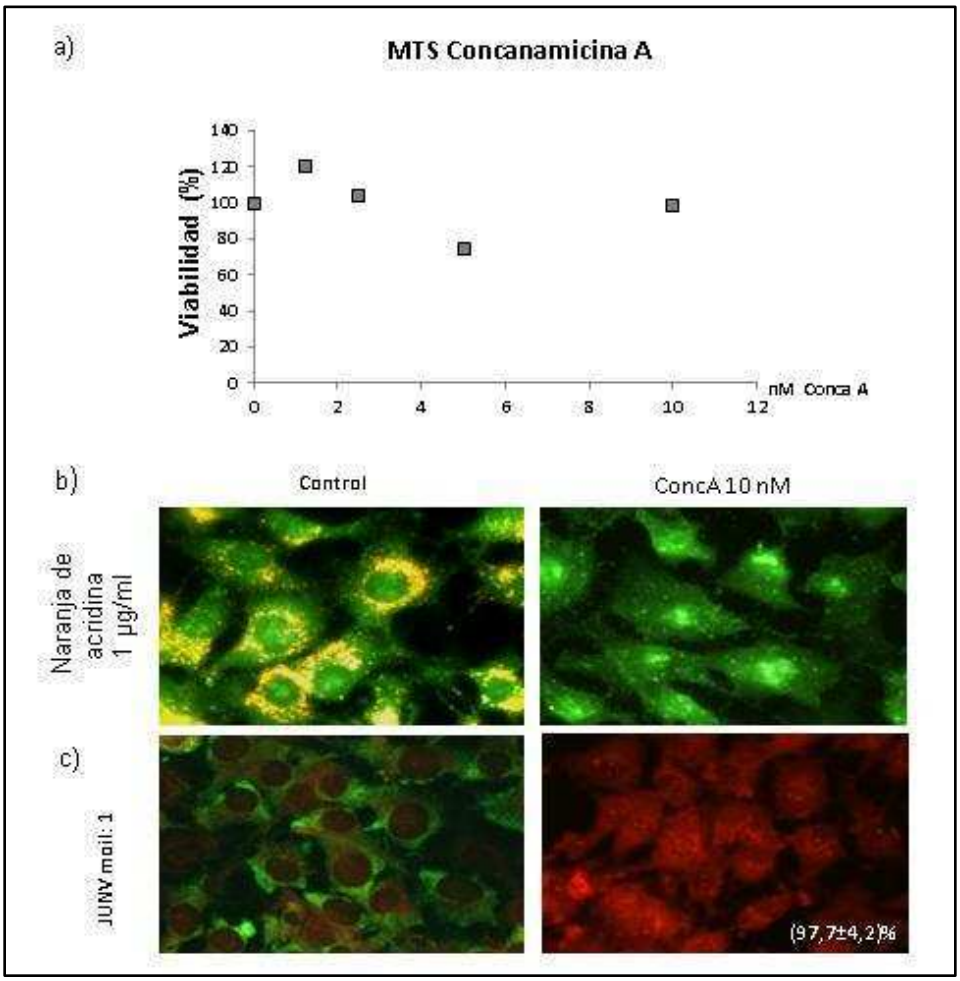

Figura 32: Estudio del efecto de ConcA sobre la expresión de NP de JUNV. a) Cultivos de células 3T3-DC-SIGN se incubaron con el compuesto y se analizó la viabilidad de los cultivos por la técnica de MTS. **b)** Los cultivos se se trataron con la concentración no citotóxica de ConcA y se incubaron con Naranja de Acridina 1 µg/ml para evidenciar la pérdida de acidez en los endosomas. Finalmente se trataron los cultivos con el compuesto y luego se infectó en presencia del mismo. Luego de las 24 hs p.i. se fijaron las células y se procesaron para IFI para detectar NP. Se indica el porcentaje de inhibición con el desvío estándar. Aumento 400x.

Para verificar que el efecto de ConcA es inhibitorio para la entrada de JUNV y que no afecta algún otro paso del ciclo de multiplicación, se analizó el efecto del compuesto sobre la multiplicación viral luego de las dos horas posteriores a la infección. En comparación con el control sin tratar, no se observaron diferencias significativas en la titulación de los sobrenadantes de 24 hs p.i. de los cultivos tratados con ConcA con respecto a los controles, confirmando el efecto del compuesto sobre etapas tempranas (Fig. 33b).

Por otro lado, se determinó el efecto de la misma sobre la replicación del RNA viral a las 4 horas de la internalización. Para ello, los cultivos se trataron con el compuesto de la misma forma que en los estudios de la inhibición de la entrada viral. Luego de 4 horas de incubación, los cultivos se trataron con proteinasa K para eliminar el virus adsorbido, y las células se levantaron con Trizol para ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real en el que se midieron los niveles del gen np y del gen control gapdh como se explica detalladamente en Materiales y Métodos.

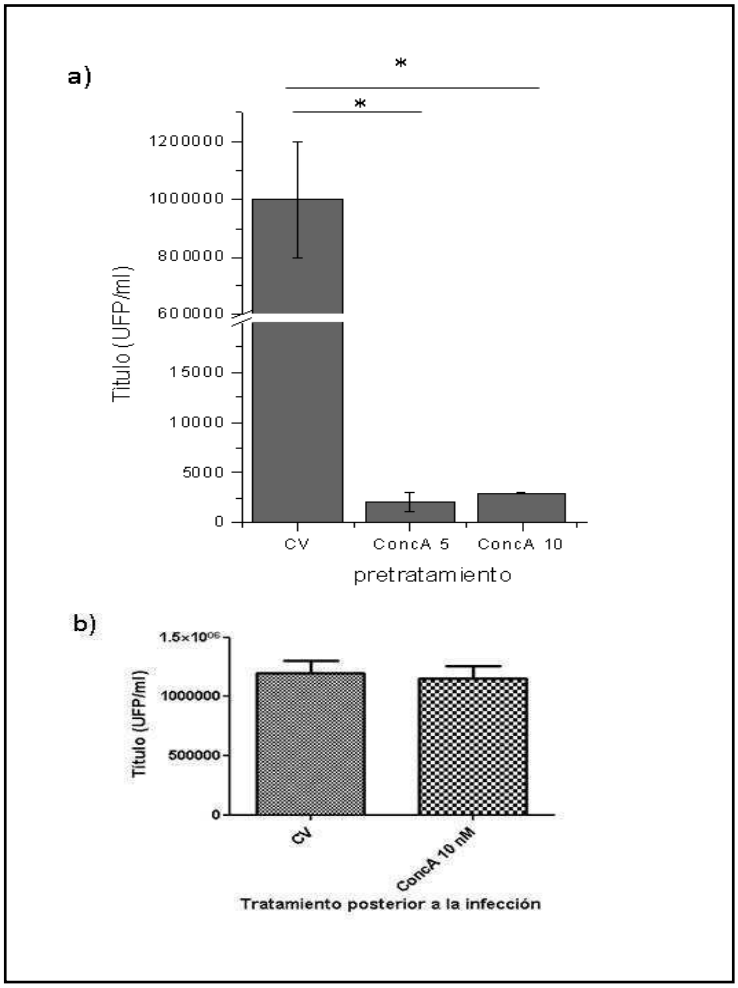

Figura 33: Efecto de ConcA sobre la producción viral. a) Las dos concentraciones no citotóxicas se estudiaron sobre la producción viral: los cultivos se pretrataron con el compuesto y se infectaron en presencia del mismo. Luego de las 24 hs p.i. los sobrenadantes se cosecharon y se titularon por la técnica de UFP. Ambas concentraciones resultaron significativas. $p<0.05$. **b)** Los cultivos celulares se infectaron con JUNV (m.i:0,1) y luego de las 2 hs p.i. se trataron con el compuesto y los sobrendantes de 24 hs p.i. se cosecharon para titularlos por la técnica de UFP.

En este caso se observa que existe también una diferencia significativa con respecto al control, en aquellos cultivos tratados con el compuesto (Figura 34).

En conjunto, estos ensayos demuestran que JUNV, al igual que en las células Vero, presenta un proceso de liberación de su material genético por fusión de membranas a nivel endosomal dependiente pH ácido antes de los veinte minutos de incubación a 37°C en esta línea celular, y no se produce una entrada por fusión directa en membrana plasmática.

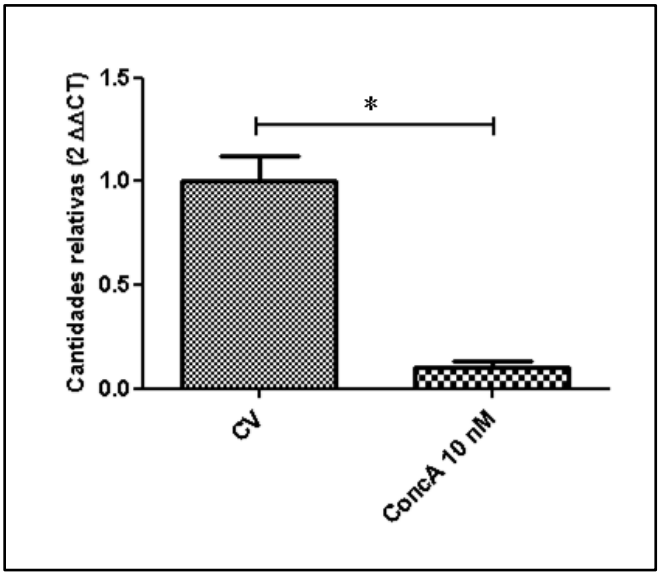

Figura 34: Efecto de la Concanamicina A en la síntesis de RNA viral. Cultivos de células 3T3-DC-SIGN se trataron con 10 nM de ConcA o MM según corresponda y posteriormente fueron infectadas con JUNV (m.i.:0,1). Pasadas las 4 hs p.i. se trataron las células con proteinasa K y se cosecharon para ensayos de PCR cuantitativa. Se indican cantidades relativas. * $p<0,05$.

2.2. Dependencia de dinamina en la entrada de JUNV a las células 3T3-DC-SIGN

En la amplia variedad de vías de entrada de los virus, existen distintas formas que pueden ser dependientes de dinamina como en la endocitosis dependiente de caveolas o vesículas recubiertas de clatrina, en las cuales se encuentra la GTPasa dinamina involucrada en la fisión del endosoma que se origina por separación de la membrana

plasmática. Estudios de Martínez y col. (2009) demostraron que en la entrada de JUNV a las células Vero es indispensable la presencia de dinamina II.

Para determinar el rol de esta proteína en la entrada de JUNV utilizando DC-SIGN evaluamos la dependencia de la dinamina, utilizando el inhibidor farmacológico Dynasore (DYN), una molécula pequeña, permeable a la membrana celular que inhibe la actividad GTPasa de dinamina II en forma no competitiva, bloqueando así la endocitosis dependiente de dicha proteína (Macia y col., 2006).

Por ls técnica de MTS se determinó si este compuesto altera la viabilidad celular entre las concentraciones 60 y 150 μM. Para ello, los cultivos se incubaron por dos horas con el compuesto. En la figura 33a se observa que la máxima concentración ensayada no afecta la viabilidad celular y ésta fue la elegida para la entrada de JUNV. Para evaluar la acción de este compuesto sobre la dinamina II celular, se trataron cultivos de células 3T3-DC-SIGN por una hora y se infectaron con JUNV a una m.i. de 0,1. Los sobrenadantes de 24 hs p.i se titularon por la técnica de UFP y las células se fijaron para IFI para detectar la expresión de la nucleoproteína de JUNV.

La figura 35c y d muestran los resultados del estudio del efecto del compuesto DYN sobre la entrada de JUNV por ambas técnicas. En los estudios de producción viral se observó una inhibición del 69% y en la expresión de la proteína NP un 60%. Ambos valores resultaron ser significativamente diferentes con respecto a los controles no tratados.

Para controlar que dicho compuesto realmente ejerce una alteración de la endocitosis, se trataron cultivos con DYN por una hora y luego se incubaron con transferrina (tfr) acoplada a TRITC, ya que se conoce que la tfr ingresa a la célula por un mecanismo de endocitosis y en particular una endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina que implica la acción de dinamina II. En la figura 33b se observa una disminución en la presencia de tfr citoplasmática en los cultivos tratados con Dynasore respecto a los no tratados.

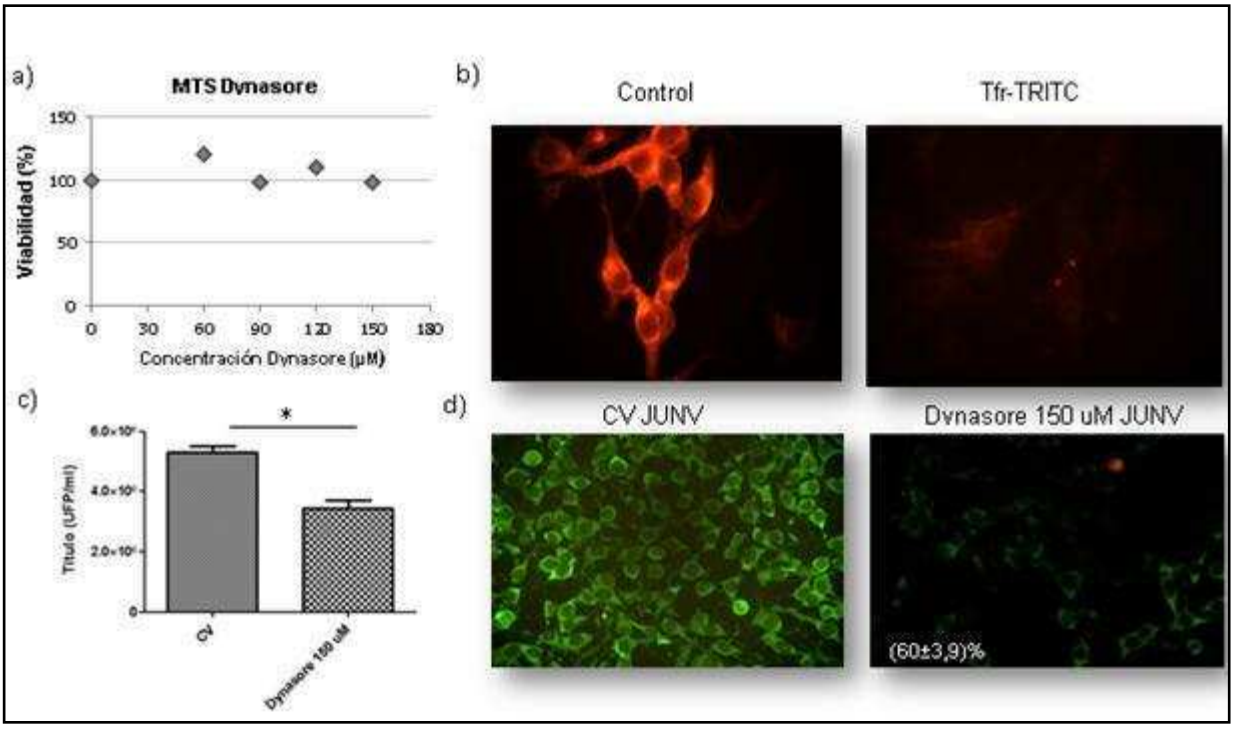

Figura 35: Rol de Dynasore en la entrada de JUNV. **a)** Se determinó la viabilidad de los cultivos luego de las incubaciones con distintas concentraciones del compuesto por la técnica de MTS. **b)** Los cultivos se trataron con el compuesto y luego se incubaron con tfr-TRITC por 15 minutos. Aumento: 400x. **c)** Células 3T3-DC-SIGN se trataron con Dynasore 150 µM o MM para el caso del control y luego se infectaron en presencia del mismo. Los sobrenadantes de 24 hs p.i. se titularon por la técnica de UFP. *p<0,05. **d)** Esos cultivos se fijaron y procesaron para IFI para evaluar la expresión de la nucleoproteína viral. Se indica el porcentaje de inhibición con respecto al control sin tratar. Aumento 400x.

Para descartar un posible efecto de este compuesto distinto a la entrada, se incubaron los cultivos con Dynasore 150 µM por dos horas posteriores a la infección con JUNV. Luego de 24 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se analizó la producción viral. En la figura 34a se puede observar que Dynasore no produce una acción inhibitoria de la infección de JUNV cuando es agregado después de las 2 hs p.i., confirmando que su efecto es exclusivo sobre la entrada de JUNV.

Por otro lado, al igual que con los compuestos anteriores, se repitieron los ensayos de evaluación de la síntesis de RNA a las 4 hs p.i. luego de pretratar los cultivos con Dynasore. Los resultados de la figura 36b demuestran que efectivamente el efecto del tratamiento con este compuesto es en las etapas tempranas del ciclo de multiplicación.

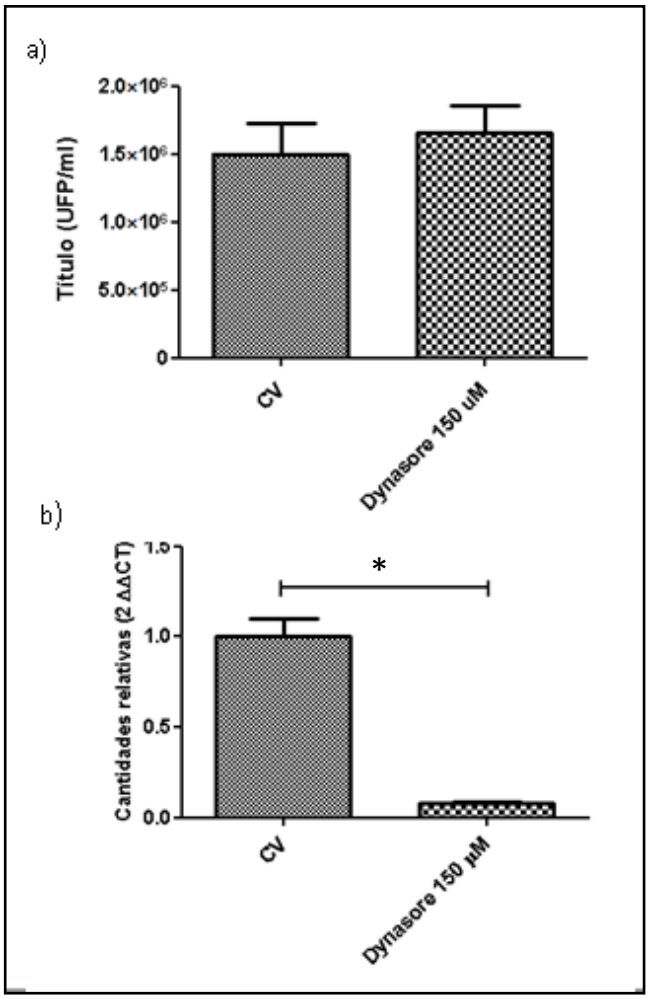

Figura 34: Controles del efecto de Dynasore en la entrada de JUNV. a) Los cultivos se infectaron con JUNV (m.i.:0.1) y se trataron con el compuesto a las 2 hs p.i. Transcurridas las 24 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por la técnica de UFP. **b)** Para evaluar la acción del compuesto sobre el RNA viral se trataron los cultivos con el compuesto y se infectaron en presencia del mismo. Luego de las 4 hs p.i. se trataron las células con proteinasa K y se cosecharon para ensayos de PCR cuantitativa. Se indican cantidades relativas. *p<0,05.

Considerando que los inhibidores farmacológicos presentan efectos pleiotrópicos y para corroborar los resultados encontrados con Dynasore, se utilizaron dominantes negativas de la GTPasa dinamina II como inhibidor molecular.

Existen tres genes en células de mamíferos que codifican para la dinamina I, II y Drp1 respectivamente (Kirchhausen y col., 2009). Estos 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 y presenta un 79% de homología con la Din I (Cook y col., 1994). Ha sido previamente demostrado que la dinamina I participa de funciones neuronales específicas, como el reciclaje sináptico, mientras que Din II media la internalización convencional por clatrina y por caveolas (Gray y col, 2003; Henley y col., 1998), y Drp1 es la dinamina mitocondrial.

Se ha demostrado que la sobreexpresión de una mutante defectiva de una proteína pero no la proteína salvaje bloquea la endocitosis en el estadío posterior al ensamblaje de la envoltura, pero previo al secuestro de los ligandos unidos a los receptores dentro de las vesículas cubiertas (Van der Bliek y col., 1993), concluyendo que la sobreexpresión de esta construcción inhibe la constricción y liberación de la vesícula.

Se transfectaron cultivos de células 3T3-DC-SIGN con las construcciones salvaje y dominante negativa K44A de la GTPasa dinamina por 24 hs y luego se infectaron con JUNV (m.i.:5). A las 24 hs p.i. se fijaron los cultivos para estudios de expresión de la nucleoproteína viral. Se determinó en las células transfectada que expresan la proteína fluorescente, el porcentaje de células que presentan expresión de NP. Luego, se calculó el porcentaje de inhibición con respecto a las células que expresan la proteína salvaje, resultando una inhibición significativa de aproximadamente el 77% (Figura 35a).

Como control se incubaron cultivos transfectados con transferrina acoplada a TRITC por 15 minutos a 37ºC y se fijaron para IFI. En este ensayo se pudo comprobar que la intensidad de las células transfectadas con la dominante negativa resultó, como era esperado, menor a la construcción salvaje, concluyendo que ingresó menos transferrina en dichas células. Del mismo modo que con la transferrina, la expresión de NP de JUNV disminuyó en un 76,9% de inhibición como se observa en la figura 37b.

Estos resultados aportan evidencias de que el mecanismo de entrada a las células luego de la interacción con DC-SIGN sería una endocitosis dependiente de dinamina II.

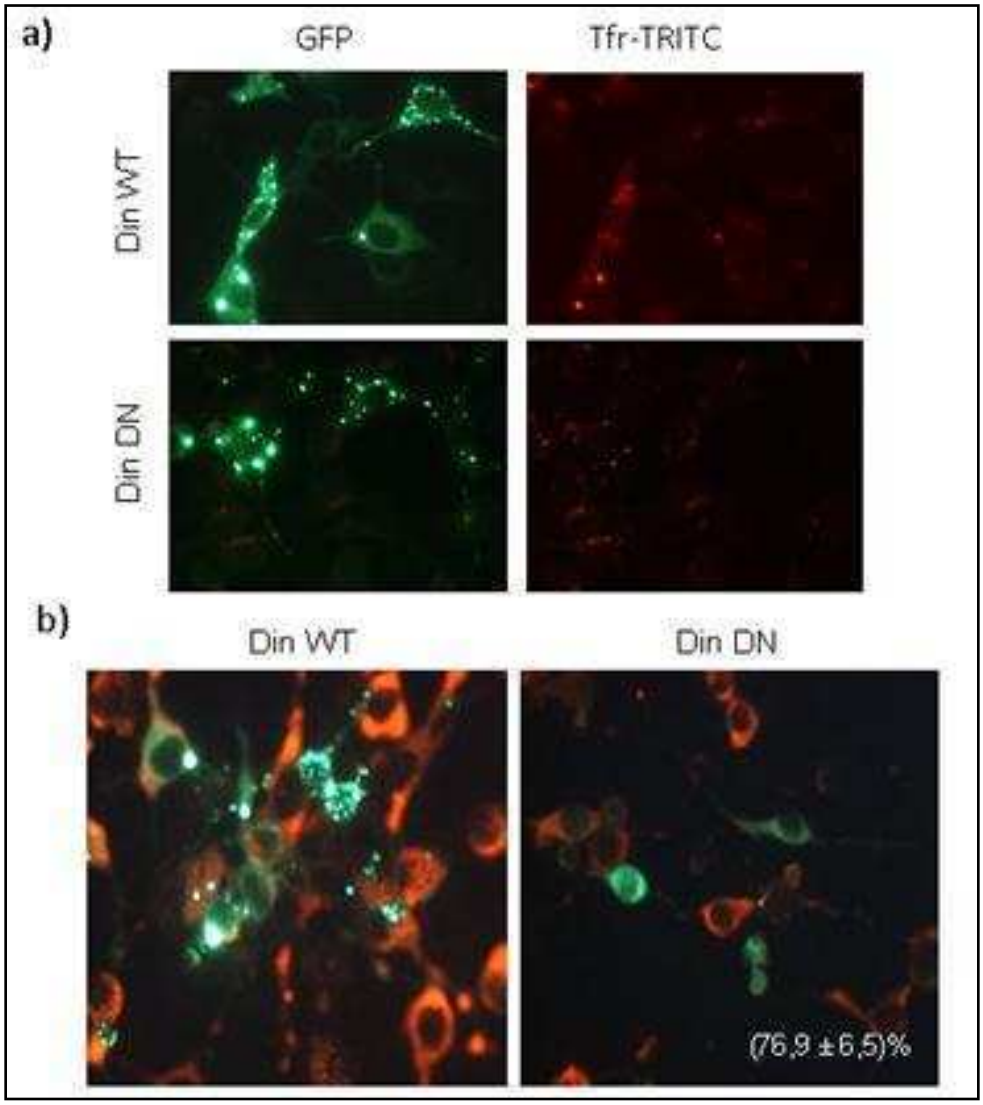

Figura 37: Efecto de la expresión de una construcción dominante negativa de dinamina II. a) Cultivos transfectados con las construcciones salvaje y dominante negativa se incubaron con tfr marcada por 15 minutos. Luego se fijaron y permeabilizaron para su observación. Aumento 400x. **b)** Cultivos de células 3T3-DC-SIGN transfectados con ambas construcciones se infectaron con JUNV (m.i.: 5). Luego de las 24 hs p.i. se procesaron las células para IFI para detectar la expresión de NP. Se determinó el número de células infectadas (rojo) dentro del grupo de aquellas transfectadas que expresan GFP. Se indica el porcentaje de inhibición con respecto a la construcción salvaje.

2.3. Determinación de la vía endocítica involucrada en la entrada de JUNV a las células que expresan DC-SIGN

Considerando que en este sistema celular, existe dependencia de la entrada de JUNV por dinamina II, se presentan dos alternativas principales de las posibles vías que utilizan esta proteína: la endocitosis dependiente de clatrina o de caveolas.

JUNV entra a células Vero por la vía dependiente de clatrina (Martínez y col., 2007). Sin embargo, muchos estudios han demostrado que los virus pueden adoptar distintas rutas de entrada dependiendo de la línea celular que se utilice.

Para determinar si JUNV utiliza la endocitosis dependiente de clatrina en este sistema celular murino que expresa la lectina humana se analizó la acción del compuesto Clorpromacina (CPZ), el cual desestabiliza la red de clatrina subyacente a la membrana plasmática, previniendo así la formación de la vesícula (Wang y col., 1993).

En primer lugar se evaluó el efecto de la Clorpromazina sobre la viabilidad celular por MTS entre las concentraciones 10 a 50 μM. Este compuesto, como se observa en la figura 36a resultó ser bastante tóxico en comparación a las concentraciones de trabajo reportadas en bibliografía. Para evaluar si las concentraciones 10 y 20 μM presentan efecto sobre la endocitosis dependiente de clatrina, se probó la capacidad de inhibir la tfr. Para eso, al igual que en el caso anterior, se trataron los cultivos por una hora con 10 y 20 μM de CPZ o con MM en el caso del control, y luego se incubaron con transferrina-TRITC por 15 minutos y se procesaron para IF. En la figura 36b se puede observar que la transferrina ingresó al citoplasma celular en dicho tiempo en los cultivos tratados con MM, mientras que en los cultivos tratados con 20 μM de CPZ se observa menor intensidad de fluorescencia correspondiente a una menor entrada de esta molécula a las células. Por ese motivo se eligió esta última concentración para los ensayos de inhibición de la infectividad por JUNV.

Para dicho propósito, los cultivos de esta línea se trataron con CPZ 20 μM o MM por una hora y se infectaron en presencia del mismo. A partir de las 24 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes para su titulación por el método de UFP y los cultivos se fijaron para IFI para detectar la expresión de NP.

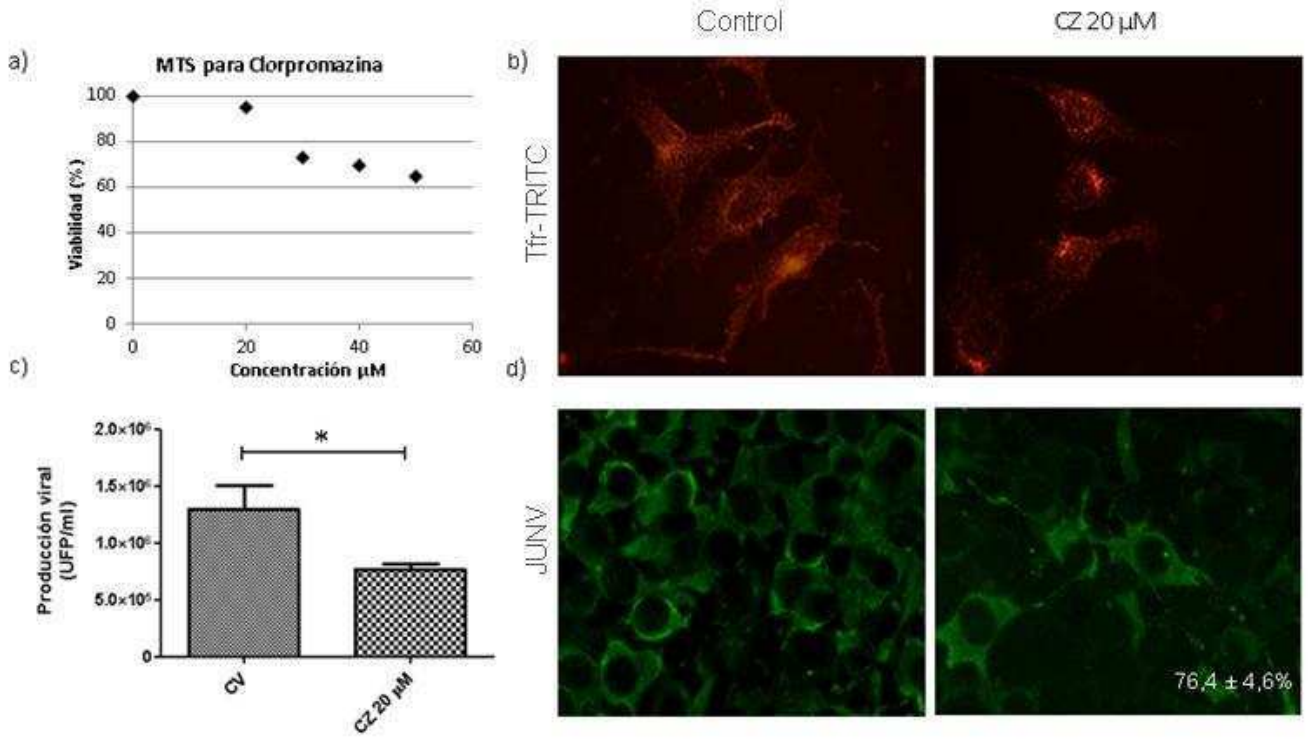

Figura 38: Efecto de la clorpromazina sobre la entrada de JUNV a través de DC-SIGN. a) Cultivos de células 3T3-DC-SIGN se incubaron con el compuesto y luego se determinó la viabilidad por la técnica MTS. **b)** Los cultivos se trataron con el compuesto por una hora y luego se incubaron con tfr-TRITC por 15 minutos. Aumento: 400x**. c)** Los cultivos se trataron con Clorpormazina 20 µM y luego se infectaron con JUNV (m.i.: 0,1) en presencia del compuesto. A las 24 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por la técnica de UFP. *$p<0,05$. **d)** Los cultivos mencionados en c se procesaron para IFI para detectar la expresión de NP. Se indica el porcentaje de inhibición con respecto al control sin tratar. Aumento: 400x.

En los ensayos de producción viral presentados en la 38c se observa que el tratamiento de los cultivos con CPZ produce una inhibición de la producción viral del 70% con respecto al control sin tratar, y que dicha diferencia resulta ser estadísticamente significativa. Además de la productividad viral, se observó inhibición significativa de la misma magnitud en los estudios de expresión de nucleoproteína viral por IFI (Fig 38d).

Continuando con los controles de entrada y para descartar efectos en otras etapas del ciclo de multiplicación, el mismo ensayo de producción viral se realizó agregando el compuesto por el mismo periodo de tiempo que en el caso anterior pero dos horas posteriores a la infección con JUNV. En este caso, no se observó diferencia significativa del título viral con respecto al control sin tratar (Fig 39a).

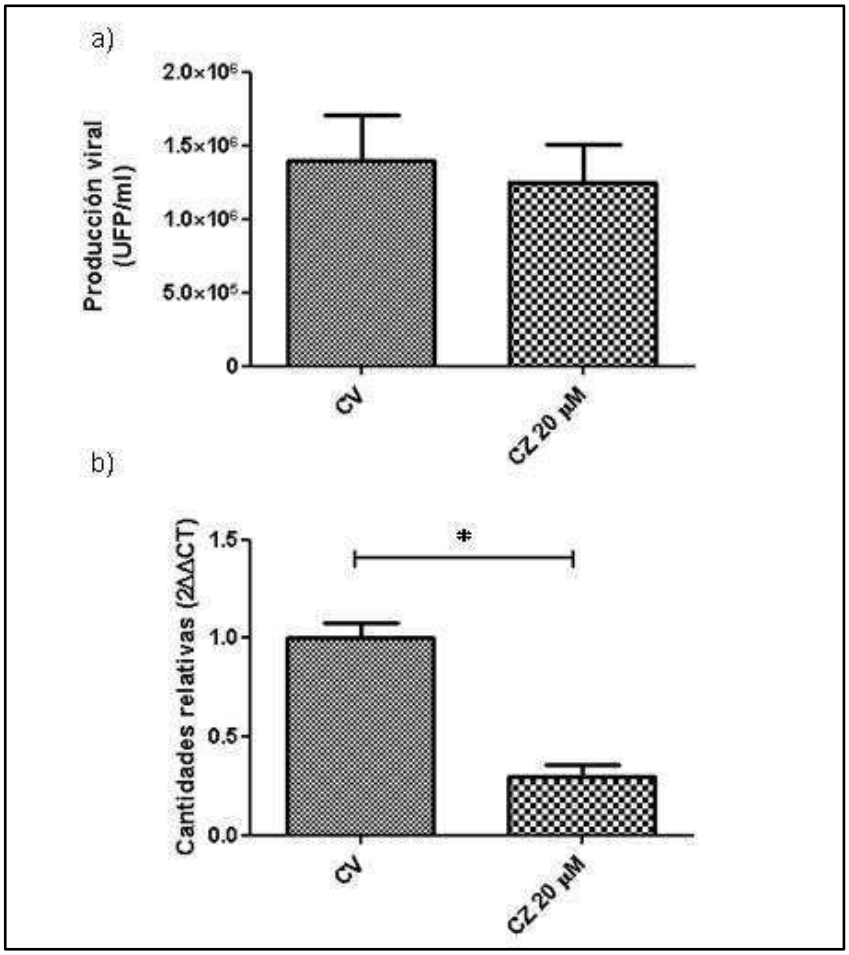

Figura 39: Controles de especificidad de acción e CPZ en la entrada de JUNV.a) Cultivos de células 3T3-DC-SIGN se infectaron con JUNV (m.i.: 0,1) y luego de las dos horas se incubaron con el compuesto CPZ por el mismo tiempo que en los ensayos anteriores. Pasadas las 24 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes para evaluar la producción viral. **b)** Los cultivos se trataron con CPZ y luego se infectaron en presencia del mismo (m.i.:0,1). A las 24 hs p.i. se trataron con proteinasa K y se procesaron para ensayos de PCR cuantitativa. Se indica cantidades relativas. *p<0,05.

También se determinó el efecto de este compuesto a tiempos tempranos evaluando el efecto sobre el RNA viral a las 4 hs p.i. Del mismo modo que en el caso anterior, los cultivos se trataron con el compuesto por el tiempo adecuado a cada uno y se infectó con JUNV (m.i.:0,1) en presencia de CPZ. Luego de 4 horas de incubación, los cultivos se trataron con proteinasa K para eliminar el virus adsorbido, y las células se resuspendieron en Trizol para ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real, en el que se midieron los niveles del gen np y del gen control gapdh como se explica detalladamente en Materiales y Métodos. En este caso podemos determinar que el tratamiento con CPZ reduce significativamente la síntesis del RNA viral correlacionándose con una menor cantidad de virus internalizado (Fig 39b).

La entrada dependiente de clatrina no solo involucra esta molécula, sino que las canastas de clatrina que recubren las vesículas endocíticas están formadas por distintas proteínas adaptadoras, como por ejemplo, Eps15. Para continuar en la determinación de esta vía en la entrada de JUNV y sumar evidencias que respalden los resultados observados con los inhibidores farmacológicos, se utilizaron inhibidores moleculares. En este caso se utilizaron construcciones salvaje y dominante negativa de la proteína Eps15.

Esta proteína es esencial en el proceso de endocitosis dependiente de vesículas recubiertas por clatrina. La misma 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 Eps15 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 Eps15: EH29, la cual expresa una forma de Eps15 que no posee el segundo ni el tercer dominio EH, característica que interfiere específicamente con la formación de vesículas recubiertas con clatrina en la membrana plasmática (Benmerah y col., 1998).

Del mismo modo que con CPZ, se evaluó en primera instancia el efecto sobre la endocitosis de transferrina. Para ello, se transfectaron los cultivos celulares con ambas

construcciones de Eps15 y a las 24 horas se las incubó con 15 µM de tfr-TRITC por 15 minutos. Los cultivos se procesaron como se describió anteriormente y se observó que en el caso de las células que expresan la dominante negativa de Eps15 hay una menor cantidad de tfr en el citoplasma celular que en el caso de los cultivos que expresan la proteína salvaje (Fig 40a).

.

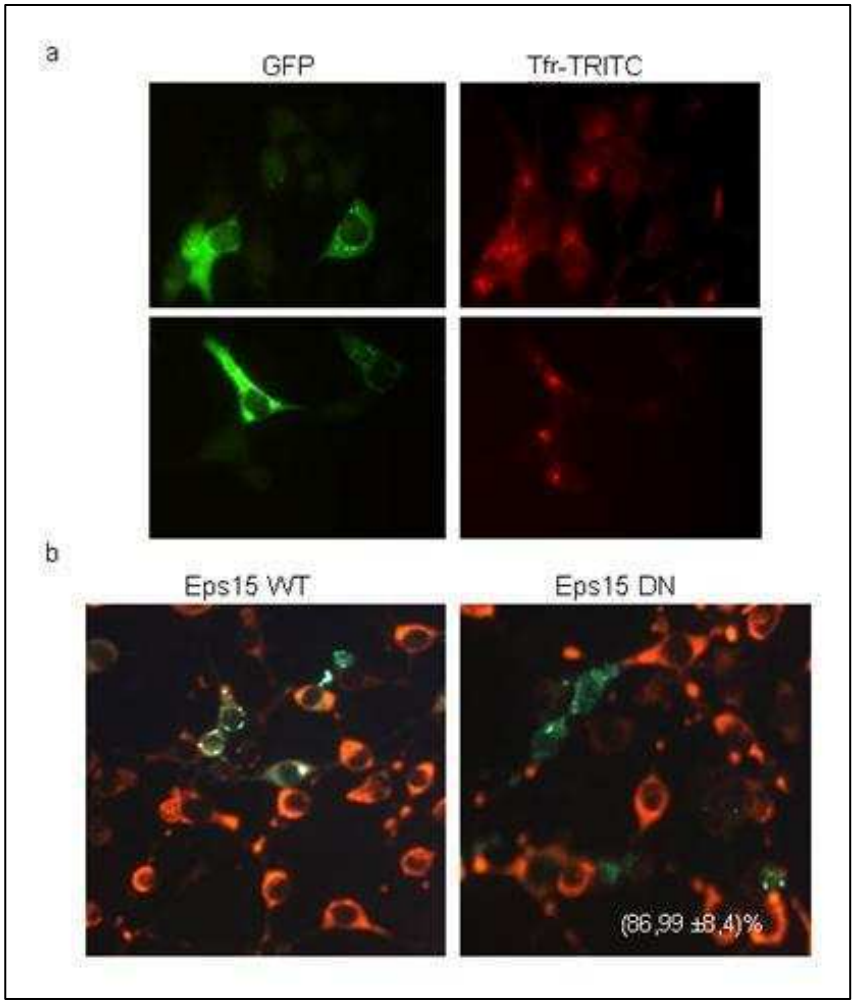

Figura 40: Efecto de la expresión de Eps15 dominate negativa en la infección por JUNV a través de DC-SIGN. a) Cultivos celulares se transfectaron con las construcciones salvaje y dominante negativa de Eps15 por 24 hs y luego se incubaron con tfr-TRITC por 15 minutos. Aumento 400x. **b)** Cultivos de esta línea se transfectaron por 24 hs y se infectaron con JUNV (m.i.: 5). A las 24 hs p.i se procesaron para IFI para evaluar la expresión de NP (rojo). Se determinó el número de células infectadas dentro de las transfectadas (verde) para cada caso. Se indica el porcentaje de inhibición con respecto a la construcción salvaje. Aumento: 400x.

Una vez corroborado el efecto de esta construcción en la internalización de ligandos, se procedió de la misma manera con JUNV. Los cultivos a las 24 hs de ser transfectados se infectaron con JUNV (m.i:5). Transcurridas las 24 hs p.i. se fijaron y permeabilizaron para observar el patrón de expresión de NP por IFI.

Se determinó el porcentaje de células infectadas que expresan la proteína NP dentro de las células que efectivamente estén transfectadas. Esta última determinación es posible ya que estas construcciones expresan GFP fusionado a las proteínas de interés. En los resultados que se observan en la figura 38b se pudo determinar que los cultivos con la dominante negativa de Eps15 presentan más de un 80% de inhibición de la expresión de NP con respecto al control con la proteína salvaje.

Para descartar la posible endocitosis dependiente de caveolas se transfectaron los cultivos con construcciones salvajes y dominantes negativas de la proteína caveolina 1. La mutante dominante negativa de caveolina 1, denominada cav-1-Y14F, es portadora de una mutación que impide la fosforilación de la proteína en la tirosina 14 y en consecuencia, se bloquea su internalización (Coyne y col., 2006), mientras que la fusión de GFP en el extremo carboxilo-terminal no afecta su función y puede ser utilizada como control (cav-1-wt) (Pelkmans y col., 2001).

Luego, se transfectaron estas células y se incubaron con toxina colérica (ctx) acoplada a TRITC por 30 minutos. En las imágenes de la figura 41a se puede observar que la expresión de la dominante negativa reduce la concentración de ctx.

Por otro lado, los cultivos celulares se transfectaron con ambas construcciones y luego de las 24 horas de expresión, se infectaron con JUNV (m.i.:5). Transcurridas las 24 horas de infección se analizaron los cultivos por IFI para evaluar las posibles diferencias en la expresión de NP entre los cultivos control y los que expresan la dominante negativa (Figura 41b).

En estos ensayos de IFI no observamos diferencias significativas en la expresión de la nucleoproteína viral entre ambas construcciones. Estos resultados refuerzan la posibilidad que la entrada a las células que expresan DC-SIGN sea la vía clásica de entrada por endocitosis dependiente de vesículas recubiertas de clatrina.

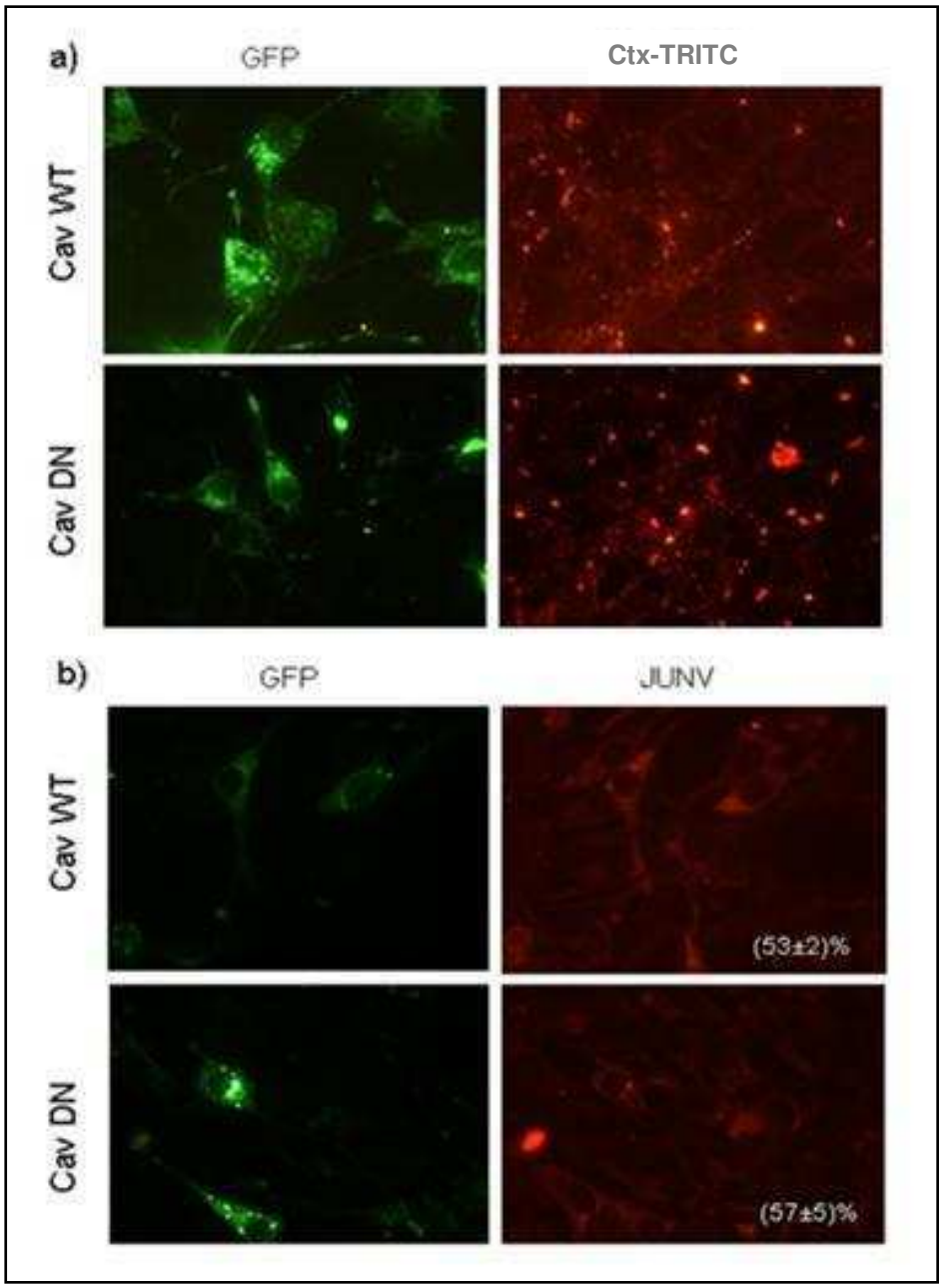

Figura 41: Rol de la endocitosis dependiente de caveolas en la entrada de JUNV a través de DC-SIGN. a) Cultivos que expresan esta lectina se transfectaron por 24 hs con la construcción salvaje y dominante negativa de caveolina 1. Luego, se incubaron con ctx-FITC por 30 minutos. Aumento 400x. **b)** Los cultivos se transfectaron con ambas construcciones por 24 hs y se infectaron con JUNV (m.i.:0,1). Luego de las 24 hs p.i. se procesaron las células para ensayos de IFI para detectar la expresión de NP. Se indica el número de células infectadas dentro de las transfectadas. Aumento 400x.

2.4. Rol del colesterol en la entrada de JUNV a las células que expresan la lectina humana.

Como se ha descrito anteriormente, DC-SIGN se expresa en microdominios que son ricos en colesterol, y en varios ensayos se ha observado que si bien la endocitosis dependiente de caveola depende de colesterol porque dicha proteína se aloja en *rafts* lipídicos, cada vez más ensayos avalan que también existen endocitosis dependientes de clatrina en el cual el colesterol cumple una función imprescindible para la entrada de virus. Este es el caso de HIV al endocitarse a través de DC-SIGN. (Cambi y col., 2009). Además, hay evidencia que algunos arenavirus tanto del VM como del NM, requieren del colesterol en la membrana celular para poder entrar en la célula (Vela y col., 2007).

Para determinar el efecto de la alteración del colesterol en la membrana celular sobre la multiplicación de JUNV, se utilizaron dos compuestos que perturban la presencia del colesterol de distintas formas.

En primer lugar se utilizó el compuesto Nistatina (NT), el cual se une al colesterol de la membrana plasmática formando complejos sin afectar la cantidad de colesterol en la membrana. Este compuesto, en todas las concentraciones ensayadas para la técnica de MTS no mostró citotoxicidad luego de tres horas de incubación (Fig 42a).

Al igual que en casos anteriores se comprobó que los compuestos ejercen la función inhibitoria adecuada. La efectividad del tratamiento para alterar la endocitosis mediante *rafts* lipídicos se comprobó usando como control la entrada de la subunidad B de ctx, proteína marcadora de internalización por esta vía. Los cultivos se trataron por dos horas con la concentración 70μM de NT y se incubaron con ctx por 30 minutos. Se observa en la figura 42b que la NT en la concentración 70 μM efectivamente inhibe la entrada de la toxina, evidenciado como una disminución en la intensidad de ctx citoplasmática con respecto al control.

Posteriormente, los cultivos se trataron en las mismas condiciones con NT y luego se infectaron en ausencia de esta droga. Pasada las 24 horas de infección, los sobrenadantes se titularon por la técnica de UFP y las células se fijaron para evaluar la expresión de la nucleoproteína viral. Los cultivos tratados con este compuesto no demostraron diferencias

significativas con respecto al control, ya sea en cuanto a la producción viral como en la expresión de NP (Fig 42 c y d).

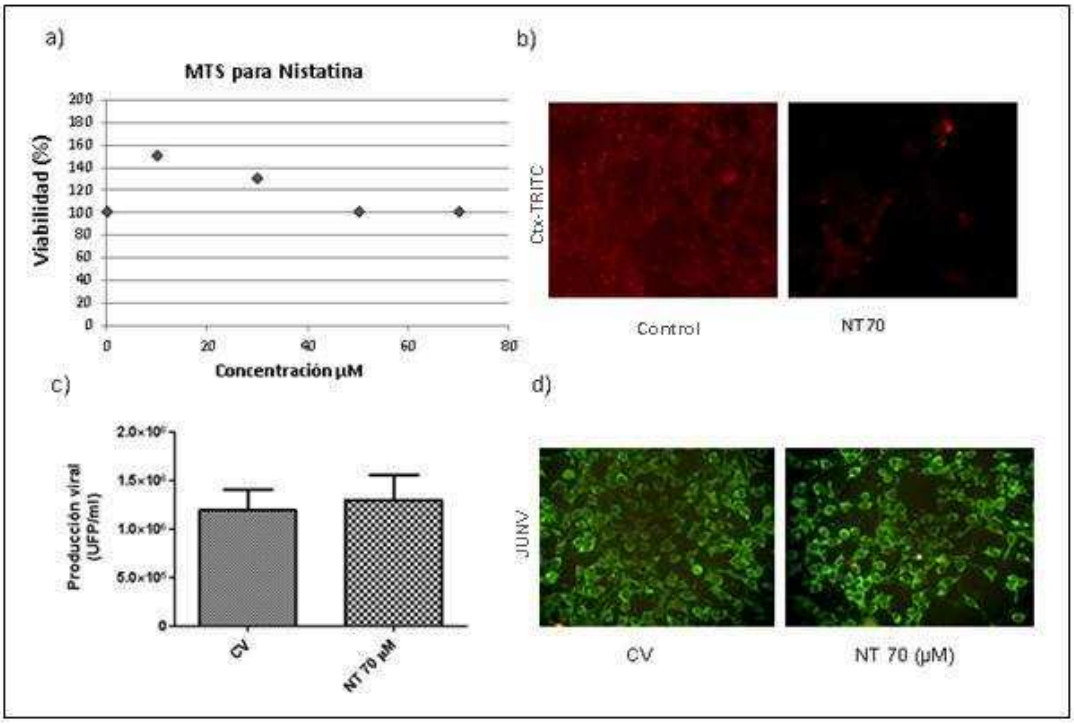

Figura 42: Efecto de Nistatina en la entrada de JUNV a células 3T3-DC-SIGN. a) Cultivo de esta línea se incubaron con distintas concentraciones de Nistatina y se determinó la viabilidad celular por la técnica de MTS. **b)** Con la concentración máxima no citotóxica se incubaron los cultivos por dos horas y se incubaron con ctx-TRITC por 30 minutos. Aumento 400x. **c)** Cultivos de esta línea se incubaron con el compuesto y luego se infectaron con JUNV (m.i.:0,1). A las 24 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes para los ensayos de producción viral y **d)** se fijaron las células y se procesaron para IFI para la detección de la expresión de NP. Aumento: 400x.

Otro compuesto ampliamente utilizado es la Metil-β-ciclodextrina (MβCD), la cual 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 y col., 2011; Zidovetzki y col., 2007).

Al igual que en los casos anteriores, se realizó un estudio de viabilidad celular en un rango que abarque las concentraciones reportadas. En este caso, se comprobó que la

máxima concentración no citotóxica es 10 mM (Fig 43a). Para la misma, se realizaron estudios de internalización de la ctx ya que su receptor, el gangliósido GM1, es endocitado por la vía dependiente de caveolas (Merritt y col., 1994). Los cultivos se trataron por 30 minutos con este compuesto, y luego, al igual que en el caso anterior, se incubó por 30 minutos con ctx. En los resultados de este ensayo presentados por la figura 43b se puede verificar que, luego la incubación con los marcadores de entrada por el tiempo correspondiente, existe una inhibición en la entrada de este compuesto con respecto a los controles sin tratar.

Una vez determinada su eficacia, se realizaron los ensayos de inhibición de la entrada de JUNV como se procedió con los otros inhibidores farmacológicos. Se incubaron los cultivos con 10 mM de MβCD por 30 minutos y se infectó con JUNV (m.i.:0,1) en ausencia del compuesto por el efecto virucidas reportado (Carro y col., 2013). Los sobrenadantes de 24 hs p.i. se utilizaron para ensayos de producción viral y los cultivos se fijaron y permeabilizaron para la evaluación de la expresión de NP por IFI.

En la figura 43c y d se observa que la producción viral disminuye significativamente un 79% en aquellos cultivos tratados con respecto al control sin tratar. Además, en los ensayos de expresión de la nucleoproteína también se observó una inhibición del 70% (Fig 43d).

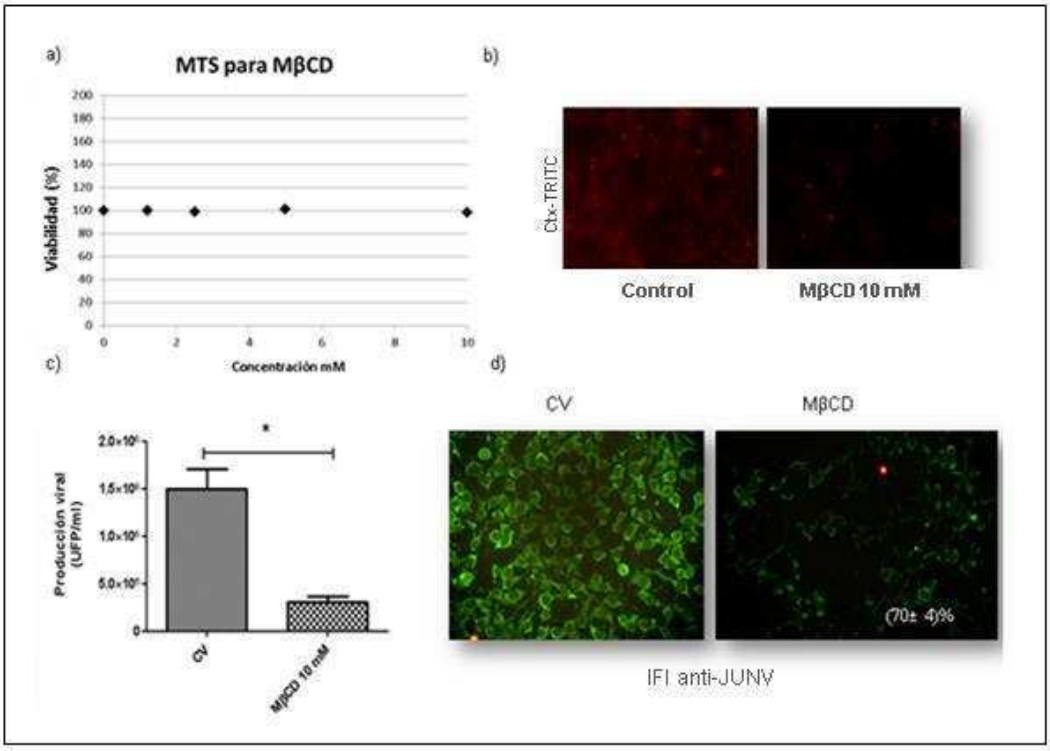

Figura 43: Efecto de Metil-β-ciclodextrina en la entrada de JUNV a través de DC-SIGN. a) Se determinó la viabilidad por MTS sobre los cultivos al incubarlos con el compuesto por 90 minutos. **b)** La concentración mayor no citotóxica se utilizó para incubar los cultivos por 30 minutos y luego se incubaron con ctx-TRITC por 30 minutos. Aumento: 400x. **c)** Cultivos de células 3T3-DC-SIGN se incubaron con el compuesto por 30 minutos y luego se infectaron con JUNV (m.i.: 0,1). Sobrenadantes de 24 hs p.i. se cosecharon para ensayos de producción viral (*$p<0,05$) y **d)** los cultivos se fijaron para ensayos de IFI para detección de NP. Se indica el porcentaje de inhibición con respecto al control sin tratar. Aumento 400x.

Para verificar que la extracción de colesterol no estuviera alterando la salida del virus por falta del mismo, se realizaron ensayos de medición de colesterol total con o sin el compuesto a distintos tiempos. Considerando que la droga se deja en contacto con las células por 30 minutos, se realizó a dicho tiempo (siempre en paralelo con el control sin tratar) una medición que corresponde al tiempo efectivo de la droga, y la otra a las 24 horas, para comprobar que las células se hayan recuperado adecuadamente luego de la remoción del compuesto. Esta medición se realizó con el kit comercial Amplex Red$_{tm}$ como

se explica en Materiales y Métodos. Los resultados de las mediciones de colesterol total (Fig 44a) indican que efectivamente la cantidad de colesterol disminuye en las muestras tratadas con MβCD a los 30 minutos con respecto al control para el mismo tiempo, pero que tanto los cultivos tratados como los controles a las 24 horas se encontraban con concentraciones de colesterol similares, descartando que la inhibición encontrada con JUNV se deba a un defecto del sistema celular, carente del colesterol necesario para su salida.

Para corroborar que la MβCD afecta la entrada de JUNV y no en los pasos posteriores de su multiplicación, se realizaron los mismos ensayos de exposición al compuesto, pero luego de las dos horas de infección con JUNV. En el análisis del rendimiento viral de estos tratamientos podemos determinar que no hubo inhibición significativa con respecto a su control (Fig 44b).

Finalmente, para comprobar a tiempos tempranos que esta droga afecta la entrada de JUNV, se analizó el efecto sobre el RNA viral. Como ya fue descrito, los cultivos se incubaron con MβCD infectaron a baja multiplicidad en ausencia del compuesto, y a las 4 hs p.i. se cosecharon las células para ensayos de medición de RNA viral por PCR en tiempo real tal como se describe en MyM (Fig 44c). En este caso se puede observar una disminución en el gen que codifica para la nucleoproteína viral en aquellos cultivos tratados con MβCD.

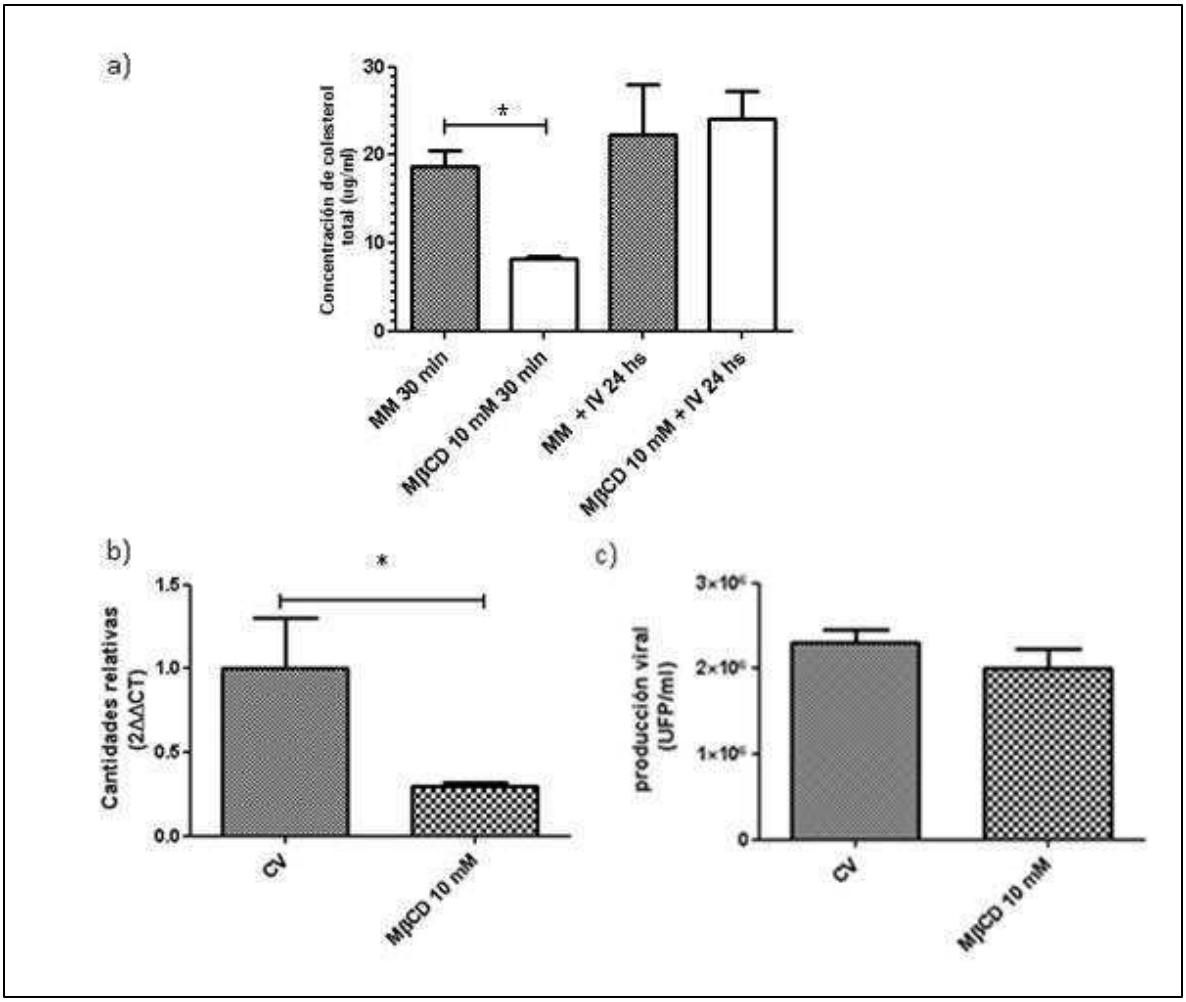

Figura 44: Ensayos controles del efecto de MβCD en la entrada de JUNV a través de DC-SIGN. **a)** Los cultivos se trataron con el compuesto y/o se infectaron con JUNV por los tiempos indicados. Luego se cosecharon las células para ensayos de medición de colesterol total. **b)** Los cultivos se trataron con el compuesto y se infectaron con JUNV (m.i.:2). A las 24 hs p.i. se trataron las células con proteinasa K y se cosecharon las células para determinar el RNA viral por PCR cuantitativa. Se indican cantidades relativas. * $p<0,05$. **c)** Los cultivos se infectaron con JUNV (m.i.:0,1) y se trataron con el compuesto a las 2 hs p.i. por 30 minutos. Los sobrenadantes de 24 hs p.i. se cosecharon para su titulación por la técnica de UFP.

2.5. Utilización de endosomas tempranos y tardíos

Una vez internalizado, JUNV en la línea celular Vero, utiliza endosomas tempranos y tardíos durante el tránsito citoplasmático hasta su desnudamiento a pH ácido. Estos tipos de endosomas tienen relevancia en la vía clásica de clatrina, y son evidenciados por la presencia de las proteínas celulares Rab5 y Rab7 respectivamente. Las mismas son proteínas pertenecientes a la familia de pequeñas GTPasas Rab, las cuales controlan distintos pasos del transporte intracelular. Para determinar si los endosomas tempranos y tardíos están involucrados en la entrada de JUNV luego de la interacción con la lectinas DC-SIGN se utilizaron, en el caso de Rab5, la mutante S34N-Rab5, construida en base a la mutante dominante de p21-ras S17N (Stenmark y col., 1995); y en el caso de Rab7, se utilizó la mutante dominante negativa T22N-Rab7 (Feng y col., 1995).

En primer lugar, se estudió la utilización de los endosomas tempranos, ricos en Rab5 en la infección por JUNV dependiente de la lectina DC-SIGN. Para ello, cultivos de células que expresan esta lectina se transfectaron con las construcciones plasmídicas salvaje y dominante negativa de Rab5 por 24 hs y luego fueron infectadas con JUNV (m.i.:5). A las 24 hs p.i. se fijaron y permeabilizaron los cultivos para ensayos de IFI. En la figura 43 se observa que en las células que expresan la forma dominante negativa de la proteína Rab5 se detecta una inhibición del 50 % en la expresión de NP.

Como control, cultivos transfectados con ambas construcciones se incubaron por 30 minutos con tfr y se procesaron para IF. Los resultados de la figura 46 muestran que la acumulación de tfr en la zona perinuclear disminuye en las células que expresan la proteína alterada.

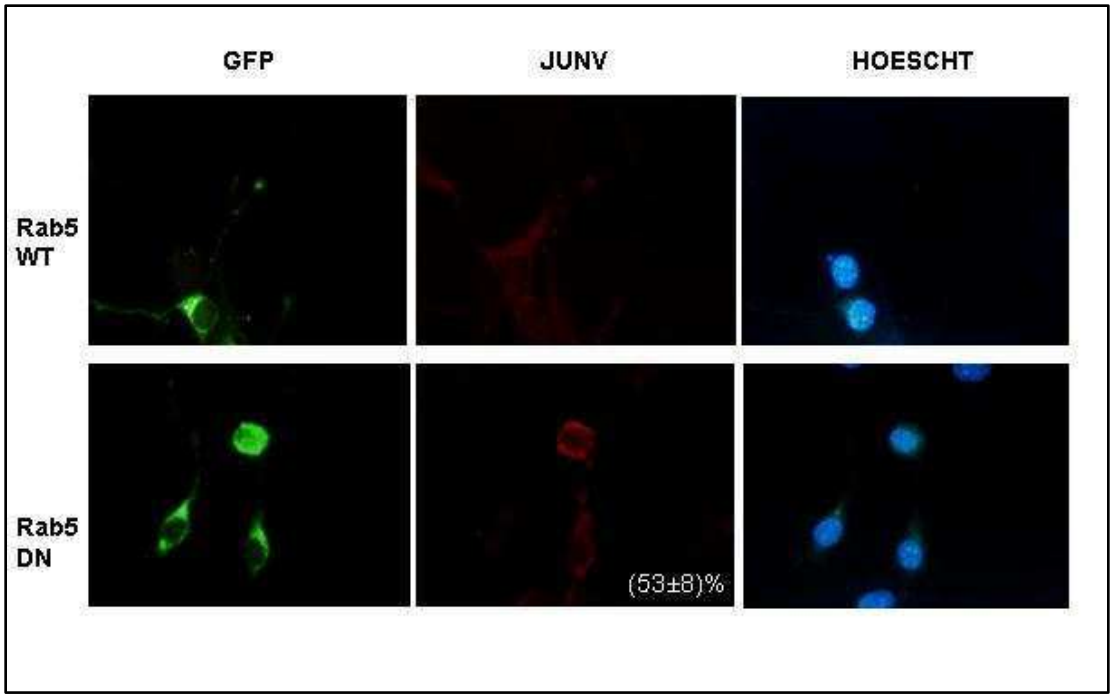

Figura 45: Rol de los endosomas tempranos en la entrada de JUNV en la línea 3T3-DC-SIGN. Cultivos de células 3T3-DC-SIGN se transfectaron con las construcciones salvaje y dominante negativas de Rab5 por 24 hs y luego se infectaron con JUNV (m.i.:0,1). A las 24 hs p.i. se procesaron las muestras para la detección de NP por IFI. Se indica el porcentaje de células transfectadas que expresan GFP que fueron infectadas con JUNV (m.i.: 5).

Por otro lado, se estudió el rol de los endosomas tardíos en el tránsito citoplasmático de JUNV en este sistema celular. Los cultivos se transfectaron por 24 horas con las construcciones de las proteínas salvaje y DN de Rab7, marcador de endosomas tardíos. Luego se infectaron con JUNV a una m.i. de 5. A las 24 hs p.i. se procesaron las células para IFI y se determinó el número de células positivas para la expresión de JUNV del total de transfectadas que expresan GFP. La figura 47 demuestra, que no hubo diferencias significativas de expresión de la proteína viral en ambos sistemas.

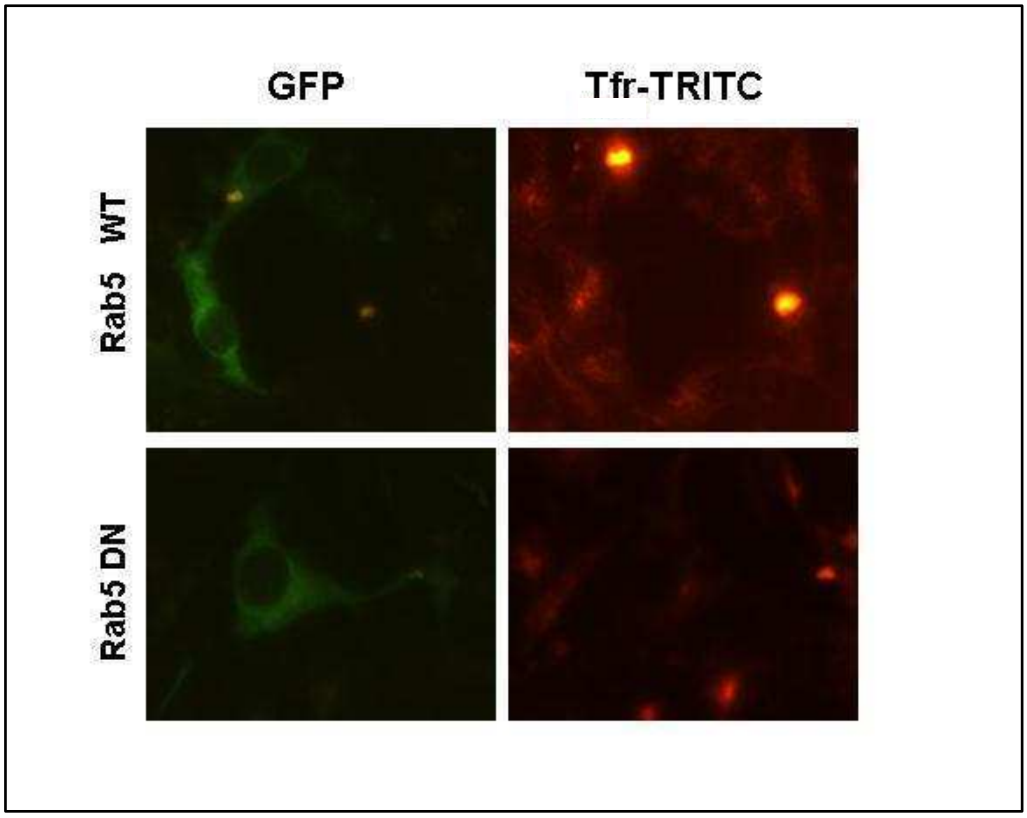

Figura 46: Efecto de la expresión de la construcción dominante negativa de Rab5 en la entrada de trf-TRITC. Cultivos de células 3T3-DC-SIGN se transfectaron con ambas construcciones por 24 hs y luego se incubaron por 15 minutos con tfr-TRITC. Aumento: 400x.

Se comprobó la capacidad de transportar la transferrina por estas construcciones. A partir de cultivos transfectados, se incubó con tfr-TRITC por 30 minutos y se procesó los cultivos para IF. En los resultados de la figura 48 se observa que efectivamente la tfr es incorporada en endosomas tardíos, mientras que las células que expresan la proteína no funcional carecen de esta correcta internalización de este compuesto.

Estos resultados indican una utilización de los endosomas tempranos, pero aparentemente los tardíos no estarían ejerciendo un rol esencial en la entrada de JUNV en este sistema celular.

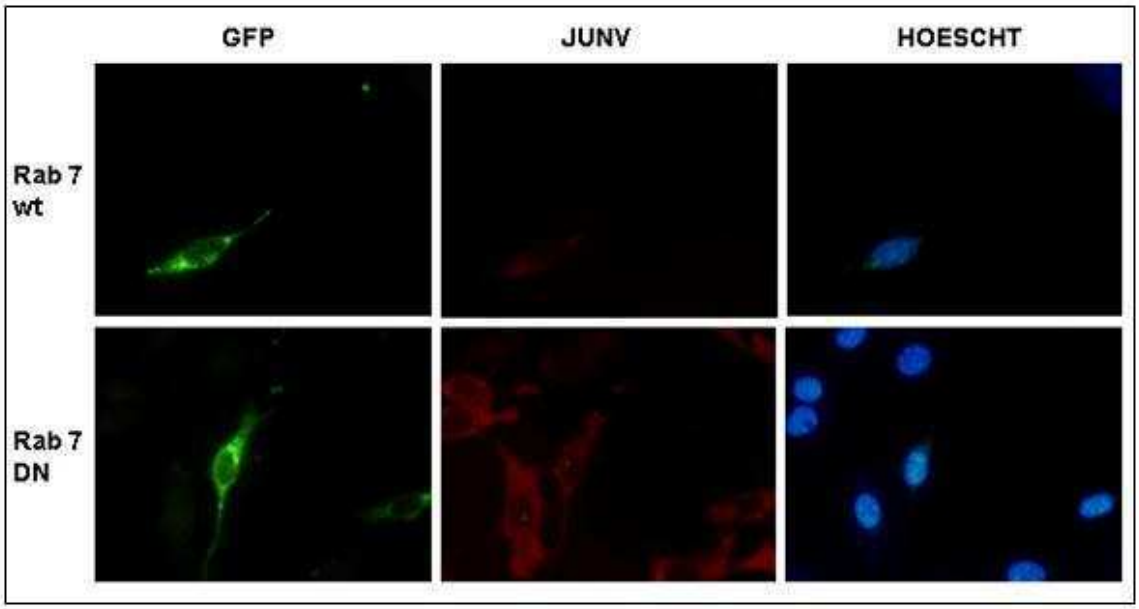

Figura 47: Rol de los endosomas tardíos en la infección de JUNV a células 3T3-DC-SIGN. Cultivos de esta línea fueron transfectados con las construcciones salvaje (WT) y dominante negativa de Rab7 por 24 hs. Luego se infectaron con JUNV (m.i.: 5) y a las 24 hs p.i. se procesaron los cultivos para IFI para la detección de la expresión de NP. Aumento 400x.

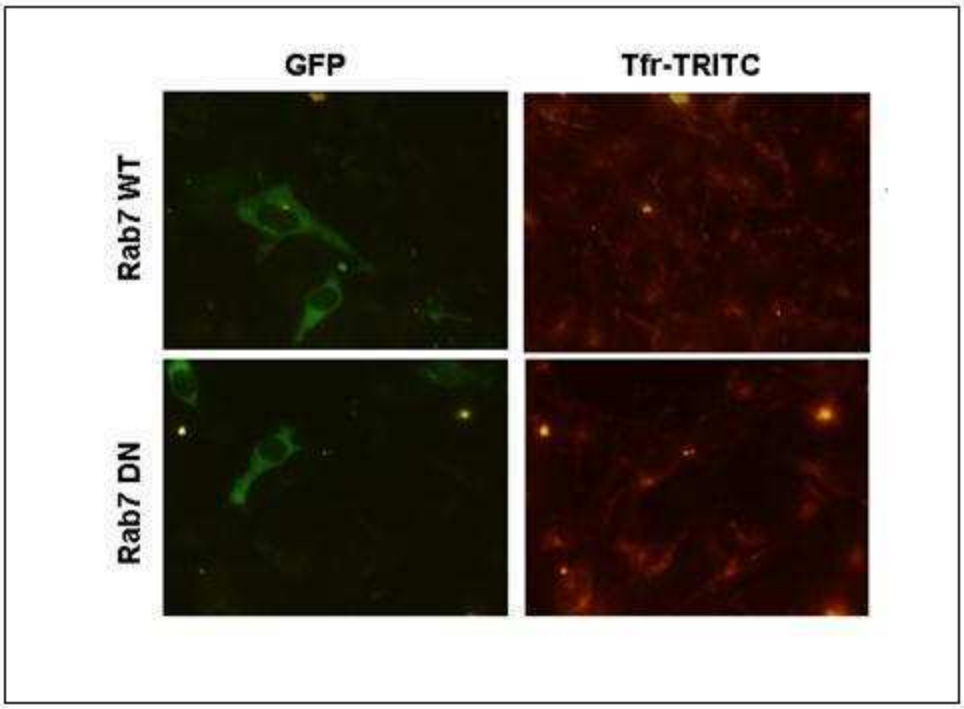

Figura 48: Efecto de la expresión de la construcción dominante negativa de Rab7 sobre la entrada de transferrina. Cultivos de células que expresan la lectina se transfectaron con las

construcciones salvaje y dominante negativa de Rab7 por 24 hs y luego se incubaron con tfr-TRITC por 30 minutos. Aumento: 400x.

2.6. Rol del citoesqueleto en la entrada de JUNV por DC-SIGN.

Con el fin de estudiar la participación del citoesqueleto en las etapas tempranas de la infección de JUNV en células que expresan la lectina DC-SIGN, se estudió el rol de los microfilamentos de actina como la de los microtúbulos.

Se estudió la dependencia de los microfilamentos de actina en las etapas tempranas del ciclo de multiplicación de JUNV, induciendo la desorganización de esta red del citoesqueleto utilizando los compuestos Citochalasina D (CitD), la cual se une a la F-actina previniendo su despolimerización, y Latrunculina A (LatA), que se une a la G-actina y evita su polimerización.

Se determinaron las concentraciones viables en este sistema celular por la técnica de MTS abarcando concentraciones entre 0,5 y 5 μM de cada compuesto. La CitD no mostró un efecto citotóxico para estos cultivos, mientras la Latrunculin A resultó no alterar la viabilidad de las mismas a la concentración 1 μM, cinco veces menos concentrada que para los tratamientos reportados en células Vero (Figura 49a).

La acción de estos compuestos sobre los elementos del citoesqueleto se ha descripto en trabajos anteriores, sin embargo para corroborar y caracterizar su efecto en nuestro sistema, se determinó la integridad estructural de los microfilamentos mediante la técnica de IFI. Los cultivos controles y tratados con los distintos compuestos en sus concentraciones adecuadas fueron crecidos sobre cubreobjetos tratados con poli-L-lisina, para favorecer la adhesión ya que las células al ser tratadas con los compuestos muestran una alteración morfológica que propicia su desprendimiento de la superficie a la cual se adhieren. Luego del tratamiento por 90 minutos, los cultivos fueron fijados y permeabilizados para IF. Los microfilamentos fueron evidenciados con faloidina conjugada a FITC, un intercalante de actina.

En la figura 49b se muestran las fotografías representativas que corresponden al efecto de los compuestos sobre los filamentos de actina. Como puede observarse los

delgados filamentos de actina formando una red irregular en el citoplasma celular. Cuando los cultivos se trataron con CitD, el patrón de IF se alteró completamente, resultando en una evidente desaparición de los filamentos de actina, siendo los más afectados los citoplasmáticos. Como ha sido previamente descrito, la CitD no desorganiza totalmente los microfilamentos sino que los filamentos corticales quedan prácticamente intactos (Stossel y col., 1989).

Como estos filamentos son los que se encuentran más relacionados con la internalización del virus, se estudió el efecto de la LatA que posee propiedades despolimerizantes del citoesqueleto de actina, actuando principalmente sobre los filamentos corticales. LatA, es un 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 49b, luego de 90 minutos de tratamiento con LatA tanto los filamentos corticales como citoplasmáticos desaparecieron y en su lugar se observaron los característicos cúmulos de actina.

Luego de corroborar el efecto sobre las fibras de actina con ambos compuestos, se determinó si las células podían recuperar su morfología y así permitir la replicación viral hasta las 24 hs. Para ello, los cultivos de células 3T3-DC-SIGN se trataron por 90 minutos, y luego se agregó medio fresco por 90 minutos más para permitir su recuperación. Los cultivos se fijaron y se analizaron por IF como se describió anteriormente. En la figura 49b se observa que con 90 minutos de recuperación sin compuesto y con medio fresco, la morfología de los microfilamentos de actina se recupera de manera similar al control.

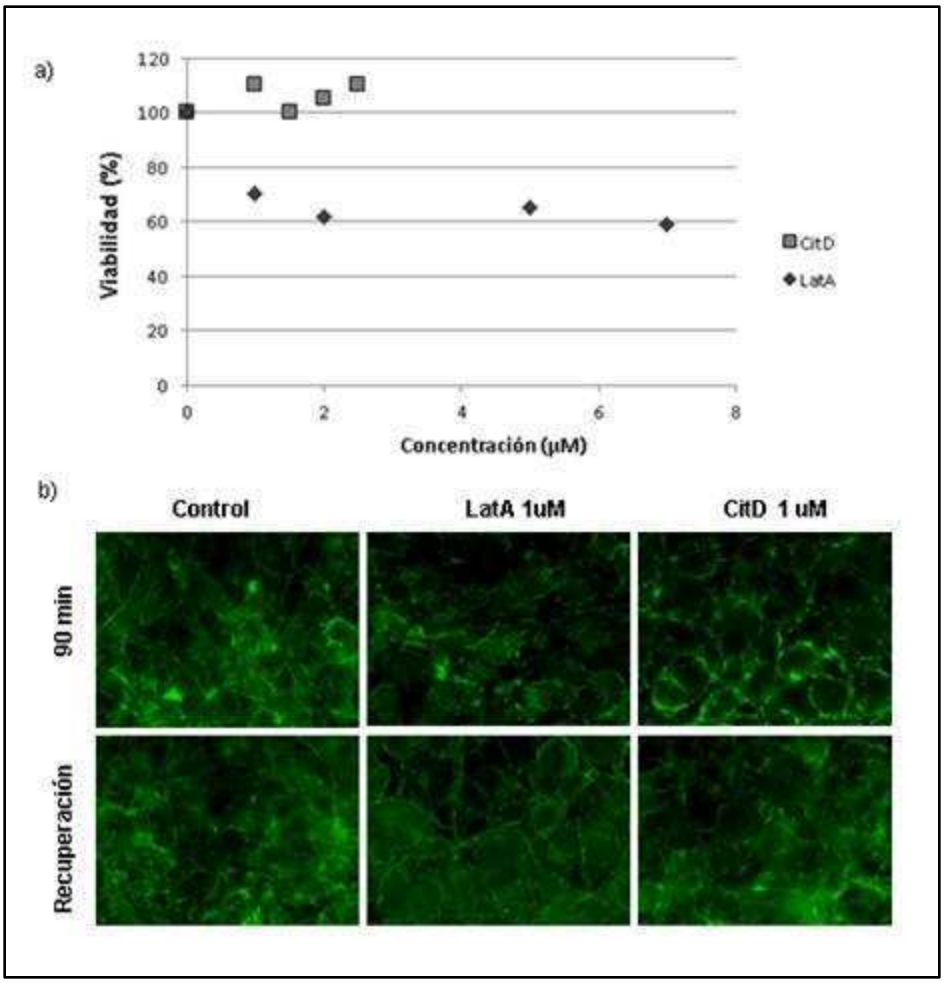

Figura 49: Efecto de Latruculin A y Citochalasina D en los cultivos que expresan DC-SIGN. a) Se incubaron los cultivos con los compuestos por 90 minutos y luego se determinó la viabilidad de los mismos por la técnica de MTS. **b)** Se determinó el efecto de los compuestos sobre los microfilamentos de actina luego de 90 min de tratamiento y su posterior recuperación a los 90 minutos con MM. Se procesaron los cultivos para IF utilizando faloidina-FITC. Aumento: 400x.

Una vez corroborados los controles que garanticen la viabilidad celular, se probó el efecto de estos compuestos sobre la entrada de JUNV por DC-SIGN. Para ello, se trataron los cultivos con CitD y LatA por 30 minutos, y luego se infectaron en presencia de los compuestos. A las 24 horas p.i. se titularon los sobrenadantes por la técnica de UFP y las células se fijaron para ensayos de detección de NP por IF. Los resultados de la figura 50 permiten observar que en los tratamientos con CitD no hubo diferencia en el rendimiento viral con los obtenidos para el control sin tratar, mientras sí se pudo evidenciar una inhibición significativa del 70 % aproximadamente en los tratamientos con LatA. Del

mismo modo, la expresión de la proteína viral se vio disminuida solamente en aquellos cultivos tratados con LatA.

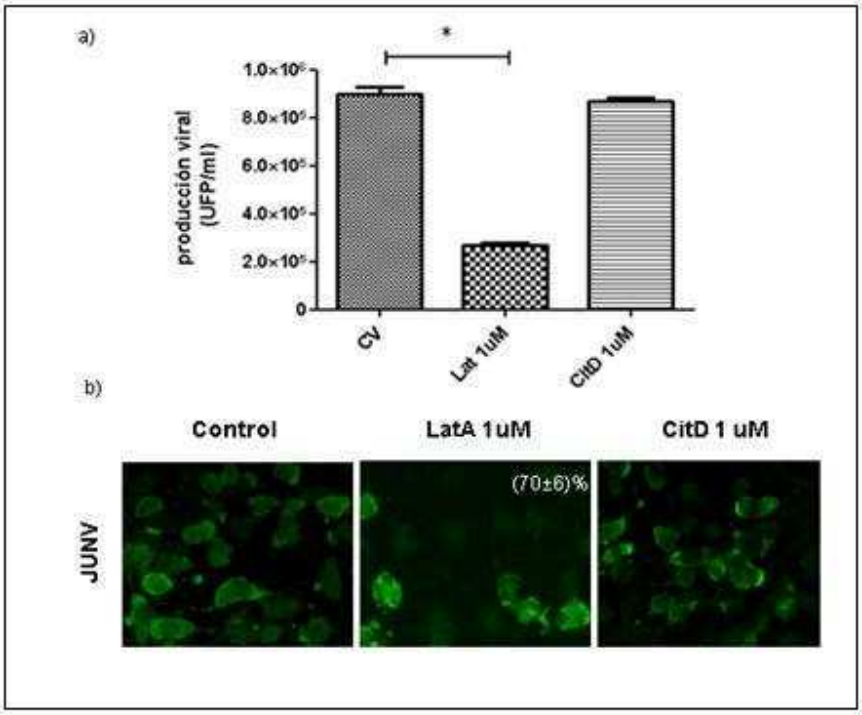

Figura 50: Efecto de los compuestos que alteran los microfilamentos de actina sobre la multiplicación de JUNV. a) Cultivos de células 3T3-DC-SIGN se trataron con los compuestos por el tiempo indicado y luego fueron infectados con JUNV (m.i.:0,1). A las 24 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes para ensayos de producción viral (*p<0,05) y **b)** se procesaron las células para ensayos de IFI para detección de NP. Se indica el porcentaje de inhibición con respecto al control sin tratar.

Para el caso de LatA que demostró inhibición significativa al tratar los cultivos, se repitió el mismo esquema de infección pero agregando el compuesto dos horas posteriores a la infección para descartar que el mismo tenga efecto sobre otras etapas del ciclo de multiplicación de JUNV. Los resultados de la figura 51a permiten evidenciar que la multiplicación de JUNV no se modifica con dicho tratamiento.

Finalmente se estudió si el efecto inhibitorio observado corresponde a etapas tempranas analizando el efecto de LatA sobre el RNA viral a las 4 hs p.i. Este estudio se evaluó utilizando la técnica de PCR en tiempo real para el gen que codifica para NP. Los cultivos se trataron como en los ensayos de inhibición del rendimiento viral y luego del

tiempo mencionado se cosecharon las células tratadas con proteínasa K para ensayos de PCR cuantitativa. Los resultados de la diferencia de CT que se observa en la figura 51b permiten corroborar que efectivamente la LatA estaría actuando en la entrada de JUNV en este sistema celular.

Luego de evaluar el efecto que tienen los microfilamentos de actina sobre la entrada de JUNV a las células 3T3-DC-SIGN, se estudió la capacidad de JUNV de utilizar los microtúbulos para las etapas tempranas de su ciclo de multiplicación.

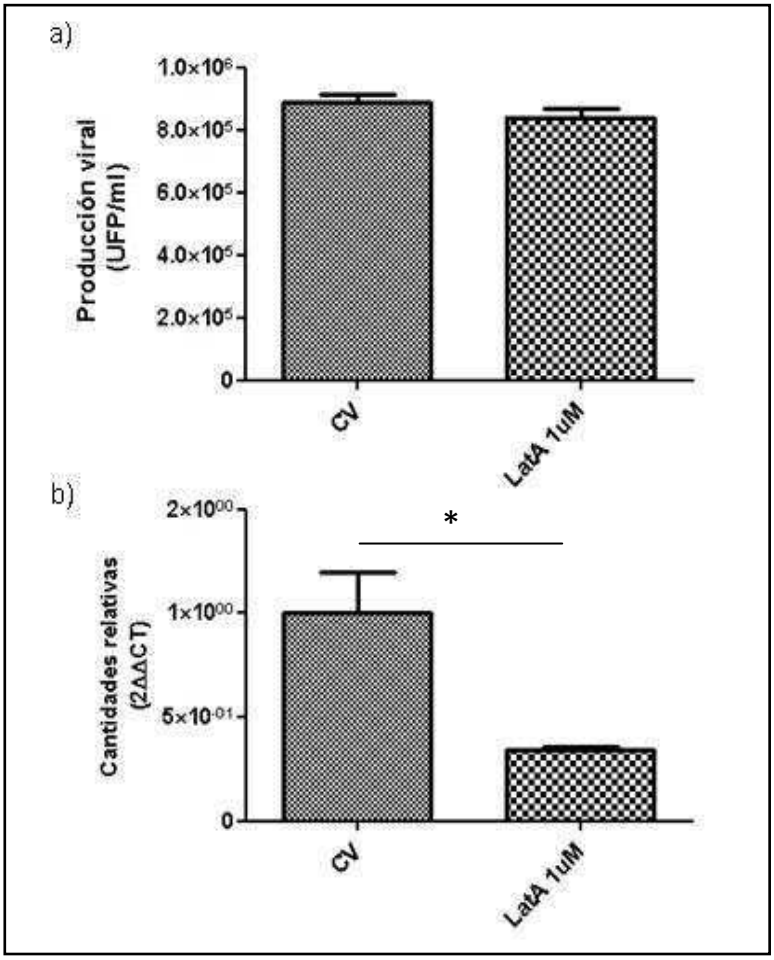

Figura 51: Controles de especificidad de acción de los compuestos que alteran los microfilamentos de actina para la entrada de JUNV. a) Los cultivos se infectaron con JUNV (m.i.:0,1) y a las 2 hs p.i. se trataron con LatA por 90 minutos. Luego de las 24 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se analizó la producción viral. **b)** Células 3T3-DC-SIGN se trataron con los compuestos por 30 minutos y luego fueron infectados en presencia del mismo. A las 24 hs p.i. se

trataron las células con proteinasa K y se cosecharon las mismas para ensayos de cuantificación del RNA viral por PCR en tiempo real. Se indican cantidades relativas. *p<0,05.

Para ello, se utilizaron dos compuestos que alteran la dinámica de los microtúbulos: Nocodazol (Noc) y Paclitaxel (Pac). El primero se une a la β-tubulina y previene la polimerización, mientras que Paclitaxel se une al extremo N-terminal de la β-tubulina y promueve la estabilización de los microtúbulos.

En primer lugar se determinó la viabilidad celular en presencia de ambos compuestos por la técnica MTS. En ambos casos las concentraciones mayores ensayadas resultaron ser bastantes citotóxicas por lo que se decidió utilizar las concentraciones 20 y 25 μM respectivamente (Figura 52a). Una vez determinadas las mismas, se evaluó la capacidad de alterar la red de microtúbulos. Cultivos de células 3T3-DC-SIGN se incubaron con ambos compuestos por 90 minutos, y luego se fijaron para ensayos de IFI para tubulina. En la figura 52b se observa, en el control celular que la red de microtúbulos se origina desde la zona perinuclear en el centro organizador de microtúbulos, y se irradian hacia la periferia. En los cultivos tratados, se observó una alteración del citoesqueleto que modifica la morfología celular.

Para determinar si este efecto observado es irreversible o la célula puede recuperarse del mismo, se trataron los cultivos con los compuestos por 90 minutos, y luego fue reemplazado por medio fresco por 90 minutos más. Se repitieron los ensayos de IFI para tubulina y se observó que efectivamente, las células pudieron recuperar la morfología tanto como la red de microtúbulos (Figura 52b).

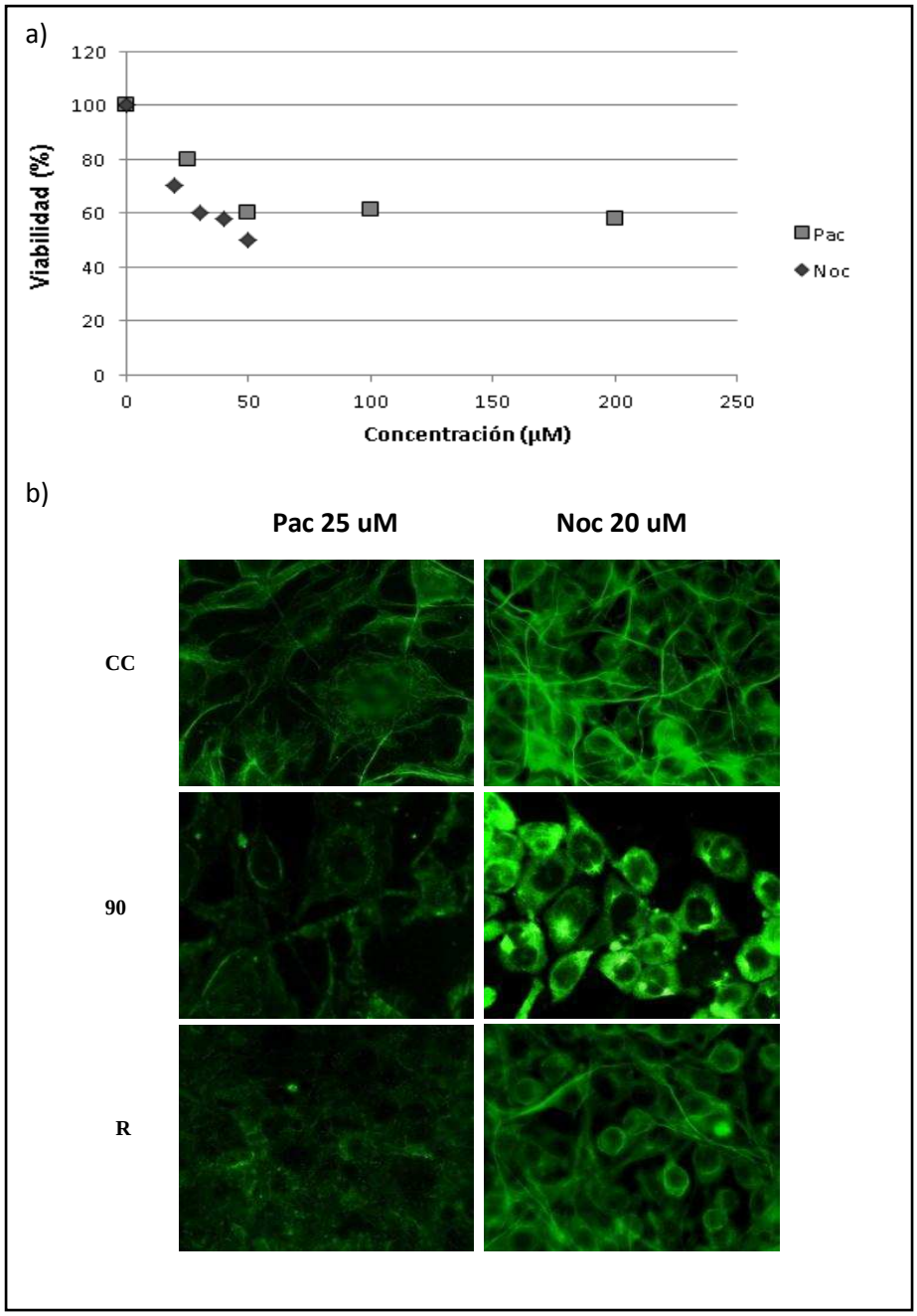

Figura 52: Efecto de Pac y Noc en la línea 3T3-DC-SIGN. a) Cultivos de estas células se incubaron con los compuestos por 90 minutos y se determinó la viabilidad celular por la técnica MTS. **b)** Cultivos de células 3T3-DC-SIGN se incubaron con los compuestos por 90 minutos (90) y las células se procesaron para IFI para evaluar el estado de los microtúbulos. Cultivos tratados por el mismo período y recuperados (R) con MM por 90 minutos más se procesaron para IFI para detectar tubulina. CC: control celular. Aumento 400x.

Una vez determinado el efecto de los compuestos sobre el citoesqueleto y la viabilidad celular, se estudió su acción sobre el sistema viral. Cultivos de células 3T3-DC-SIGN se incubaron con Pac 25 uM y Noc 20 uM por treinta minutos, y luego se infectó en presencia de los mismos. Luego de las 24 hs de infección, se cosecharon los sobrenadantes para ensayos de rendimiento viral por la técnica de UFP y los cultivos se fijaron para ensayos de IFI para detectar la expresión de la nucleoproteína.

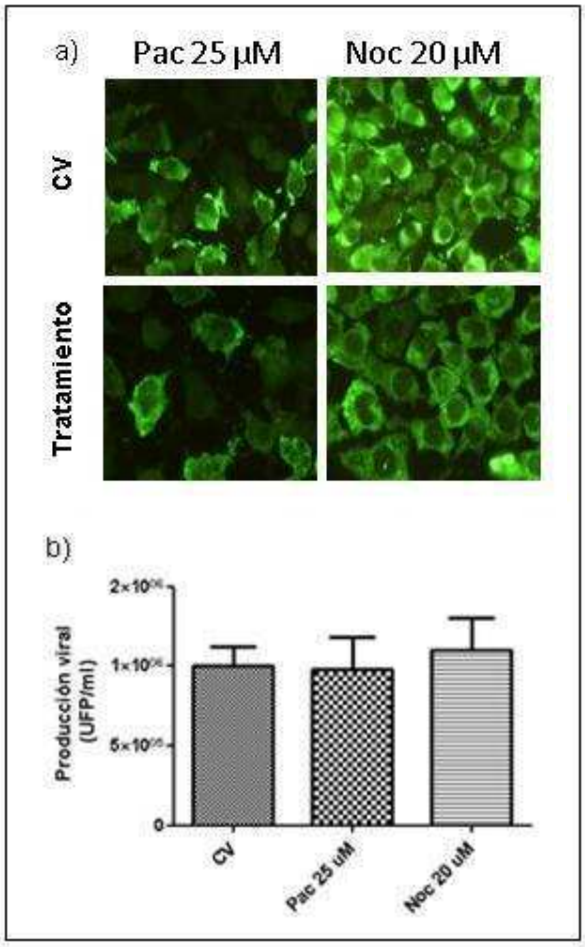

Figura 53: Rol de los compuestos desestabilizantes de los microtúbulos en la entrada por JUNV. **a)** Cultivos celulares fueron tratados con lo compuestos por 30 minutos y luego fueron infectados con JUNV (m.i.:0,1) en presencia de los mismos. A las 24 hs p.i. se fijaron las células para ensayos de IFI para detectar la expresión de NP (Aumento: 400x) y **b)** se cosecharon los sobrenadantes para evaluar la productividad viral por la técnica de UFP.

En la figura 53 se observa que los valores de UFP/ml de los cultivos tratados con ambos compuestos no presentan diferencias significativas respecto al control con MM. Así mismo, la expresión de la nucleoproteína NP no mostró variaciones entre los cultivos tratados y controles.

Estos resultados indican que la estabilidad de las fibras corticales de actina es necesaria para la entrada de JUNV, pero que la actina citoplasmática y la dinámica de los microtúbulos no presentan un rol esencial en la multiplicación de JUNV.

2.7. Estudio de la producción viral de JUNV en células poco permisivas 3T3.

Si bien este trabajo se concentra en la entrada de JUNV a través de DC-SIGN, se observa una infección basal en la línea que no expresa la lectina. Para estudiar la vía de entrada asociada a un receptor aún desconocido que permitiría la entrada de JUNV, se realizaron ensayos de producción viral por UFP a 24 hs p.i y de determinación de la síntesis de RNA viral a 4 hs p.i. en la línea murina 3T3, con los inhibidores farmacológicos de distintas vías utilizados en las 3T3-DC-SIGN: cloruro de amonio, Concanamicina A, Dynasore, Clorpromazina, Nistatina, Metil-β-ciclodextrina, Lantruculin A, Citochalasina D, Paclitaxel y Nocodazol. Los mismos mostraron tener igual efecto sobre esta línea que en los casos anteriores, es por eso, que se mantuvieron dichas concentraciones para los ensayos de rendimiento viral.

Habiendo corroborado la efectividad de las concentraciones de los inhibidores en los estudios anteriormente mencionados, se determinó su efecto sobre el sistema viral. Los cultivos se trataron e infectaron en presencia de los compuestos. A las 24 hs p.i se determinó el rendimiento viral por la técnica de UFP. La figura 54 muestra que los tratamientos, con los mismos compuestos que en la línea celular que expresa la lectina, tienen su efecto inhibitorio de la entrada de JUNV en esta línea murina.

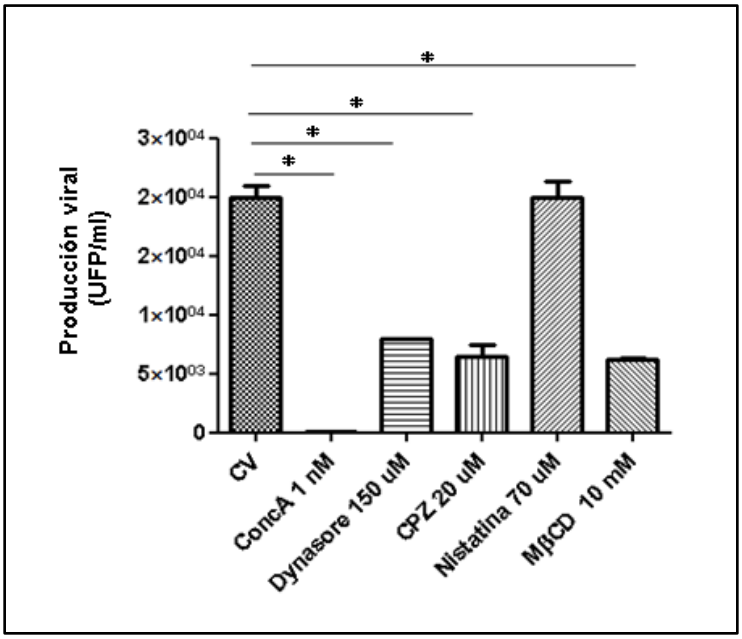

Figura 54. Efecto de los inhibidores farmacológicos en la infección de JUNV a células 3T3. Cultivos de células 3T3 se incubaron con los compuestos y se infectaron con JUNV (m.i.:0,1). A las 24 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes para ensayos de producción viral. *p<0,05.

Además, para comprobar que este efecto es específico de la entrada se trataron los cultivos con los compuestos luego de las dos horas de infección (Fig 55a). En estos ensayos no se observó inhibición del rendimiento viral, demostrando que la los resultados encontrados anteriormente se deben a las etapas tempranas del ciclo de multiplicación de JUNV. Por otro lado, para evaluar el efecto de los compuestos en la síntesis de RNA viral, se trataron los cultivos con los compuestos y se infectaron con JUN (m.i.:0,1) en presencia o ausencia de los compuestos según corresponda. A las 4 hs p.i. se trataron los cultivos con proteinasa K y se cosecharon las células para ensayos de PCR cuantitativa. Los resultados de producción viral fueron confirmados evaluando la expresión de RNA, demostrando que los mismos tienen efecto en la entrada de JUNV a los cultivos (Fig 55b).

Estos resultados proponen que la entrada de JUNV a la línea murina es una endocitosis dependiente de clatrina, al igual que lo encontrado para las líneas permisivas Vero y 3T3-DC-SIGN.

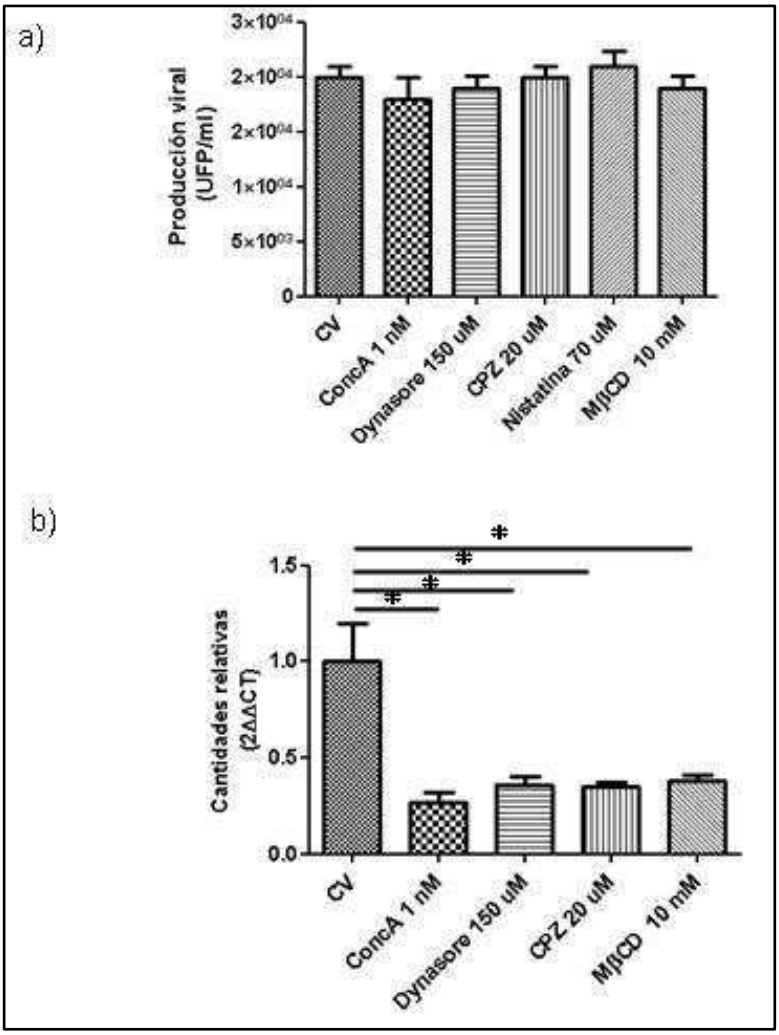

Figura 55: Controles del efecto en la entrada de los inhibidores farmacológicos en células 3T3. **a)** Los cultivos fueron infectados con JUNV (m.i.:0,1) y a las 2 hs p.i. se trataron con los compuestos por el tiempo correspondiente. Los sobrenadantes de 24 hs p.i. se titularon por la técnica de UFP. **b)** Los cultivos de células 3T3 se trataron con los compuestos por el tiempo indicado y se infectaron con JUNV (m.i.:2). A las 4 hs p.i. se trataron las células con proteinasa K y se procesaron para PCR cuantitativa. Se indican cantidades relativas. *p<0,05.

Para evaluar el rol del citoesqueleto en esta línea murina se repitieron los ensayos anteriores con LatA, CitD, Noc y Pac a las mismas concentraciones probadas en la línea murina que expresa la lectina, ya que ensayos de MTS demostraron no ser citotóxicos para estos cultivos.

Cultivos de células 3T3 se trataron con LatA 1 μM, CitD 1 μM, Noc 20 μM y Pac 25 μM y se infectaron los mismos en presencia de los compuestos (m.i.:0,1). Luego de las 24 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes para los ensayos de rendimiento viral. En los resultados de la figura 56 se puede observar que existe inhibición significativa de la producción viral solamente en los tratamientos con LatA.

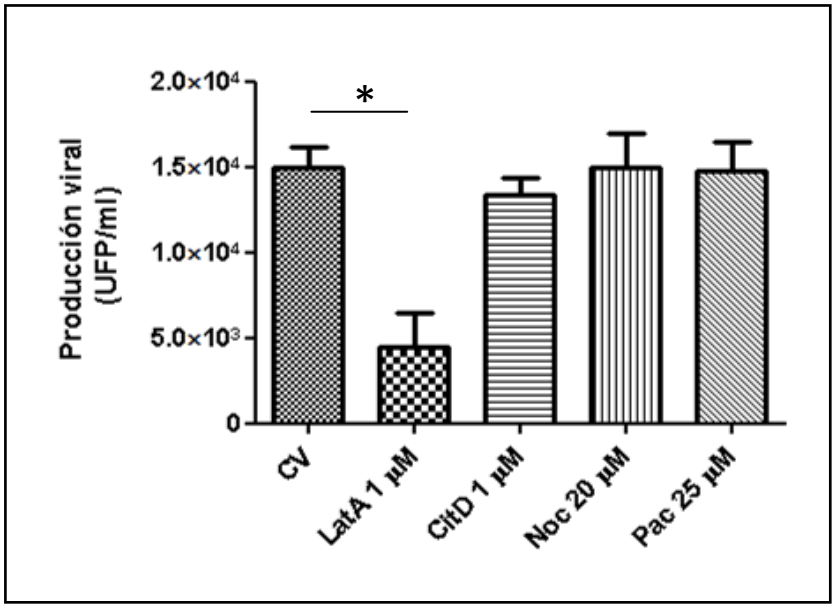

Figura 56: Efecto de los compuestos que alteran el citoesqueleto en la producción viral. Los cultivos de células 3T3 fueron tratados con los compuestos por 30 minutos e infectados con JUNV (m.i.:0,1) en presencia de los mismos. Los sobrenadantes de 24 hs p.i. se titularon por la técnica de UFP. *p<0,05.

Para verificar que la inhibición observada es en etapas tempranas se realizaron los controles de tratamiento con LatA a las dos horas posteriores a la infección y se titularon los sobrenadantes de 24 hs p.i. por la técnica de UFP. Los resultados de producción viral no mostraron reducción de la infectividad confirmando los efectos en la entrada de JUNV (Fig 57a).

Asimismo, se realizó la determinación de los niveles de RNA viral. Para ello, cultivos de células 3T3 se trataron con los compuestos por 30 minutos y se infectaron en presencia de los mismos. A las 4 hs p.i. se trataron los compuestos con proteinasa K y se cosecharon las células para la cuantificación del RNA viral. En la figura 55b se observa que el tratamiento con LatA reduce significativamente la cantidad de RNA viral en etapas tempranas.

Estos resultados se asemejan a los encontrados en la línea3T3-DC-SIGN, que deriva de esta, indicando la dependencia de los filamentos corticales de actina para su internalización.

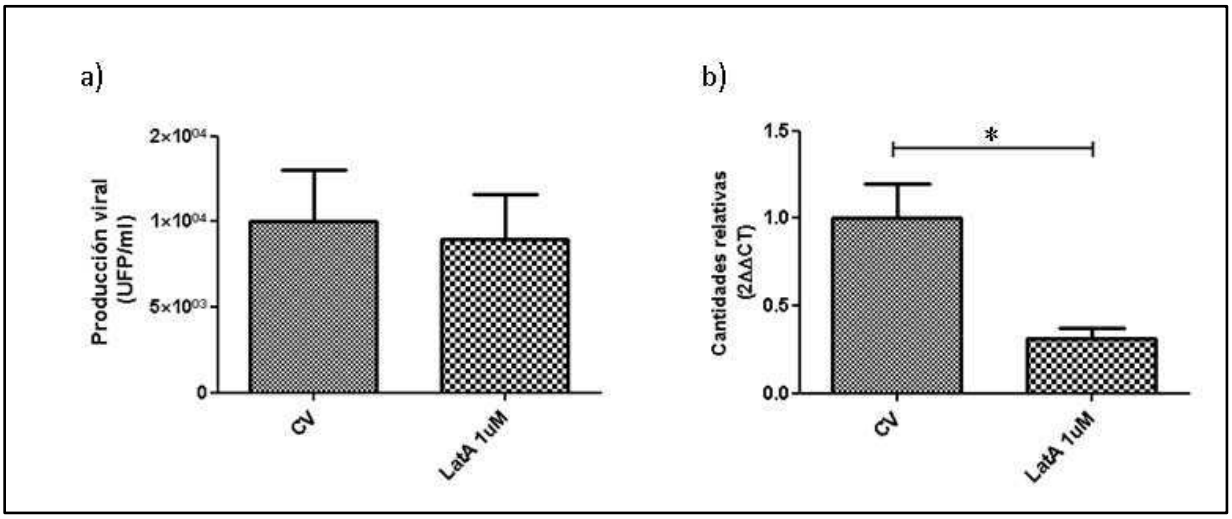

Figura 57: Controles del efecto de LatA en la entrada por JUNV. a) Cultivos de células 3T3 se infectaron con JUNV (m.i.:0,1) y a las 2 hs p.i. se trataron con el compuesto por 90 minutos. Los sobrenadantes de 24 hs p.i. se cosecharon y se titularon por la técnica de UFP. **b)** Cultivos de células 3T3 se trataron con el compuesto por 30 minutos y se infectaron con JUNV (m.i.:0,1) en presencia del mismo. A las 4 hs p.i. se trataron los cultivos con proteinasa K y se cosecharon las células para PCR cuantitativa. Se indican cantidades relativas. *p<0,05.

Conclusiones y Discusión

El virus Junín es uno de los arenavirus causante de fiebre hemorrágica en humanos. Distintos grupos de investigación han abordado el estudio de esta enfermedad y sus respectivos agentes etiológicos con el objetivo de esclarecer los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la infección. Hasta el momento no se conoce con exactitud la interacción del JUNV con la célula hospedadora y con el sistema inmunológico del organismo infectado, así como tampoco existen terapias antivirales efectivas. Los eventos tempranos del ciclo de replicación viral, tanto el reconocimiento del receptor específico como la adecuada internalización y desnudamiento constituyen una serie de eventos determinantes en el ciclo de replicación y el tropismo viral. Cada paso del mismo presenta requerimientos específicos y cada estructura celular utilizada representa un punto de estudio básico para la virología, es por eso que el conocimiento del ciclo de replicación viral es el punto de partida para el desarrollo de estrategias tendientes al control, cura y/o prevención de las enfermedades virales.

En este trabajo se profundizó la caracterización de la interacción virus-célula hospedadora a través de la interacción con lectinas de membrana como DC-SIGN. Así mismo, se ha prestado particular interés en los eventos tempranos del ciclo de replicación que se desencadenan luego de dicha interacción. Se estudiaron sobre todo las interacciones entre el JUNV y las membranas celulares, el citoesqueleto, así como también la interacción del virus con distintas proteínas involucradas en procesos endocíticos. Como ha sido descripto en el capítulo 2 de Resultados, al utilizar diferentes herramientas que inhiben específicamente las distintas vías de entrada, se ha demostrado que el JUNV utiliza principalmente la vía de vesículas recubiertas por clatrina para internalizarse en células que expresan DC-SIGN y que esta entrada depende del colesterol de membrana y de la integridad de los filamentos corticales de actina. El resumen final de los hallazgos de este trabajo se esquematiza en la figura 58.

. Interacción de JUNV con DC-SIGN

DC-SIGN interactua con varios virus como Citomegalovirus, Bunyavirus, Hepatitis C, Dengue, HIV, y los mismos la utilizan para infectar células dendríticas. Asi mismo, hepatitis

C, HSV-1, HSV-2 y el virus de la inmunodeficiencia simiana (SIV) utilizan esta lectina para favorecer su diseminación. (Van Kooyk y col., 2003; Lozach y col., 2011)

Martínez y col. (2013) demostraron que la expresión de la lectina humana DC-SIGN aumenta la infección en células susceptibles a la infección por JUNV y que la presencia de la misma en células no susceptibles es suficiente para su incremento. Sin embargo, hasta el momento no existían estudios que demuestren la interacción física de esta lectina con el virus o su glicoproteína.

En este trabajo ampliamos los estudios indirectos que caracterizan la interacción del virus con la lectina humana y sumamos herramientas que permiten confirmar su colocalización en la célula ya sea por técnicas de inmunoprecipitación como por microscopía confocal. Estos resultados nos permitieron comprobar que tanto JUNV como su glicoproteína GP1 por sí misma, se unen a DC-SIGN en distintos tipos celulares que la expresen estable o transitoriamente (Fig 25).

Los resultados de inmunoprecipitación conjunta de DC-SIGN con la glicoproteína de JUNV que se encontraron en la figura 27 es una evidencia fuerte de la interacción entre ambos.

Por otro lado, los resultados de las figura 26 demuestran la expresión de JUNV y DC-SIGN co-localizando en las membranas plasmáticas de células transfectadas establemente con esta lectina, así como también de células humanas con expresión endógena de DC-SIGN, que permite inferir la posible interacción natural durante la infección.

Corroboramos que esta interacción es dependiente de manosas y calcio. A pesar del amplio uso de las lectinas tipo C por los virus envueltos, el mecanismo de interacción entre el huésped y el patógeno no está del todo esclarecido, ya que se desarrollan distintas variaciones en la estrategia de infección y de utilización de DC-SIGN durante la misma. Se sabe que las glicoproteínas de HIV y Ébola pueden presentar distintos patrones de glicosilación dependiendo del tipo celular en el que fueron producidas, lo cual podría alterar la interacción con esta lectina (Simmons y col., 2003). De todos modos, no todos los

virus glicosilados pueden interactuar con DC-SIGN demostrando cierta especificidad en la interacción (Colmenares y col., 2002).

. Efecto de la glicosilación en la interacción de JUNV con DC-SIGN

En este caso, si bien el patrón de glicosilación de GP1 no está del todo dilucidado, se comprobó que el mismo permite la interacción con DC-SIGN. En este trabajo además analizamos la posibilidad de JUNV de interactuar con la lectina soluble Griffithsin que es reconocida por HIV. Por su amplio rango de concentraciones que permiten la unión de HIV y el bloqueo con su receptor, se han propuesto utilizar este compuesto como como espermicida para continuar con la lucha contra el SIDA. Sin embargo, en el caso de JUNV al infectar los cultivos con el virus previamente incubado con Griffithsin no encontramos inhibición de la producción viral. Estos resultados podrían explicarse por la falta de interacción con la misma o, en el caso de que existiera, tendría menor afinidad por JUNV que por DC-SIGN y sería desplazada en el momento de la infección.

Estudios de glicosilación diferencial mostraron que el virus Sinbis producido en células de mosquito presenta más eficiencia para unirse a DC-SIGN que aquel producido en mamíferos ya que presenta mayor proporción de manosas por la diferencia de procesamiento de carbohidratos en estas células (Tai y col, 2011). Si bien JUNV no replica en células de mosquito, se ha mimetizado este efecto de glicosilación diferencial con tratamientos de los cultivos con el inhibidor de mannosidasa 1-deoxymannojiromicina. Los resultados de las figuras 19 y 21 demuestran que estos tratamientos han resultado en *stocks* virales que al presentar más residuos de manosas aumentan la infección por DC-SIGN en un 50% con respecto al virus no modificado. Este inhibidor evita la remoción de un grupo de azúcares que se agregan en la ruta secretoria de las glicoproteínas dejando un patrón manosilado mayor que el convencional. De todas formas, si bien el aumento observado no es abundante, este inhibidor utilizado no afecta las manosidasas de retículo endoplasmático, por lo que el efecto podría ser mayor si se utilizara compuestos que también contemplen manosidasas del mismo.

Estos resultados hacen referencia a la especificidad de interacción entre la lectina y el patógeno que aún no está completamente dilucidado. Estudios de cristalización de la

lectina con JUNV y la obtención del patrón de glicosilación en GP1 serán herramientas importantes que ayuden a entender este fenómeno. Con estos mismos lineamientos, se han realizado estudios que revelan la interacción entre la glicoproteína viral y los anticuerpos neutralizantes del suero de convaleciente y el receptor de transferrina que reconoce JUNV (Mahmutovic y col., 2015). Ambos estudios permitirían la comprensión de las primeras etapas de la infección de JUNV *in vivo*.

. Rol de DC-SIGN en la infección por JUNV

Si bien es ampliamente reconocida la interacción de DC-SIGN con distintos virus envueltos, la mayoría de los estudios apuntan a un rol de DC-SIGN como factor de adhesión, el cual concentraría las partículas virales en la membrana para permitir la internalización por su receptor. De todos modos, en los últimos años han surgido estudios que demuestran el rol de receptor de DC-SIGN. Al parecer, los parámetros que definen esta determinación varían según los distintos autores.

La cola citoplasmática de DC-SIGN lleva secuencias aminoacídicas que están involucradas en señales de internalización y tránsito citoplasmático. Lozach y col. (2011) demostraron que en las células que expresan mutantes para estas secuencias el flebovirus UUKV no es internalizado, mientras que en el control la internalización fue posible. Por otro lado, Cambi y col. (2009) demostraron por inmuno-microscopía electrónica, junto con la utilización de mutantes de la cola citoplasmática, que HIV es efectivamente internalizado por DC-SIGN. Estos resultados comprueban que DC-SIGN no es un mero factor de adhesión, sino que es un verdadero receptor necesario para la internalización de estos virus.

Por el contrario, Wang y col. (2015) demostraron que la expresión de estas mutantes de endocitosis asi como la proteína salvaje permitieron la unión y la internalización del virus de la encefalitis japonesa. Así mismo, se ha comprobado que DENV interactúa con DC-SIGN pero esta no regula la internalización (Lozach y col, 2005). Para estos autores DC-SIGN tedría la función de factor de adhesión.

Por otro lado, Hofmann y col. (2013) proponen un rol de receptor de DC-SIGN para SFTSV a partir de trabajos con la glicoproteína purificada del mismo en células

transfectadas con la lectina y en células dendríticas en las que se observa un aumento de infección, aunque no verifican la capacidad endocitica de la misma con construcciones mutantes de los dominios involucrados.

Para el caso de los arenavirus, se ha demostrado que los virus Lassa y LCMV utilizan DC-SIGN como factor de adhesión en células dendríticas (Shimojima y col., 2012 y 2013).

En este trabajo, se demuestra que DC-SIGN cumple el rol de receptor en la entrada de DC-SIGN según los resultados de inhibición de la infección en las mutantes en comparación con la proteína salvaje (Figura 28). En los mismos se puede observar que la expresión de las mutantes para los dominios de internalización y tránsito citoplasmático a las 24 hs afecta la producción viral y la expresión de la nucleoproteína viral en un 50% comparado a los cultivos transfectados con la proteína salvaje. Estos ensayos son utilizados por primera vez en el análisis de la entrada de los arenavirus.

. Entrada dependiente de clatrina

En este trabajo se han utilizados inhibidores farmacológicos que han sido ensayados anteriormente en estudios de entrada de JUNV en células Vero, así como también para otros virus envueltos. Con compuestos como Dynasore, hemos encontrado que el mecanismo de entrada es una endocitosis. Y en particular, los tratamientos con Clorpromazina indican que la misma es dependiente de clatrina como se demuestra en la figura 38. Además existe una dependencia de la integridad de los microfilamentos de actina corticales para permitir la infección de JUNV. Por otro lado, hemos encontrado por primera vez en el estudio de la entrada de JUNV que existe una dependencia del colesterol de membrana celular para permitir la internalización viral.

Es conocido el efecto pleiotrópico de los inhibidores farmacológicos. Es por esto que las proteínas celulares dominantes negativas han demostrado ser una herramienta útil para analizar la función de las distintas proteínas involucradas en una determinada vía de tráfico intracelular. Cuando son expresadas a altas concentraciones, estas mutantes actúan solapando el efecto de las proteínas salvajes de la célula e inhibiendo su función. En estudios de entrada viral, han sido ampliamente utilizadas la expresión de proteínas

dominantes negativas para analizar el rol de la dinamina, que es la GTPasa requerida para liberar la vesícula de clatrina. Pero además de ser necesaria para la endocitosis mediada por clatrina la dinamina también es necesaria para la formación de caveolas (Henley y col., 1998), la exocitosis de vesículas derivadas de Golgi (Jones y col., 1998; Nicoziani y col.,2000), fagocitosis (Gold y col., 1999) y endocitosis no mediada por clatrina (Lamaze y col., 2001). Es por eso, que en paralelo se recurre al uso de moléculas que inhiban más específicamente la endocitosis mediada por clatrina. La más utilizada hasta el momento es la proteína Eps15, la cual se une al adaptador AP-2 requerido para la internalización a través de vesículas recubiertas con clatrina (Benmerah y col., 1998). Es por esto que estos inhibidores moleculares se utilizaron para determinar si estas moléculas están involucradas en la infección de JUNV, comprobando los efectos encontrados con los inhibidores farmacológicos, concluyendo que la vía principal de entrada es la endocitosis dependiente de vesículas recubiertas de clatrina (Fig 40).

. Rol de la actina en la entrada por endocitosis dependiente de clatrina.

Parton y col. (1994) descubrieron que la actina está involucrada en la endocitosis dependiente de clatrina ya que la misma se inhibe con la perturbación del citoesqueleto. (Schnitzer y col., 1994; Deckert y col., 1996), pero Lamaze y col. (1997) determinaron que no es necesario para la invaginación. La diferencia entre la cinética de incorporación de LDL, Reovirus e Influenza sugiere que existen amplios modelos de la iniciación de la endocitosis dependiente de clatrina y pueden involucrar distintos mecanismos de ensamble y posiblemente distintos destinos del ligando. En *S. cerevisae*, la maquinaria del citoesqueleto de actina se recluta a las zonas ricas en clatrina y ejercen la fuerza para la deformación de la membrana y la internalización. En ese caso se forman canastas de clatrina incompletos y más grandes que los convencionales. En el caso de VSV que es internalizado por endocitosis dependiente de clatrina, la formación de la canasta requiere polimerización de actina para su internalización (Cureton y col., 2009).

En este trabajo corroboramos que los efectos de Citochalasina D no afectan la infección por JUNV en esta línea celular pero si se observó inhibición significativa con Latruculin A (Fig 49). Se sabe que la diferencia entre estos compuestos reside en que la

CitD presenta mayor efecto de alteración de las fibras de actina citoplasmáticas, dejando las corticales intactas. Es por este motivo que las diferencias encontradas en la infección de JUNV se pueden explicar con la necesidad de mantener la integridad de los filamentos corticales para la entrada. Como se ha postulado por los autores mencionados anteriormente, la necesidad de los filamentos corticales podría facilitar la invaginación de las vesículas de clatrina, aunque no se observe este comportamiento en la mayoría de los casos de este tipo de endocitosis.

. Uso de colesterol en la entrada dependiente de clatrina.

La composición de los *rafts* lipídicos varía entre tipo celular. Un cambio en el contenido de colesterol en la membrana afecta su viscosidad, por lo tanto, la exposición de las proteínas de membrana y la interacción entre estas y proteínas citosólicas. La MβCD presenta un efecto bloqueante de la endocitosis dependiente de clatrina, ya que algunas proteínas involucradas en la curvatura de las canastas de clatrina, como por ejemplo proteínas de unión a GTP, necesitan del mismo. También podrían afectar la asociación de otras moléculas de la canasta, la unión entre sí de proteínas de membrana o de la formación de invaginaciones por otros lípidos de membrana (Kilsdonk y col., 1995; Criado y co.l, 1982). Rodal y col., 1999 demostraron que los tratamientos en líneas MDCK con MβCD 10 μM no alteran la permeabilidad celular y que permiten la unión de la transferrina en membrana, pero se ve alterado la endocitosis dependiente de clatrina, por la remoción de colesterol. Si bien se observan parches de clatrina luego del tratamiento con el compuesto, es su curvatura la que se ve afectada por el mismo. Así mismo, Hambleton y col. (2007) demostraron que el mecanismo mayoritario de entrada del virus Varicella-zoster es la endocitosis dependiente de clatrina, y que dicho mecanismo requiere del colesterol en membrana.

En este trabajo se ha demostrado en las figuras 42, 43 y 44 la inhibición de la entrada de JUNV con el compuesto MβCD y no así con Nistatina. El efecto diferencial de ambos que se observa en estos compuestos se explica, por un mecanismo de acción diferente entre ambos en la alteración del colesterol de membrana. Como se explicó

anteriormente, la MβCD altera la concentración de colesterol en membrana y si bien ha sido asociado a una inhibición de vías dependientes de *rafts* lipídicos como la endocitosis dependiente de caveolas, la información brindada por varios autores han encontrado un rol del colesterol y los *rafts* lipídicos en la entrada dependiente de clatrina. Por otro lado, la independencia de la entrada por caveolas ha sido corroborada con la utilización de las construcciones dominantes negativas de caveolina1 (Fig 41).

Uso de colesterol en la entrada de DC-SIGN

La organización de DC-SIGN en la membrana es crítica para la unión de patógenos. Cambi y col. (2004) utilizando estudios de alta resolución para evaluar la distribución de DC-SIGN en la membrana, determinaron que esta lectina se encuentra organizada en dominios bien definidos que colocalizan con *rafts* lipídicos. Estos dominios actúan como sitio de anclado para HIV facilitando la entrada. Además, la inhibición con Metil-β-ciclodextrina de DC-SIGN explica la relación con estos *rafts* lipídicos. Estos estudios demostraron que en la superficie celular de células dendríticas intermedias, DC-SIGN está distribuida al azar en la membrana plasmática, y apenas puede unir partículas de tamaño viral. Por el contrario, en las células dendríticas inmaduras esta lectina se organiza en microdominios que le permite la unión de partículas virales de 40 nm.

Torreno- Pina y col. (2014) revelaron el importante rol de los glicanos de superficie en regular la organización y las interacciones rio abajo que conllevan. A partir de técnicas de estudio basadas en molécula única evaluaron directamente el impacto de las interacciones basadas en glicanos del DC-SIGN en la organización de membrana y en la interacción con clatrina durante la unión al patógeno glicosilado. Estos resultados sugieren que la unión dependiente de carbohidratos no influencia la organización lateral a nivel de nanoescala, pero restringe la movilidad del receptor a regiones de membrana de tamaños de micrones. Estas regiones están enriquecidas en clatrina, aumentando la probabilidad de encuentro al azar entre la lectina y clatrina. La remoción o la neutralización de los glicanos llevan a una exploración mayor de la membrana, reduciendo la probabilidad de encuentro e internalización por clatrina. La interacción mediada por azúcares no contribuye al agrupamiento del receptor ni promueve la interacción dinámica entre los mismos, sino que

afectan la movilidad lateral en áreas de la superficie celular. Así mismo, demostraron que DC-SIGN se aloja en regiones permisivas de membrana enriquecidas en clatrina y que son parches especializados en actina cortical que podría eficientemente organizar las canastas. El mecanismo por el cual los ligandos glicosilados censan las zonas ricas en clatrina se explica de modo tal que podría haber áreas de la membrana celular enriquecidas en actina donde varias moléculas colocalizan en espacio y tiempo como CD44 (el receptor en estudio en este trabajo) y clatrina. DC-SIGN puede ser mantenida en estas regiones a través de las interacciones con CD44 que podría mantener unidas ambas proteínas a través de sus dominios glicosilados. Estos resultados apoyan los resultados que indican la necesidad de la endocitosis dependiente de clatrina y de colesterol de membrana.

. Infección en células 3T3

Muchos estudios reportaron que las especies *Mus* de roedores eran refractarias a la infección por el clado B de los mammarenavirus del Nuevo Mundo, por diferencias polimórficas de la región de unión de GP1 al receptor de transferrina. A pesar de esto, se demostró que las células murinas permiten la infección por JUNV a través de la glicoproteína GP1 pero no utilizando el receptor de transferrina, sino que la entrada es mediada por alguna otra molécula presente en las células de ratón, pero que la entrada sigue siendo dependiente de pH ácido por los tratamientos con Bafilomicina A. A su vez, estudios en ratones demostraron que la inducción del sistema inmune innato ocurre temprano en la infección y tal vez previamente a la internalización y que la entrada es permitida por receptores tipo *toll* 2 (TLR2). También se ha demostrado que este virus activa células centinela vía TLR2, lo cual puede indicar una respuesta inmune innata común a los arenavirus (Cuevas y col., 2011).

En este trabajo, si bien el receptor presente en la línea murina 3T3 no ha sido determinado, pudimos agregar a los estudios anteriores que JUNV entra a las células mencionadas por un mecanismo de endocitosis dependiente de clatrina, con necesidad del colesterol de membrana y la integridad de los microfilamentos de actina corticales al igual que en la línea 3T3-DC-SIGN. Estos resultados son esperables, ya que la vía de endocitosis dependiente de clatrina es una de las vías de entrada más utilizadas por los virus.

. Modelo propuesto para la infección de JUNV en células 3T3-DC-SIGN.

Resumiendo los resultados encontrados en la infección del virus Junín a través de la utilización de DC-SIGN como receptor, podemos proponer un modelo (Fig 58) en el cual, la lectina tipo C DC-SIGN se presenta en microdominios ricos en colesterol que facilitarían el encuentro de la lectina con JUNV en las zonas ricas en clatrina. Una vez reconocido JUNV por DC-SIGN a través de los residuos ricos en manosas de su GP1 y con la presencia de calcio en el dominio DRC de esta lectina, se induciría una endocitosis dependiente de dinamina II y Eps15 que es compatible con la vía dependiente de clatrina. La misma sería facilitada por la presencia de las fibras de actina corticales en una manera aun no dilucidada. Así mismo, la endocitosis de la lectina es posible gracias a la señalización de su dominio citoplasmático LL. Esta endocitosis prosigue a endosomas tempranos y se realizaría la fusión a pH citoplasmático ácido, pero a uno mayor al alcanzado en las células Vero, ya que no se ha observado la utilización de los endosomas tardíos.

Estos últimos resultados, que difieren con los encontrados para otros arenavirus o JUNV en otros sistemas celulares, deberán continuar siendo estudiados para explicarlos más detalladamente y confirmarían la existencia de diferencias en las vías de entrada de las infecciones virales según el sistema celular.

El conocimiento de la utilización de la lectina DC-SIGN en la vía de entrada de JUNV aporta información sobre el mecanismo de replicación básico, que permitirá contribuir al enriquecimiento en la comprensión de la patogénesis de la Fiebre Hemorrágica Argentina para poder realizar nuevos tratamientos y vacunas más seguros.

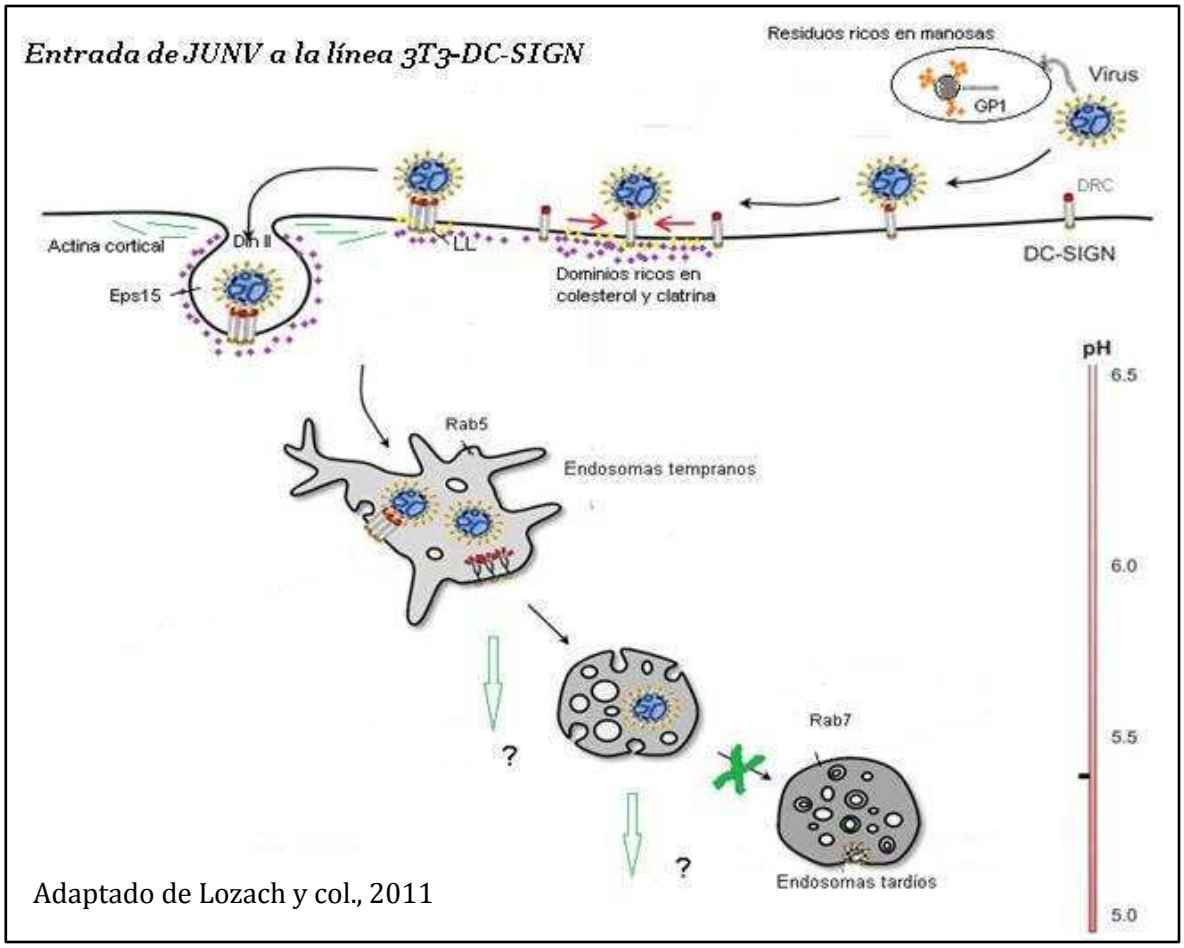

Figura 58: Esquema de ciclo de entrada de JUNV a la línea 3T3-DC-SIGN. A partir de los resultados de este trabajo, proponemos que la entrada de JUNV en células que expresan DC-SIGN es un mecanismo endocítico que depende de vesículas recubiertas de clatrina (Eps15 y Din II). Este proceso requiere de la integridad de los filamentos de actina corticales y del colesterol de membrana. Asimismo, la entrada es dependiente de pH ácido y utiliza endosomas tempranos pero no así los tardíos para las etapas tempranas consiguientes a la internalización.

Bibliografía

- **Abraham** J, Corbett KD, Farzan M, Choe H, Harrison SC. (2010). "Structural basis for receptor recognition by New World hemorrhagic fever arenaviruses". Nat Struct Mol Biol. Apr; 17(4):438-44.
- **Adema**, Y. van Kooyk, and C. G. Figdor. (2000). "Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses". Cell 100:575–585.
- **Agnihothram** SS, York J, Trahey M, Nunberg JH. (2007). "Bitopic membrane topology of the stable signal peptide in the tripartite Junín virus GP-C envelope glycoprotein complex". J Virol. Apr; 81(8):4331-7.
- **Albariño**, C. G., P. D. Ghiringhelli, et al. (1997). "Molecular characterization of attenuated Junin virus strains." J Gen Virol 78 (Pt 7): 1605-10.
- **Ambrosio**, A., Enria D, et al. (1986). "Junin virus isolation from lymphomononuclear cells of patients with Argentine hemorrhagic fever." Intervirology 25(2): 97-102.
- **Armstrong** C, et al (1934). "Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic." Public Health Republic 49: 1019-1027.
- **Aronson**, J,Herzog N, et al. (1995). "Tumor necrosis factor and the pathogenesis of Pichinde virus infection in guinea pigs." Am J Trop Med Hyg 52(3): 262-9.
- **Azad**, A., Torrelles, J & Schlesinger, L. (2008) "Mutation in the DC-SIGN cytoplasmic triacidic cluster motif markedly attenuates receptor activity for phagocytosis and endocytosis of mannose-containing ligands by human myeloid cells". J. Leukoc. Biol. 84, 1594–1603.
- **Belmont-Williams** R. (1986). "Lassa fever: effective therapy with ribavirin". N Engl J Med. Jan 2; 314(1):20-6.
- **Benmerah** A, Bégue B, Dautry-Varsat A, Cerf-Bensussan N. (1996). "The ear of alpha-adaptin interacts with the COOH-terminal domain of the Eps 15 protein". JBiol Chem. May 17; 271(20):12111-6.
- **Benmerah** A, Gagnon J, Bègue B, Mégarbané B, Dautry-Varsat A, Cerf-Bensussan N. (1995). "The tyrosine kinase substrate eps15 is constitutively associated with the plasma membrane adaptor AP-2".J Cell Biol. Dec; 131(6 Pt2):1831-8.
- **Bergold** G. H., Gonzalez Marquez L.A., y col. (1969). "Structure of nine arboviruses". J Gen Virol 5(1): 135-40.
- **Bernhard** O, Lai J, Wilkinson J, et al. (2004) "Proteomic analysis of DC-SIGN on dendritic cells detects tetramers required forligand binding but no association with CD4". JBC 279(50): 51828- 51835.
- **Borrow** P., Oldstone M.B. (1994). "Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells". Virology 198(1):1-9
- **Bourne** HR, Sanders D, McCormick F. (1991). "The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism". Nature. 349(6305):117-27.
- **Briggiler** A, Sinchi A, Coronel F, Sánchez Z, Levis S, Taylor J, Enria D. (2015) "New transmission scenarios of the Argentine hemorrhagic fever since the introduction of the live attenuated junin virus vaccine (Candid #1): an experience in migrant workers". Rev Peru Med Exp Salud Publica. Jan-Mar; 32(1):165-71.
- **Brodsky** F., Chen C.Y., Knuehl C., Towler M.C., Wakeham D.E. (2001). "Biological basket weaving: formation and function of clathrin coated vesicles". Annual Review of Cell and Developmental Biology 17, 517-568.

- **Buchmeier** M, et al. (2002). "Arenaviruses: protein structure and function". Curr Top Microbiol Immunol.; 262:159-73. Review.
- **Buchmeier**, M. J., P. J. Southern, et al. (1987). "Site-specific antibodies define a cleavage site conserved among arenavirus GP-C glycoproteins." J Virol 61(4):982-5.
- **Burke**, E., Dupuy, L., Wall, C., Barik, S.(1998). "Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus". Virology 252(1), 137-148.
- **Burns** J.W., Buchmeier M.J. (1991). "Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus". Virology 183(2): 620-9.
- **Cambi** A, Frank de Lange, Noortje M. van Maarseveen, et al. (2004) "Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells". J Cell Biol. 164(1): 145–155..
- **Candurra** N.A., Lago M.J., Maskin L, Damonte E.B. (1999). "Involvement of the cytoskeleton in Junin virus multiplication". Journal of General Virology 80, (Pt 1), 147-56.
- **Cao**, W., Henry, M.D., Borrow P., Yamada H., Elder J.H., Ravkov E.V., Nichol S.T., Compans R.W., Campbell K.P., Oldstone M.B. (1998). "Identification of alphadystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus". Science.Dec11; 282(5396):2079-81.
- **Caparrós** E, Munoz P, Sierra- Filardi E, et al. (2006) "DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production". Bllod 107(10): 3950.
- **Carro**, A.C. & Damonte, E.B., (2013). "Requirement of cholesterol in the viral envelope for dengue virus infection". Virus Research 174: 78-87.
- **Castilla** V., Mersich S.E., y Damonte EB. (1992). "Lysosomotropic compounds inhibiting the multiplication of junin virus". Rev Argent Microbiol 23(2): 86-9.
- **Castilla** V., Mersich S.E., y Damonte EB. (1991). "Lysosomotropic compounds inhibiting the multiplication of junin virus". Rev Argent Microbiol 23(2): 86-9.
- **Castilla**, V., Mersich, S. E., Candurra, N. A. & Damonte, E. B. (1994). "The entry of Junin virus". Arch Virol. 141(7):1307-17.
- **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.
- **Clegg** J, Buchmeier M, Gonzalez J, Peters C, Rico-Hesse R, RomanowskiV (2000). "Family Arenaviridae". In: Regenmortel MHV van, Fauquet, CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (eds). Virus Taxonomy. (Seventh report of International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic, Orlando.)
- **Clement**, C. et al., (2006). "A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry". JBC, 174(7), pp.1009–1021.
- **Colmenares** M, Puig-Kröger A, Pello OM, Corbí AL, Rivas L. (2002). "Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for Leishmania amastigotes". J Biol Chem. 277: 3676-79.
- **Cook** TA, Urrutia R, McNiven MA. (1994). "Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues". Proc Natl Acad Sci USA 91(2):644-8.

- **Cordo** S, Candurra N. (2003) "Intermediate filament integrity is required for Junin virus replication". Virus Research 97:47-55.
- **Cordo** SM, Valko A, Martinez GM, Candurra NA. (2013). "Membrane localization of Junín virus glycoproteins requires cholesterol and cholesterol rich membranes". Biochem Biophys Res Commun. Jan 18;430(3):912-7
- **Coyne** C, Bergelson JM. (2006) "Virus induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions". Cell.; 124(1):119–131.
- **Cuevas**, C. D., Lavanya, M., Wang, E. & Ross, S. R. (2011) "Junin Virus Infects Mouse Cells and Induces Innate Immune Responses". J. Virol. 85, 11058–11068.
- **Cureton** D, Massol R, Saffarian S, et al. (2009) "Vesicular Stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clatrhin that depend upon actin for internalization". PLoS Pathog. 5(4): e1000394.
- **Damke** H, Baba T, Warnock DE, Schmid SL. (1994). "Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation". J Cell Biol. 127(4):915-34.
- **Damonte** E.B., Mersich S.E., Candurra N.A., Coto C.E. (1986). "Cross reactivity between Junin and Tacaribe viruses as determined by neutralization test and immunoprecipitation". Med. Microbiol. Inmunol., 175, 85-88.
- **De** B.P., Lesoon, A., Banerjee, A.K. (1991). "Human parainfluenza virus type 3 transcription in Vitro: role of cellular actin in mRNA synthesis". J. Virol. 65 (6), 3268-3275.
- **Deckert M** et al, (1996) "Endocytosis of GPI- anchored proteins in human lymphocytes: role of glycolipid- based domains, actin cytoskeleton, and protein kinases". JBC 133(4): 791.
- **Dennis** J et al (2009) "Adaptative regulation at the cells surface by N- glycosylation". Traffic 10 (11): 1569-79.
- **Di Simone**, C., M. A. Zandonatti, Buhcmeier M.J. (1994). "Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike." Virology 198(2): 455-65.
- **Downs** W, Anderson C, Spence L, Aitken T & Greenhal A (1963) "Tacaribe virus, a new agent isolated from Artibeus bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies" Am J Trop Med Hyg. 12, 640.
- **Dzionek** A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Günther G, Johnston I, Lanzavecchia A, et al (2001). "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction". J Exp Med.194(12):1823-34
- **Eddy** GA, Wagner FS, Scott SK, Mahlandt BJ. (1975). "Protection of monkeys against Machupo virus by the passive administration of Bolivian haemorrhagic fever immunoglobulin (human origin)". Bull World Health Organ.; 52(4-6):723-7.
- **Ehrlich**, M., Boll, W., Van Oijen, A., Hariharan, R., Chandran, K., Nibert, M. L. & Kirchhausen, T. (2004). "Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits". Cell 118, 591-605.
- **Eichler** R, Lenz O, Strecker T, Eickmann M, Klenk HD, Garten W. (2003). "Identification of Lassa virus glycoprotein signal peptide as a trans-acting maturation factor". EMBO Rep. Nov; 4(11):1084-8.
- **Ellenberg** P1, Linero FN, Scolaro LA. (2007) "Superinfection exclusion in BHK-21 cells persistently infected with Junín virus". J Gen Virol. Oct; 88 (Pt 10):2730-9.

- **Ellenberg**, P., M. Edreira, Lozano M, Scolaro L (2002). "Synthesis and expression of viral antigens in Vero cells persistently infected with Junin virus." Arch Virol 147(8):1543-57.
- **Emau** P, Tian B, O´Keefe B, et al (2007) "Griffithsin, a potent HIV entry inhibitor, is an excellent candidate for anti-HIV microbicide". J. Med Prmatol 36: 244- 253.
- **Enria** DA, Ambrosio AM, Briggiler AM, Feuillade MR, Crivelli E; (2010) Study Group on Argentine Hemorrhagic Fever Vaccine. "Candid#1 vaccine against Argentine hemorrhagic fever produced in Argentina. Immunogenicity and safety".Medicina (B Aires); 70(3):215-22.
- **Enria** DA, Maiztegui JI. (1994). "Antiviral treatment of Argentine hemorrhagic fever". Antiviral Res. Jan; 23(1):23-31.
- **Feng** Y, Press B, Wandinger-Ness A. (1995). "Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic". J Cell Biol. 131(6 Pt 1):1435-52.
- **Figdor** CG, van Kooyk Y, Adema GJ. (2002). "C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells". Nat Rev Immunol. Feb; 2(2):77-84. Review.
- **Franze-Fernandez** M.T., Zetina C., Lapalucci s., Lucero M.A., Boissou C., Lopez R., Rey O., Daheli M., Cohen G.N., Zakin M.M. (1987). "Molecular structure and early events in the replication of Tacaribe arenavirus S RNA". Virus res. 7, 309-24.
- **Fuller-Pace**, F. V. and P. J. Southern (1989). "Detection of virus-specific RNA dependent RNA polymerase activity in extracts from cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus: in vitro synthesis of full-length viral RNA species." J Virol 63(5): 1938-44.
- **Galindo** I et al (2015) "African Swine Fever Virus infects macrophages, the natural host cells, via clathrin- and cholesterol-dependent endocytosis". Virus Research 200: 45–55.
- **Garcia**, C., B. N. Brousse, García CC, Brousse BN, Carlucci MJ, Moglioni AG, Martins Alho M, Moltrasio GY, D'Accorso NB, Damonte EB. (2003). "Inhibitory effect of thiosemicarbazone derivatives on Junin virus replication in vitro." Antivir. Chem Chemother 14(2): 99-105.
- **García** CC, Djavani M, Topisirovic I, Borden KLB, Salvato MS, Damonte EB. "Arenavirus Z protein as an antiviral target: virus inactivation and protein oligomerization by zinc finger-reactive compounds". The Journal of general virology. 2006; 87(Pt 5):1217-1228.
- **Garcin**, D., Rochat, S. & Kolakofsky, D. (1993) "The Tacaribe arenavirus small zinc finger protein is required for both mRNA synthesis and genome replication" J Virol. 67, 807-12.
- **Geijtenbeek**, T. B., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J. (1999). "Dynamin 2 is requires for phagocytosis in macrophages". Journal of Experimental Medicine 190, 1849-1856.
- **Geijtenbeek**, T. B., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J.Geisbert TW, Jahrling PB. (2004). "Exotic emerging viral diseases: progress and challenges". Nat Med. 10 (12):110-21. Review.
- **Gerondopulos** A., et al (2010) "Murine norovirus-1 cell entry is mediated through a non-clathrin-, non-caveolae-, dynamin - and cholesterol-dependent pathway". Journal of General Virology 91(Pt 6):1428-38.
- **Ghazal**, P. et al. (2000). "Viruses: hostages to the cell". Virology, 275(2), pp.233–237.

- **Ghiringhelli**, P. D., C. G. Albarino, et al. (1997). "The glycoprotein precursor gene of the atenuated Junin virus vaccine strain (Candid #1)." Am J Trop Med Hyg 56(2): 216- 25.
- **Gold** E.S., Underhill D.M., Morrissette N.S., Guo J., McNiven M.A., Aderem A.(1999). "Dynamin 2 is requires for phagocytosis in macrophages". Journal of Experimental Medicine 190, 1849-1856.
- **Goncalves**, A. et al. "Role of DC-SIGN in Lassa Virus Entry into Human Dendritic Cells". J. Virol. 87, 11504–11515 (2013).
- **Gray** NW, Fourgeaud L, Huang B, Chen J, Cao H, Oswald BJ, Hémar A, McNiven MA. 2003). "Dynamin 3 is a component of the postsynapse, where it interacts with mGluR5 and Homer". (. Curr Biol. 13(6):510-5.
- Greber 2002
- **Hambleton** S, Steinberg S, Gershon M, Gershon A. (2007) "Cholesterol dependence of Varicella- Zoster virions entry into target cells". J Virol. 81(14): 7548- 7558.
- **Heikkilä** O, Susi P, Tevaluoto T, Härmä H, Marjomäki V, Hyypiä T, Kiljunen S. (2010) "Internalization of coxsackievirus A9 is mediated by B2-microglobulin, dynamin, and Arf6 but not by caveolin-1 or clathrin". J Virol. 84(7):3666-81.
- **Heller** M, Marta R, Sturk , Maiztegui J, Hack C, Cate J, Molinas F (1989). "Early markers of blood coagulation and fibrinolysis activation in Argentine hemorrhagic fever" Rev Infect Dis. May-Jun; 11 Suppl 4:S762-70.
- **Henley**, J.R. et al., (1998). "Dynamin-mediated internalization of caveolae. The Journal of cell biology", 141(1), pp.85–99.
- **Hofmann** M, et al, (2013) "Differential sensitivity of bat cells to infection by envoleped RNA viruses: coronaviruses, paramyxoviruses, filoviruses, and influenza viruses". Plos One 8(8): e72942.
- **Holla** P, et al (2015) "Hepatitis E virus enters liver cells through a dynamin-2, clathrin and membrane cholesterol- dependent pathway". Traffic 16(4) 398- 416
- **Hoorebeke** B, XXue J, LiWang P, Balzarini J. (2013) "Role of carbohydrate- binding Sites of Griffithsin in the prevention of DC-SIGN- mediated capture and transmission of HIV-1". Plos One 8(5): e64132.
- **Howard**, C. R. (1986) "Arenaviruses" In: Perspectives in medical virology. Vol 2.
- Amsterdam: Elsevier, 1986
- **Jones** S.M., Howel K.E., Henley J.R., Cao H., McNiven M.A. (1998). "Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-golgi network".Science 279, 573-577.
- **Kenyon** R.H., McKee K.T., Jr., y col (1992). "Aerosol infection of rhesus macaques with Junin virus" Intervirology 33(1): 23-31.
- **Kerr**, M.C. & Teasdale, R.D., 2009. Defining macropinocytosis. Traffic, 10(4), pp.364–371.
- **Kerur** N, Valiya M, Sharma- Walla S, et al. (2010) "Characterization of entry and infection of monocytic THP-1 cells by Kaposi´s sarcoma associated Herpesvirus (KSHV): role of heparin sulfate, DC-SIGN, integrins and signaling."
- **Kilsdonk** E, et al (1995) "Cellular cholesterol efflux mediated by ciclodextrins". J Biol. Chem 270: 17250-6.

- **Kirchhausen** T, Macía E, Pelish H (2008) "Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis". Methods Enzymol. 438: 77-93.
- **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.
- **Kwon** D, Gregorio G, Bitton N, et al, (2002) "DC-SIGN mediated internalization of HIV is required for Trans- enhancement of T cell infection". Immunity 16: 135-144.
- **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.
- **Lamaze** C., Dujeancourt A., Baba T., Lo C., Benmerah A., Dautry-Varsat A. (2001). "Interleukin 2 receptors and detergent-resistent membrane domainsdefine a clathrin-independent endocytic pathway". Molecular cell 7, 661-671.
- **Lee**, K. J., I. S. Novella, et al. (2000). "NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs." J Virol 74(8): 3470-7.
- **Lehmann-Grube**, F. (1972). "Persistent infection of the mouse with the virus of lymphocytic choriomeningitis." J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol) 6: 8-21.
- **Lei**, Y. et al. (2015)" Characterization of N-Glycan Structures on the Surface of Mature Dengue 2 Virus Derived from Insect Cells". PLoS One 10, e0132122.
- **Linero**, F. N. & Scolaro, L. a. "Participation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in Junín virus replication in vitro". Virus Res. 145, 166–170 (2009).
- **Londrigan** S, Turville S, Tate M, et al. (2011) "N-linked glycosylation facilitates sialic acid- independent attachment and entry of influenza A virus into cells expressing DC-SIGN or L-SIGN". J.Virol. 85(6): 2990- 3000.
- **Lozach** P, Lortat- Jacob H, et al. (2003) "DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2". J Biol Chem 278: 358-366.
- **Lozach** PY, Burleigh L, Staropoli I, Amara A. (2007). "The C type lectins DC-SIGN and L-SIGN: receptors for viral glycoproteins". Methods Mol Biol 379:51-68.Review.
- **Lozach**, P. Y. et al. "DC-SIGN as a receptor for phleboviruses". Cell Host Microbe 10, 75–88 (2011).
- **Lozach**, P.-Y. et al. (2005) "Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3-grabbing Non-integrin (DC-SIGN)-mediated Enhancement of Dengue Virus Infection Is Independent of DC-SIGN Internalization Signals". J. Biol. Chem. 280, 23698–23708
- **Mabit** H, et al (2002) "Intact microtubules support adenovirus and Herpes simple virus infection". J vir 76: 9962- 71.
- **Macia** E. Ehrlich M, et al (2006)" Dynasore, a cell- permeable inhibitor of dynamin". Dev Cell 10: 839- 50.
- **Mahtmutovic** S, Clark L, Levis S, et al. (2015) "Molecular basis for antibody-mediated neutralization of the New World hemorrhagic fever mammarenavirus". Cell Host and Microbe 18:705- 713.
- **Maiztegui** J, et al (1998). "Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine hemorrhagic fever". AHF Study Group. J Infect Dis 177, 277-83.
- **Maiztegui** J. I. (1975). "Clinical and epidemiological patterns of Argentine hemorrhagic fever". Bull World Health Organ 52(4-6): 567-75.

- **Mariño** K, Bones J, Kattia J, Rudd P. (2010) "A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze". Nature Chem, Biol. 6: 713- 723.
- **Marsh** M, Helenius A (1980). "Adsorptive endocytosis of Semlinki Forest virus". Journal of Molecular Biology 142, 439-454.
- **Martinez Segovia** Z. M., De Mitri M.I. (1977). "Junin virus structural proteins". J Virol. 21(2): 579-83.
- **Martinez**, M. G., Cordo, S. M. & Candurra, N. a. (2007) "Characterization of Junin arenavirus cell entry". J. Gen. Virol. 88, 1776–1784.
- **Martinez**, M. G., Forlenza, M. B. & Candurra, N. a. "Involvement of cellular proteins in Junin arenavirus entry". Biotechnol. J. 4, 866–70 (2009).
- **Mastrangelo** A. (2014) "Quali- quantitative study of the social variables defining transmission scenarios of Argentine Hemorrhagic fever in the provinces of Buenos Aires and Santa Fe 2001-2010". Salud Col 10: 171-84.
- **Matlin** K.S., Regio H., Helenius A., Simons K. (1981). "Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line". Journal of Cell Biology 91, 601-613.
- **Matlin** K.S., Regio H., Helenius A., Simons K. (1982). "Pathway of vesicular stomatitis virus leading to infection". Journal of Molecular Biology 156, 609-631.
- **McCormick** JB, King IJ, Webb PA, Scribner CL, Craven RB, Johnson KM, Elliott LH,Belmont-Williams R. (1986). "Lassa fever. Effective therapy with ribavirin." N EnglN Engl J Med. 1986 Jan 2;314(1):20-6.
- **McGraw** TE, Greenfield L, Maxfield FR. (1987). "Functional expression of the human transferrin receptor cDNA in Chinese hamster ovary cells deficient in endogenous transferrin receptor". J Cell Biol. Jul;105(1):207-14.
- **Mercer**, J., Schelhaas, M. & Helenius, A. "Virus Entry by Endocytosis". Annu. Rev. Biochem. 79, 803–833 (2010).
- **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.
- **Mersich** S, Castilla V, Damonte E (1988) "Lectin affinity of Junin virus glycoproteins". Ann. Inst. Pasteur/ virol 139: 277- 284.
- **Mettler** C, Casals J, et al. (1963) "Study of the antigenic relationship between Junin virus, the etiological agent of Argentinian hemmorhagic fever, and other arthropod-borne viruses". Am j Trop Med Hig 12: 647- 652.
- **Misinzo** et al (2009) "Porcine circovirus 2 infection of the epithelial cells in clathrin and Rho- GTPase- mediated and enhanced by cholesterol depletion". Virus R 139: 19
- **Molinas** F.C., B.M. d., Maiztegui J.I. (1989) "Hemostasis and the complement system in Argentine Hemorrhagic Fever". Rev Infect Dis11(suppl 4): 762-67.
- **Morisono** K, Ku A, Xie Y, et al. (2010). "Redirecting lentiviral vectors pseudotyped with sindbis virus- derived envelope proteins to DC-SIGN by modification of N-linked glycans of envelope proteins". Jour. Vir. 84(14): 6923- 6934.
- **Moyer** S.A., Baker S.C., Lessard J.L. (1986). "Tubulin: a factor necessary for the synthesis of both Sendai virus and vesicular stomatitis virus RNAs". Proc Natl Acad Sci U S A. Aug; 83(15):5405-9.
- **Mulherkar**, N. et al., (2011). "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.
- **Muroi** M, Takasu A, Yamasaki M, Takatsuki A. (1993) Folimycin (concanamycin A), an inhibitor of V-type H(+)-ATPase, blocks cell-surface expression of virus-envelope glycoproteins. Biochem Biophys Res Commun. 193(3):999-1005.
- **Nicoziani** P., Vilhardt F., Llorente A., Hilout L., Courtoy P.J., Sandvig K., van deurs B. (2000). "Role for dynamin in late endosomes dynamics and trafficking of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor". Molecular Biology of the Cell 11, 481-495.
- **Nuñez**, D et al (2011). "Hotspot organized clathrin- mediated endocytosis by efficient recruitment and retention of nuclearing resources". Traffic 12: 1868-78.
- **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.
- **Parodi**, A et al (1958) "Sobre la etiología del brote epidémico de Junín". Día Médico, 30, pp.2300–2301.
- **Parton** RG, Joggerst B, Simons K.J (1994). "Regulated internalization of caveolae". Cell Biol. 127(5):1199-215.
- **Pasqual** G, Rojek J, Masin M, et al (2011). 2Old Word arenavirus enter the host cell via the multivesicular body and depend on the endosomal sorting complex required for transport". PLoS Pathog. 7(9): e1002232.
- **Pelkmans** L. (2005). "Secrets of caveolae-and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses". Biochimica et Biophysica Acta 1746:295-304.
- **Pelkmans**, L. & Helenius, A. (2003). "Insider information: what viruses tell us about endocytosis". Curr Opin Cell Biol 15, 414-22.
- **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.
- **Peters**, C. J. (1997). "Pathogenesis of viral hemorrhagic fevers." (In: Nathanson N,Ahmed R, Gonzalez-Scarano F, Griffin D, Holmes KV, Murphy FA, Robinson HL (eds) Viral pathogenesis. Lippincott-raven, Philadelphia.): pp 779-799.
- **Radoshitzky** S, Bào2 Y, Buchmeier M, Charrel R, Clawson5 A, Clegg C, DeRisi J, Emonet S, Gonzalez J, Kuhn J, Lukashevich I, Peters C, Romanowski V, Salvato M, Stenglein M, De la Torre J. (2015) "Past, present, and future of arenavirus taxonomy" . Arch Virol 160:1851–1874
- **Regan** A, Wittaker G (2008) "Utilization of DC-SIGN for entry coronaviruses into host cells". J Virol 82 (23): 1192- 11996.
- **Rey** O., Canon J., Krogstod P. (1996). "HIV- gag protein associates with f-actin present in microfilaments". Virology 220, 530-534.
- **Rodal**, S.K. et al., 1999. "Extraction of cholesterol with methyl-β-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles". Molecular biology of the cell, 10(4), pp.961–974.
- **Rojek**, J. M., Sanchez, A., Nguyen, N. T., de la Torre, J.-C. & Kunz, S. (2008) "Different Mechanisms of Cell Entry by Human-Pathogenic Old World and New World Arenaviruses". J. Virol. 82, 7677–7687.

- **Roldán** JS, Martínez MG, Forlenza MB, Whittaker GR, Candurra NA. (2016) "Human transferrin receptor triggers an alternative Tacaribe virus internalization pathway". Arch Virol.Feb; 161(2):353-63.
- **Romanowski** V, Bishop DH. (1983). "The formation of arenaviruses that are genetically diploid". Virology. Apr 15; 126(1):87-95.
- **Romanowski** V (2000). "Family Arenaviridae". In: Regenmortel MHV van, FauquetCM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (eds). Virus Taxonomy. (Seventh report of International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic, Orlando.)
- **Rowe** WP, Pugh WE, Webb PA, Peters CJ. (1970). "Serological relationship of the Tacaribe complex of viruses to lymphocytic choriomeningitis virus". J Virol. Mar; 5(3):289-92.
- **Salvato** M, Shimomaye E, et al. (1989)."The primary structure of the lymphocytic choriomeningitis virus L gene encodes a putative RNA polymerase". Virology 169: 377- 384.
- **Sánchez-San Martín**, C., López, T., Arias, C. F., & López, S. (2004). "Characterization of Rotavirus Cell Entry". Journal of Virology, 78(5), 2310–2318.
- **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.
- **Scheelhaas** M, Shah B, Holzer M, et al (2012) "Entry of human papillomavirus type 16 by actin- dependent, clatrhin- and lipid raft- independent endocytosis". Plos Pathog 8(4):e1002657.
- **Schley** D, Whittaker R, Neuman B. (2013). "Arenavirus budding resulting from viral-protein-associated cell membrane curvature". J R Soc Interface 10(86):20130403.
- **Serrano Gomez** D, Sierra- Filardi E, Martinez- Nuñez R, et al. (2008). "Structural requirements for multimerization of the pathogen receptor dendritic cell- specific ICAM3- grabbing non- integrin (CD 209) on the cell surface". JBC. 283(7): 3889-3903.
- **Shimojima** M, stroher U, Ebihara H, et al. (2012). "Identification of cell surface molecules involved in dystroglycan- independent Lassa virus cell entry". JVI 86 (4): 2067- 2078.
- **Shimojima** M., Stroher U, Kawaoka Y (2012). "Cell surface molecules involved in infection mediated by lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein".j Vet MedSci 74: 1363- 1366.
- **Sieczkarski** S, Whittaker G. (2003). "Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis". J Virol. 76 (20):10455-10464.
- **Silver** A, Candurra N, Damonte E. (2013) "The effect of oligosaccharide trimming inhibitors on glycoprotein expression and onfectivity of Junín virus". FEMS 109: 39-43.
- **Simmons** G, Reeves JD, Grogan CC, Vandenberghe LH, Baribaud F, Whitbeck JC, Burke E, Buchmeier MJ, Soilleux EJ, Riley JL, Doms RW, Bates P, Pöhlmann S. (2003). "DC-SIGN and DC-SIGNR bind Ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells". Virology. 305(1):115-23.
- **Sinchi** A. (2012). "Informe para la XXVII reunión anual del programa nacional de control de la FHA". ANLIS Instituto Maiztegui, Pergamino.

- **Skehel** et al (2000) "Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin". Annu Rev Biochem 69: 531- 69.
- **Smelt**, S. C., Borrow, P., Kunz, S., Cao, W., Tishon, A., Lewicki, H., Oldstone, M. B. A. (2001). "Differences in Affinity of Binding of Lymphocytic Choriomeningitis Virus Strains to the Cellular Receptor α-Dystroglycan Correlate with Viral Tropism and Disease Kinetics". J Virology, 75(1), 448–457.
- **Southern** P.J., Singh M.K., y col. (1987). "Molecular characterization of the genomic S RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus". Virology 157(1): 145-55.
- **Speir**, R. W., Wood, O., Liebhaber, H. & Buckley, S. M. (1970) "Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. IV. Electron microscopy of Vero cell cultures infected with Lassa virus" Am J Trop Med Hyg. 19, 692.
- **Spoden** et al (2008)."Clathrin and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16 involvement of tetrasparin- enriched microdomains TEMS2. Plos One 3: e3313.
- **Stenglein** M, Sanders C, Kistler A, Ruby J, Franco J, Reavill D, Dunker F, Derisi J. (2012). "Identification, characterization, and in vitro culture of highly divergent arenaviruses from boa constrictors and annulated tree boas: candidate etiological agents for snake inclusion body disease". MBio. Aug 14;3(4):e00180-12.
- **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 cytoplasmatic actin assembly". J. Biol. Chem. 264: 18261-18264.
- **Tai** A, Froelich S, Joo K, Wang (2011) "Production of lentiviral vectors with enhanced efficiency to target dendritic cells by attenuating mannosidase activity of mammalian cells" J Bioleng 5: 2-11.
- **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.
- **Thromb,** H. (1995) Mar; 73(3):368-73. "Molecular Basis for Antibody-Mediated Neutralization of New World Hemorrhagic Fever Mammarenaviruses". Mahmutovic S, Clark L, Levis SC, Briggiler AM, Enria DA, Harrison SC, Abraham J.Cell Host Microbe. 2015 Dec 9; 18(6):705-13.
- **Tilney** R.G. (1983). "Interactions between actin filaments and membrane give spatial organization cell". In Modern Cell Biology. Vol2: Spatial organization of Eukaryotic Cells. Mcintosh J.R., Satir B.H. (Eds.)pp 163-199.
- **Tkaczenski,** L. Z. & Boxaca, M. C. (1970) "Cambios citoquímicos en células Vero infectadas con alguno virus del grupo Tacaribe" Medicina (B Aires). 30, 28-37.
- **Torreno-Pina** J, Castro B, Manzo C, Buschow S, Cambi A, García- Parajo F. (2014) "Enhanced receptor- clathrin interactions induced by N- glycan-mediated membrane micropatterning". PNAS. 111(30):11037-11042.
- **Tortorici**, M. A., Ghiringhelli, P. D., Lozano, M. E., Albarino, C. G. & Romanowski, V. (2001) "Zinc-binding properties of Junin virus nucleocapsid protein" J Gen Virol.82, 121-8.
- **Traub**, E., 1935. "A filterable virus recovered from white mice". Science, 81(2099), pp.298–299
- **Urata** S, Weyer J, Storm N, Miyazaki Y, van Vuren PJ, Paweska J, Yasuda J. (2015). "Analysis of assembly and budding of Lujo virus". J Virol. Dec 30. pii: JVI.03198-15.

- **Urata**, S. & Yasuda, J. Molecular Mechanism of Arenavirus Assembly and Budding. Viruses 4, 2049–2079 (2012).
- **Van der Bliek** A, Redelmeier TE, Damke H, Tisdale EJ, Meyerowitz EM, SchmidSL. (1993). "Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation". J Cell Biol. 122(3):553-63.
- **Van Hamme** E, Dewerchin HL, Cornelissen E, Verhasselt B, Nauwynck HJ. "Clathrin- and caveolae-independent entry of feline infectious peritonitis virus in monocytes depends on dynamin". J Gen Virol. (2008) Sep; 89(Pt 9):2147-56.
- **Van Kooyk** Y, Geijtenbeek T. (2003). "DC-SIGN: Escape mechanism for pathogens". Nature Reviews. 3: 697.
- **Van KooyK** Y, Unger W, Fehres C, et al. (2012) "Glycan- based DC-SIGN targeting vaccines to enhance antigen cross- presentation". Mol Immunology 55: 143- 145.
- **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.
- **Wang** P, Hu K., Luo S. et al. (2015) "DC-SIGN as an attachment factor mediates Japanese encephalitis virus infection of human dendritic cells via interaction with a single high- mannose residue of viral E glycoprotein". Virology 488: 108- 119.
- **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.
- **Weissenbacher** M, Avila M, Calello M, Merani M, McCormick J, Rodriguez M. "Effect of ribavirin and immune serum on Junin virus-infected primates". (1986). Med Microbiol Immunol. 175(2-3):183-6.
- **Whittaker**, G.R. & Helenius, A., (1998) "Nuclear import and export of viruses and virus genomes". Virology, 246(1), pp.1–23.
- **Wood** S, Brown W. (1992). "The morphology but not the function of endosomes and lysosomes is altered by brefeldin A."J Cell Biol. 119(2):273-85
- **Yamahuchi** Y, Helenius A. (2013)" Virus entry at a glance". JCS 126: 1289- 1295.
- **York** J, Nunberg JH. (2007). "A novel zinc-binding domain is essential for formation of the functional Junín virus envelope glycoprotein complex". J Virol Dec; 81(24):13385-91.
- **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., Romanowski, V., Lu, M. & Nunberg, J. H. (2004). "The signal peptide of the Junín arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex". J. Virol. 78, 10783–92.

- **Yousuf** MA, Zhou X, Mukherjee S, Chintakuntlawar AV, Lee JY, Ramke M, et al. (2013) "Caveolin-1 Associated Adenovirus Entry into Human Corneal Cells". PLoS ONE 8(10): e77462.
- **Zaas**, A. K., Chen, M., Varkey, J., Veldman, T., Hero, A. O., Lucas, J., Ginsburg, G. S. (2009). "Gene Expression Signatures Diagnose Influenza and Other Symptomatic Respiratory Viral Infection in Humans". Cell Host & Microbe, 6(3), 207–217.
- **Zerial**, M., and H. McBride. (2001). "Rab proteins as membrane organizers". Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2:107–117.)
- **Zhang** Y, Buckles E, Whittaker G. (2012). "Expression of the C- type lectins DC-SIGN or L-SIGN alters host cell susceptibility for the avian coronavirus, infectious bronchitis virus". Vet. Microb. 157:285- 293.
- **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.