

## Tesis de Posgrado

# Naturaleza de las relaciones antigénicas entre Arenavirus del viejo y del nuevo mundo

Weber, Elba Laura

1989

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

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

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

**Cita tipo APA:**

Weber, Elba Laura. (1989). Naturaleza de las relaciones antigénicas entre Arenavirus del viejo y del nuevo mundo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2253\\_Weber.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2253_Weber.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Weber, Elba Laura. "Naturaleza de las relaciones antigénicas entre Arenavirus del viejo y del nuevo mundo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2253\\_Weber.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2253_Weber.pdf)

**Universidad de Buenos Aires**

**FACULTAD de CIENCIAS EXACTAS y NATURALES**

**NATURALEZA DE LAS RELACIONES ANTIGENICAS ENTRE ARENAVIRUS  
DEL VIEJO Y DEL NUEVO MUNDO**

**Autora: Elba Laura Weber**

**Directores: Dr. Michael J. Buchmeier**

**Dra. Mercedes C. Weissenbacher**

**Lugar de Trabajo: Departamento de Inmunología de Scripps**

**Clinic and Research Foundation,**

**La Jolla, California, E.E.U.U. de Norteamérica**

**Tesis presentada para optar al título de**

**Doctora en Ciencias Químicas**

**1989**

**A ni aniga Susana**

**A mi familia,**

**a los que ya no están,**

**y muy especialmente a Pedro, José y María Aurora.**

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lucía T. Barcelona de Guerrero, primer Directora de mi trabajo de tesis, que no continuó como tal por circunstancias fortuitas. Gracias por su estímulo, apoyo y ejemplo.

A Daniel Rabinovich, por su permanente estímulo durante muchos e importantes años.

A mis compañeros de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Medicina por su amistad y apoyo en tantos momentos críticos.

A la Dra. Celia E. Coto, invaluable acicate para la realización de este trabajo.

Al Dr. Michael B. A. Oldstone, de Scripps Clinic and Research Foundation, por haberme permitido formar parte de un grupo cuya meta es la excelencia científica.

Al Dr. Michael J. Buchmeier, por sus valiosos consejos, y estímulo continuo, desde cerca y a la distancia, que han hecho posible este trabajo.

Al grupo de Scripps Clinic and Research Foundation, que me acompañó durante la ejecución del trabajo, en especial a Hanna Lewicki, Kathryn Wright, Frances Fuller-Pace y Jim Johnston.

Al Sr. Norberto Malarini, que generosamente realizó las Figuras de este trabajo.

## RESUMEN

En nuestro laboratorio se obtuvieron anticuerpos monoclonales (AcMs) contra la glicoproteína GP-2 del virus de la coriomeningitis linfocitaria, LCM, prototipo de la familia Arenaviridae. Los AcMs 33.6 y 83.6, no neutralizantes, reaccionaron con todos los miembros de la familia en reacciones de inmunofluorescencia, inmunoprecipitación y ELISA. Un tercer AcM, 9-7.9, reaccionó con el arenavirus africano Mopeia, no patógeno, que es indistinguible por métodos serológicos del patógeno Lassa, pero no dio reacción con este último. El análisis topográfico realizado "a posteriori" en el laboratorio demostró que 33.6 y 83.6 definen un único antígeno, conservado en todos los arenavirus, que se denominó GP-2A, y que el epítopo definido por 9-7.9, denominado GP-2B, se superpone parcialmente con el anterior.

Los arenavirus se clasifican en dos subgrupos: arenavirus del Viejo Mundo y del Nuevo Mundo, según su distribución geográfica y las relaciones antigénicas que existen entre ellos. GP-2A es el primer antígeno conservado en la glicoproteína de ambos subgrupos que se describe.

Los dos epítopos son importantes ya sea desde el punto de vista de la evolución de esta familia viral como desde un punto de vista práctico: Como en la familia se encuentran patógenos

humanos (Junín y Machupo, agentes de la Fiebre Hemorrágica Argentina y Boliviana respectivamente, además de los mencionados LCM y Lassa), un epitope conservado como el GP-2A puede eventualmente servir como herramienta para el diagnóstico de infecciones con estos virus; GP-2B tiene la propiedad de diferenciar a un arenavirus patógeno de otro que no lo es, lo que lo hace un probable marcador de atenuación para los arenavirus africanos.

El objetivo de este trabajo fue definir, a nivel de secuencia de aminoácidos, ambos epitopes sobre GP-2.

Con este fin se trabajó con péptidos sintéticos, producidos sobre la base de la secuencia de aminoácidos predicha para la porción correspondiente a GP-2 de GPC, el glicopéptido intracelular de 498 residuos precursor de las glicoproteínas estructurales GP-1 y GP-2 de LCM. Se determinó la reactividad en ELISA de los AcMs con 18 péptidos correspondientes a la mencionada secuencia, y se encontró que sólo uno, que abarcaba los residuos 370-382 de GPC, reaccionaba con los tres AcMs.

La secuencia de 370-382 es <sup>370</sup>CNY SKFWYLEHAK<sup>382</sup>; los aminoácidos subrayados están conservados en los arenavirus LCM, Lassa, Pichindé y Tacaribe, únicos cuya secuencia se conoce. Posteriormente se trabajó también con la secuencia 368-382, debido a que los residuos <sup>368</sup>PPY<sup>382</sup>, también están conservados.

Los AcMs reaccionaron específicamente con la secuencia 370-382 en ELISA y en solución, no habiendo reacción con las secuencias adyacentes 353-370 y 378-391. La reactividad en solución se determinó midiendo la capacidad de la secuencia de bloquear la unión a la glicoproteína de LCM (arenavirus del Viejo Mundo) en reacciones de inmunofluorescencia, ELISA de viriones intactos y "Western blot". En todos los casos hubo bloqueo total de la unión de los AcMs a GP-2 cuando los mismos habían sido preincubados con 370-382, mientras 353-370 y 378-391 no tuvieron efecto bloqueante. La secuencia 370-382 también bloqueó la unión de 33.G a la glicoproteína de los virus Junín y Tacaribe, del Nuevo Mundo, confirmando la presencia del epítopo GP-2A en este subgrupo.

Con el objeto de determinar cuáles son los límites de los epítopos GP-2A y GP-2B en la secuencia 368-382 se determinó la reactividad en ELISA y en solución de los AcMs con los siguientes péptidos:

368PYCNYSKFWYLEHAK382

370CNYSKFWYLEHAK382

372YSKFWYLEHAK382

374KFWYLEHAK382

376WYLEHAK382

368PYCNYSKFWYL378

370CNYSKFWYL378

372YSKFWYL378

Todas las secuencias excepto 374-382 y 376-382 reaccionaron con 33.6 y 9-7.9 en ELISA y en solución. 374-382 reaccionó con 33.6, pero el grado de reacción con 9-7.9 (medido según el título en ELISA y según la capacidad de bloquear la unión del AcM a la glicoproteína) fue menor. 376-382 no reaccionó con ninguno de los AcMs. Es decir que todos los péptidos con la secuencia 372-378 completa contienen residuos pertenecientes tanto a GP-2A como a GP-2B. Los aminoácidos EHAK no parecen influir directamente sobre ninguno de los epitopes, cuyo grado de superposición es muy alto, ya que sus límites no pudieron definirse.

Con el objeto de analizar las bases moleculares de la falta de reactividad de 9-7.9 con Lassa y Pichindé se trabajó con los péptidos (a) CNYTKFWYLEHAK y (b) CNYSKYWYLEHAK, donde los residuos subrayados corresponden a sustituciones naturales que aparecen en Pichindé y Lassa, respectivamente, en la zona conservada de la secuencia. El péptido (a) se comportó igual que 370-382, es decir que el reemplazo Ser por Thr no tuvo efecto sobre la reactividad; el péptido (b), en cambio, reaccionó con 33.6 pero no lo hizo con 9-7.9, lo que sugiere que el reemplazo de Phe por Tyr, que ocurre naturalmente en Lassa, sería suficiente para destruir el epitope en este virus.

Como la sustitución correspondiente a Pichindé en la zona de superposición de GP-2A y GP-2B no afectó la reactividad de 9-7.9, se determinó el grado de reacción de este AcM con secuencias que

involucraban residuos ubicados fuera de la zona conservada 368-378, ya que podría ocurrir que el epítope fuera discontinuo. Las secuencias probadas fueron:

- Pichindé: 1) AKICNYTKFWYINDTI  
2) CNYTKFWYINDTI  
LCM: 3) MGVCNYSKFWYLEHAK  
4) CNYSKFWYLEHAK (370-382)

Los títulos de 9-7.9 en ELISA fueron menores con las secuencias de Pichindé, pero en solución sólo hubo una pequeña diferencia con la secuencia 1), sugiriendo que los residuos 368AKI387 influyen en GP-2B. En todos los casos se hicieron simultáneamente los ensayos con 33.6, y no hubo diferencias en la reactividad.

Con el objeto de evaluar la posible utilidad de la secuencia 370-382 como reactivo de diagnóstico se ensayó su reactividad en ELISA y en solución de sueros hiperinmunes contra arenavirus del Viejo y del Nuevo Mundo, obteniéndose resultados positivos. Cuando se determinó la reactividad en ELISA del suero anti-LCM con los péptidos con deleciones y los correspondientes a secuencias de Lassa y Pichindé, el suero hiperimmune disminuyó significativamente el título con respecto al título con 368-382 y 370-382, demostrando su mayor especificidad. Cuando se realizaron los correspondientes ensayos en solución con las secuencias de

Lassa y Pichindé, la especificidad de la reacción del anticuerpo policlonal fue total: este "vio" en las secuencias mencionadas las diferencias que los AcMs no "veían", probablemente debido a la presencia de anticuerpos contra otro/s epitope/s virales, por ejemplo el GP-2C, definido por otros AcMs obtenidos en nuestro laboratorio.

Se realizaron ensayos con sueros de convalescientes de infecciones con diferentes arenavirus; en estos casos la reactividad de 370-382 no fue significativa, pero sí lo fue la de 368-382. Se ensayaron 36 muestras, con resultados positivos en más del 90% de las mismas.

Con el objeto de dilucidar la función biológica de la secuencia 370-382 se realizaron diferentes ensayos: para determinar si 33.6 tiene influencia en la neutralización de la infectividad viral dependiente de complemento o en la neutralización mediada por otros AcMs. Los resultados fueron negativos en todos los casos.

Para establecer si la secuencia está involucrada en la inmunidad celular se inmunizaron cobayos con la secuencia 370-382. Los animales desarrollaron anticuerpos contra el péptido y contra el virus, medidos por ELISA. Los ensayos preliminares de linfoproliferación de los esplenocitos de estos cobayos indican que probablemente la secuencia 370-382 está relacionada con fenómenos de inmunidad celular.

La conservación de la secuencia 368-382 en los arenavirus del Viejo y del Nuevo Mundo, así como su inmunodominancia, sugieren que puede ser un componente de importancia estructural o funcional en el virión, y apoyan la hipótesis de que los arenavirus derivan de un ancestro común.

Por otra parte, la unión de anticuerpos policlonales a la misma le asigna una utilidad potencial como reactivo para la detección de anticuerpos contra arenavirus.

## ABREVIATURAS

AcM: Anticuerpo monoclonal  
ADN: Acido desoxirribonucleico  
ADNc: Acido desoxirribonucleico complementario  
ARN: Acido ribonucleico

Ala, A: Alanina  
Arg, R: Arginina  
Asn, N: Asparragina  
Asp, D: Acido aspártico  
Cys, C: Cisteína  
Gln, Q: Glutamina  
Glu, E: Acido glutámico  
Gly, G: Glicina  
His, H: Histidina  
Ile, I: Isoleucina  
Leu, L: Leucina  
Lys, K: Lisina  
Met, M: Metionina  
Phe, F: Fenilalanina  
Pro, P: Prolina  
Ser, S: Serina

Thr, T: Treonina

Tyr, Y: Tirosina

Trp, W: Triptofano

Val, V: Valina

## INDICE

### 1.- INTRODUCCION

1.1.- <u>Los Arenavirus</u> .....	1
1.2.- <u>Composicion química de los arenavirus</u>	
1.2.a.- <u>Acidos nucleicos</u> .....	7
1.2.b.- <u>Proteínas y glicoproteínas</u>	
1.2.b.i.- <u>Proteínas no glicosiladas</u>	10
1.2.b.ii.- <u>Glicoproteínas</u>	14
1.3.- <u>Relaciones entre los arenavirus</u> .....	18

2.- ANTECEDENTES .....	23
------------------------	----

### 3.- MATERIALES Y METODOS

3.1.- <u>Cultivos celulares</u> .....	25
3.2.- <u>Virus</u> .....	25
3.3.- <u>Titulación de virus</u> .....	26
3.4.- <u>Extractos de células infectadas</u> .....	28
3.5.- <u>Anticuerpos</u>	
3.5.a.- <u>Anticuerpos policlonales</u> .....	28

3.5.b.- Anticuerpos monoclonales	29
3.6.- <u>Péptidos sintéticos</u> .....	29
3.7.- <u>Acoplamiento de péptidos sintéticos a KLH (keyhole lymphet hemocianin)</u> .....	29
3.8.- <u>Imunización de conejos</u> .....	30
3.9.- <u>Reacción inmunológica a la gota ("dot blot")</u>	31
3.10.- <u>Enzimoimmunoensayo</u>	31
3.11.- <u>Imunofluorescencia</u>	32
3.12.- <u>Immunoblotting</u> .....	33
3.13.- <u>Reacción péptido-anticuerpo en solución</u> .....	34
3.14.- <u>Inoculación de cobayos con péptido</u> .....	34
3.15.- <u>Ensayo de proliferación de esplenocitos</u> .....	35
 4.- RESULTADOS	
 4.1.- <u>Ubicación de los epitopes GP-2A y GP-2B sobre GP-2</u>	
4.1.a.- <u>Ensayos preliminares</u> .....	36
4.1.b.- <u>Titulación de los AcMs 33.6, 83.6 y 9-7.9 con 370-382 por la técnica de "dot blot"</u> .....	38

4.1.c.- Reactividad de los AcMs 33.6 y 9-7.9 con la secuencia 370-382 en ELISA	
i) Determinación de la cantidad de péptido óptima para trabajar con los AcMs en ELISA .....	39
ii) Determinación del título de los AcMs 33.6, 83.6 y 9-7.9 con el péptido 370-382 en ELISA...	39
4.1.d.- Reacción de los AcMs con el péptido 370-382 en solución	44
4.2.- <u>Presencia del epitope GP-2A en arnavirus del Nuevo       Mundo</u>	49
4.3.- <u>Ubicación de los límites de los epitopes GP-2A       y GP-2B en la secuencia 370-382</u>	
4.3.a.- Reactividad de los AcMs 33.6 y 9-7.9 con péptidos con deleciones en el extremo amino	53
4.3.b.- Reactividad de los AcMs 33.6 y 9-7.9 con péptidos con deleciones amino y carboxiterminales .....	57
4.3.c.- Reactividad de los AcMs 33.6 y 9-7.9 con los péptidos con deleciones amino y carboxiterminales en solución	60
4.4.- <u>Determinación de la mínima secuencia antigénica       conservada en la glicoproteína de arnavirus del       Viejo y del Nuevo Mundo .....</u>	66

4.5.- <u>Análisis molecular de la especificidad viral del</u> <u>AcM 9-7.9 (epitope GP-2B)</u> .....	68
4.6.- <u>Análisis de la reactividad de anticuerpos policlona-</u> <u>les contra arenavirus con péptidos correspondientes</u> <u>a GPC de LCM</u>	
4.6.a.- Anticuerpos policlonales contra arenavirus se unen específicamente al péptido 370-382.....	83
4.6.b.- Reactividad del suero anti-LCM con péptidos con deleciones amino y carboxi-terminales	89
4.6.c.- Reactividad del anticuerpo policlonal anti-LCM con péptidos con sustituciones correspondientes a los virus Pichindé y Lassa .....	94
4.7.- <u>Potencial utilidad de secuencias correspondientes a</u> <u>GP-2 para la detección de infecciones por</u> <u>arenavirus</u>	
4.7.a.- Reacción de sueros humanos antiarenavirus con los péptidos 370-382 y 368-382	99
4.8.- <u>Función biológica de la secuencia 370-378</u> .....	103
5.- DISCUSION .....	106
6.- REFERENCIAS .....	144

## 1.- INTRODUCCION

### 1.1.- Los Arenavirus

La familia Arenaviridae comprende virus con envoltura cuyo genoma esta compuesto por dos segmentos de ARN monocatenario, no mensajero.

Sus miembros se clasifican en dos grupos: arenavirus del Viejo y del Nuevo Mundo (Fig.1), de acuerdo con su distribución geográfica y con las relaciones antigénicas que existen entre ellos (1).

El prototipo de la familia es el virus de la coriomeningitis linfocitaria, LCM, que se encuentra distribuido mundialmente; este virus ha sido incluido entre los arenavirus del Viejo Mundo debido a las relaciones antigénicas con los arenavirus africanos que se mencionarán más adelante.

La familia incluye otros tres virus patógenos para el hombre: Junín, Machupo y Lassa, agentes de la Fiebre Hemorrágica Argentina, Boliviana y de Lassa respectivamente.

Los restantes arenavirus, no patógenos, comprenden los africanos Mopeia, Mobala, el recientemente aislado Ippy (2), y los americanos Pichindé, Tacaribe, Tamiami, Amaparí, Flexal, Paraná y Latino.

Saluzzo et al. han sugerido la existencia de otros arenavirus africanos presentes en roedores (3).

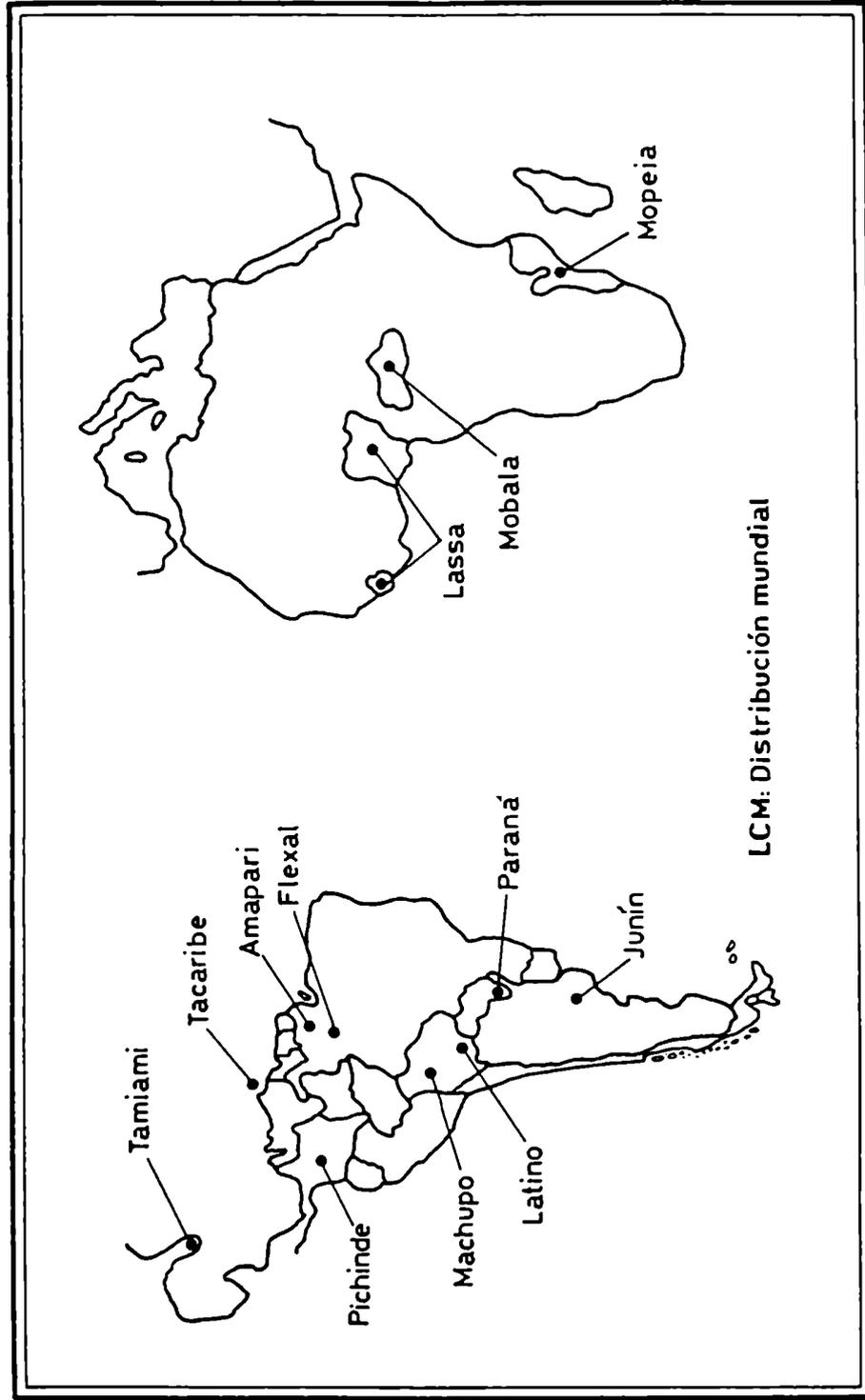


FIG. 1. Distribución Geográfica

Estos virus se mantienen en la Naturaleza por transmisión horizontal y posiblemente vertical entre roedores de las familias Cricetidae (arenavirus del Nuevo Mundo) y Muridae (arenavirus del Viejo Mundo) en los cuales establecen infecciones persistentes (1,4,5). La habilidad de establecer este tipo de infecciones tanto "in vivo" como "in vitro" constituye una de las principales características de los miembros de esta familia viral (1), y su estudio, particularmente en el caso de LCM, permitió recientemente establecer hechos que podrían tener relevancia en el caso de algunas patogenias de etiología actualmente desconocida (30).

El estudio de los arenavirus comenzó en la década del 30, con el aislamiento de LCM. Este fue detectado por primera vez por Armstrong y Lillie cuando realizaban pasajes en monos de tejidos provenientes de un caso humano de encefalitis de San Luis. Se encontró que junto con el virus causante de la enfermedad existía en los monos otro agente, y que los signos de la infección eran similares a los de la meningitis aséptica humana, por lo que Rivers y Scott intentaron un aislamiento de pacientes con meningitis aguda, con resultados positivos. Aproximadamente al mismo tiempo Traub aisló un agente similar de ratones albinos. Estudios serológicos posteriores establecieron que ambos agentes estaban relacionados (6,7,8, citados por Howard, 1).

Posteriormente mediante aislamientos virales se demostró que la meningitis aguda humana se relacionaba directamente con la presencia del virus en ratones domésticos *Mus musculus*, reservorio natural del mismo.

En 1955, unos veinte años después del primer aislamiento de LCM, se describió una nueva enfermedad hemorrágica, la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA), cuyos primeros brotes habían sido detectados 2 años antes en el NO de la provincia de Buenos Aires, Argentina (9). La enfermedad se caracteriza por manifestaciones hemorrágicas leves o severas, con compromiso renal, digestivo y neurológico. La evolución es rápida, en dos semanas el 80-90 % de los pacientes experimenta mejoría clínica; en el 10-20 % restante se agrava la sintomatología, con aumento de las manifestaciones neurológicas, hasta llegar en muchos casos al coma y la muerte (10). El agente etiológico, denominado virus Junín, fue aislado en 1958 por Parodi et al. (11). El reservorio son roedores de la familia Cricetidae: *Calomys musculinus*, *Calomys laucha* y *Akodon azarae* (12). Como estos roedores invaden los campos en que se está cosechando maíz o sorgo, sin acercarse a los hogares, los principales afectados por la enfermedad son trabajadores rurales, que se infectan por contacto con secreciones salivales y urinarias de los roedores.

Aunque el porcentaje de mortalidad por FHA ha disminuido, ya que se ha generalizado el empleo de plasma de convalesciente como tratamiento y se detectan formas leves que antes no se reconocían como tales (13), el area endémica se extiende año a año, debido probablemente a cambios en la distribución geográfica de los roedores portadores del virus (14).

La Fiebre Hemorrágica Boliviana (FHB), de características similares a la FHA, fue detectada en Bolivia en 1962. El agente causal fue aislado de pacientes y ratones peridomésticos *Calomys callosus*, y caracterizado como virus--denominado Machupo-- en 1965 por Johnson y colaboradores (citado por Howard,1). Johnson et al describieron semejanzas entre la infección de ratones con LCM y la de hamsters con Machupo (15). Al erradicarse los roedores de la zona, el número de casos se redujo notoriamente (1). En el caso de FHA el control de los roedores es mucho más dificultoso debido a que estos sólo habitan en el campo, sin invadir viviendas.

Aunque en el caso de FHA la administración de plasma de convalesciente ha reducido de manera importante la proporción de casos fatales (13) y se ha comprobado la eficacia del antiviral Ribavirina en infecciones con Lassa y Junín (116,118), no existe aún un tratamiento adecuado para las infecciones por arenavirus. En cuanto a agentes profilácticos, se han ensayado vacunas

inactivadas en el caso de Junín (105) que no dieron resultados totalmente satisfactorios. Una vacuna a virus atenuado aplicada a voluntarios residentes en la zona endémica de FHA otorgó buena protección, pero su uso no se extendió debido a que no cumplía con las normas de seguridad requeridas por los organismos internacionales. Actualmente se están estudiando inmunógenos a virus recombinante contra el virus de Lassa, y a virus atenuado contra FHA (105).

No hay evidencias de que los otros arenavirus americanos sean patógenos, aunque se han detectado anticuerpos contra Taiaími, producto, aparentemente, de una infección natural (16).

En 1956 se había aislado un agente viral de murciélagos en la isla de Trinidad. Este virus se denominó Tacaribe, y, años más tarde, se denominó "complejo Tacaribe" al conjunto de los arenavirus americanos que se aislaron entre 1965 y 1977 debido a que se encontró que todos ellos están antigénicamente relacionados con el virus de ese nombre (19).

También se denominó a este grupo "arenavirus del Nuevo Mundo", y ICM, junto con los arenavirus africanos aislados más tarde, constituyó el grupo de "arenavirus del Viejo Mundo", también debido a las relaciones antigénicas que existen entre ellos (17,18).

El primer aislamiento de un arenavirus africano fue el del virus Lassa (19). La enfermedad asociada (fiebre de Lassa) había sido descripta por primera vez en 1969 (20). Los síntomas más comunes son fiebre, malestar, dolores musculares, vómitos, diarrea, dolor de garganta; suele haber manifestaciones hemorrágicas y neurológicas, aunque no tan severas como en el caso de la FHA y la FHB. Aunque en un principio se creyó que la mortalidad debida a la enfermedad era de un 50 %, posteriormente se estableció la existencia de un alto número de casos de enfermedad subclínica, y que la relación caso-fatalidad es del 1%-2%. (21).

Los otros arenavirus africanos, que no están asociados con enfermedad, fueron aislados más tarde Hopeia en 1977 (119), Mobala en 1983 (120), y más recientemente Ippy (2); Monath ha mencionado al virus Toure (121).

Murphy et al. (22) describieron semejanzas entre los arenavirus americanos y LCM, proponiendo que se los clasificara dentro de un mismo grupo, que denominaron "arenovirus", debido a la apariencia arenosa que presentaban en los preparados de microscopía electrónica. Esa denominación fue más adelante cambiada a "arenavirus" para evitar confusiones con los "adenovirus".

En 1970, más de 30 años después del primer aislamiento de LCM, se creó un nuevo taxón (familia "Arenaviridae", género "arenavirus"), (23,24), que se ha ido ampliando a medida que se producían aislamientos nuevos.

## 1.2.- Composición química de los arenavirus

### 1.2.a.- Ácidos nucleicos

El genoma de los arenavirus está formado por dos segmentos de ARN de cadena simple (54), de polaridad negativa o no mensajero, es decir que se requiere una transcripción para que se produzca su ARN complementario y a partir de éste se sinteticen las proteínas codificadas por el ARN viral. La polaridad negativa del ácido nucleico viral fue sugerida por primera vez cuando se identificó actividad de ARN polimerasa asociada a preparaciones de Pichinde (55,56).

Los segmentos de ARN se denominan L y S, de acuerdo con su tamaño. El segmento L (por "Large", grande), tiene un peso molecular entre  $2,1$  y  $2,7 \times 10^6$  en los distintos arenavirus, y el del segmento S ("Small", pequeño) oscila entre  $1,2$  y  $1,3 \times 10^6$  (1). Para LCM, en particular, Dutko et al. (57) establecieron que el segmento L pesa  $2,58 \times 10^6$ , y el S  $1,3 \times 10^6$ , que corresponden a 8-9 kb y 3,5 kb respectivamente (58).

Además de los ácidos nucleicos virales, los viriones contienen ARN ribosomal de la célula huésped, de coeficientes de sedimentación 28 S y 18 S, que confieren el característico aspecto arenoso observable en las fotografías de microscopía electrónica, al cual debe su nombre la familia (22). Se desconoce hasta el momento si estas estructuras cumplen alguna función específica en la infección por arenavirus, siendo la hipótesis generalmente aceptada la de que son ARNr celulares que de alguna manera se incorporan a la partícula viral durante los procesos de maduración y liberación.

El segmento L probablemente codifica para la polimerasa o replicasa viral, de alto peso molecular, 150-200 kD (1), que se requiere para la transcripción y replicación virales (59).

El segmento S contiene los genes correspondientes a las principales proteínas estructurales: N o NP, que es una nucleoproteína interna asociada con ARN en complejos de ribonucleoproteína (RNP), y GPC, un glicopéptido celular precursor que se disocia para producir la glicoproteínas GP-1 y GP-2 presentes en la superficie de los viriones (60).

Riviere et al. (61,62) determinaron que el segmento L de LCM y las proteínas que codifica están asociados con la virulencia de ese virus para el cobayo, y el segmento S se asocia con las alteraciones en la producción de hormona de crecimiento (63).

Una característica de los arenavirus es el modo especial de expresión de sus genes: En las familias virales cuyo ARN actúa como mensajero (Picornaviridae, Coronaviridae, Togaviridae, Toroviridae) las proteínas virales se sintetizan a partir del ARN viral. Como se dijo, la familia Arenaviridae posee ARN no mensajero. En la mayoría de los virus con genoma de este tipo (Rabdoviridae, Myxoviridae, y algunos miembros de la familia Bunyaviridae) a partir del genoma viral se sintetiza el ARN mensajero, del cual se traducen las proteínas virales. Es decir que las proteínas se sintetizan a partir del ARN "complementario viral". En el caso de los arenavirus, una parte de la información genética contenida en el segmento S--la correspondiente a la NP-- se traduce en el sentido "complementario viral" a partir de un extremo de la cadena de ARN viral, es decir según el esquema "normal" para los virus con ARN no mensajero; la otra parte de la información genética--correspondiente al glicopéptido precursor GPC-- se traduce a partir del otro extremo del segmento S, en el sentido del ARN viral (64,65). Este tipo de estrategia para la expresión de la información genética se denomina "de dos sentidos" (en inglés "ambisense") y se encuentra también en el caso de uno de los segmentos de ARN de los flebovirus, un género dentro de la familia Bunyaviridae (66).

Entre los dos genes contenidos en el segmento S se encuentra la región intergénica en forma de horquilla, no codificante, limitada por los codones de terminación para ambos genes. Esta estructura ha sido descrita para LCM (58), Lassa (67), Pichinde (68), y Tacaribe (65).

El mecanismo de transcripción y replicación del gen L está siendo estudiado en la actualidad. Aparentemente se codifica la polimerasa viral, y un péptido de bajo peso molecular cuya función se desconoce. Existiría una zona intergénica, y el mecanismo también parece ser de dos sentidos (179).

#### 1.2.b.-Proteínas y glicoproteínas.

##### 1.2.b.i.- Proteínas no glicosiladas

Cuantitativamente, el principal componente de los viriones es la proteína asociada a la nucleocápside, N o NP, cuyo peso molecular obtenido en corridas electroforéticas está entre 54 y 68 kD. Las estrechas relaciones serológicas que existen entre estos virus, principalmente en reacciones de fijación de complemento, sugieren que más que una diferencia en el tamaño de la proteína los pesos moleculares reflejan diferencias en el contenido de aminoácidos cargados (1). La predicción de la secuencia de aminoácidos a partir del ADNc para NP de LCM (cepas Armstrong y WE), Lassa, Pichinde y Tacaribe (65,69) y la

comparación de las mismas demostro que, en efecto, el grado de homología entre las distintas NP es alto: aproximadamente un 50 % si se compara la NP de Pichindé con las de LCM y Lassa, mientras entre la NP de estos últimos la homología es del 62-63 % (69,70).

Franze-Fernandez et al. obtuvieron datos coincidentes: un 35 % de homología entre las NP de LCM, Lassa, Pichindé y Tacaribe; alrededor de un 50 % cuando compararon las NP de LCM y Lassa con las de Pichinde' y Tacaribe, y 60 % comparando las NP de LCM y Lassa (65).

Como se ve, la homología es mayor entre las NP de los miembros de cada subgrupo, Viejo Mundo (LCM y Lassa) y Nuevo Mundo (Pichinde y Tacaribe), que si se comparan las de miembros de uno de los subgrupos con las del otro.

Para la proteína NP de LCM, Howard y Buchmeier (71) encontraron, por análisis de aminoácidos, que es rica en Asp y Glu, que podrían existir como las correspondientes aminas Asn y Gln. La secuencia predicha a partir de la secuencia del ADNc del segmento S (69) confirmó la presencia de una alta proporción de estos aminoácidos, permitiendo suponer que las variaciones en punto isoeléctrico observadas por Bruns et al (72) podrían deberse a variación en la carga de los diferentes polipéptidos (1). También en NP de Pichindé y Tacaribe se encontro una alta proporción de aminoácidos básicos (65).

Howard y Buchmeier (71) han descripto una actividad de proteína quinasa asociada al virión de LCM, que fosforila residuos Ser y Thr en NP; no se ha demostrado que esta actividad sea codificada por el genoma viral, y sólo en una ocasión fue posible detectar una fracción fosforilada soluble de NP (73).

Se han descripto otros componentes no glicosilados en LCM (72), Pichindé (74,75), Tacaribe y Tamiami (76), Lassa (77), Machupo (78) y Junín (79). Entre éstos predomina una proteína de peso molecular entre 180 y 200 kD denominada L en Pichindé y LCM (59,80), que probablemente sea la polimerasa viral (69), una proteína de 77 kD denominada P (75,76) en Tacaribe, y varios productos de degradación de NP (74,72,73,81). Aunque algunos autores han considerado tales polipéptidos menores como productos de traducción primarios del genoma viral, se ha señalado (59) que el tamaño del segmento S no permite suponer que se codifiquen otras proteínas además de GPC y NP; tampoco pueden ser productos del gen L, ya que se ha identificado como su único producto al segmento L de Pichindé (80), y Singh et al (82) identificaron también como único producto de ese segmento en LCM un polipéptido de 180 kD.

Singh et al (82) aislaron, caracterizaron y secuenciaron clones del ADNc del segmento L, sintetizaron péptidos correspondientes a secuencias predichas a partir de esos ADNc y

encontraron que antisueros contra esos péptidos reaccionaban con la banda correspondiente a la proteína L, de 200.000 D en inmunoblots, sugiriendo que ésta es el único producto proteico del gen L. Sin embargo, los autores no aseguran que tal sea la situación debido a que para codificar una proteína de 200.000 D es suficiente con 6 kb, y el gen L posee 8-9 kb. No se conocen regiones no codificantes de 2-3 kb en los genomas virales a ARN, por lo que podría suponerse que hay otras proteínas codificadas por L. En el mismo trabajo se analizaron posibles homologías entre la secuencia predicha por ellos para la proteína L de LCM y la de otras proteínas virales, y se encontró un par de residuos de ácido aspártico (-Asp-Asp-) en una bolsa hidrofóbica; esta distribución se encontró en polimerasas virales, y se ha propuesto como característica conservada entre diversas polimerasas (83). Además se encontraron otras dos zonas de 8 y 9 aminoácidos respectivamente con una gran homología con la proteína L de VSV (69,82). Recientemente, Iapalucci et al. encontraron motivos semejantes en la proteína L de Tacaribe (179), y detectaron un ARNm para un péptido de bajo peso molecular (Franze-Fernandez, comunicación personal).

Lo anterior constituye un indicio a nivel molecular de que la proteína L poseería las funciones de polimerasa viral que le

habían asignado estudios anteriores realizados con otros arenavirus (55,56).

#### 1.2.b.ii) Glicoproteínas

En células infectadas con LCM, Tacaribe, Pichindé, Lassa, Machupo y Junín (84,76,74,77,78,79) se ha descrito un glicopéptido no estructural de peso molecular entre 70 y 78 K, denominado GPC (60), que daría origen por división a las dos glicoproteínas estructurales GP-1 (45-65 K) y GP-2 (35-40 K). Buchmeier et al (85) demostraron usando anticuerpos contra péptidos sintéticos que el sitio de ruptura de GPC de LCM se encuentra entre los aminoácidos 262 y 263, en que hay un par de residuos básicos, Arg-Arg, rodeados de aminoácidos hidrofóbicos (Fig. 2). Este es un tipo de estructura que corresponde a sitios de ruptura en otros precursores (86). El ordenamiento de las dos glicoproteínas en el precursor GPC es NH<sub>2</sub>-GP-1---GP-2-COOH. Buchmeier y Oldstone (60) encontraron que ambas se encuentran en la superficie del virión, lo que sugería que la división de GPC es intracelular. Posteriormente, sin embargo, van der Zeijst (87) por iodinación encontró GPC en la superficie de viriones de LCM, y Buchmeier y Parekh (59) observaron algo de GPC en corridas electroforéticas de LCM purificado, por lo que existiría la posibilidad de que la ruptura de GPC para dar GP-1 y GP-2 no se

produjera solamente en el interior de la célula sino también en la membrana celular.

En GPC del virus Lassa también se encuentra un par Arg-Arg, que correspondería al sitio de ruptura, mientras que en Pichindé el par correspondiente es Arg-Lys (69).

El caso de Tacaribe merece un párrafo aparte, ya que el par de aminoácidos correspondiente es Arg-Thr, lo que sugiere que no hay tal sitio de ruptura (65). Este hallazgo reciente es coherente con la existencia de una sola glicoproteína, denominada G en los arnavirus Tacaribe y Tamiami (76). Como en ambos casos se observó la presencia del precursor intracelular GPC, Boersma et al. (88) trataron de dilucidar si en realidad en Tacaribe las dos glicoproteínas tienen pesos moleculares similares, pero los resultados obtenidos por estos autores haciendo electroforesis bidimensional sugieren que este no es el caso, sino que se trata de una sola glicoproteína. Los resultados obtenidos por Howard et al. (89), Damonte et al. (90) y Franze-Fernandez et al. (65) confirman la existencia del precursor GPC en células infectadas con Tacaribe y de aparentemente una sola glicoproteína en el virión. Se desconocen los mecanismos que conducirían a la aparente pérdida de la segunda glicoproteína.

La comparación de las secuencias de aminoácidos predichas para GPC de LCM, Lassa, Pichindé y Tacaribe (65,69) muestra

que existe considerable grado de conservación en la zona amino terminal, correspondiente a GP-1, pero que la conservación es llamativamente mayor en el dominio carboxiterminal, que corresponde a GP-2. En el extremo amino existen muchos sitios potenciales de glicosilación Asn-X-Ser/Thr (9 en LCM cepa Armstrong, 8 en LCM cepa WE, 11 en Lassa, 15 en Pichindé, 10 en Tacaribe). Buchmeier y Parekh demostraron que en LCM cepa Armstrong por lo menos 5 de los 9 sitios están ocupados (59).

El análisis topográfico de las glicoproteínas de LCM usando AcMs demostró que los epitopes hacia los cuales están dirigidos los anticuerpos neutralizantes se encuentran en GP-1. La cepa Armstrong, no patógena para el cobayo, posee dos epitopes neutralizantes, denominados GP-1A y GP-1D. El primero se encuentra también en otras cepas virales, incluida la patógena WE, mientras que GP-1D es exclusivo de la cepa Armstrong (59,91). En GP-1 se detectaron, además, dos sitios no neutralizantes, GP-1B y GP-1C. Los tres sitios hallados en GP-2, GP-2A, B y C, son no neutralizantes.

Usando reacciones de competición y análisis de mutantes resistentes a la neutralización mediada por AcMs se identificaron dos epitopes neutralizantes en la glicoproteína G de Tacaribe (89,92,93).

### 1.3.-Relaciones entre los arenavirus

Una característica de la familia Arenaviridae, que contribuyó a la inclusión de sus miembros en un mismo taxón, es el alto grado de reactividad cruzada que presentan en reacciones de fijación de complemento e inmunofluorescencia (18,94). Esta reactividad cruzada es muy alta entre los miembros de un mismo subgrupo, Viejo Mundo o Nuevo Mundo, y menor entre miembros de los dos diferentes subgrupos.

Los arenavirus americanos forman el complejo Tacaribe, que recibe esa denominación porque todos sus miembros comparten antígenos fijadores de complemento y antígenos detectables por inmunofluorescencia con el virus Tacaribe (revisado en 1). Mediante reacciones de fijación de complemento usando reactivos policlonales fue posible establecer distintos grados de relación entre los miembros del grupo (95), que resultaron confirmadas cuando se emplearon AcMs (89). Se encontró una relación muy estrecha entre Tacaribe y Junín, que son indistinguibles en reacciones de fijación de complemento, y una relación muy cercana entre Junín, Machupo, Tacaribe y Amapari (96,18).

Buchmeier y Oldstone identificaron el polipéptido reaccionante en fijación de complemento de Pichindé mediante inmunoprecipitación por sueros homólogos y heterólogos (97) y

determinaron que ese polipéptido es la proteína no glicosilada asociada a la nucleocápside. Demostraron que esa estructura está conservada en el complejo Tacaribe.

Coto et al (96) emplearon otro método para establecer relaciones antigénicas entre estos virus: determinaron la capacidad inductora de anticuerpos neutralizantes en cobayos de distintos arenavirus del Nuevo Mundo, así como la capacidad protectora de cada uno de ellos frente al desafío con virus Junín.

Damonte et al (98) establecieron las mismas relaciones entre los miembros del grupo Tacaribe analizando la capacidad de los mismos de replicar en células persistentemente infectadas con Junín, Pichindé o Tacaribe.

Los resultados fueron coherentes en todos los casos, confirmandose lo establecido en un principio usando reactivos policlonales.

La relación entre Tacaribe y Junín es particularmente importante porque cobayos y marmosets (Callithrix jacchus) inoculados con Tacaribe están protegidos frente a dosis letales de virus Junín (99,100,101,102), pese a que sólo se había observado una débil neutralización de Junín por sueros anti-Tacaribe (103).

La protección observada en cobayos en las primeras etapas de la infección no es atribuible a una respuesta inmune humoral (104) pero 6 semanas después de la infección con Tacaribe los animales desarrollan anticuerpos heterólogos neutralizantes de virus Junín, y presentan una típica respuesta secundaria cuando son desafiados con el mismo (101).

Estos estudios demostraron la existencia de epitopes neutralizantes compartidos por ambos virus, aunque no se ha observado neutralización de Tacaribe empleando sueros anti-Junín.

Damonte et al (90) estudiaron la reactividad cruzada a nivel molecular, mediante reacciones de inmunoprecipitación de proteínas de extractos de células infectadas con Tacaribe o Junín sueros anti-Tacaribe o anti-Junín, encontrando que las proteínas de ambos virus reaccionaban con los sueros heterólogos. Aunque se esperaba la reacción de los sueros anti-Tacaribe con las glicoproteínas de Junín, dada la protección observada "in vivo" y la inducción de anticuerpos anti-Junín por Tacaribe, es interesante que sueros anti-Junín, incapaces de neutralizar a Tacaribe, precipiten las glicoproteínas del mismo. Esto indica que se comparten otros antígenos en las glicoproteínas además de los neutralizantes.

Con respecto a las relaciones antigénicas entre los arenavirus del Viejo Mundo, la relación entre Lassa y LCM fue demostrada en

reacciones de inmunofluorescencia, pero no en fijación de complemento, poco después de descripta la enfermedad producida por el primero (19,20).

Relaciones entre LCM y Lassa, Mobala y Mopeia han sido claramente observadas en reacciones de inmunofluorescencia: anticuerpos policlonales anti-LCM reaccionaron con los otros tres virus, y, mientras el suero anti-Lassa reaccionó con LCM, no ocurrió lo mismo con los sueros contra Mobala y Mopeia (105). Buchmeier et al encontraron también reactividad cruzada entre LCM, Lassa y Mopeia empleando AcMs contra LCM (106).

Peters et al. observaron que cobayos inoculados con LCM (cepa Armstrong, atenuada para el cobayo), Mobala y Mopeia fueron protegidos frente al desafío con Lassa, mientras solamente la inoculación con Lassa protegió del desafío con la cepa WE, patógena, de LCM. La protección conferida por Mobala y Mopeia frente a Lassa no fue atribuible a anticuerpos neutralizantes (105).

Relaciones similares a las halladas para los miembros del complejo Tacaribe se han encontrado para los arenavirus africanos.

Algunos investigadores (2,107) han propuesto denominar "complejo Lassa" al conjunto de los mismos debido no sólo a las relaciones antigénicas entre los mismos, sino también a las

similitudes en los ARN, obtenidos por analisis de oligonucleotidos con RNAsa T<sub>1</sub> y a las movilidades electroforéticas semejantes de las proteínas estructurales (2,108). Estudios con AcMs permitieron a Clegg y Lloyd identificar sitios antigénicos conservados en las proteínas estructurales de Lassa y Mopeia, así como sitios que claramente diferenciaban un virus del otro (109).

También con estos virus se obtuvo una sólida protección de animales de experimentacion contra el virus Lassa usando el virus heterólogo atenuado Mopeia (primeramente denominado Mozambique): monos Rhesus inoculados con Mopeia fueron desafiados con Lassa 75 días después de la primera infección, y resultaron protegidos, con desarrollo de anticuerpos contra Lassa detectables por inmunofluorescencia; hubo una respuesta secundaria, ya que los anticuerpos anti-Lassa aumentaron 12 días despues del desafío (110)

## 2.- ANTECEDENTES

Como se ha mencionado, la familia Arenaviridae se divide en dos grupos: arenavirus del Viejo Mundo, y arenavirus del Nuevo Mundo, o "complejo Tacaribe". Existen antígenos conservados en cada grupo, lo cual constituye una de las características del taxón (24). Estos epitopes permiten establecer relaciones entre los arenavirus, y se han usado como base para la clasificación: el complejo Tacaribe se define por las relaciones antigénicas entre sus miembros (18), y se ha propuesto denominar "complejo Lassa" al conjunto de los arenavirus africanos, sobre la base del mismo tipo de relaciones (2,107).

Dada la presencia de patógenos humanos (Junín, Machupo, LCM y Lassa) entre estos virus, las relaciones antigénicas, que implican conservación de epitopes, fueron estudiadas extensamente (18,95), ya que los antígenos conservados tienen utilidad potencial como elementos de diagnóstico o profilaxis.

Con sueros inmunes contra arenavirus fue posible definir epitopes específicos de la familia detectables por fijación de complemento o por inmunofluorescencia sobre células infectadas y fijadas con acetona (111,112,107); en ambos casos se detectaban antígenos de la nucleocápside, NP, que eran los únicos antígenos conservados en ambos grupos que se conocían (97).

La obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales contra LCM (113,81) permitió definir un epitope conservado en la glicoproteína GP-2 de LCM (Viejo Mundo) y Pichindé (Nuevo Mundo). Posteriormente se demostró que este antígeno está presente en otros arenavirus del Nuevo Mundo, así como en los arenavirus africanos Lassa y Mopeia.

También se definió un epitope presente en el arenavirus africano no patógeno Mopeia y ausente en el africano patógeno Lassa (106). Este último epitope podría, quizá, emplearse como marcador de atenuación en cepas africanas de arenavirus.

Parekh y Buchmeier demostraron que ambos epitopes se superponen parcialmente (91). El epitope conservado en la glicoproteína de LCM y Pichindé, definido por los anticuerpos monoclonales 33.6, 83.6, y 57.6, fue denominado GP-2A ; el que se encuentra presente en Mopeia y no en Lassa, definido por el monoclonal 9-7.9, se denominó GP-2B.

En la Tabla 1 se muestra la reactividad de los mencionados anticuerpos monoclonales con arenavirus del Viejo y del Nuevo Mundo.

El objetivo de este trabajo fue estudiar los epitopes conservados en GP-2 y definidos por esos anticuerpos monoclonales contra LCM.

Tabla 1: Reactividad de AcMs contra GP-2 de LCM con  
 arenavirus del Viejo y del Nuevo Mundo.

AcM	Viejo Mundo			Nuevo Mundo				
	LCM	Lassa	Mopeia	Pic	Tac	Jun	Ana	Par
33.6	+	+	+	+	+	+	+	+
83.6	+	+	+		+	+	+	+
9-7.9	+		+					

Pic: Pichindé; Tac: Tacaribe; Jun: Junín; Ana: Amaparí;  
 Par: Paraná

LCM	MGQIVTMFEA	LPHIIDEVIN	IVIIVLIVIT	GIKAVYNFAT	CGIFALISFL
LA	MGQIVTMFEA	LPHIIDEVIN	IVIIVLIIIT	SIKAVYNFAT	CGILALVSFL
PV	MGQIVTFFQE	VPHVIEEVMN	IVLIALSOLA	VLKGLYNFAT	CGLVGLVTFL
	MGQIVTLIQS	IPEVLQEVFN	VALIIVSVLC	IVKGFVNLMR	CGLFQLVTFL
	MGQIVT	P EV N	I	K N	CG L FL
	LLAGRSCGMY	GLKGPDIYKG	VYQFKSVEFD	MSHLNLTMPN	ACSANNSHHY
	FLAGRSCGMY	GLNGPDIYKG	VYQFKSVEFD	MSHLNLTMPN	ACSVNNSHHY
	LLCGRSCT..	....TSLYKG	VYELQTLELN	METLNMTMPL	SCTKNNSHHY
	ILSGRSCDSM	MIDRRHNLTH	VEFNLTRMFD	NL.....PQ	SCSKNTHHY
	L GRSC		V	P	C NN HHY
	ISMGTS...G	LELTFTNDSI	ISHNFCNLTS	AFNKKTFDHT	LMSIVSSLHL
	ISMGSS...G	LEPTFTNDSI	LNHNFCNLTS	ALNKKSF DHT	LMSIVSSLHL
	IMVGNET..G	LELTFTNDSI	INHKFCNLSD	AHKKNLYDHA	LMSIISTFHL
	YKGPSNTTWG	IELTLTNTSI	ANETSGNFSN	IGSLGYGNIS	NCDRTREAGH
	G E T TN SI		N		
	SIRGNSNYKA	VSCDFNNG..	.....	.ITIQYNLTF	SDAQAQSQC
	SIRGNSNYKA	VSCDFNNG..	.....	.ITIQYNLSS	SDPQSAMSQC
	SIPNFNQYEA	MSCDFNNG..	....K....	.ISVQYNLSH	SYAGDAANHC
	TLKWLLELH	FNVLHVTRHI	GARCKTVEGA	GVLQYNLTV	GDRGGEVGRH
				QYNL	
	RTFRGRVLDM	F.RTAFGGKY	MRSRGWGTGS	DGKTTW.CSQ	TSYQYLIIQN
	RTFRGRVLDM	F.RTAFGGKY	MRSRGWGTGS	DGYTTW.CSQ	TSYQYLIIQN
	GTVANGVLQT	FMRMAWGSY	I.....ALD	SGRGNWDCIM	TSYQYLIIQN
	LIASLAQIIG	DPKIAWVGKC	FNNCSGDTCR	LTNCEGGTH.	..YNFLIIQN
		A G			Y LIIQN
				GP-1 ←	GP-2
	RTWENHCTYA	..GPFMSRI	LLSQEKTFF	TRRLAGFTTW	TLSDSSGVEN
	RTWENHCRYA	..GPFMSRI	LFAQEKTFF	TRRLSGFTTW	TLSDSSGVEN
	TTWEDHCQFS	RPSPIGYLGL	LSQRTRDIYI	SRRLGFTTW	TLSDSEGKDT
	TTWENHCTYT	...PMATIRM	ALQRTAYSSV	SRKLLGFTTW	DLSDSSGQHV
	TWE HC	P		R L G FTW	LSDS G
	PGGYCLTKWM	ILAAELKCFG	NTAVAKCNVN	HDAEFCDMLR	LIDYNKAALS
	PGGYCLTKWM	ILAAELKCFG	NTAVAKCNVN	HDEEFCDMLR	LIDYNKAALS
	PGGYCLTRWM	LIEAELKCFG	NTAVAKCNEK	HDEEFCDMLR	LFDYNKQAIQ
	PGGYCLEQWA	IIWAGIKCFD	NTVMAKCNKD	HNEEFCDTMR	LFDNFQNAIK
	PGGYCL W	A KCF	NT AKCN	H EFCD R	L D N A
	KFKEDVESAL	HLFKTTVNSL	ISDQLLMRNH	LRDLMGVPYC	NYSKFWYLEH
	KFKQDVESAL	HVFKTTLNSL	ISDQLLMRNH	LRDLMGVPYC	NYSKFWYLEH
	RLKAEAQMSI	QLINKAVNAL	INDQLIMKNH	LRDIMGIPYC	NYSKYWYLNH
	TLQLNVENSL	NLFKKTINGL	ISDSLVRNS	LKQLAKIPYC	NYTKFWYIND
		N L	I D L N L	PYC	NY K WY
	AKTGETSVPK	CWLVTNGSYL	NETHFSDQIE	QEADNMITEM	LRKDYIKRQG
	AKTGETSVPK	CWLVTNGSYL	NEIHFSQIE	QEADNMITEM	LRKDYIKRQG
	TTTGRSLPK	CWLVSNGSYL	NETHFSDDIE	QQADNMITEM	LQKEYMERQG
	TITGRHSLPQ	CWLVHNGSYL	NETHFKNDWL	WESQNLNEM	LMKEYEERQG
	TG S P	CWLV NGSYL	NE HF	N EM	L K Y RQG
	STPLALMDLL	MFSTSAYLVS	IFLHLVKIPT	HRHIKGGSCP	KPHRLTNKGI
	STPLALMDLL	MFSTSAYLIS	IFLHFVRIPT	HRHIKGGSCP	KPHRLTNKGI
	KTPLGLVDLF	VFSTSFYLIS	IFLHLVKIPT	HRHIVGKSCP	KPHRLNHMGI
	KTPLALTDIC	FWSLVFYTIT	VFLHIVGIPT	HRHIIGDGCP	KPHRITRNSL
	TPL L D	S Y	FLH V IPT	HRHI G CP	KPHR
	CSCGAFKVPG	VKTWVKRR			
	CSCGAFKVPG	VKTIWKRR			
	CSCGLYKQPG	VPVKWKR			
	CSCGYKYQR	NLTNG			
	CSCG K				

Fig. 2: Secuencia de aminoácidos deducida para GPC de LCM (cepas Armstrong y WE), Lassa (LA) y Pichindé (PV). Se indican los residuos conservados y el sitio de ruptura en GP-1 y GP-2.

### 3.- MATERIALES Y METODOS

#### 3.1.-Cultivos celulares

Celulas BHK-21, línea continua de riñón de hámster; células Vero E8, línea continua de riñón de mono verde africano (Cercopithecus ethiops); células L 929, línea continua de fibroblastos de ratón. Todas las líneas celulares fueron mantenidas a 37 C, en atmósfera con 4-6 % de CO<sub>2</sub>, empleándose Medio Esencial Mínimo (MEM), con 10 % de suero fetal bovino, antibióticos (estreptomocina: 100 mg/ml, penicilina: 100 U/ml); los repiques se realizaron una o dos veces por semana, dispersándose las células con tripsina al 0,25 %.

Se controló que los cultivos estuvieran libres de mycoplasma por tinción con el colorante Hoechst 33258 (122).

#### 3.2.-Virus

Los virus LCM y Tacaribe se prepararon en células BHK-21 y se purificaron de acuerdo con la técnica de Buchmeier et al (84). Brevemente, monocapas semiconfluentes de células BHK-21 en botellas "roller" fueron infectadas con la cepa Armstrong CA 1371 de virus LCM o la TRLV 11573 de Tacaribe con una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,1 UFP/célula; luego de un período de adsorción de 1 h a 37 C se agregó el medio de cultivo, y se incubó a 37 C durante 48 hs en el caso de LCM y 72 hs para

Tacaribe. Se cosechó el sobrenadante, que se centrifugó a 7000 rpm durante 20 min para eliminar residuos celulares; se agregaron 70 g/l de polietilenglicol (PEG) 6000-7500 y 23.2 g/l de NaCl, agitando para disolver el PEG y el NaCl, y se incubó a 4 C durante 2 hs. Se centrifugó 30 min a 5000 g, y el virus precipitado se resuspendió en un volumen igual a 1/60 del volumen original en buffer Tris-NaCl-EDTA (0,01 M, 0,1 M, 0,001M, pH 7,4) (buffer TNE). Entre 2 y 2,5 ml del virus concentrado se sembraron en 10 ml de un gradiente discontinuo de renografina consistente de renografina al 10 % en TNE sobre un colchón de renografina al 40 % en TNE. El gradiente se centrifugó 90 min a 35000 rpm, y se cosechó la banda correspondiente a la interfase; ésta se diluyó hasta aproximadamente un 10% de renografina y se sembró en un gradiente continuo de renografina (20-50 %), que se centrifugó 18 hs a 30000 rpm. Se cosechó la banda de virus, se diluyó como antes y se centrifugó 60 min a 30000 rpm. El precipitado se resuspendió en 0,5-2 ml de TNE. La concentración de proteína se determinó por el metodo de Lowry et al (123). La suspensión viral así preparada se fraccionó y conservó a -70 C hasta su uso.

La suspensión de virus Junín, cepa XJCl<sub>3</sub>, se preparó a partir de un stock preparado en cerebro de ratón lactante cedida gentilmente por el Dr.C.J. Peters, de la cual se hizo un pasaje en células Vero E6 (m.i.= 0,1); a las 72 hs pi se cosechó el

sobrenadante, que se clarificó por centrifugación a 1500 rpm durante 10 min.

### 3.3.-Titulación de virus

Todas las titulaciones se realizaron por el método de formación de placas bajo medio semisólido, usando células Vero E6. Dos ml de suspensión celular conteniendo  $2,5 - 3.0 \times 10^5$  células/ml se sembraron en cada una de las cavidades de policubetas de poliestireno rígido de seis orificios de 3.5 cm de diámetro (Costar Tissue Culture Plates 2006). Cuando las monocapas tenían 50-80 % de confluencia (24-48 hs después de sembradas las células) se realizó la infección con un inóculo de 0,250 ml de volumen. Después de 1 h de adsorción a 37 C se agregaron 3.5 ml de medio semisólido. En el caso de LCM se usó agarosa al 0,5 % en MEM con 10 % de suero fetal bovino y antibióticos, como se indicó antes; las policubetas se incubaron a 37 C en atmósfera con 4-6 % de CO<sub>2</sub> y 96 % de humedad; a los 5 días pi se tiñó con cristal violeta al 0.02 % para visualizar las unidades formadoras de placa. Para Tacaribe y Junín se uso como medio semisólido metilcelulosa al 0,8 % , según el método de Giovanniello et al. (124); se agregaron 0,5 ml de medio de cultivo a los 5 días pi, y se reveló a los 7 días pi.

### 3.4. -Extractos de células infectadas

Células BHK-21 fueron infectadas con virus Junín o Tacaribe con una m.i. de 0,1 UFP/célula. A las 24, 48, 72 y 96 hs pi se lavaron las monocapas tres veces con solución salina de fosfatos (PBS), se enjuagaron con buffer conteniendo Tris-HCL 20mM, pH 9; NaCl 137 mM; CaCl<sub>2</sub>; MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM; luego se lisaron las células durante 20 min a 4°C con el buffer anterior al cual se le había agregado 1 % de NP-40, 10 % de glicerol, y 1 % de aprotinina.

.-Anticuerpos

### 3.5.a). Anticuerpos policlonales

El suero policlonal contra LCM se preparó inoculando cobayos Hartley adultos con 200 000 UFP de LCM cepa Armstrong, y desafiándolos 3-4 semanas más tarde con la cepa WE. Entre 10 y 15 días después de la segunda inoculación los animales fueron sangrados para obtener los sueros, que se mezclaron; la mezcla de sueros presentó un título neutralizante de 1/5000, medido por el método de reducción del 80 % del número de UFP bajo agarosa.

El suero humano anti-Junín provenía de un caso de laboratorio de Fiebre Hemorrágica Argentina, y se obtuvo 7 años después de la enfermedad. El suero de mono Rhesus anti-Lassa fue cedido por el Dr. Peter Jahrling.

Sueros humanos anti-arenavirus fueron provistos por el Dr. Robert L. Shope y el Dr. Joseph Mc Cormick.

Los sueros humanos normales provenían de personal de laboratorio y administrativo que no habían tenido contacto conocido con arenavirus.

### 3.5.b).-Anticuerpos monoclonales

Se emplearon los AcMs contra LCM 33.6, 83.6, y 9-7.9, que fueron generados por Buchmeier et al.(106), y caracterizados por Parekh y Buchmeier (91). Para la preparación del líquido ascítico conteniendo cada AcM los correspondientes hibridomas se cultivaron en suspensión en MEM con 10 % de suero fetal bovino e hipoxantina aminopterin. 0,2 ml conteniendo  $10^7$  de estas células fueron inoculados por vía intraperitoneal en ratones Balb/c JYW que habían sido previamente sensibilizados con pristano. Una vez desarrollado el tumor ascítico se extrajo el líquido por punción, y se determinó el título de AcM por inmunofluorescencia indirecta, como se indica más adelante.

### 3.6.-Péptidos sintéticos

Los péptidos, correspondientes a secuencias predichas para GPC, el glicopéptido celular precursor de las glicoproteínas GP-1 y GP-2 de LCM (60), fueron sintetizados por Farshad Karimi, según la técnica descrita por Buchmeier et al (85).

### 3.7.- Acoplamiento de péptidos a KLH (keyhole lymphet hemocianin)

Se empleó el método de Liu et al. (125). Brevemente a 155  $\mu$ l de una solución de 32,2 mg/ml de KLH en 69  $\mu$ l de PBS 0,001 M pH

7,2 se le agregaron 106  $\mu$ l de una solución de 6 mg/ml de MBS (éster de n-maleimidobenzoil- N- hidroxisuccinimida, Pierce Cat. 22310) en dimetilformamida, y se mantuvo en rotación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución se pasó por una columna de Sephadex G-25 y se eluyó con buffer fosfato 0,005 M pH 6,0. Se recogieron fracciones de 1 ml y se midió la densidad óptica a 280 nm. Se juntó el contenido de los tubos con mayor densidad óptica y se agregó a 1,5 ml de PBS conteniendo 5 mg del péptido correspondiente (relación final mg péptido:mg KLH= 1). Se ajustó el pH a 7,0, se mantuvo con agitación constante durante 3 hs a temperatura ambiente, se fraccionó y conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 3.3.- Imunización de conejos

Se inocularon conejos por vía subcutánea con 200  $\mu$ g de péptido-KLH con adyuvante completo de Freund; a los 14 días se repitió la dosis pero usando adyuvante de Freund incompleto. Entre 3 y 5 semanas después de la primer dosis se aplicó una tercer dosis de 100  $\mu$ g de péptido libre con alúmina, y las muestras de sangre se tomaron a 1 semana después de la tercera inoculación. El título de anticuerpos anti-péptido se determinó por ELISA. Si había anticuerpos anti-péptido, los animales se sacrificaban por sangrado 8 semanas después de la primer dosis.

### 3.9.-Reaccion inmunológica a la gota ("dot blot")

1,5 ug de péptido 370-382 en 150 µl de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 9 fueron adsorbidos en papel de nitrocelulosa en un aparato para "dot blot" de Bio-Rad , incubando 1 h a 4 C, descartando la solución sobrenadante, y secando el papel con bomba de vacío. El bloqueo de sitios libres en la nitrocelulosa se hizo con solución salina de fosfatos (PBS) conteniendo Tween 20 al 0,005 % y leche en polvo descremada al 2 % o con seroalbúmina bovina al 3 % en PBS, durante 1 h a temperatura ambiente o 18 hs a 4 C. Las diluciones de anticuerpos se hicieron en una policubeta de 96 cavidades (Costar Tissue Culture Plates, 2096), y se transfirieron al aparato de "dot blot". Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Después de 3-6 lavados se incubó con Proteína A-Peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavó exhaustivamente y se detectó la presencia de Proteína A unida al complejo péptido-anticuerpo con un reactivo cromogénico conteniendo 4-Cl-1-naftol (HRP Color Development Reagent, Bio-Rad Cat. Nº 170-6534).

### 3.10.-Enzimoimmunoensayo

Para el enzimoimmunoensayo (ELISA) con los péptidos sintéticos se usaron placas de poliestireno rígidas Linbro/Titertek. Las mismas fueron sensibilizadas con 0,1 o 1,0 ug de péptido contenidos en 100 µl de PBS por orificio, que se dejaron secar

durante la noche a 37 C. El bloqueo se hizo con leche descremada en polvo al 2 % en PBS conteniendo 0,005 % de Tween 20, durante 1-3 hs a temperatura ambiente o 18 hs a 4 °C.

Para los ensayos con viriones de LCM las placas se sensibilizaron con 1-1.5 µg de virus purificado en NaHCO<sub>3</sub> 0,01 M, pH 9 por orificio, se incubó durante la noche a 4 °C, y se bloqueó con seroalbúmina bovina al 3 % en PBS (59).

Los ensayos con virus Tacaribe y Junín se hicieron con células Vero E6 infectadas con el virus respectivo. 100 µl de una suspensión conteniendo  $1,25 \times 10^6$  células/ml fueron sembrados en cada orificio de policubetas de 96 pozos (Costar Tissue Culture Plates 2096), incubadas a 37 °C en presencia de CO<sub>2</sub> e infectadas 24-48 hs después con virus a una m.i. de aproximadamente 1. Cuando la acción citopatogénica era de alrededor del 50 % las monocapas se fijaron con metanol frío durante 10 minutos, se secaron al aire y se guardaron a -20 °C hasta su uso.

En todos los casos la unión del anticuerpo se detectó usando Proteína A-Peroxidasa, usando o-fenilendiamina como sustrato cromogénico y midiendo la absorbancia a 492 nm en un lector automático (Flow Multiskan).

### 3.11.-Inmunofluorescencia

El método empleado fue el de Peters et al. (112), y Buchmeier et al (113).

Células L 929 sembradas en cubreobjetos colocados en cavidades de policubetas de 6 pozos fueron infectadas con LCM con una m.i. de 1, y fijadas a las 24-48 hs pi con acetona durante 10 minutos, luego de tres lavados con PBS. Los cubreobjetos se conservaron a 4 C hasta su uso. Las monocapas así fijadas se incubaron las diluciones de líquido ascítico conteniendo el anticuerpo correspondiente durante 30 minutos a 37 C, en atmósfera húmeda, se lavaron 3 veces con PBS, y se incubaron con suero de carnero anti ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína a 37 C durante 30 minutos más. Los cubreobjetos se montaron con las células hacia abajo con glicerol-PBS 9:1. En el caso de Tacaribe y Junín se emplearon células Vero E6, que se fijaron entre 72 y 96 hs después de la infección.

### 3.12. Immunoblotting

Virus LCM purificado fue hidrolizado durante 3 minutos a 100 C en presencia de dodecilsulfato de sodio y corrido electroforéticamente en gel de poliacrilamida al 10 %, según la técnica de Laemmli (126), con corriente constante de 25 miliamperes. Las proteínas virales así separadas se transfirieron electroforéticamente a nitrocelulosa, siguiendo la técnica de Burnette (127). La nitrocelulosa se incubó con leche descremada en polvo al 2 % en PBS con 0,005 % de Tween-20 para bloquear, se cortó en tiras según fuera conveniente, y cada tira se incubó con

la correspondiente dilución de anticuerpo en PBS-Tween 20 0,005 % - leche descremada 2 % durante 1 h a 37 C o toda la noche a 4 C. La unión del anticuerpo se detectó incubando con Proteína A marcada con  $I^{125}$ , y revelando por autorradiografía usando placas radiográficas Kodak XAR-5 o XRP-1.

Con los extractos de células infectadas con virus Junín o Tacaribe se siguió el mismo procedimiento.

### 3.13.-Reacción Péptido-Anticuerpo en solución

Para demostrar la unión de los anticuerpos con los péptidos en solución, la correspondiente dilución de anticuerpo (policlonal o monoclonal) en PBS, PBS-Tween 20-leche descremada en polvo, o PBS-seroalbúmina bovina, se incubó con cada péptido durante 1h a temperatura ambiente o 30 min a 37 C, y la reactividad residual del anticuerpo se midió por inmunofluorescencia, ELISA o "immunoblotting". Se consideró que había ocurrido reacción del anticuerpo con el péptido en solución cuando la unión del anticuerpo a la glicoproteína viral fue bloqueada después de la incubación con el péptido.

### 3.14.-Inoculación de cobayos con péptido

Cobayos de 350-400 g de peso fueron inoculados con 50  $\mu$ g de péptido 370-382 acoplado a KLH con adyuvante completo de Freund. A los 14 días se inoculó una dosis igual pero con adyuvante de Freund incompleto. Una semana después de la segunda dosis se

inoculó la tercera usando alúmina como adyuvante. Diez días después de la tercer inoculación los animals fueron sangrados y se determinó la presencia de anticuerpos anti-péptido en suero mediante un ensayo de ELISA. Se inoculó una cuarta dosis usando alúmina como adyuvante, y 10 días después los animales fueron sacrificados por sangrado a blanco.

### 3.15.-Ensayo de proliferación de esplenocitos

A partir de los bazos de los cobayos sacrificados se prepararon suspensiones de esplenocitos en RPMI con 5% de suero fetal bovino cortando los órganos en trozos muy pequeños y pasándolos a través de una malla muy fina. Se sembraron  $4 \times 10^5$  células por cavidad en policubetas de 96 cavidades, en presencia de 2-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M. Se estimularon 8 cavidades con Concanavalina A (0.5 ug) para control, y con virus LCM (m.i.=3) para el ensayo. A las 48 hs se hizo un pulso con  $1 \mu\text{C}$ /cavidad de Timidina- $^3\text{H}$  en RPMI a los controles. A las células que habían recibido virus se les agregó el radioactivo a las 96 hs. En todos los casos se cosecharon las células 18 hs después del pulso, se extrajo el ADN según la técnica descripta por Strong et al. (128). El índice de estimulación se calculó como la relación entre la radioactividad de los cultivos estimulados con LCM y los cultivos control.

#### 4.-RESULTADOS

##### 4.1.-Ubicación de los epitopes GP-2A y GP-2B sobre GP-2

##### 4.1.a):Ensayos preliminares.

Con el objeto de localizar ambos epitopes sobre la glicoproteína se trabajó con péptidos sintéticos correspondientes a GP-2. Estos péptidos habían sido sintetizados sobre la base de la secuencia de aminoácidos deducida para GPC (69), el glicopéptido celular de 498 residuos de longitud, precursor de las glicoproteínas estructurales de LCM, que se denominan GP-1 y GP-2 (60,84). Para seleccionar las secuencias a ensayar se tuvo cuenta el sitio de ruptura de dicho precursor predicho por Buchmeier y colaboradores, que se encuentra entre los aminoácidos 262 y 263 (85).

Los péptidos a sintetizar se seleccionaron según las zonas de mayor hidrofiliidad de la proteína, (Fig.3), ya que cuanto mayor es la hidrofiliidad mayor es la probabilidad de que la secuencia se encuentre en la superficie de la proteína, y, por lo tanto, de que sea antigénica (129). Las secuencias se superponían parcialmente, de acuerdo con los métodos desarrollados por otros autores ya sea para proteínas animales o virales (130).

El primer ensayo consistió en determinar si los AcMs 33.6, 83.6 y 9-7.9 (Tabla 1) reaccionaban en ELISA (fase sólida) con

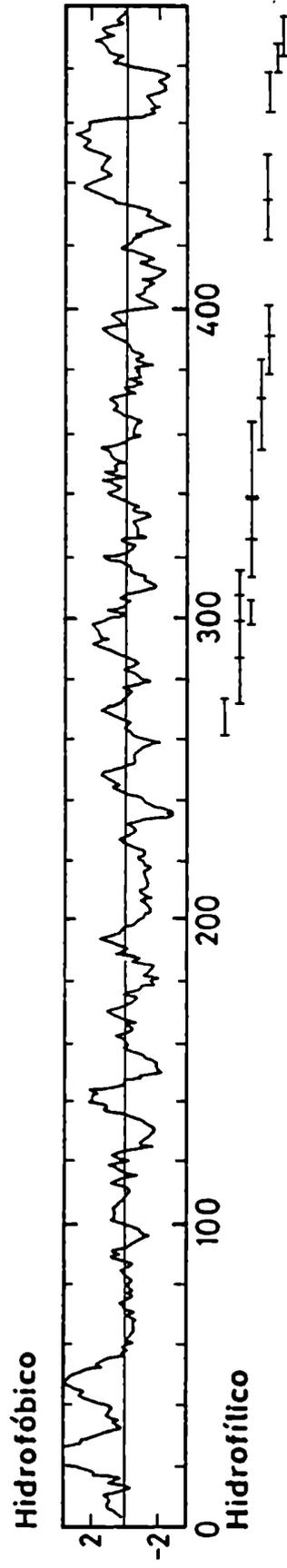


Fig. 3. Perfil de hidrofiliidad de GPC de LCR. Los segmentos corresponden a la posición de los 18 péptidos ensayados con los AcMs 33.6, 83.6 y 97.9.

0,06 nmoles de alguno/s de los péptidos correspondientes a los siguientes segmentos de GPC: 262-275, 272-285, 285-297, 294-305, 297-306, 307-315, 312-323, 323-338, 338-363, 353-370, 370-382, 378-391, 391-401, 422-435, 436-450, 465-478, 477-487, 483-498.

Un único péptido, que abarcaba los residuos 370-382 de GPC, presentó reacción positiva con los tres AcMs. Esto confirmó la superposición de los epitopes correspondientes a esos anticuerpos: GP-2A (33.6 y 83.6) y GP-2B (9-7.9), encontrada por Parekh y Buchmeier (91).

La secuencia 370-382 comprende 13 aminoácidos; entre los 8 primeros, comenzando por el extremo amino, hay 5 que están conservados en LCM, Lassa, Pichindé y Tacaribe (Fig.4; 65,69). No hay residuos conservados en el extremo carboxilo de la secuencia.

CNYSKFWYLEHAK

Fig.4: Secuencia de aminoácidos del péptido 370-382. Se han subrayado los residuos conservados en LCM, Lassa, Pichindé y Tacaribe.

4.1.b): Titulación de los AcMs 33.6 y 9-7.9 con 370-382 por la técnica de "dot blot"

Como confirmación de la reactividad de la secuencia con 33.6 y 9-7.9 se titularon los mismos en "dot blot", según se indica en Materiales y Métodos. Se usó un antisuero preparado en conejo contra 370-382 como control positivo. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Titulación por "dot blot" de los AcMs 33.6 y 9-7.9 con la secuencia 370-382.

Dilución	1/4	1/16	1/64	1/256	1/1024	1/4096	1/16384
AcM							
33.6	3+ <sup>@</sup>	3+	3+				
9-7.9	4+	3+	3+	3+	2+		
Control positivo*	3+	3+					
Control negativo#							-

\*Suero de conejo anti 370-382

#AcM contra la glicoproteína del virus Tacaribe.

@Las cruces indican intensidad de color del sustrato cromogénico empleado,  $\alpha$ -Cl-naftol (ver Materiales y Metodos).

Este experimento confirmó que 33.6 y 9-7.9 reaccionan con la secuencia 370-382, y sugirió que 9-7.9 tiene mayor afinidad por la misma que el primero, e incluso que el antisuero preparado en conejo, ya que presentó un título significativamente mayor.

4.1.c): Reactividad de los AcMs 33.6, 83.6 y 9-7.9 con la secuencia 370-382 en ELISA.

i) Determinación de la cantidad de péptido óptima para trabajar con los AcMs en ELISA

Con el objeto de determinar la cantidad de péptido 370-382 óptima para obtener una densidad óptica adecuada en ensayos de ELISA con los AcMs, se realizaron titulaciones de estos utilizando 0,06, 0,6 y 6 nmoles (0,1, 1, y 10 ug respectivamente) de péptido por microcubeta. En la Fig. 5 se muestran los resultados. Con 0,6 y 6 nmoles la densidad óptica resultó muy alta, por lo que se decidió trabajar con 0,06 nmoles por microcubeta. 83.6 presentó un comportamiento anómalo, ya que pese a que con 0,6 y 6 nmoles la densidad óptica fue similar a la de los otros AcMs, con 0,06 nmoles fue muy baja.

ii) Determinación del título de los AcMs 33.6, 83.6 y 9-7.9 con el péptido 370-382 en ELISA

Los resultados obtenidos fueron similares a los del "dot blot", ya que nuevamente 9-7.9 mostró un título considerablemente

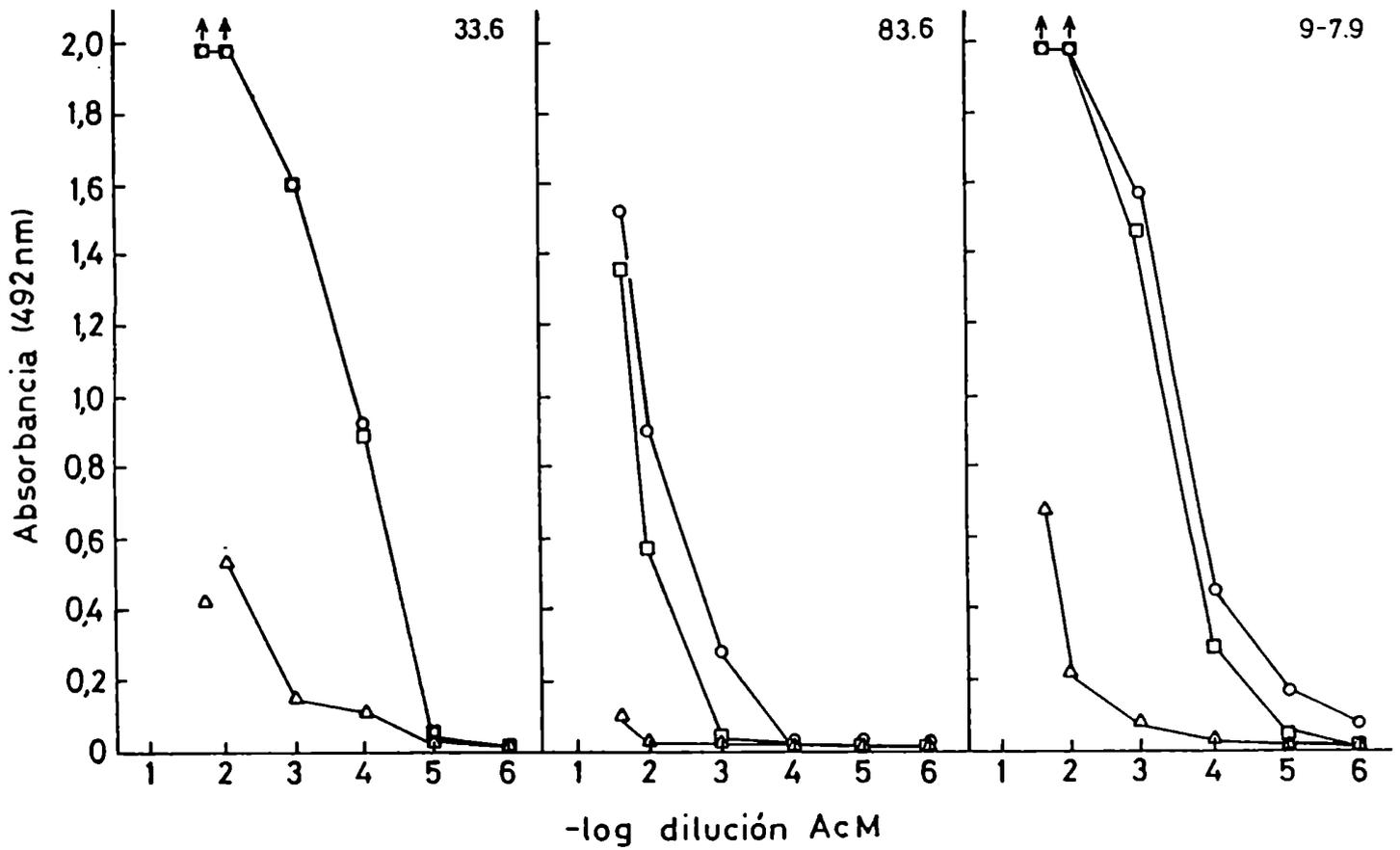


Fig.5: Titulación de los AcMs 33.6, 83.6 y 9-7.9 en ELISA con las siguientes cantidades de péptido 370-382.  $\circ$ : 6 nmoles;  $\square$ : 0,6 nmoles;  $\Delta$ : 0,06 nmoles.

mayor que los otros dos (Tabla 3). Para confirmar la especificidad de la reacción se realizó simultáneamente el ensayo con los péptidos adyacentes a 370-382, secuencias 353-370 y 378-391, usándose los inmunosueros de conejo contra cada uno como controles positivos y un AcM contra la glicoproteína GP-1 de LCM como control negativo. Los resultados se muestran en la Fig.6 y en la Tabla 3, donde se consignan las secuencias correspondientes a los tres péptidos, que en conjunto abarcaban el segmento 353-391 de GPC de LCM. Se han subrayado los residuos conservados en LCM, Lassa, Pichindé y Tacaribe.

Como puede observarse, los tres AcMs reaccionaron específicamente con la secuencia 370-382, sin presentar reacciones cruzadas con los otros péptidos, algo que sí ocurrió con los inmunosueros de conejo antipéptidos. Esto no debe sorprender, ya que existe superposición de secuencias entre los péptidos adyacentes y 370-382. En la Tabla 3 se han incluido los títulos de los AcMs con el virus LCM completo.

Nuevamente 9-7.9 presenta título más alto que los demás, incluyendo el inmunosuero de conejo, y más alto con el péptido que con el virus.

Es importante destacar que mientras en "dot blot" los AcMs reaccionaron con 0,9 nmoles de péptido, en el ensayo de ELISA se usaron sólo 0,06 nmoles. Aún cuando se había demostrado que son

epitopes parcialmente superpuestos (91), resultó interesante que GP-2A y GP-2B parecieran estar confinados a una secuencia de sólo 13 ami

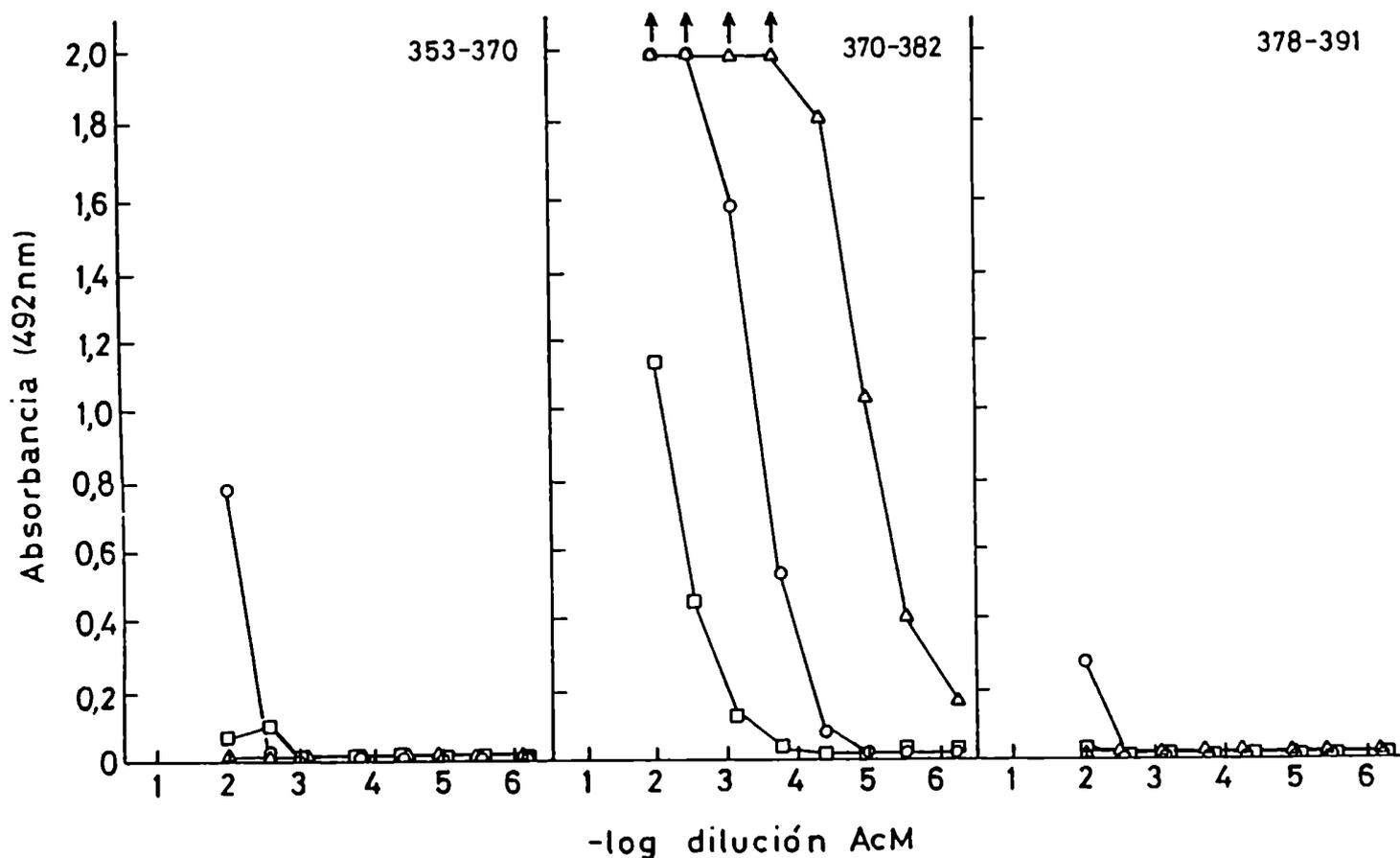


Fig.6: Reactividad de los AcMs 33.6, 83.6 y 9-7.9 con péptidos correspondientes a secuencias de GPC de LCM. ○:33.6; □:83.6; △:9-7.9. Las secuencias están indicadas en la Tabla 3.

**Tabla 3: Reactividad de AcMs contra LCM con péptidos correspondientes a los aminoácidos 353-370, 370-382 y 378-391 de GPC.**

GPC.... 353=DQLLMRNHLRDLMGVPYCNYSKFWYLEHAKTGETSVPKC=391...  
 Ac Título en ELISA

	Viriones LCM	353-370	370-382	378-391
33.6	83.176	<100	25.600	<100
83.6	32.768	<100	6.400	<100
9-7.9	28.526	<100	1.638.400	<100
2-11.10 <sup>@</sup>	>10 <sup>6</sup>	<100	<100	<100
Suero I*	NR	102.400	1600	1600
Suero II	NR	<100	1600	400
Suero II	NR	<100	1600	6400

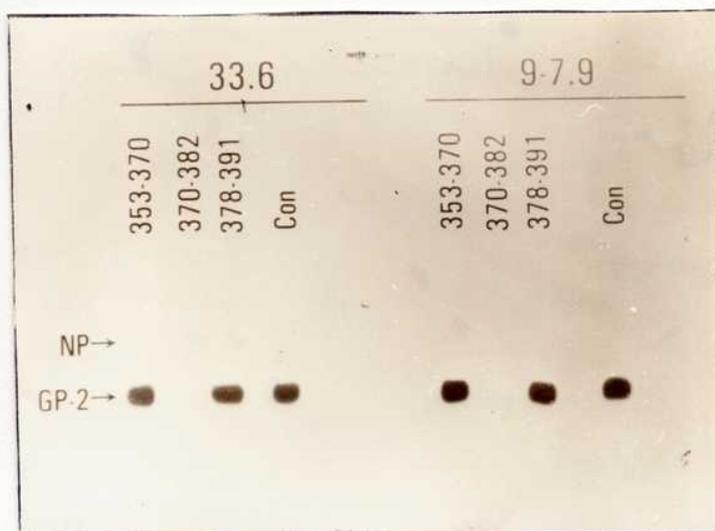
@: AcM contra GP-I (Control negativo). \*: Sueros I, II y III: Sueros de conejo anti-353-370, 370-382 y 378-391 respectivamente.

#### 4.1.d):Reacción de los AcMs con el péptido 370-382 en solución:

Tanto en "dot blot" como en ELISA los péptidos se encontraban adsorbidos sobre una fase sólida (membrana de nitrocelulosa y superficie de la placa respectivamente), y el ensayo se hizo sobre el péptido "seco", lo cual implica una restricción en cuanto al número y tipo de conformaciones que el mismo puede adoptar si se las compara con las conformaciones en solución. La interacción péptido-fase sólida podría hacer que quedaran expuestos residuos que reaccionen con los AcMs en esta situación particular pero no en solución. Para determinar si éste era el caso, se incubaron los AcMs 33.6 y 9-7.9 (líquido ascítico diluido 1:50) con 50 µg (30 nmoles) de péptido 370-382 y 50 µg de cada uno de los péptidos adyacentes (24 nmoles de 353-370 y 34 nmoles de 378-391), durante 30 minutos a 37 C, y se determinó si dicha incubación bloqueaba la unión de los AcMs a GP-2 de LCM en inmunoblots ("Western blot") de proteínas de LCM (Fig.7) y en inmunofluorescencia sobre células L929 infectadas con LCM y fijadas con acetona (Tabla 4).

Los resultados demostraron que 33.6 y 9-7.9 reaccionaron específicamente en solución con la secuencia 370-382, ya que la preincubación con ésta bloqueó la unión a GP-2, mientras no hubo efecto con las otras secuencias. Además se demostró que la secuencia de aminoácidos reaccionante con los AcMs en la proteína

desnaturalizada es equivalente a la secuencia con la que esos anticuerpos reaccionan en el péptido 370-382.



**Fig.7:** Actividad bloqueante de la unión de 33.6 y 9-7.9 a GP-2 ejercida por el péptido 370-382. Inmunoblot. Virus LCM purificado, hidrolizado en buffer conteniendo SDS-2-mercaptoetanol fue corrido electroforéticamente en un gel de poliacrilamida con SDS al 10%. Las proteínas se transfirieron electroforéticamente a nitrocelulosa y se cortaron tiras que se incubaron individualmente con los AcMs, previamente incubados con los péptidos indicados o con diluyente (Con). Luego se siguió un protocolo de Western blot estándar, para detectar GP-2 en las tiras, usando Proteína A-I<sup>125</sup> para detectar la unión .

Tabla 4: Efecto inhibitor de la unión de los AcMs 33.6 y 9-7.9 a la glicoproteína GP-2 de LCM ejercido por el péptido 370-382. Inmunofluorescencia.

AcM	<u>Intensidad de fluorescencia después de</u>			
	<u>incubar con el péptido</u>			
	353-370	370-382	378-391	Ninguno*
33.6			++++	++++
9-7.9	++++		++++	++++
2-11-10#	++++	++++	++++	++++

\*AcMs incubados con diluyente

#AcM contra GP-1 de LCM.

Los experimentos descriptos hasta ahora no demuestran fehacientemente que la secuencia 370-382 sea realmente la secuencia con que los AcMs reaccionan en la proteína nativa, es decir en el virión. Tanto en las células fijadas con acetona en inmunofluorescencia como en la nitrocelulosa del inmunoblot las proteínas virales se encuentran desnaturalizadas, por lo tanto lo

único demostrado es que los AcMs estaban "viendo" la misma secuencia en el péptido y en GP-2 desnaturalizada, es decir en la estructura primaria de la misma, presentada en forma lineal. Una secuencia pequeña, de solo 13 aminoácidos, puede adoptar en la glicoproteína completa (236 residuos en este caso), una conformación diferente de la adoptada por el péptido en solución, ya que el resto de la cadena polipeptídica influye en la determinación de la estructura secundaria (131).

Por esto era necesario verificar que la preincubación con 370-382 también bloqueaba la unión de los AcMs a la proteína en estado nativo, en el virión.

Con ese objeto se repitió la experiencia de bloqueo incubando los AcMs con los tres péptidos, como se indicó anteriormente, y se utilizaron estos anticuerpos así preincubados en un ensayo de ELISA empleando viriones de LCM completos. El resultado se presenta en la Fig.8, que muestra el bloqueo de la unión de 33.6 a LCM. Lo mismo resultó con 9-7.9.

Por lo tanto se puede inferir que la conformación del péptido 370-382 que predomina en solución corresponde a la que ese segmento adopta en la glicoproteína nativa, y que la secuencia representa los epítopos GP-2A y GP-2B.

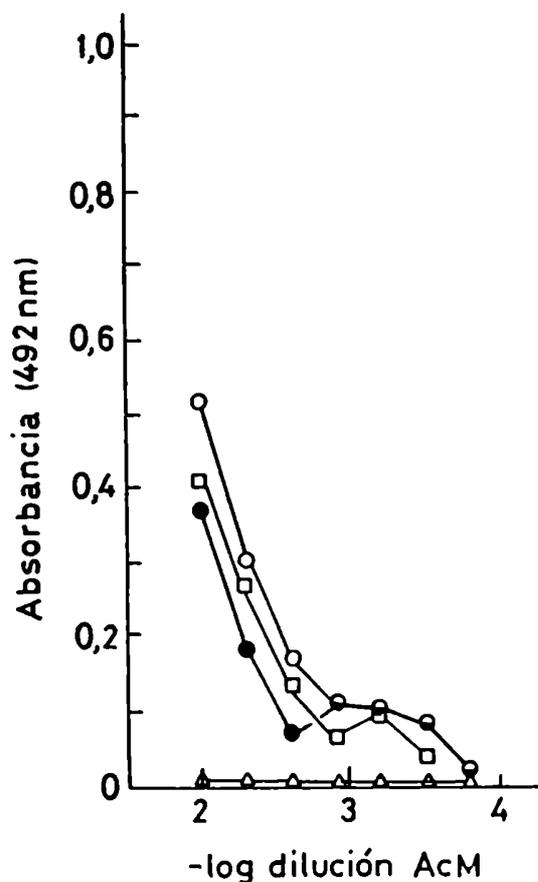


Fig. 8: Efecto bloqueante de la unión de 33.6 a viriones de LCM debido al péptido 370-382. El AcM fue incubado con los péptidos como se indicó en la leyenda de la Fig. 7 y se usó en ELISA contra viriones de LCM. ●: Control sin péptido; ○: 353-370; △: 370-382; □: 378-391.

#### 4.2.-Presencia del epitope GP-2A en arenavirus del Nuevo Mundo

La reactividad de 33.6 con arenavirus del Nuevo Mundo o complejo Tacaribe (Tabla 1;81) implica que el epitope correspondiente está presente también en este subgrupo de la familia, pero era de interés comprobarlo más precisamente. Con este fin se realizó el mismo ensayo de bloqueo de la unión de 33.6 a la glicoproteína, trabajando con células infectadas con virus Junín o Tacaribe. Se hicieron ensayos de inmunofluorescencia (Tabla 5) y ELISA (Fig.9).

Nuevamente la unión a la glicoproteína viral fue específicamente bloqueada por la secuencia 370-382. En el caso de Junín hubo cierto grado de inhibición cuando se incubó con 378-391, pero con 370-382 el efecto fue total. En el caso de Tacaribe la preincubación con 353-370 aumentó la unión del AcM. No tenemos explicación aún para estos fenómenos, pero no invalidan el hecho de que la unión del AcM fue específicamente bloqueada por 370-382.

De lo anterior se concluye que el determinante antigénico GP-2A, contenido en el segmento 370-382 de GPC de LCM, está, en efecto, presente en ambos grupos de la familia Arenaviridae, constituyendo el primer epitope conservado a nivel de la glicoproteína que se describe.

Cuando se realizó el mismo experimento tratando de detectar glicoproteínas de Junín y Tacaribe por inmunofluorescencia o en inmunoblots de extractos de células infectadas usando 33.6 preincubado con 370-382, los resultados fueron similares (Tabla 5, Fig.10).

Tabla 5: Efecto inhibitor de la unión del AcM 33.6 a células infectadas con virus Junín y Tacaribe ejercido por el péptido 370-382. Inmunofluorescencia.

Virus	Intensidad de fluorescencia después de incubar con el péptido			
	353-370	370-382	378-391	Nin-guno*
Junín	++++		+++	++++
Tacaribe	++++		++++	++++

\* 33.6 incubado con diluyente

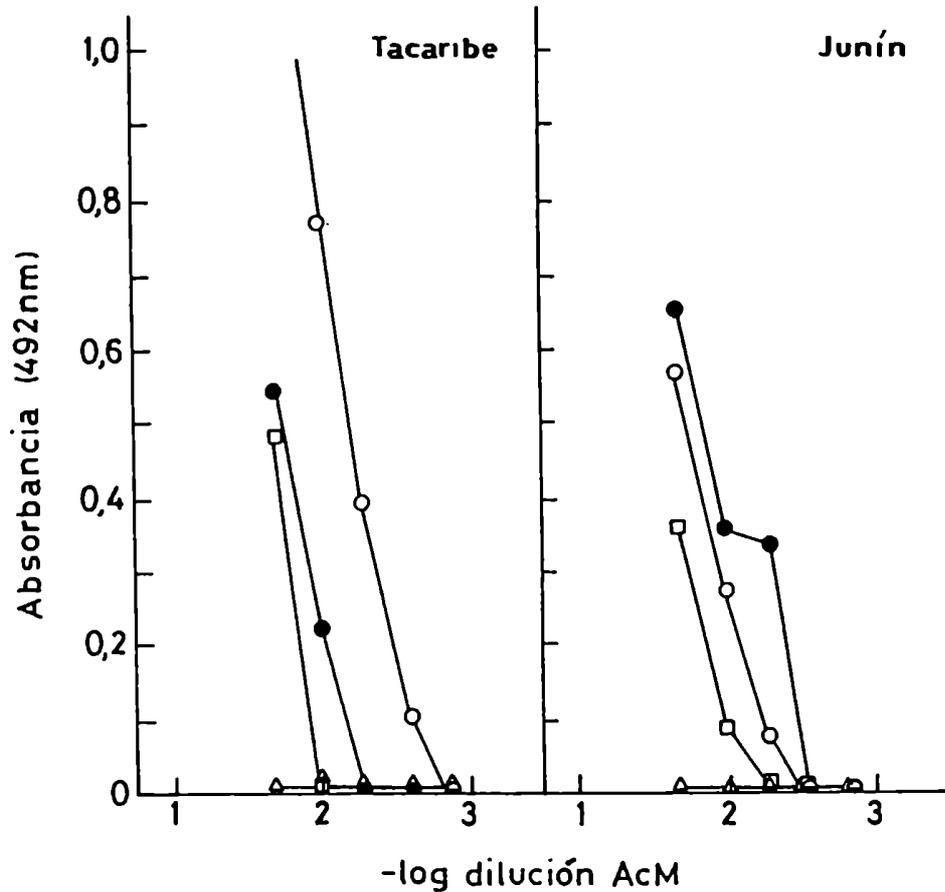
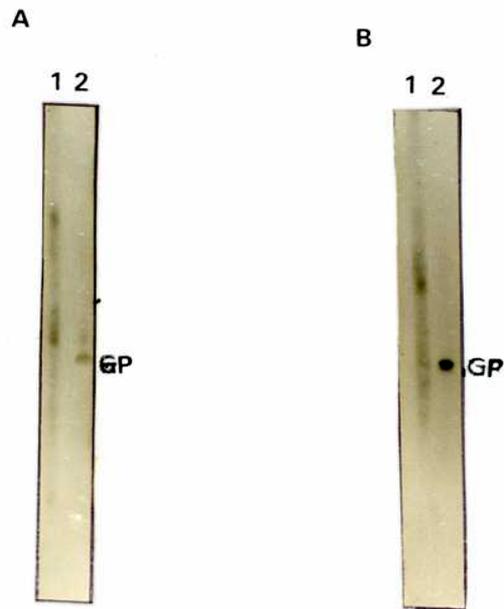


Fig.9: Efecto bloqueante de la unión del AcM 33.6 a células infectadas con Tacaribe y Junín. Monocapas de células Vero fueron infectadas con los virus Junín o Tacaribe (m.i.= 0,1), fijadas con metanol a 4°C cuando había aproximadamente 50% de efecto citopático, y usadas en ELISA con el AcM incubado con los péptidos como se indica en Materiales y Métodos. ●:Control sin péptido; ○:353-370; △:370-382; ◻:378-391.



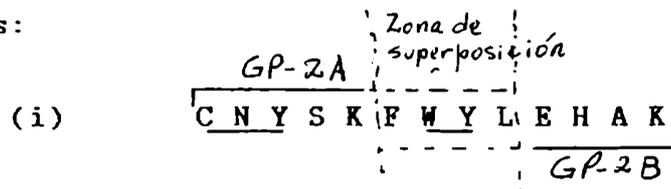
**Fig. 10:** Efecto bloqueante de la unión del AcM 33.6 a la glicoproteína de arenavirus del Nuevo Mundo. Extratos de células BHK infectadas con a): virus Junín, o b): virus Tacaribe fueron corridos electroforéticamente, transferidos a membranas de nitrocelulosa y usados en un ensayo de Western blot con el AcM 33.6 preincubado con el péptido 370-382 (1) o diluyente (2).

4.3.-Ubicación de los límites de los epitopes GP-2A y GP-2B en la secuencia 370-382.

Parekh y Buchmeier (91) demostraron que los epitopes definidos por 33.6 y 9-7.9, GP-2A y GP-2B respectivamente, se superponen parcialmente. Los resultados presentados hasta aquí demuestran que ambos están comprendidos en el segmento 370-382 de GPC de LCM. Para definir con mayor precisión los límites de ambos epitopes dentro de esa secuencia, se trabajó con péptidos derivados de la misma por deleciones a partir del extremo amino y/o carboxilo.

4.3.a): Reactividad de los AcMs 33.6 y 9-7.9 con péptidos con deleciones en el extremo amino.

Los cinco residuos carboxiterminales de 370-382 no están conservados en los arenavirus cuya secuencia se conoce (65,69), y los aminoácidos conservados se encuentran en el extremo amino, por lo que parecía lógico suponer que el antígeno común de la familia, GP-2A, está en el extremo amino, y el no conservado, GP-2B, en el extremo carboxilo, con algunos residuos superpuestos en el centro. Se postuló la siguiente distribución para ambos epitopes:



Para comprobarlo se probó la reactividad de 33.6 y 9-7.9 con una serie de péptidos derivados de 370-382, con deleciones amino terminales y el extremo carboxiterminal común (Lys en 382). Se incluyó además una secuencia que incluía Pro 368 y Tyr 369, ya que estos residuos están conservados (Tabla 3).

La serie completa de péptidos empleados comprendía: 368-382; 370-382; 372-382; 374-382 y 376-382. No se incluyeron péptidos más cortos porque se ha establecido que una secuencia para ser antigénica debe tener como mínimo siete residuos de longitud (132).

Los resultados del ensayo de ELISA se muestran en la Fig.11 y en la Tabla 6.

De acuerdo con nuestra hipótesis (i) con respecto a la distribución de epitopes, a medida que se eliminan residuos del extremo amino debería disminuir la reactividad de 33.6, conservándose la de 9-7.9. Como se puede ver en la Tabla 6, no fue esto lo que ocurrió, sino que ambos AcMs reaccionaron de la misma manera con los cinco péptidos, por lo que no se puede inferir la ubicación de GP-2A y GP-2B a partir de estos datos.

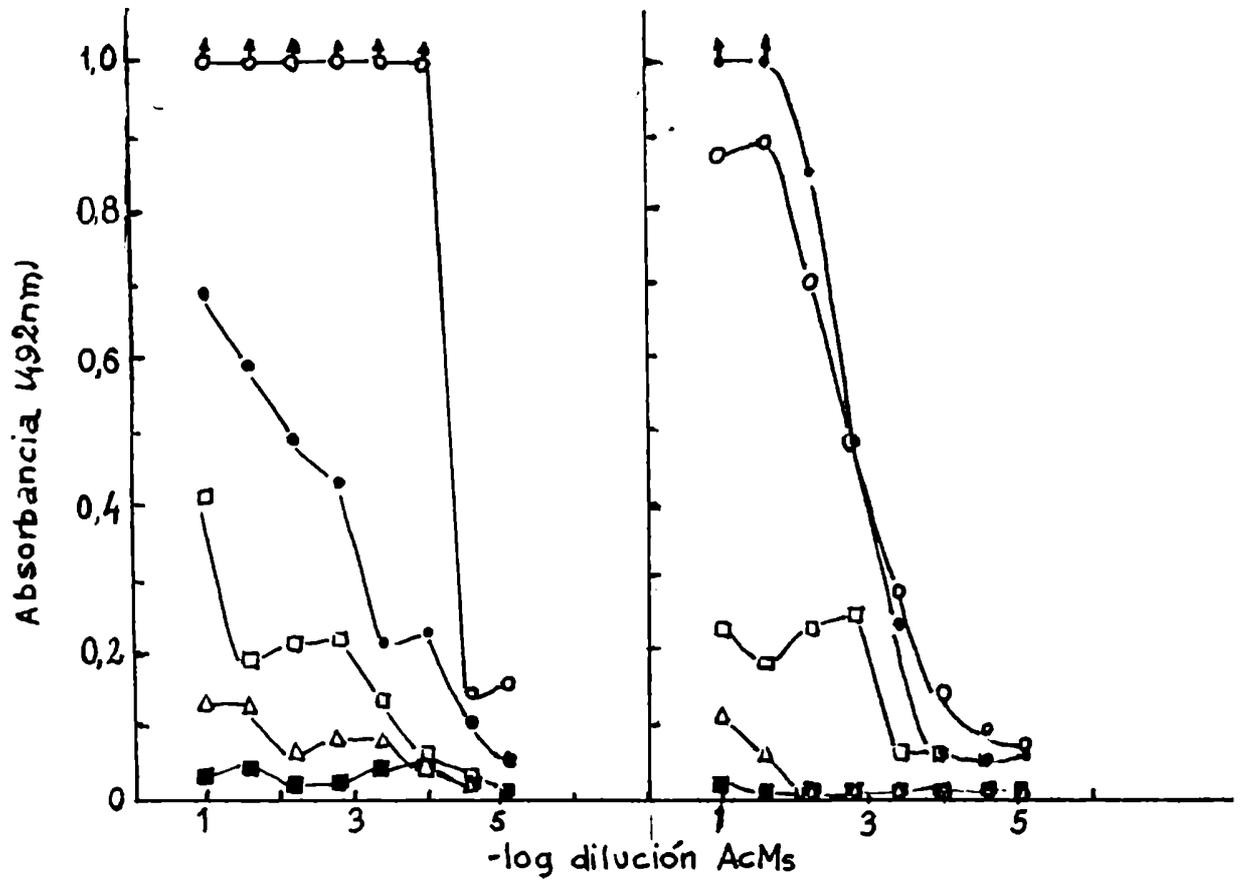


Fig. 11. Reactividad en ELISA de péptidos obtenidos por deleciones amino terminales de 370-382 con AcMs contra GP-2 de LCH. a) 33.6; b) 9-7.9. ○ 368-382; ● 370-382; □ 372-382; △ 374-382; ■ 376-382.

Tabla 6: Efecto de deleciones amino terminales en la reactividad de los AcMs 33.6 y 9-7.9 con secuencias conservadas de GP-2.

<u>Secuencia de GPC</u>	<u>Péptido</u>	<u>Título en ELISA</u>	
		<u>33.6</u>	<u>9-7.9</u>
368-382	PYCNYSKFWYLEHAK	>40.960	>40.960
370-382	CNYSKFWYLEHAK	>40.960	>40.960
372-382	YSKFWYLEHAK	2.560	2.560
374-382	KFWYLEHAK	40	10
376-382	WYLEHAK	<10	<10

Los resultados muestran que los residuos 370-371 (Cys-Asn) son importantes para ambos epitopes, ya que el título de los dos AcMs disminuye de >40.960 a 2.560 cuando dichos amino ácidos son eliminados, y que el extremo carboxilo no contribuye a la reactividad de la secuencia, ya que la eliminación de los residuos 372-374 (Tyr-Ser) suprimió la reacción prácticamente en su totalidad y no hubo ninguna reacción con la última secuencia, el extremo carboxiterminal Trp-Tyr-Leu-Glu-His-Ala-Lys, del cual sólo Trp-Tyr están conservados en arenavirus del Viejo y del Nuevo Mundo.

4.3.b):Reactividad de los AcMs 33.6 y 9-7.9 con péptidos con deleciones amino y carboxiterminales

Sobre la base de los resultados anteriores se probó la reactividad en ELISA de otra serie de péptidos con deleciones amino terminales, en los cuales se habían suprimido los cuatro aminoácidos del extremo carboxilo que no contribuían a ninguno de los epitopes (Glu-Hys-Ala-Lys) (Tabla 7). Las secuencias ensayadas fueron 368-378, 370-378, y 372-378. Nuevamente la secuencia más corta que se probó fue de siete aminoácidos de longitud, por las evidencias presentadas por diferentes autores de que ese es el menor número de residuos necesarios para que un sitio sea antigénico (132,152,157).

La Fig.12 y la Tabla 7 muestran los resultados de este segundo experimento.

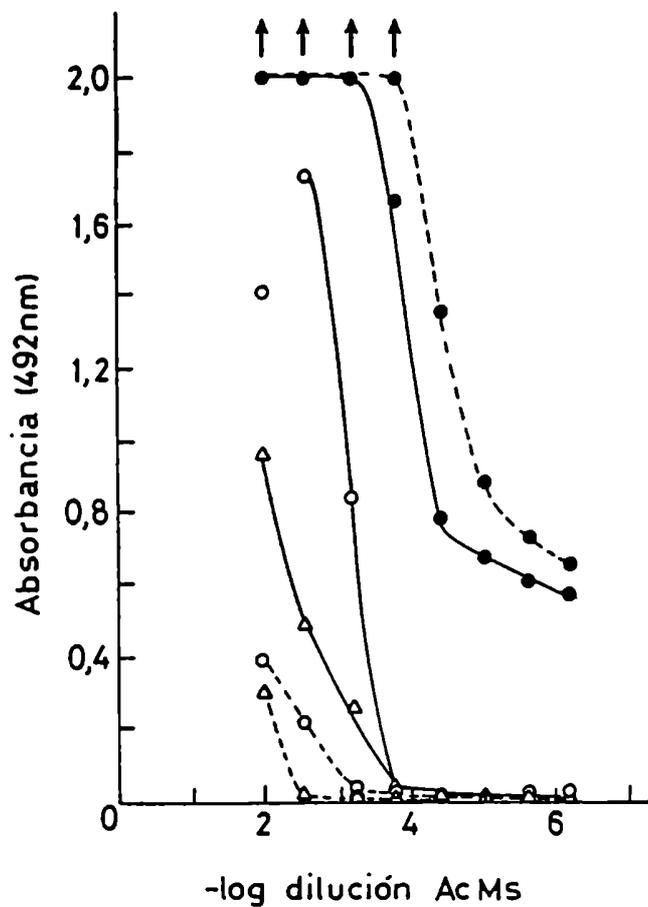


Fig. 12: Reactividad en ELISA de peptidos derivados de 370-382 mediante deleciones amino y carboxiterminales con AcMs contra GP-2 de LCM. ●:PYCNYSKFWYL; ○:CNYSKFWYL; Δ:YSKFWYL; — 33.6; ----9-7.9.

**Tabla 7: Efecto de deleciones amino y carboxi terminales de la secuencia 370-382 sobre la reactividad de los AcMs 33.6 y 9-7.9.**

<u>Secuencia de</u> <u>GPC</u>	<u>Péptido</u>	<u>Título en ELISA</u>	
		<u>33.6</u>	<u>9-7.9</u>
368-378	PYCNYSKFWYL	40960	40960
370-378	CNYSKFWYL	6400	6400
372-378	YSKFWYL	1600	100

En este caso, la eliminación de Pro-Tyr 368-369 disminuyó el título apreciablemente, algo que no ocurrió cuando se hizo la misma deleción en el péptido 370-382, es decir cuando estaban incluidos los cuatro residuos carboxiterminales (ver Tabla 6). Esto sugiere la posibilidad de que exista un cierto grado de cooperación entre estos últimos-Glu-Hys-Ala-Lys, y Cys-Asn-de acuerdo con la hipótesis de Barlow et al (133) que han sugerido que todos los epitopes tienen un cierto grado de discontinuidad.

Cuando se suprimieron los aminoácidos Cys-Asn 370-371 la reactividad de 33.6 cambió igual que con la serie de péptidos anteriores (Tabla 6), y la de 9-7.9 prácticamente desapareció.

Considerando solamente los resultados de ELISA con los péptidos derivados de 370-382, que se resumen en la Tabla 8, la mínima secuencia que contiene los dos epitopes GP-2A y GP-2B abarcaría los residuos 370-378, y el extremo carboxilo de GP-2B se encontraría entre Ser 373 y Lys 374.

#### 4.3.c): Reactividad de los AcMs 33.6 y 9-7.9 con los péptidos con deleciones amino y carboxiterminales en solución

Debían tenerse en cuenta las posibles restricciones conformacionales debidas a que los péptidos se encuentran adsorbidos a una fase sólida ya mencionadas, por lo que era

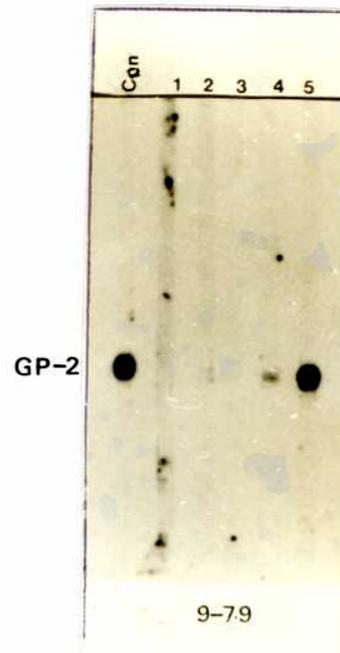
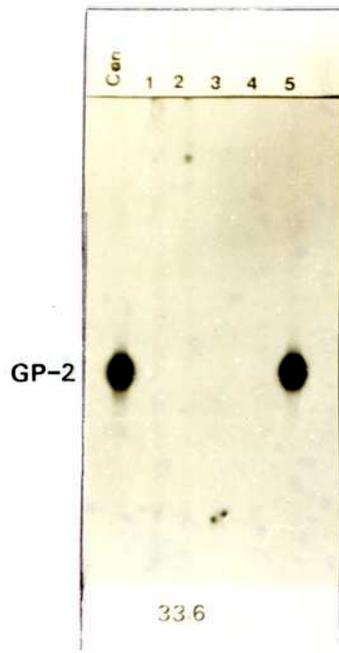
**Tabla 8:** Reactividad en ELISA de péptidos derivados de 370-382 con los AcMs 33.6 y 9-7.9. Resumen.

<u>Secuencia en</u> GPC	<u>Péptido</u>	<u>Título en ELISA</u>	
		<u>33.6</u>	<u>9-7.9</u>
<b>Experimento 1</b>			
368-382	PYCNYSKFWYLEHAK	>40.960	
370-382	CNYSKFWYLEHAK	>40.960	
372-382	YSKFWYLEHAK	2.560	
374-382	KFWYLEHAK	40	10
376-382	WYLEHAK	<10	<10
<b>Experimento 2</b>			
368-378	PYCNYSKFWYL	>40.960	
370-378	CNYSKFWYL	6.400	
372-378	YSKFWYL	1600	100

necesario verificar si la reaccion entre los AcMs y los mismos ocurría en solución. Se preincubaron los AcMs con las secuencias truncadas y se emplearon en un protocolo de "Western blot" para detectar GP-2 de LCM.

En la Fig.13 se muestran los resultados obtenidos con la primer serie de péptidos, con deleciones amino terminales. Todas las secuencias, excepto 376-382, reaccionaron con 33.6 y 9-7.9, como lo demuestra el bloqueo de la unión a GP-2.

Es interesante el caso de 374-382, ya que bloqueó totalmente la unión de 33.6, pero sólo parcialmente la de 9-7.9, mostrando que la pequeña diferencia de título en ELISA (40 para 33.6, 10 para 9-7.9, Tabla 8), en este caso es significativa.



Con: Control

1: 368-382

2: 370-382

3: 372-382

4: 374-382

5: 376-382

PYCNYSKFWYLEHAK

CNYSKFWYLEHAK

YSKFWYLEHAK

KFWYLEHAK

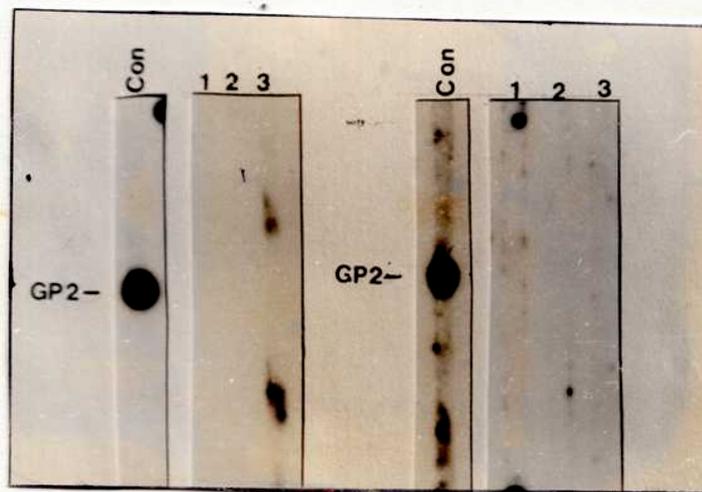
WYLEHAK

**Fig.13:** Actividad bloqueante de la unión de 33.6 y 9-7.9 a GP-2 de péptidos con deleciones amino terminales derivados de 370-382. Se siguió el procedimiento detallado en la leyenda de la Fig.6.

Como muestra la Fig.13 no hubo diferencias en la reactividad en solución entre ambos AcMs, pese a que en fase sólida (ELISA) el título de 9-7.9 con 372-378 había disminuido sensiblemente (Tabla 7). Este fenómeno puede explicarse por restricciones conformacionales impuestas sobre el péptido adsorbido a la fase sólida, o por la mayor cantidad de péptido presentada al Ac en solución (50 nmoles, mientras en fase sólida eran sólo 0,1nmoles).

En la Fig.14 se muestran los resultados del mismo ensayo utilizando las secuencias derivadas de 370-382 por deleciones amino terminales en las que se había suprimido el extremo carboxilo.

La Tabla 9 resume los resultados de reactividad en solución obtenidos con ambas series de péptidos. Todas las secuencias conteniendo el segmento 372-378 (Tyr- Ser- Lys- Phe-Trp-Tyr-Leu) presentaron actividad bloqueante. La secuencia 376-382, de igual longitud que la anterior, que no contenía el segmento 372-378 completo, no tuvo efecto bloqueante.



33.6

9-7.9

Con: Control

1: 368-378

2: 370-378

3: 372-378

PYCNYSKFWY

CNYSKFWYL

YSKFWYL

**Fig.14** :Actividad bloqueante de la unión de 33.6 y 9-7.9 a GP-2 de péptidos con deleciones amino y carboxi terminales.

Tabla 9: Actividad bloqueante la unión de 33.6 y 9-7.9 a GP-2 de ICM de péptidos con deleciones amino y carboxi terminales.

Resumen.

<u>Secuencia en</u>	<u>Péptido</u>	<u>Actividad bloqueante</u>	
		<u>33.6</u>	<u>9-7.9</u>
GPC			
Experimento 1			
368-382	PYCNYSKFWYLEHAK	+	+
370-382	CNYSKFWYLEHAK	+	+
372-382	YSKFWYLEHAK	+	+
374-382	KFWYLEHAK	+	+ -
376-382	WYLEHAK		
Experimento 2			
368-378	PYCNYSKFWYL	+	+
370-378	CNYSKFWYL	+	+
372-378	YSKFWYL	+	+

#### 4.4.-Determinación de la mínima secuencia antigénica conservada en la glicoproteína de arenavirus del Viejo y del Nuevo Mundo

Los datos presentados hasta aquí permitieron localizar los epitopes GP-2A y GP-2B en la glicoproteína GP-2 de LCM, (Tablas 3, 6 y 7), determinar la mínima secuencia antigénica para los AcMs que los definen (33.6 y 9-7.9) tanto en fase sólida (ELISA) como en solución (Tabla 8 y 9), y verificar que GP-2A está conservado en arenavirus de los dos subgrupos, Viejo y Nuevo Mundo (Tablas 4 y 5). Esto último confiere a este epitope especial interés, ya sea desde el punto de vista de la evolución de esta familia viral, o desde el punto de vista práctico, como posible reactivo para diagnóstico y/o profilaxis para todo el grupo. Por esta razón se quiso verificar si 372-378, la mínima secuencia reactiva con 33.6 capaz de bloquear la unión a GP-2 de LCM (Tabla 9), podía bloquear la unión del mismo AcM a la glicoproteína de arenavirus del Nuevo Mundo. También se deseaba comprobar que los aminoácidos carboxiterminales Leu-Glu-Hys-Ala-Lys no estaban involucrados en la reacción de 33.6 con arenavirus de este grupo. Con este objeto se incubaron los péptidos 368-378, 370-378 y 372-378 con 33.6 durante 30 minutos a 37C, como se detalló antes, y se usó el AcM en inmunofluorescencia sobre células infectadas con Tacaribe, usando

células infectadas con LCM como control positivo. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Actividad bloqueante de la unión de 33.6 a la glicoproteína de arenavirus de péptidos derivados de 370-382 por deleciones amino y carboxiterminales. (Inmunofluorescencia).

<u>33.6 incubado con</u>		<u>Inmunofluorescencia de</u>	
<u>péptido</u>		<u>células infectadas con</u>	
		LCM	Tacaribe
368-378	PYCNYSKFWYL		
370-378	CNYSKFWYL		
372-378	YSKFWYL		
353-370	*	+	+
Ninguno		+	+

\*Control de especificidad

Los resultados anteriores sugieren que la mínima secuencia antigénica conocida conservada en los arenavirus a nivel de la glicoproteína está contenida en el heptapéptido 372-378. Este contiene tres residuos conservados en LCM, Lassa (Viejo Mundo)

(69), Pichindé (70) y Tacaribe (65) (Nuevo Mundo) (Fig.15), que, junto con el resto de la secuencia, en la cual no hay diferencias significativas entre los 4 virus (con la excepción del cambio de Phe por Tyr en Lassa, como se verá más adelante), constituye el mínimo epítoto compartido por arenavirus del Viejo y del Nuevo Mundo.

Y S K F W Y L

Fig. 15: Residuos conservados en LCM, Lassa, Pichindé y Tacaribe en el segmento 372-378 de GPC de LCM.

#### 4.5.-Análisis molecular de la especificidad viral del AcM 9-7.9 (epítoto GP-2B)

El AcM 9-7.9, que define el epítoto GP-2B en LCM (91), es importante porque distingue entre los arenavirus africanos Lassa, patógeno, y Mopeia (antes denominado Mozambique), no patógeno (106). El hecho de que AcMs de reactividad tan diferente como 33.6 y 9-7.9 (Tabla 1) reconozcan específicamente la misma secuencia de tan sólo 9 aminoácidos 370-378 (Tabla 3) hacía particularmente interesante el estudio de GP-2B.

Si se comparan las secuencias de LCM, Lassa, y Pichindé en el segmento correspondiente a 368-377 de GPC de LCM, se ve que en Pichindé Ser en 373 está sustituida por Thr, y que en Lassa, Phe en 375 por Tyr (Fig.16)

LCM	PYCNYSKFWY
Lassa	PYCNYSKYWY
Pichinde	PYCNYT <del>K</del> FWY

Fig. 16: Comparación de las secuencias de LCM, Lassa y Pichindé en el segmento correspondiente a 370-377 de GPC de LCM.

Para determinar si esos cambios puntuales en la secuencia son responsables de la falta de reactividad de Lassa y Pichindé con 9-7.9, se probaron dos péptidos idénticos a 368-382 en los que se habían reemplazado Ser 373 por Thr en un caso y Phe 375 por Tyr en el otro. Es decir que las secuencias empleadas fueron PYCN~~Y~~T~~K~~FWYLEHAK y PYCNYSKYWYLEHAK respectivamente.

El extremo carboxiterminal de 378-382 se conservó porque se deseaba estudiar específicamente el efecto de esos cambios individuales, y por conveniencia para la síntesis de los peptidos

segun el método de Merrifield (134). Con estas secuencias se hizo una titulación por ELISA, titulando simultáneamente el AcM 33.6 como control de que sólo resultaba afectada la reactividad de 9-7.9, o, en otras palabras, el epitope GP-2B. Los resultados se presentan en la Fig. 17 y en la Tabla 11. Ninguna de las sustituciones afectó significativamente la reacción con 33.6, como se esperaba, dada su capacidad de reaccionar con los tres virus. Mientras el cambio Ser 373 por Thr no tuvo mayor efecto en el título de 9-7.9, la sustitución Phe 375 por Tyr, correspondiente al virus Lassa, produjo una caída dramática en el mismo, sugiriendo que ese residuo puede ser crítico en la estructura de GP-2B.

Se debía comprobar que el cambio de reactividad se producía también en solución, como en los casos anteriores, para lo cual se hicieron las correspondientes reacciones en fase líquida entre los péptidos y los AcMs, seguidas de "immunoblots" para detectar la capacidad de las secuencias de bloquear la unión de los anticuerpos a GP-2. En la Fig.18 se ve que la sustitución correspondiente a Pichindé (Ser 373--->Thr) no afecto la unión de la secuencia a ninguno de los AcMs, ya que fue capaz de bloquear la reacción con la glicoproteína. La sustitución Phe 375--->Tyr, en cambio, si bien modificó sólo ligeramente la unión a 33.6,

inhibió totalmente la reacción con 9-7.9, como lo demuestra la ausencia de bloqueo de la unión de 9-7.9 a GP-2.

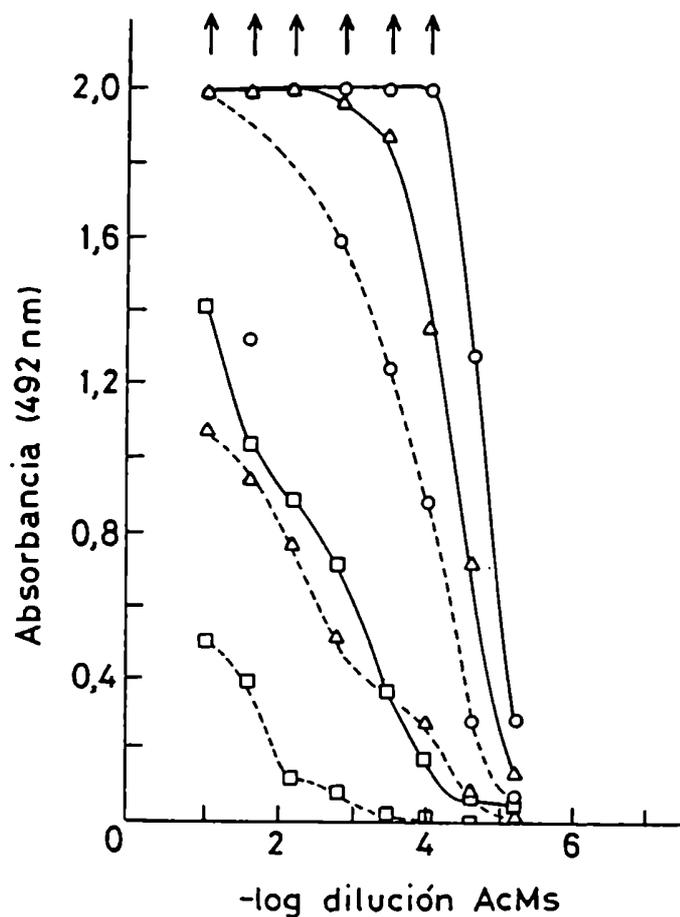
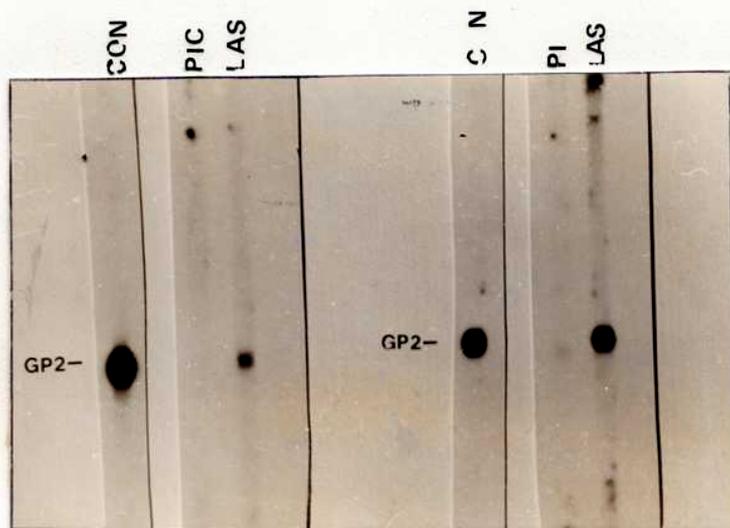


Fig. 17: Reacción de 33.6 y 9-7.9 con péptidos con sustituciones puntuales correspondientes a la secuencias de Lassa y Pichindé. O: 368-382; □: F(365)--->Y; Δ: S(373)--->T; — 33.6; --- 9-7.9



**Fig. 18:** Reacción de los AcMs 33.6 y 9-7.9 con péptidos correspondientes a 368-382 de GPC de LCM con las sustituciones puntuales Ser(373)-->Thr (Pic=Pichindé) y Phe(375)-->Tyr (Las=Lassa) en solución. Immunoblot. Los AcMs se incubaron con los péptidos como se indica en la leyenda de la Fig.6 y se usaron en immunoblot. Con= control.

Tabla 11: Efecto de la sustitución de aminoácidos correspondientes a las secuencias de Lassa y Pichindé sobre la reactividad de 9-7.9.

<u>Secuencia viral</u>	<u>Péptido</u>	<u>Título en</u>	
		<u>ELISA</u> <u>33.6</u>	<u>9-7.9</u>
GPC LCM 368-382	PYCNYSKFWYLEHAK	>40960	>40960
S(373)----> T	PYCN <del>Y</del> T <del>K</del> FWYLEHAK	40960	10240
F(375)----> Y	PYCNYSK <del>Y</del> WYLEHAK	10240	160

Este resultado, coincidente con el de ELISA, sugiere que para la definición del epítoto GP-2B es importante la posición 375, y que es crítico que en la misma no haya un residuo Tyr.

El cambio de Phe por Tyr podría explicar que Lassa no reaccione con 9-7.9. Quedaba aún por explicar la falta de reactividad de Pichindé con ese AcM, ya que el cambio de Ser 373 por Thr no tuvo ningún efecto. Dado que Pichindé posee la Phe en 375, como LCM, es evidente que otros residuos están involucrados en el epítoto. Además del reemplazo de Ser por Thr existen en Pichindé diferencias en el extremo carboxilo de la secuencia (Fig.19), algunas de las cuales pueden ser significativas desde

el punto de vista de la polaridad (Glu por Asn, Hys por Asp, Ala por Thr, Lys por Ileu). También a la derecha del extremo amino de 368-382 (residuos 365-367, Fig. 19) hay diferencias entre la estructura de LCM y Pichindé que podrían ser importantes en la determinación de la reactividad de éste con 9-7.9: Gly 366 por Lys y Met 365 por Ala.

LCM	<u>MGVPYCNYSKFWYLEHAK</u>
Pichinde	<u>AKIPYCN<del>Y</del>TKFWYINDTI</u>

Fig. 19: Comparación de las secuencias de LCM y Pichindé en el segmento 365-382 de GPC de LCM. Los residuos conservados están subrayados.

Para tratar de dilucidar cuáles de esas sustituciones determinan que Pichindé carezca del epítotope GP-2B, se trabajó con las siguientes secuencias:

- |    |                      |                                      |
|----|----------------------|--------------------------------------|
| 1) | LCM GPC 365-382      | <u>MGVPYCNYSKFWYLEHAK</u>            |
| 2) | Pichindé GPC 373-390 | <u>AKIPYCN<del>Y</del>TKFWYINDTI</u> |
| 3) | Pichindé GPC 378-390 | <u>CNYTKFWYINDTI</u>                 |
| 4) | LCM GPC 370-382      | <u>CNYSKFWYLEHAK</u>                 |

Se decidió ensayar la secuencia 3, a pesar de haberse determinado previamente que el extremo carboxilo no influía en GP-2B, porque podría ocurrir que hubiera influencia de residuos ajenos al epítopo o que este fuera discontinuo (130,133). Como se señaló anteriormente, aminoácidos no pertenecientes al epítopo podrían cooperar en la determinación de la estructura del mismo, y su sustitución podría alterar la estructura antigénica, o destruirla.

Los resultados del ensayo de ELISA con las secuencias 3 y 4 se presentan en la Tabla 12 y la Fig.20. Se incluyó siempre el ensayo con 33.6 como control de que el único epítopo afectado fuera GP-2B. En efecto, la reactividad de 33.6 no varió significativamente, mientras sí lo hizo la de 9-7.9.

Tabla 12: Reactividad de los AcMs 33.6 y 9-7.9 con secuencias correspondientes a GP-2 de Pichindé.

Secuencia	Péptido	Título	
		<u>33.6</u>	<u>9-7.9</u>
GPC LCM 370-382	CNYSKFWYLEHAK	40960	40960
GPC Pich. 378-390	CNYTKFWYINDTI	10240	640

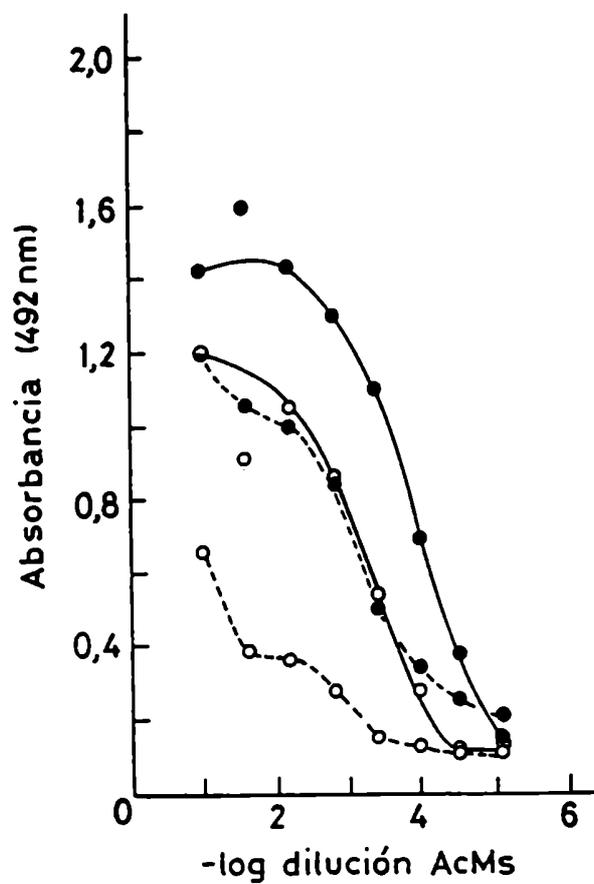
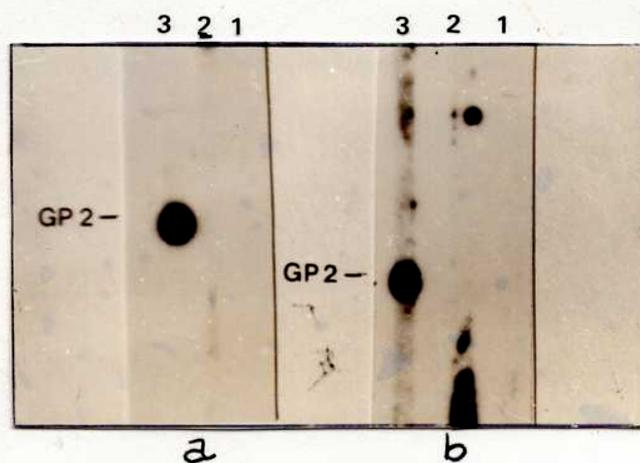


Fig. 20: Curva de titulación de los AcMs 33.6 y 9-7.9 con la secuencia 370-382 de GPC de LCM y 378-390 de GPC de Pichindé. ELISA. ●:370-382 LCM; ○:378-390 Pichinde. —:33.6; ---:9-7.9

La variación en el título de 9-7.9 con la secuencia de Pichindé sugería que el extremo carboxilo influye en la definición del epitope en LCM, y que su sustitución determinaría que Pichindé carezca del mismo. Sin embargo, cuando se midió la capacidad de ambas secuencias de bloquear la unión de los AcMs a GP-2 de LCM en "immunoblot", los dos péptidos tuvieron la misma actividad bloqueante (Fig. 21), demostrando que, en solución, 9-7.9 no "ve" diferencias entre ambos. En este caso la variación del título del AcM en ELISA (fase sólida) podría deberse a alteraciones conformacionales producidas por la unión a la placa.



**Fig. 21:** Actividad bloqueante de la secuencia correspondiente al segmento 378-390 de Pichindé. Inmunoblot. a) AcM 33.6; b) AcM 9-7.9. Los AcMs fueron preincubados con las secuencias 370-382 de LCM (1), 378-390 de Pichindé (2) o con diluyente (3).

Cuando se ensayaron los péptidos extendidos más allá del extremo amino (secuencias 1 y 2), se obtuvieron los resultados de la Tabla 13 y Fig. 22.

Tabla 13: Reactividad de 33.6 y 9-7.9 con las secuencias 365-382 de LCM y 373-390 de Pichindé.

<u>Secuencia</u>	<u>Péptido</u>	<u>Título en ELISA</u>	
		<u>33.6</u>	<u>9-7.9</u>
GPC LCM 365-382	HQVPYCNYSKFWYLEHAK	25600	102400
GPC Pic 373-390	AKIPYCNYSKFWYINDTI	6400	1600

Como se ve, hubo alteración en la reactividad de los dos AcMs con estas secuencias. El título de 33.6 fue menor con el péptido 365-382 que con 370-382 (Tabla 12), sugiriendo que el agregado de los residuos 365 a 367 había modificado de alguna manera la estructura de GP-2A, pero ésta aun era antigénica; como se esperaba, no hubo diferencia significativa de título de 33.6 entre la secuencia de LCM y la de Pichindé.

Con 9-7.9, en cambio, esa diferencia fue altamente significativa (102.400 para el péptido correspondiente a LCM, 1600 para el correspondiente a Pichindé).

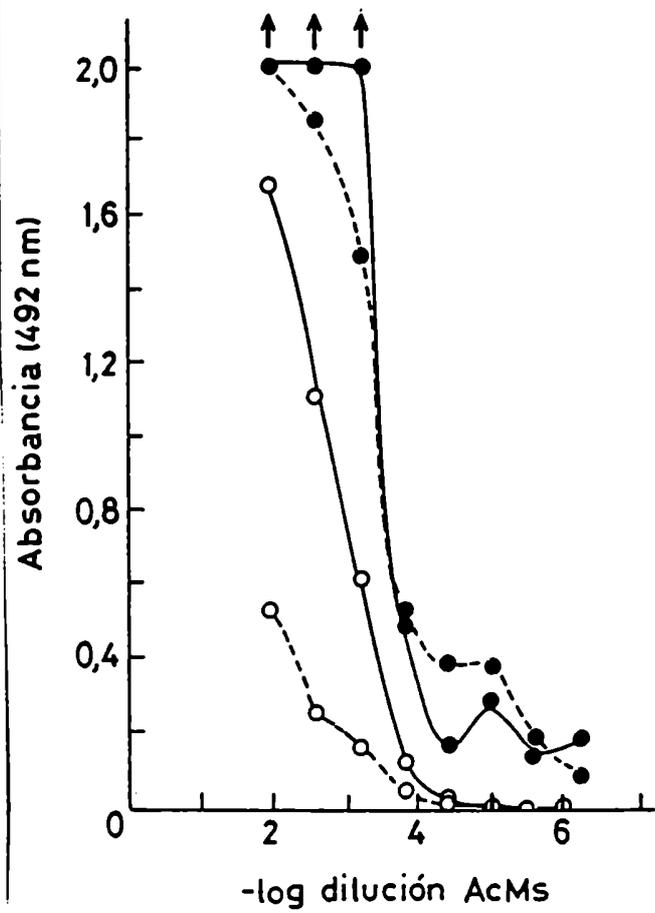
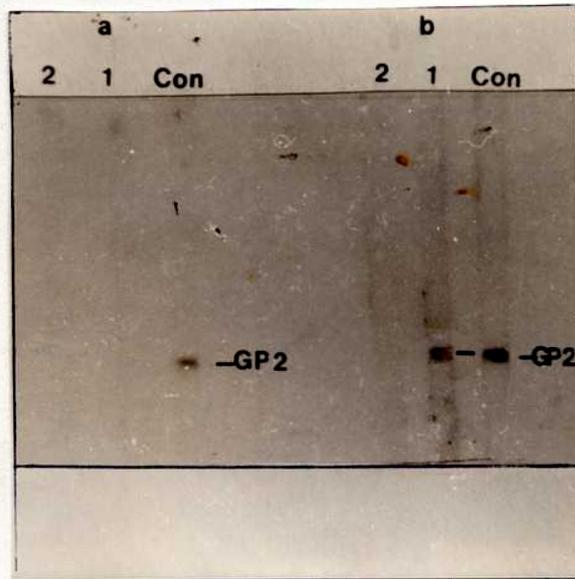


Fig. 22. Reacción de los AcMs 33.6 y 9-7.9 con las secuencias 365-382 de GPC de LCH, y 373-390 de GPC de Pichinde. ●: 365-382 LCH; ○: 373-390 Pichinde; —: 33.6; ---: 9-7.9

Cuando se hizo la reacción en solución seguida de "immunoblot", se obtuvo menor actividad bloqueante de la unión de 9-7.9 con la secuencia de Pichindé, aunque la diferencia no fue tan grande como se esperaba de acuerdo con el título en ELISA (Fig. 23). Con 33.6, en cambio, no se observaron diferencias.

Estos resultados no permitieron determinar exactamente qué residuos hacen que Pichindé no reaccione con 9-7.9, para de esta manera definir precisamente el epítopo GP-2B, pero sugieren que los residuos a la izquierda del extremo amino del segmento 368-382 influyen en la conformación del mismo, quizá mediante algún efecto cooperativo con los amino ácidos carboxi-terminales.



**Fig. 23:** Actividad bloqueante de péptidos correspondientes a la secuencia 365-382 de GPC de LCM y 373-390 de GPC de Pichindé. a) AcM 33.6; b) AcM 9-7.9. AcMs preincubados con diluyente (Con); secuencia 373-390 de Pichindé (1); secuencia 365-382 de LCM (2).

4.6.-Análisis de la reactividad de anticuerpos policlonales  
contra arenavirus con péptidos correspondientes a GPC de LCM

4.6.a): Anticuerpos policlonales contra arenavirus se unen  
específicamente al péptido 370-382

Habiendo establecido que el péptido 370-382 contiene un epítoto conservado en la glicoproteína de los arenavirus y que existen AcMs contra el mismo capaces de reaccionar con esa secuencia, era de interés determinar si esos AcMs están representados en la respuesta humoral de huéspedes infectados con virus pertenecientes a este grupo, ya que existen sistemas en que proteínas virales capaces de inducir una alta proporción de AcMs no provocan el mismo grado de respuesta cuando se estudian los anticuerpos policlonales (135).

Sueros inmunes provenientes de distintos huéspedes infectados con diversos arenavirus fueron empleados en un ensayo de ELISA usando 0,1 µg (0,6 nmoles) de péptido 370-382 por microcubeta de la placa de ELISA, como se había hecho con los AcMs, sin que hubiera reacción entre los inmunosueros y la secuencia. Cuando se repitió el ensayo usando 6 nmoles de péptido por microcubeta se produjo la reacción, como se muestra en la Fig. 24. Los inmunosueros empleados eran contra LCM (suero de cobayo hiperinmune), Lassa (suero de mono Rhesus hiperinmune) y Junin

(suero humano, de una infección de laboratorio, siete años después de la enfermedad). Como control negativo se usaron sueros humanos de cinco individuos no infectados con arenavirus.

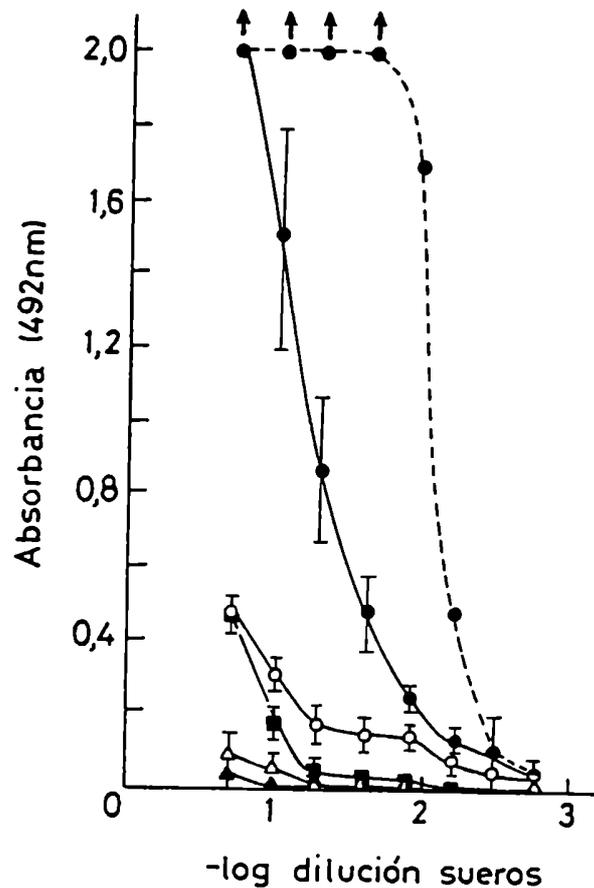


Fig. 24: Unión de sueros policlonales antiarenavirus al péptido 370-382. Las determinaciones se realizaron por duplicado; las barras verticales representan dos desviaciones estándar. ●---33.6; ●: Suero anti-LCH; ○: suero anti-Junín; □: suero anti-Lassa; ▲: 2-11.10 (control negativo); △: sueros humanos normales

Para determinar si la unión era específica se titularon los sueros en ELISA simultáneamente con las secuencias adyacentes a 370-382 (353-370 y 378-391). Como en el caso de los AcMs, la unión a 370-382 fue específica (Tabla 14). Debe destacarse que en este caso los títulos fueron mucho menores que con los AcMs, a pesar de emplearse una cantidad de péptido 10 veces mayor.

Tabla 14: Reactividad de anticuerpos policlonales anti-arenavirus con los péptidos 353-370, 370-382 y 378-391 en ELISA.

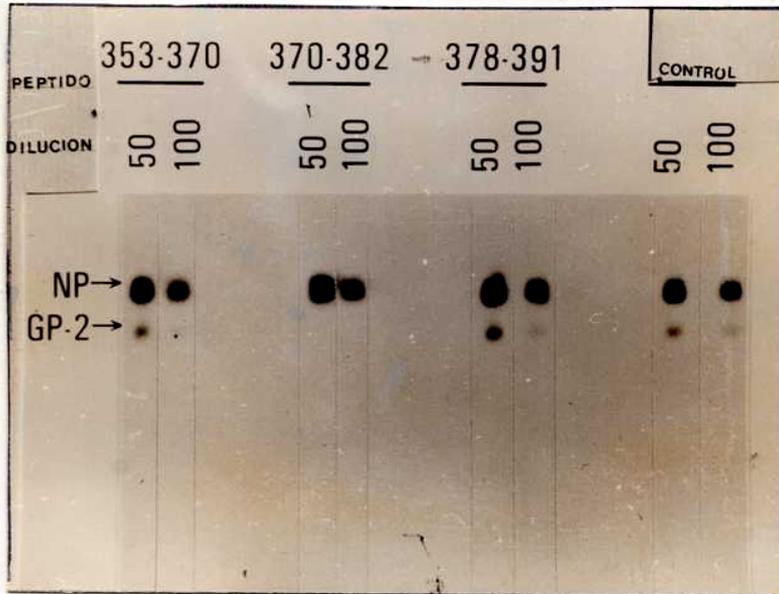
GPC...353-DQLLMRNHLRDLMGVPYCNYSKFWYLEHARTGETSVPKC-391...

Suero	353-370	370-382	378-391
Anti-LCM(cobayo)	<5	320	<5
Anti-Junín(humano)	5	160	<5
Anti-Lassa(mono Rhe- sus)	<5	20	<5
Humano normal	<5	<5	<5

Se muestran las secuencias de los tres péptidos. Los residuos subrayados están conservados en LCM, Pichindé, Lassa y Tacaribe.

Era necesario verificar que la unión suero-péptido se producía también en solución, como se había hecho con los AcMs, para comprobar que la unión al péptido en la placa de ELISA no se producía debido a la conformación particular adoptada por el mismo adsorbido en la fase sólida.

Para esto se incubaron dos diluciones (1:50 y 1:100) del suero de cobayo hiperinmune anti-LCM con 370-382 y las secuencias adyacentes 353-370 y 378-391, y se usaron las mezclas de incubación en "immunoblots" de proteínas de LCM, como se había hecho con los AcMs. Como se ve en la Fig. 25, también con el anticuerpo policlonal hubo bloqueo específico de la unión a GP-2 cuando se había preincubado con 370-382, demostrando que la reactividad del suero policlonal con los péptidos era comparable a la de los AcMs.



**Fig. 25:** Efecto inhibitor de la unión a GP-2 del suero anti-LCM debida a la preincubación con 370-382. Las diluciones de suero indicadas fueron incubadas con 50 ug de péptidos y usadas en inmunoblot, como se indicó en la Fig.6.

Como GP-2 contiene al menos tres epitopes (91), y se trataba de un anticuerpo policlonal, el efecto bloqueante no podía ser total, ya que el péptido contiene sólo a los epitopes A y B. El suero debía reaccionar con el tercer epitope, GP-2C, y eventualmente con otros que pudieren existir y que aún no han sido definidos. En efecto, cuando el tiempo de exposición del "inmunoblot" fue mayor se pudo detectar una débil banda correspondiente a GP-2 en las tiras correspondientes al suero preincubado con 370-382, aunque en este caso la radioactividad de la banda NP era tan alta que dificultaba considerablemente la interpretación del resultado. Para tratar de cuantificar el efecto inhibitor de la unión a GP-2 debido a 370-382 se cortó la zona correspondiente a GP-2 de las tiras del "inmunoblot" y se midió la radioactividad de las mismas (cpm de  $^{125}$ ). La Tabla 15 presenta los resultados: la secuencia 370-382 inhibió la unión a GP-2, en promedio, en un 72%.

Los resultados presentados en esta sección demuestran que la secuencia 370-382 contiene un epitope que es inmunológicamente activo en infecciones por arnavirus del Viejo y del Nuevo Mundo, en diversas especies animales.

Tabla 15: Porcentaje de inhibición de la unión del anticuerpo policlonal anti-LCM a GP-2 por los péptidos 353-370, 370-382 y 378-391. La zona correspondiente a la banda GP-2 en las tiras del inmunoblot se cortaron, y se midió la radioactividad de la Proteína A-I<sup>125</sup> unida.

<u>Dilucion de suero</u>	<u>Porcentaje de inhibición por el péptido</u>			
	<u>353-370</u>	<u>370-382</u>	<u>378-391</u>	<u>Ninguno</u>
1:50	16(1116)*	78(388)	0*(1964)	0(1323)
1:100	0(1180)	66(312)	5(877)	0(916)

a: Entre paréntesis: cpm de Proteína-A I<sup>125</sup>

\*: 0 indica radioactividad mayor que en el control.

4.6.b): Reactividad del suero anti-LCM con péptidos con deleciones amino y carboxi terminales

Una vez establecido que el péptido 370-382 induce una respuesta humoral en el huésped infectado, resultaba de interés determinar cuál es la mínima secuencia antigénica para el anticuerpo policlonal.

El suero hiperinmune de cobayo anti-LCM se hizo reaccionar con los péptidos derivados de 368-382 por deleciones amino y carboxi

terminales. Los resultados se presentan en la Fig.26 y en la Tabla 16. Se hizo una titulación simultánea de los AcMs como comparación.

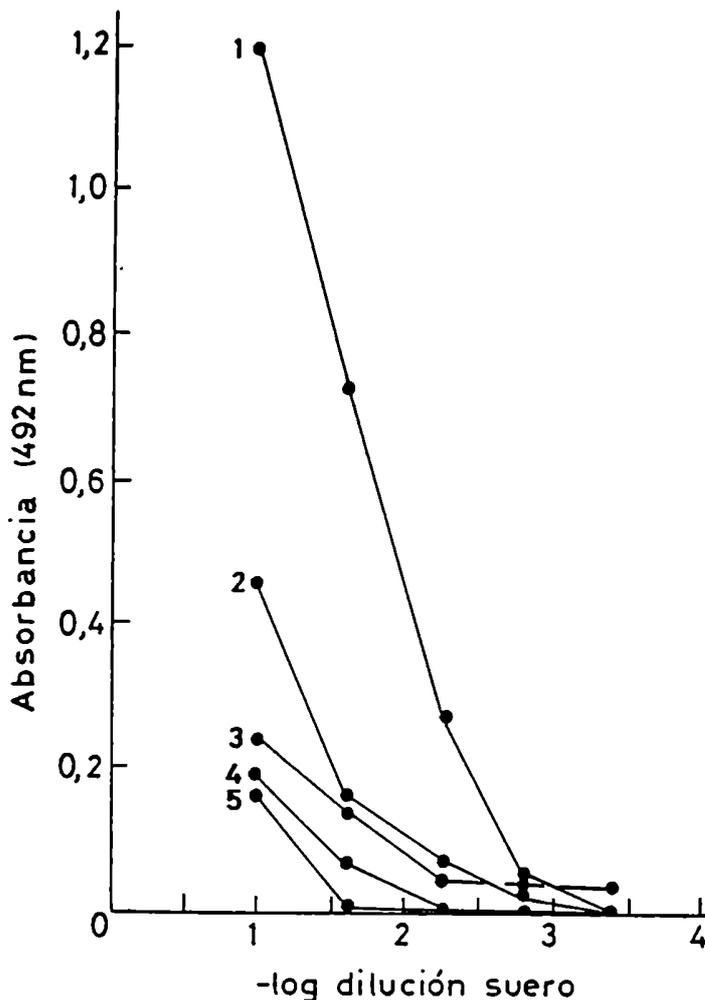


Fig. 26: Reactividad de suero hiperinmune de cobayo anti-LCM con secuencias derivadas de 368-382.1: 1: PYCNYSKFWYLEHAK; 2: CNYSKFWYLEHAK; 3: YSKFWYLEHAK; 4: KFWYLEHAK; 5: WYLEHAK.

Como puede observarse el título del suero disminuyó mucho más rápidamente que el de los AcMs al eliminarse residuos del extremo amino de 368-382, no habiendo reacción con la secuencia 372-382, que aún era reactiva con los AcMs. Debe destacarse, sin embargo, que se usaron sólo 0,1 µg de cada péptido (entre 0,012 y 0,020 nmoles). Teniendo en cuenta que los antisueros contra Lassa y Junín requirieron 10 veces mayor cantidad de 370-382 para reaccionar (Tabla 14), se puede inferir que aumentando la cantidad de los péptidos más cortos de la Tabla 16 podría obtenerse un título más alto con el antisuero. Es evidente en este caso, como con los AcMs, la importancia de los residuos 370-371 (Cys-Asn) en el epítipo GP-2A.

Cuando se probó la reactividad en solución de la primer serie de péptidos (Experimento 1) incubando el suero con los péptidos y haciendo "immunoblot" se encontró que, contrariamente a lo esperado de acuerdo con los resultados de ELISA, tanto 372-382 como 374-382 habían reaccionado apreciablemente con el antisuero, ya que bloquearon parcialmente la unión del mismo a GP-2 (Fig.27). Debe recordarse que con el anticuerpo policlonal el bloqueo de la unión a la glicoproteína no puede ser total debido a que se produce la reacción con los otros epítipos de la misma.

Tabla 16: Título en ELISA de suero hiperinmune anti LCM con péptidos derivados de 368-382.

<u>Secuencia</u>	<u>Péptido</u>	<u>Título en ELISA</u>		
		<u>Suero anti</u>	<u>33.6</u>	<u>9-7.9</u>
		<u>LCM</u>		
<u>Experimento 1</u>				
368-382	PYCNYSKFWYLEHAK	160	>40960	
370-382	CNYSKFWYLEHAK	40	>40960	
372-382	YSKFWYLEHAK	<10	2560	
374-382	KFWYLEHAK	10	40	10
376-382	WYLEHAK	<10	<10	
<u>Experimento 2</u>				
368-378	PYCNYSKFWYL	160	>40960	
370-378	CNYSKFWYL	NR*	6400	
372-378	YSKFWYL	<10	1600	100
*NR: No realizado				



**Fig. 27:** Bloqueo de la unión a GP-2 del suero anti-LCM debida a péptidos derivados de 368-382 por deleciones aminotermiales. Immunoblot. Con: Control (suero incubado con diluyente); 1: PYCNYSKFWYLEHAK; 2: CNYSKFWYLEHAK; 3: YSKFWYLEHAK.

Además de las posibles diferencias conformacionales que podrían limitar la reacción en ELISA, se debe tener en cuenta que en solución se presentaron al suero entre 6 y 10 nmoles de péptido, según su peso molecular, mientras que en fase sólida sólo había entre 0,012 y 0,020 nmoles por microcubeta.

4.6.c): Reactividad del anticuerpo policlonal anti LCM con péptidos con sustituciones correspondientes a los virus Pichindé y Lassa

Para tratar de dilucidar qué residuos, dentro de la zona antigénica en estudio, eran importantes en la determinación de la especificidad del antisuero contra LCM, se tituló éste en ELISA con los péptidos con las sustituciones puntuales correspondientes a Lassa y Pichindé (Phe 375--->Tyr y Ser 733--->Thr, respectivamente), y con las secuencias con el extremo carboxilo y amino de Pichindé. En todos los casos se hizo la titulación simultánea con la respectiva secuencia de LCM y con los AcMs 33.6 y 9-7.9, como control.

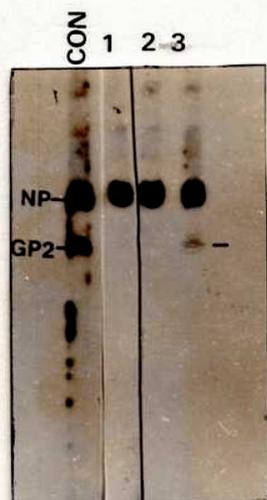
Como se ve en la Tabla 17, hubo absoluta especificidad del antisuero para los péptidos correspondientes a LCM. Es decir: el inmunosuero "vio" las diferencias en las secuencias que los AcMs no distinguieron.

Sin embargo, cuando se hicieron las reacciones en solución seguidas de "immunoblot" (Fig.28), se observó que los péptidos con las sustituciones puntuales Ser373--->Thr y Phe375--->Tyr bloquearon parcialmente la unión a GP-2, demostrando que había ocurrido cierto grado de reacción, que fue menor con la secuencia con la sustitución de Lassa (menor bloqueo), confirmando la importancia de la posición 375 en el epítope GP-2B.

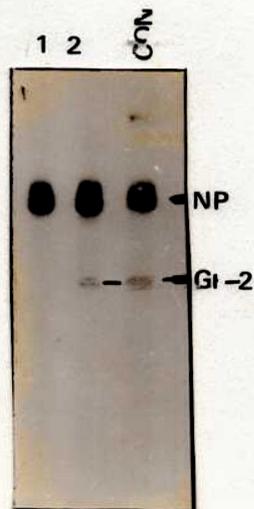
Tanto con los péptidos con deleciones amino terminales como con los que tenían deleciones puntuales, la reacción en solución del inmunosuero fue similar a la de 33.6 (Fig.13 y 18). Con la secuencia Cys-Asn-Tyr-Lys-Phe-Trp-Tyr-Asn-Asp -Thr-Ile, del virus Pichindé, en cambio, el suero no reaccionó en solución, y la secuencia no bloqueó la unión a GP-2 (Fig.29). Esto demuestra que el extremo carboxilo es importante en la respuesta policlonal, ya que la sustitución de Ser373 por Thr no había sido suficiente para suprimir la reacción. Puede ser que el extremo carboxilo 378-382 (residuos Leu-Glu-Hys-Ala-Lys en LCM) forme parte del epítope GP-2C, el tercero definido en GP-2 (91), en cuyo caso el suero anti LCM no reaccionaría cuando se sustituye por Ile-Asn-Asp-Thr-Ile.

**Tabla 17:** Reactividad en ELISA del suero anti LCM con péptidos correspondientes a Lassa y Pichindé.

<u>Secuencia</u>	<u>Péptido</u>	<u>Título en ELISA</u>		
		<u>Cb. antiLCM</u>	<u>33.6</u>	<u>9-7.9</u>
<b>Experimento 1</b>				
GPC LCM 368-382	PYCNYSKFWYLEHAK	160	>40960	
Ser(373)-->Thr	PYCNYSKFWYLEHAK	10	40960	10240
Phe(375)-->Tyr	PYCNYSKYWYLEHAK	10	10240	160
<b>Experimento 2</b>				
GPC LCM 370-382	CNYSKFWYLEHAK	160	>40960	40960
GPC Pic 373-390	CNYTKFWYINDTI	<10	10240	640
<b>Experimento 3</b>				
GPC LCM 365-382	MGVPYCNYSKFWYLEHAK	160	25600	10240
GPC Pic 373-390	AKIPYCNYSKFWYINDTI	<10	6400	1600



**Fig. 28:** Bloqueo de la unión a GP-2 del suero anti-LCM debida a péptidos derivados de 368-382 por sustitución puntual de aminoácidos. Con: Control (suero incubado con diluyente); 1:PYCNYSKFWYLEHAK; 2:PYCNYTKFWYLEHAK (Ser 373-->Thr); 3:PYCNYSKYWYLEHAK (Phe 375-->Tyr).



**Fig. 29:** Bloqueo de la unión a GP-2 del suero anti-LCM debida a secuencias correspondientes a LCM y Pichindé.

Con: Control (suero incubado con diluyente); 1: CNYSKFWYLEHAK (LCM); 2: CNYTKFWYINDTI (Pichindé).

4.7.-Potencial utilidad de secuencias correspondientes a GP-2 para la detección de infecciones por arenavirus

4.7.a):Reacción de sueros humanos antiarenavirus con los péptidos 370-382 y 368-382

La reactividad específica de sueros policlonales antiarenavirus con el péptido 370-382 sugería la posibilidad de usar dicha secuencia para la detección de infecciones por dichos virus.

Para investigar esta posibilidad sueros de individuos infectados con diferentes arenavirus del Viejo y del Nuevo Mundo varios años antes del momento del ensayo fueron probados en ELISA con 1 µg de los péptidos 370-382 y 368-382.

La Tabla 18 describe las características de las primeras muestras ensayadas. Estas habían sido enviadas por el Dr. Robert Shope, de Yale Arbovirus Research Unit, de la Universidad de Yale, y habían sido extraídas en las fechas indicadas, entre 8 y 20 años antes de nuestro estudio. Como control negativo se emplearon 5 sueros humanos de individuos sin antecedentes de infección por arenavirus.

Tabla 18: Listado de muestras de sueros humanos antiarenavirus enviadas por el Dr. Robert L. Shope.

<u>Suero N</u>	<u>Fecha de extracción</u>	<u>Virus infectante</u>
1	NR*	Pichindé
2		
3		
4	9/8/67	Junín (LIN>4)#
5	5/12/78 (9 anos pi)@	Lassa
6	NR	Pichindé
7	21/9/68	Junín
8	NR	Pichindé
9+	5/12/78	
10+	20/7/79	
11	9/8/67	Junín (LIN>4)
12	5/12/78	LCM
13	NR	Pichindé

\*NR: No registrado; #LIN: Logaritmo del índice de neutralización; @pi: post infección; + Muestras pertenecientes al mismo individuo. Todas las muestras fueron ensayadas en julio de 1987.

Se ensayaron las secuencias 370-382 y 368-382, haciendo la reacción simultáneamente con 353-370 y 378-391 como controles de especificidad. Con 370-382 no hubo reacción apreciable, pero con el segmento 368-382 se obtuvo reacción con las 13 muestras probadas (Fig.30). Hubo considerable dispersión en los niveles de densidad óptica y en los títulos alcanzados, pero todos estuvieron por encima de los valores de los sueros normales. En ningún caso hubo unión a las secuencias 353-370 o 378-391.

También se ensayaron sueros de pacientes infectados con virus Lassa, enviados por el Dr. Joseph McCormick, del Center for Disease Control, Atlanta. Las características de estas muestras se desconocían, de manera que se trabajó sin saber cuáles provenían de individuos infectados y cuáles no. Sobre un total de 23 muestras, se obtuvieron 20 positivos reales, dos falsos positivos y un falso negativo.

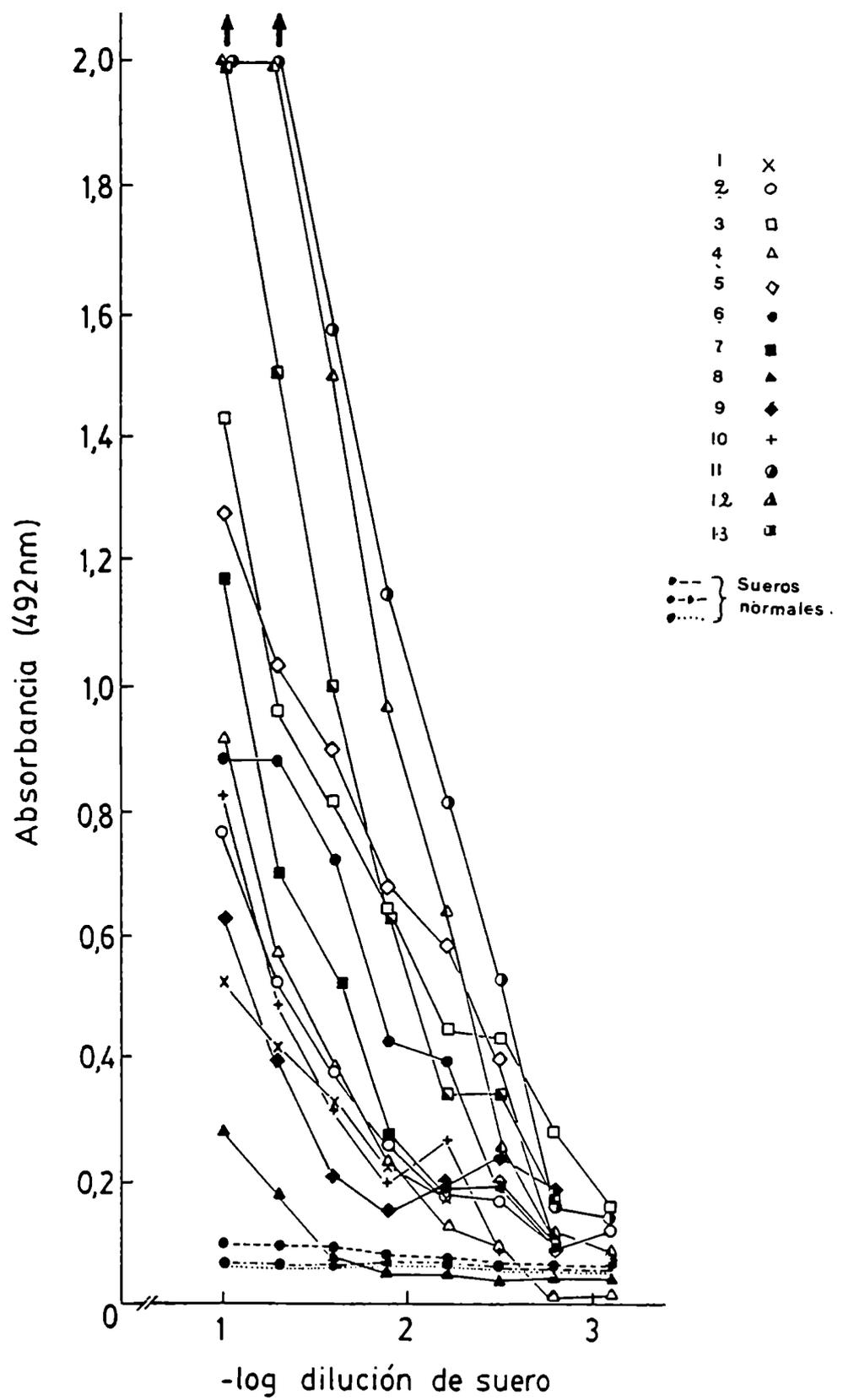


Fig. 30: Reactividad de sueros humanos antiarenavirus con el péptido 368-382. Los números corresponden a los indicados en la Tabla 18.

Considerando los dos grupos de muestras de sueros humanos, los provistos por el Dr. Shope y los provistos por el Dr. Mc Cormick, se obtuvo reacción positiva en un 92 % de los casos.

Por otro lado, placas sensibilizadas con 1 µg por microcubeta de las secuencias 353-370, 370-382 y 378-391 fueron enviadas al Dr. Peter Jahrling, del United States Army Research Institute of Infectious Diseases, Fort Detrick. El Dr. Jahrling no había sido informado sobre cuál era el péptido reactivo. Después de ensayar sueros humanos, de cobayo y de mono Rhesus contra diferentes arenavirus, obtuvo reacción positiva en el 100 % de los casos, sin falsos positivos.

Los resultados obtenidos con las secuencias 368-382 y 370-382 son alentadores en cuanto a la posibilidad de su empleo para la detección de infecciones por arenavirus.

#### 4.8.-Función biológica de la secuencia 370-378

Habiendo verificado la inmunodominancia de GP-2A en las infecciones por arenavirus, se trató de dilucidar cuál es la función biológica de dicha secuencia, qué rol cumple durante la infección, y si la respuesta inmunológica es protectora.

Aunque los resultados son insuficientes para llegar a una conclusión definitiva, se mencionarán brevemente las experiencias

realizadas, ya que pueden contribuir a la respuesta a estas preguntas.

Se efectuaron estudios "in vitro" e "in vivo".

El estudio "in vitro" se realizó trabajando con uno de los AcMs que definen al epitope, 33.6, analizando si el mismo ejerce algún efecto sobre la neutralización del virus LCM.

Se estudió la actividad neutralizante de 33.6 en presencia de complemento y el efecto ejercido por 33.6 sobre la neutralización mediada por otros AcMs.

Los resultados preliminares indicaron que el AcM no ejerce actividad neutralizante en presencia de complemento, como ocurre con otros AcMs contra LCM (113). Con respecto a la influencia de 33.6 sobre la neutralización por otros AcMs, se obtuvo evidencia que indicaría que un AcM anti-GP-1 de LCM, dirigido contra un sitio no neutralizante, tendría cierta actividad neutralizante en presencia de 33.6. De verificarse este resultado, muy preliminar, implicaría un efecto cooperativo en la neutralización viral por parte de 33.6, y, por lo tanto, la secuencia 370-378 estaría involucrada en la neutralización.

La Dra. Kathryn Wright, en el laboratorio del Dr. Buchmeier, realizó ensayos para determinar si 33.6 está involucrado en la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, con resultados preliminares negativos.

Para el estudio "in vivo" se inocularon cobayos con la secuencia 370-382, estudiando la respuesta de anticuerpos inducida por el mismo, y tratando de determinar si ejerce algun efecto a nivel de la inmunidad celular.

Se inmunizaron 6 cobayos con el péptido 370-382 acoplado a KLH. Estos animales produjeron anticuerpos antipéptido y anti LCM, detectables por ELISA. Cuatro animales fueron sacrificados, sus bazos se extrajeron y los esplenocitos se emplearon en un ensayo estándar de proliferación de linfocitos frente al desafío con LCM. En dos casos hubo proliferación, con índices de estimulación (128) de 2,4 y 8,3.

Este resultado, de verificarse, indicaría que la secuencia está involucrada en la inmunidad celular.

## 5.- DISCUSION

El objetivo de este trabajo fue localizar sitios antigénicos conservados en la familia Arenaviridae. En esta familia viral se incluyen virus patógenos para el ser humano: Lassa, causante de la fiebre de Lassa; Junín y Machupo, agentes de la Fiebre Hemorrágica Argentina y Boliviana respectivamente, y LCM, agente de la coriomeaingitis linfocitaria y prototipo de la familia.

La importancia de los estudios aquí presentados radica en la potencial utilidad de los antígenos conservados como elementos de diagnóstico o profilaxis. Este tipo de análisis también puede contribuir al conocimiento de la evolución de esta familia viral: dado el alto grado de reactividad cruzada en reacciones de inmunofluorescencia y de fijación de complemento (95) y el considerable porcentaje de homología entre las proteínas estructurales que han sido secuenciadas, se postula la existencia de un ancestro común para estos virus (69). Una manera de estudiar esta posibilidad es mediante el análisis de antígenos compartidos por los miembros de la familia.

La localización y secuenciación de sitios antigénicos se logró utilizando una serie de péptidos sintéticos derivados de la

secuencia de amino ácidos predicha para GPC, el precursor celular de las glicoproteínas estructurales GP-1 y GP-2 de LCM (60, 69). Trabajando con dichos péptidos se localizó el sitio de unión a GP-2 de tres AcMs contra dos determinantes antigénicos diferentes, distinguibles por análisis topográfico (91).

La metodología empleada fue diferente de la usada por la inmunoquímica clásica, que es larga y laboriosa, ya que requiere el aislamiento y purificación de la proteína en estudio, seguida de síntesis de análogos de la proteína y de péptidos correspondientes a la región antigénica, cuya reacción con antisueros contra la proteína original y contra los análogos sintéticos se analiza para determinar cuáles son los residuos importantes para los diferentes epitopes (130). El primer estudio inmunoquímico que se realizó fue el de la mioglobina, y demandó 10 años para completarse(132). Poco después el mismo grupo de trabajo terminó el análisis inmunoquímico de la lisozima (129), que se realizó en 11 años.

Siendo los arenavirus difíciles de purificar debido a la pobre replicación de los mismos en cultivos celulares, y, en el caso de los patógenos, a las instalaciones especiales requeridas para su manipuleo (1), las dificultades para aplicar las técnicas clásicas son aún mayores que en los casos antes mencionados.

Actualmente la posibilidad de predecir secuencias proteicas a partir de secuencias de ácidos nucleicos ha hecho innecesaria la etapa de aislamiento y purificación de la proteína en estudio, que involucra aislamiento y purificación viral previos, facilitando así el análisis inmunoquímico. Esta ventaja sobre la inmunoquímica tradicional se combina con la relativa facilidad y rapidez para sintetizar péptidos por el método de Merrifield (134), modificado por Houghten (136), junto con la eficacia de los métodos de purificación de péptidos por HPLC (137).

Desde la década del 40 se sabía que anticuerpos contra fragmentos peptídicos de una proteína eran capaces de reaccionar con la proteína parental (138, citado por Atassi en 130). Posteriormente se demostró la posibilidad de obtener anticuerpos contra el virus del mosaico del tabaco inmunizando con péptidos derivados del mismo (139). En todos los casos se trabajaba con péptidos obtenidos por digestión enzimática de las proteínas correspondientes purificadas, lo que hacía el análisis más complejo de lo que resultó en nuestro trabajo, en el que, como se mencionó, se emplearon péptidos sintéticos.

En vista de lo complejo que había sido el análisis antigénico de la mioglobina y el de la lisozima, Kazim y Atassi comenzaron a usar péptidos sintéticos que cubrían la longitud de la proteína

en estudio cuando se trataba de analizar epitopes continuos o secuenciales (140), es decir aquellos formados por aminoácidos ubicados uno a continuación del otro en la secuencia proteica (177).

El método consiste en sintetizar y estudiar péptidos de igual longitud, cada uno de los cuales se superpone en sus extremos con los dos péptidos adyacentes. Esto puede resultar bastante complicado debido al gran número de péptidos necesario. Como la determinación por Atassi y col. de varias estructuras antigénicas demostró que los epitopes continuos se encuentran en la superficie de las proteínas (129,156), el número de péptidos a sintetizar puede ser mucho menor si se seleccionan para el estudio péptidos que correspondan a la superficie de la molécula.

Por esta razón los péptidos ensayados en este trabajo fueron seleccionados de acuerdo con su hidrofiliidad (Fig.3), y en su mayoría tenían extremos superpuestos.

El número de residuos superpuestos y la longitud de los péptidos variaban debido a que se eligieron, siempre que fue posible, secuencias que tuvieran Cys en un extremo, ya que este aminoácido es necesario para acoplar el péptido a KLH ("keyhole lymphet hemocyanin"), la proteína portadora para preparar antisueros (125).

Otros autores han sintetizado sistemáticamente todos los péptidos superpuestos de la misma longitud que abarcaban la totalidad de la proteína en estudio para detectar las zonas reactivas con anticuerpos.

Por ejemplo Geysen et al. sintetizaron hexapéptidos superpuestos para analizar epitopes de tres serotipos de virus aftosa (141,142) y Meloen y Barteling mapearon, también con hexapéptidos, los epitopes en VP1 de diferentes serotipos del mismo virus (143). Estos últimos observaron que los péptidos antigénicos correspondían a zonas de alta variabilidad de residuos, y que el perfil de hidrofiliicidad no necesariamente indicaba las zonas antigénicas, por lo que, para el análisis por ellos encarado, resultaría más útil seleccionar los péptidos según el perfil de variación de amino ácidos. Esto es lógico, considerando que ellos estudiaban epitopes neutralizantes, y que se postula existe una presión selectiva ejercida por los anticuerpos sobre esos epitopes, que variarían para permitir al virus escapar a la neutralización (178). En nuestro estudio se trataba de localizar epitopes conservados, definidos por AcMs que en inmunofluorescencia reaccionaban con la superficie celular (106), por lo que el perfil de hidrofiliicidad, indicador de zonas de la molécula expuestas en la superficie de la envoltura viral,

debe ser un indicio mejor que la variabilidad de aminoácidos para ubicar esos antígenos.

Varias proteínas virales han sido estudiadas desde el punto de vista inmunoquímico empleando este método: La estructura inmunogénica de la hemoaglutinina de Influenza A fue analizada mediante péptidos sintéticos parcialmente superpuestos; los péptidos utilizados eran de longitud variable, de acuerdo a la presencia de residuos Cys que permitieran acoplarlos a KLH, o de Tyr que permitieran la marcación con  $I^{131}$  (144). Trabajando con virus Herpes Simplex, Heber-Katz y Dietzschold midieron la reactividad de péptidos sintéticos correspondientes a gD, la principal proteína inmunogénica, con sueros específicos anti-gD, para localizar determinantes antigénicos (145). Con péptidos sintéticos correspondientes a secuencias hidrofílicas del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B se indujo la formación de anticuerpos anti-Hepatitis B en conejos y ratones (146,147). Elder et al. localizaron regiones neutralizantes en la envoltura del virus de la leucemia felina, pero no trabajaron con péptidos superpuestos, sino con zonas adyacentes (148). También de han empleado péptidos sintéticos para estudiar sitios inmunológicamente activos del virus rábico (149).

Además de la posibilidad de predecir secuencias proteicas a partir de ácidos nucleicos y de sintetizar un alto número de péptidos en tiempos relativamente cortos, la disponibilidad de AcMs representa otra ventaja sobre las técnicas tradicionales. El uso de AcMs combinado con la técnica de "immunoblotting" (127) permite identificar con precisión en qué proteína viral se encuentra un epítotope, sin que sea necesario aislar esa proteína.

Habiéndose determinado que los AcMs que interesaban a nuestro estudio reaccionaban con GP-2 (91), se estudió la reactividad de los mismos solamente con péptidos derivados de esa proteína.

Esos AcMs--denominados 33.6, 83.6 y 9-7.9-- se unieron específicamente al péptido correspondiente a la secuencia 370-382 de GPC. 33.6 y 83.6 definen el epítotope GP-2A, y 9-7.9 define el epítotope GP-2B (91). Como se ve en la Tabla 1, la especificidad viral de los AcMs es muy diferente: 33.6 y 83.6 reaccionaron con todos los arenavirus ensayados, y 9-7.9 sólo lo hizo con LCM y Mopeia; aun cuando Parekh y Buchmeier habían demostrado la parcial superposición de GP-2A y GP-2B (91) resultaba interesante que sus epítotope parecieran estar confinados a un segmento de tan sólo 13 aminoácidos de longitud.

Se verificó que los AcMs reaccionaban con la secuencia 370-382 en fase sólida (ELISA) y en solución (Tabla 3, Fig. 7), y que la reacción con el péptido bloqueaba la unión de los anticuerpos con la glicoproteína viral, ya fuera desnaturalizada o en estado nativo (Figs. 7 y 8).

Como se ha dicho, la secuencia 370-382 corresponde a un sitio hidrofílico de GP-2, altamente conservado entre los arenavirus cuya secuencia se conoce. El grupo de residuos conservados incluye una dupla Pro-Tyr a la izquierda del extremo amino de 370-382, por lo que en ensayos posteriores se utilizó el péptido 368-382, que también reaccionó con nuestro panel de AcMs.

LCM (cepas WE y Armstrong)	P Y C N Y S K F W Y L E H A K
Lassa (cepa Jos)	P Y C N Y S K Y W Y L N H T T
Pichindé (cepa 3739)	P Y C N Y T K F W Y I N D T I
Tacaribe (cepa TRVLII 573)	P Y C N Y T R F W Y V N H T L

Fig. 30 : Comparación de la secuencia 368-382 de GPC de LCM con secuencias equivalentes de otros arenavirus.

El alto grado de conservación del extremo amino de esta secuencia (Fig. 30), y el hecho de que indujera la formación de AcMs sugiere que puede ser un componente importante de los arenavirus desde un punto de vista estructural o funcional, por lo cual se trato de profundizar el análisis.

Mediante péptidos derivados del original por deleciones amino y carboxiterminales se intentó definir los límites de ambos epitopes, siempre determinando la reactividad en fase sólida (en ensayos de ELISA), y en solución. El grado de reacción péptido-anticuerpo en solución se determinó tomando como parámetro la capacidad de cada secuencia de bloquear la unión a la glicoproteína viral.

Los resultados de estos experimentos, que se suman en la Tabla 19, permiten inferir que el mínimo sitio de unión de los AcMs ensayados abarca los residuos 370-378. El extremo carboxilo--Leu-Glu-His-Ala-Lys--no influyó en la reactividad de ninguno de los dos AcMs, ya que su eliminación no afectó el título en ELISA ni la actividad bloqueante (secuencia 368-378), y los péptidos 374-382 y 376-382 tuvieron poca o ninguna reactividad. 370-378, que es la menor secuencia ensayada, reaccionó en ELISA en fase sólida y fue capaz de bloquear la

Tabla 19: Efecto de deleciones amino y carboxiterminales sobre la reactividad de 33.6 y 9-7.9 con secuencias conservadas de GP-2.

GPC	Péptido	Título		Actividad	
		en 33.6	en 9-7.9	bloqueante 33.6	bloqueante 9-7.9
<b>Experimento 1</b>					
368-382	PYCNYSKFWYLEHAK	>40.960		+	+
370-382	CNYSKFWYLEHAK	>40.960		+	+
372-382	YSKFWYLEHAK	2.560		+	+
374-382	KFWYLEHAK	40	10		+-
376-382	WYLEHAK	<10	<10		
<hr/>					
<b>Experimento 2</b>					
368-378	PYCNYSKFWYL	>40.960		+	+
370-378	CNYSKFWYL	6.400		+	+
372-378	YSKFWYL	1600	100	+	+

unión a GP-2 de AcMs dirigidos contra los dos epitopes, GP-2A y GP-2B.

El péptido 372-378 tuvo actividad bloqueante, pero su reactividad con 9-7.9 (GP-2B) en ELISA fue baja. La razón de esta diferencia no es clara. Posiblemente restricciones conformacionales aplicadas a la secuencia por la unión a la placa de ELISA disminuyeron la reactividad; estas restricciones es probable que sean mayores cuanto más corto es el péptido.

Houghten et al., trabajando con péptidos de la hemoaglutinina de Influenza A, observaron que al variar la concentración del péptido en la placa de ELISA variaba la sensibilidad del ensayo a la sustitución de aminoácidos (150). Atribuyeron las diferencias a cambios en el tipo de interacciones entre las moléculas de péptido al variar la concentración. En nuestro caso, puede que al disminuir el tamaño del péptido hayan cambiado las asociaciones entre los residuos involucrados en la reacción con los AcMs.

Por otra parte, puede haber ocurrido alguna diferencia debida a factores cuantitativos: en las reacciones en solución la relación de  $\mu\text{moles}$  de péptido a  $\mu\text{g}$  de IgG monoclonal fue de 0.1, mientras en ELISA, en la dilución inicial de AcM (1/10) esa relación era 0,0004  $\mu\text{moles}$  péptido/ $\mu\text{g}$  IgG. Sin embargo, si esta

diferencia en la concentración de péptido fuera la única razón de la distinta reactividad en fase sólida y en solución, debería haberse observado un efecto de prozona (151) al aumentar la dilución de AcM en ELISA, algo que nunca ocurrió.

Si se supusiera que la baja reactividad en ELISA es un artificio debido a la adsorción del péptido a la fase sólida, y se tuviera en cuenta sólo el resultado de la reacción en solución, el mínimo segmento representativo de ambos epitopes, GP-2A y B, sería 372-378, pero considerando los resultados en conjunto debemos decir que dicha secuencia mínima está representada por 370-378, de 9 residuos de longitud.

372-378, en cambio, representa la mínima longitud de GP-2A, como lo demuestran la unión a 33.6 tanto en fase sólida como en solución, junto con la capacidad de bloquear la unión de ese AcM a la glicoproteína de arnavirus del Nuevo Mundo (Tabla 10). El tamaño coincide, como se dijo, con la longitud "teórica" de un epitope y de algunos que han sido descriptos. Elder y colaboradores determinaron que la mínima longitud de un sitio neutralizante del virus de la leucemia felina es de cinco aminoácidos, y verificaron que la eliminación de un solo residuo, ya fuera en el extremo amino o carboxilo, abolía toda reactividad (148).

No se ensayaron segmentos de menor longitud porque diversos autores han demostrado que se requieren al menos seis o siete residuos para que un segmento sea antigénico: A principios de la década del 60 se demostró que se requieren siete hidratos de carbono para que un oligosacárido se una a anticuerpos (152), y trabajos posteriores demostraron que el número mínimo de aminoácidos necesario para conformar un determinante antigénico está entre 5 y 7 (132,153), así como que el sitio de combinación de un Ac permite "acomodar" entre 5 y 7 aminoácidos (154). Sin embargo, Melen et al. obtuvieron unión de AcMs a péptidos de 3, 4 y 5 aminoácidos de longitud (155). La metodología empleada por estos autores para determinar cuál es la mínima longitud y cuáles son los aminoácidos esenciales para epitopes de virus aftoso fue diferente de la empleada por nosotros: trabajaron con péptidos de 3, 4 y 5 aminoácidos de longitud a los que se iban adicionando los aminoácidos restantes en el extremo amino y/o carboxilo

En 372-378 sólo hay tres residuos conservados en los arenavirus LCM, Lassa (Viejo Mundo), Pichindé y Tacaribe (Nuevo Mundo) (Fig.31).

En Pichindé y Tacaribe, Ser está sustituida por Thr; en Tacaribe, además, Lys está reemplazada por Arg. Estas son sustituciones conservativas, que no involucran cambios

significativos de polaridad, carga o tamaño de la cadena lateral del residuo. En Lassa, en cambio, la sustitución es más importante, ya que reemplazar Phe por Tyr implica introducir una diferencia en la polaridad (Fig.32). Sin embargo, ésto no afectó significativamente la unión a 33.6, por lo que se puede inferir que ese residuo (Phe) no es un sitio de contacto importante para el AcM (Tabla 11 y Fig. 18).

Viejo Mundo	{	LCM	<u>Y</u> S K F <u>W</u> <u>Y</u> L
		Lassa	<u>Y</u> S K Y <u>W</u> <u>Y</u> L
Nuevo Mundo	{	Pichindé	<u>Y</u> T K F <u>W</u> <u>Y</u> I
		Tacaribe	<u>Y</u> T R F <u>W</u> <u>Y</u> L

Fig. 31: Secuencia de aminoácidos de la glicoproteína de arenavirus del Viejo y del Nuevo Mundo en el segmento correspondiente a 372-378 de LCM. Las cepas de virus son LCM:WE y Armstrong; Lassa:Jos; Pichindé:3739; Tacaribe:TRVLII 573.

El mínimo epitope conservado en GP-2 consistiría de una secuencia de 6-7 aminoácidos. Tres de esos residuos están conservados en las glicoproteínas de arenavirus analizadas, y los restantes son reemplazados por aminoácidos equivalentes en cuanto a carga, polaridad y tamaño.

Aunque es necesario conocer las secuencias de otras glicoproteínas de arenavirus, la reactividad de 33.6 con todos ellos y la especificidad de la reacción con los péptidos ensayados sugiere que esto se cumple para toda la familia Arenaviridae

Para analizar el epitope GP-2B se probaron péptidos idénticos a 368-382 de LCM pero con las sustituciones puntuales correspondientes a Pichindé (Ser 373 por Thr), y Lassa (Phe 375 por Tyr). La reactividad de 9-7.9 y 33.6 no fue afectada por la primera, mientras la segunda, que afectó sólo ligeramente la reacción con 33.6, eliminó totalmente la unión a 9-7.9. Esto se resume en la Tabla 20.

Esto confirma el hecho de que en 368-382 los AcMs estaban "viendo" dos epitopes diferentes, y permite suponer que el reemplazo de Phe en 375 por Tyr en Lassa puede ser crítico para GP-2B, determinando la falta de reacción de este virus con 9-7.9.

Para poder afirmar que la Phe es esencial para GP-2B se debería haber comparado la reactividad con 9-7.9 de los péptidos obtenidos reemplazando ese residuo por cada uno de los 19 aminoácidos restantes. Geysen et al. determinaron con este sistema que el epítipo representado por los residuos 146-152 de VP1 del virus aftosa depende de la presencia de Leu en las posiciones 148 y 151, que son irremplazables por otros aminoácidos, y que existen residuos que contribuyen al epítipo y otros que son "indiferentes", es decir que pueden ser sustituidos por cualquier aminoácido (142). De la misma manera Houghten estudió la influencia que la sustitución de residuos en la secuencia 75-110 de la hemoaglutinina de Influenza A ejerce sobre la unión de AcMs con el péptido y encontró que un aminoácido (Asp en posición 101) es indispensable para que haya reacción (136). Los resultados aquí presentados no demuestran, como se dijo, que Phe 375 es indispensable para GP-2B, pero sugieren fuertemente que Tyr en esa posición es suficiente para destruir dicho epítipo.

Aunque no hemos aplicado la sustitución de aminoácidos de la manera "tradicional" usada en los casos antes mencionados, nuestra estrategia de reemplazar ciertos residuos por los correspondientes de los arenavirus no reactivos con el AcM en estudio permitió obtener evidencia de que el reemplazo de un solo

aminoácido es suficiente para destruir el determinante antigénico definido por ese AcM.

Nuestro resultado indica también que en el epítopo intervienen otros aminoácidos, ya que Pichindé y Tacaribe, a pesar de conservar la Phe en esa posición, tampoco reaccionan con 9-7.9. (Tabla 20).

Tabla 20: Secuencias de arenavirus en el segmento 365-382 de GPC de LCM. Reactividad con 9-7.9.

Secuencia	Reacción del virus con 9-7.9
LCM: M G V P Y C N Y S K F W Y L E H A K	
Lassa: M G I P Y C N Y S K Y W Y L N H T T	
Pichinde: A K I P Y C N Y T K F W Y I N D T I	
Tacaribe: M S V P Y C N Y T R F W Y V N H T L	

Antes de continuar con el análisis de GP-2B conviene recordar que los determinantes antigénicos, definidos como aquellas

estructuras capaces de reaccionar con anticuerpos, pueden ser continuos o discontinuos (o secuenciales y conformacionales, respectivamente). Los continuos o secuenciales están formados por residuos contiguos en la secuencia proteica; los discontinuos o conformacionales están formados por residuos distantes en la secuencia proteica que resultan próximos entre sí después que la proteína adquiere su conformación definitiva (157). Podría ocurrir que GP-2B sea un epítope discontinuo.

Para tratar de verificar esta hipótesis, y de dilucidar los límites del epítope, que no se habían podido definir, se trabajó con péptidos correspondientes a Pichindó, comparando su reactividad con las de las respectivas secuencias de LCM.

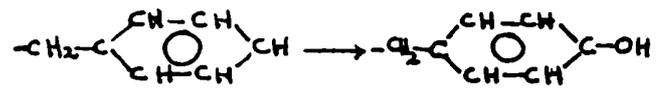
Las secuencias ensayadas fueron:

LCM:	a)	C N Y S K F W Y L E H A K
	b)	M G V P Y C N Y S K F W Y L E H A K
Pichindó:	c)	C N Y T K F W Y I N D T I
	d)	A K I P Y C N Y T K F W Y I N D T I

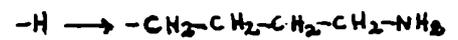
Como se puede observar, las diferencias entre algunos residuos de LCM y Pichindé en el extremo carboxilo pueden ser significativas desde el punto de vista de la polaridad : Glu por Asn, Hys por Asp, Ala por Thr, Lys por Ileu. Sin embargo, teniendo en cuenta que el péptido que representa el extremo carboxilo de 368-382 no había reaccionado con 9-7.9 (Tabla 6), era probable que los responsables de la falta de reactividad de los diversos arenavirus con el AcM fueran las sustituciones en el extremo amino: el cambio de Gly 366 por Lys representa una diferencia considerable de carga y tamaño, y Met 365 por Ala puede también ser estéricamente importante (Fig.32).

Las secuencias descritas fueron ensayadas en ELISA y en solución con 33.6 y 9-7.9, y solamente con el péptido d) pudo detectarse diferencia tanto en fase sólida como en solución, aunque no muy grande, entre la reactividad de la secuencia de LCM y la de Pichindé (Tabla 13). La reacción con 33.6 no varió significativamente, reforzando la evidencia de que es un AcM "universal" para arenavirus. (Fig.24).

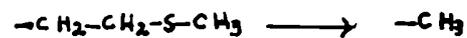
Lassa: Phe (375)  $\longrightarrow$  Tyr



Pichindé: Gly(366)  $\longrightarrow$  Lys



Met(365)  $\longrightarrow$  Ala



Tacaribe: Gly(366)  $\longrightarrow$  Ser



Fig. 32: Aminoácidos sustituidos en la región equivalente a 365-37 de GPC de LCM en diversos arenavirus.

Este resultado sugiere que en GP-2B están involucrados residuos a la izquierda del extremo amino del segmento 368-382, que probablemente cooperen con el resto de esta secuencia para definir la antigenicidad.

Aunque sólo se ensayaron las secuencias de Pichindé (a, b, c, y d), los cambios a la izquierda del extremo amino en otros arenavirus--con la excepción de Lassa--apoyan la hipótesis de que esos residuos en LCM contribuyen a la definición de GP-2B. En el caso de Lassa la sustitución Phe 375 por Tyr es aparentemente suficiente para destruir el epítopo (Tabla 11).

Mientras en Pichindé, como se mencionó, se reemplaza Gly 366 por Lys, en Tacaribe el cambio es Gly por Ser, involucrando también una gran variación en polaridad y tamaño (Fig.32). Considerando que Gly carece de cadena lateral, podría ocurrir que su reemplazo por otros residuos bloqueara la accesibilidad del epítopo, impidiendo la unión del AcM a la proteína y determinando la especificidad de la reacción. En el caso de Lassa, la sustitución Phe375 por Tyr produce el segmento ...TyrTrpTyr..., que considerado aislado del resto de la secuencia es conformacionalmente diferente de ...PheTrpTyr..., ya que los grupos hidroxilo de ambas Tyr se deben rechazar. De producirse,

esta alteración conformacional podría ser suficiente para que 9-7.9 no reaccione con el virus.

Por otra parte, de acuerdo con el método de Chou y Fasman (158), modificado por Levitt (159), para la predicción de la estructura secundaria, la conformación más probable para el segmento 368-382 de GPC de LCM es una  $\alpha$ -helice. El mismo tipo de cálculo aplicado a las secuencias correspondientes a Lassa, Pichindé y Tacaribe indica que en éstos la conformación más probable es una hoja plegada. Este cambio podría explicar la distinta reacción con 9-7.9.

Por supuesto, estas son sólo especulaciones que deben ser verificadas experimentalmente. Debe tenerse en cuenta, además, que se están considerando secuencias aisladas que en la realidad existen en el contexto de una glicoproteína compleja que influye en la conformación de las mismas, y, por ende, en su antigenicidad. (157,160,161). Se ha demostrado que la estructura secundaria de un péptido en la proteína completa está influida por los aminoácidos vecinos e interacciones debidas a residuos no adyacentes, ya que en proteínas que no están relacionadas entre sí existen secuencias homólogas de hasta ocho aminoácidos de longitud, y la conformación de esas secuencias no es la misma en todas las proteínas en que aparecen (162). Chou y Fasman

observaron que las predicciones de estructura secundaria coinciden con la estructura real cuando en los cálculos se incluyen los residuos adyacentes (163, citado por Lerner, 164).

Hay otro aspecto a considerar con respecto al epítopo GP-2B. La secuencia 368-382 incluye un sitio potencial de N-glicosilación -- AsnTyrSer en LCM y Lassa, AsnTyrThr en Pichindé y Tacaribe-- (165) presente en los cuatro virus considerados. Ese sitio podría estar "sin usar" en LCM, permitiendo la unión del AcM, y "ocupado" (glicosilado) en los otros. La cadena de hidratos de carbono bloquearía así la reacción con el AcM. Este efecto ha sido demostrado en otros sistemas: se vio que la glicosilación de un sitio en la hemoaglutinina de Influenza Hong Kong impide la unión de un AcM al virión (166), y Webster et al. encontraron que la diferencia entre una cepa virulenta y una avirulenta de Influenza A que afecta a pollos involucra la adquisición de un potencial sitio de glicosilación por la primera (167); si ese sitio estuviera ocupado, el polisacárido podría bloquear la unión de anticuerpos neutralizantes al virión.

Tabla 21: Reactividad de secuencias correspondientes a Pichinde y Lassa con 33.6 y 9-7.9. Resumen.

<u>Secuencia</u>	<u>Péptido</u>	<u>Reactividad</u>			
		33.6		9-7.9	
		ELISA	Bloqueo	ELISA	Bloqueo
Exp. 1					
LCM 370-382	CNYSKFWYLEHAK	>40960	+	>40960	+
Ser373->Thr	...T.....	40960	+	10240	+
Phe375->Tyr	.....Y.....	10240		160	
-----					
Exp. 2					
LCM 370-382	CNYSKFWYLEHAK	40960	+	40960	+
Pic 373-390	...T....INDTI	10240	+	640	+
-----					
Exp. 3					
LCM 365-382	MGVPYCNYSKFWYL- EHAK	25600	+	102400	+
Pic 373-390	AKIPYCNYYTKFWYI- NDTI	6400	+	640	+ -

Ahora bien, si se consideran los resultados resumidos en la Tabla 19, GP-2B está contenido en 368-378, de 11 residuos de longitud; si la hipótesis sobre la influencia del extremo amino (residuos 365-367) fuera cierta resultaría un epítopo de 14 aminoácidos, mucho más largo que lo que el sitio de unión de un anticuerpo permite "acomodar". Pero debe tenerse en cuenta que el número de residuos que están en contacto con el Ac puede ser mucho menor. Barlow et al. han sugerido que todos los epítopos tienen cierto grado de discontinuidad, y que los péptidos que presentan reacción cruzada con los Ac contra una proteína representan sólo parte de la zona de interacción antígeno-anticuerpo en la proteína completa (133). Resulta interesante, además, aunque puede ser algo fortuito, que el título en ELISA de 9-7.9 con la secuencia 365-382 de LCM haya resultado mayor que con las otras secuencias (Exp.3, Tabla 20).

En estudios in vivo con el virus del mosaico del tabaco se vio que secuencias reconocidas por AcMs no representaban epítopos completos, y que mutantes con sustituciones en zonas cercanas a las secuencias analizadas presentaban diferencias en la unión a esos AcMs (156). Piccone et al. analizando secuencias de distintos serotipos de virus aftosa, han sugerido la posibilidad de que las diferencias serológicas entre los virus

C<sub>3</sub>Res 55 y C<sub>3</sub>Arg 84 se deban a sustituciones significativas de aminoácidos en las posiciones 45 (Ser por Leu) y/o 47 (Arg por Gly) de VP1, aun cuando el epítopo analizado se encuentra en la región 136-155 de la proteína, y la zona que comprende los residuos 40-60 no parece estar involucrada directamente en la inmunogenicidad (168).

En el caso de GP-2B podría ocurrir que sólo parte de los residuos contenidos en 365-378 estuviera en contacto con el AcM, y que el epítopo real, pese a estar representado por una secuencia de 14 aminoácidos, fuera mucho menor.

Es importante señalar que hemos trabajado con AcMs contra la proteína nativa que reaccionaban con los péptidos, y no a la inversa, o sea anticuerpos contra los péptidos que reaccionaban con la proteína. Algo establecido por la inmunología clásica y confirmado por los modernos trabajos con péptidos es que anticuerpos contra una secuencia peptídica cualquiera de una proteína reaccionan con ésta, aun cuando esa secuencia no sea inmunogénica en la proteína nativa, requiriéndose solamente que se encuentre en la superficie de la proteína (130,139,144).

En nuestro caso el reconocimiento de las secuencias por parte de AcMs contra la proteína nativa apoya el hecho de que las

secuencias son antigénicas en la estructura completa. El Dr. Peter Southern, de Scripps Clinic and Research Foundation, realizó la búsqueda de secuencias proteicas significativamente análogas a 368-382 y 370-382 en el banco de datos de Protein Identification Resource del National Institute of Health, que comprende 4028 secuencias, no encontrando homologías, lo que permite decir que se trata de secuencias propias de arenavirus.

Resumiendo, en la primer parte del trabajo se definió a nivel de la secuencia de aminoácidos el sitio de unión de dos AcMs contra dos epitopes de LCM, prototipo de la familia Arenaviridae (Fig. 33).

Uno de estos epitopes está presente en un arenavirus africano no patógeno, y permite distinguirlo del patógeno Lassa, constituyendo un potencial marcador de atenuación para los arenavirus africanos.

El segundo reviste particular importancia, ya que está conservado en todos los miembros de la familia. Este epitope es el primer antígeno conservado a nivel de la glicoproteína de los arenavirus que se describe.

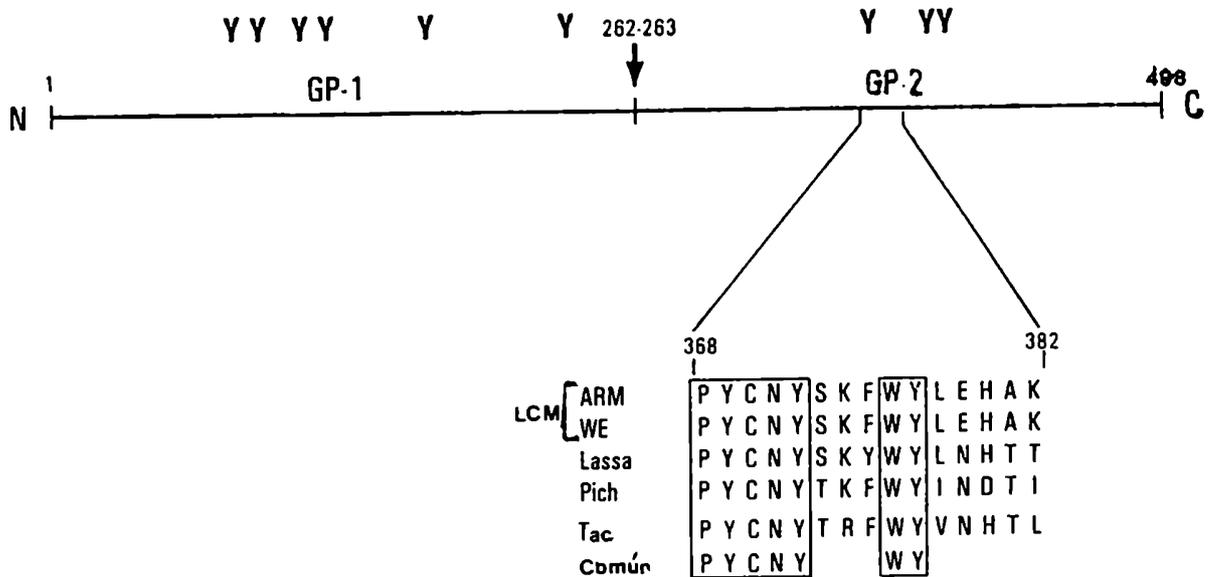


Fig. 33: Esquema de GPC mostrando la posición del sitio antigénico conservado. Se ha señalado el sitio de ruptura proteolítica entre los aminoácidos 262 y 263, y los sitios potenciales de glicosilación (Y).

En la segunda parte del trabajo se trató de determinar si el epítopo conservado es reconocido por antisueros contra arenavirus. Este análisis debe realizarse para determinar qué

epitopes son significativos desde el punto de vista de la inmunidad humoral, y, en nuestro caso, verificar que los AcMs reaccionantes con 370-382 están representados en la respuesta inmune policlonal, algo que puede no ocurrir: trabajando con vaccinia Wilton et al. no encontraron correlación alguna entre la incidencia de anticuerpos policlonales circulantes contra determinada proteína en el huésped inmune y la frecuencia con que se seleccionaban hibridomas que produjeran AcMs contra la misma (135).

Se hizo un primer ensayo de ELISA con sueros de cobayo, mono Rhesus y humanos contra LCM y Lassa, arenavirus del Viejo Mundo, y Junín, del Nuevo Mundo. Todos los antisueros reaccionaron con la secuencia 370-382 de GPC de LCM, y no hubo reacción con ninguno de los sueros control (Fig.25 y Tabla 14), indicando que existe una respuesta humoral específica contra esta secuencia.

Para profundizar el análisis se trabajó solamente con el suero hiperinmune de cobayo contra LCM. Se encontró que la reacción con 370-382 se producía también en solución, y que la secuencia bloqueaba la unión del antisuero con GP-2 de LCM en inmunoblot (Fig.16), por lo tanto el péptido es también antigénico cuando enfrenta anticuerpos policlonales. Se ha observado que la presencia de residuos Pro y Tyr aumenta la antigenicidad de

péptidos sintéticos (169). Al respecto cabe recordar que tanto 370-382 como 368-382 poseen ambos aminoácidos, con tres residuos Tyr en un segmento de ocho y diez aminoácidos respectivamente.

Como en GP-2 de LCM existen al menos tres epitopes, GP-2A, GP-2B y GP-2C (91), y la secuencia 370-382 representa solamente a GP-2A y GP-2B, se determinó qué porcentaje de la respuesta policlonal estaba dirigido contra estos antígenos.

Midiendo la radioactividad de Proteína-A-I<sup>125</sup> unida a GP-2 en inmunoblot se determinó que la preincubación del antisuero con 370-382 bloqueaba aproximadamente un 70% de la unión del mismo a la glicoproteína; por lo tanto puede inferirse que éste es el porcentaje de anticuerpos contra GP-2A y B presentes en el suero anti-LCM (Tabla 15). Este es un cálculo grosero de la fracción de anticuerpos contra ambos epitopes, ya que el método empleado tiene un margen de error considerable, y, además, se está suponiendo que los únicos epitopes en GP-2 son A, B y C, algo que aún no se puede afirmar rotundamente: podría haber otro u otros, contra los cuales no se hubiera encontrado aún un AcM.

Rumpold et al. determinaron en sueros humanos la fracción de anticuerpos que reaccionaban con el antígeno nuclear del virus de Epstein Barr mediante reacciones de inhibición de la unión a la

proteína en inmunoblot por péptidos sintéticos, basando sus cálculos en el método más preciso de densitometría de la autorradiografía usando un densitómetro de rayo laser (170). Encontraron que el porcentaje de bloqueo dependía de la concentración de péptido empleada, y que dicha fracción de anticuerpos variaba en diferentes individuos. Esto último debe tenerse en cuenta: podría ocurrir que en otros inmunoseros la fracción de anticuerpos contra los epitopes de LCM estudiados sea diferente del 70%.

También se estudió la reactividad del antisuero con péptidos derivados de 370-382 y 368-382 mediante deleciones amino y carboxiterminales. Se encontró que la reacción del anticuerpo policlonal en ELISA fue mucho más sensible que la de los AcMs a las deleciones (Tabla 16). Así, mientras 33.6 y 9-7.9 reaccionaron con todos los péptidos con deleciones en el extremo amino, el antisuero sólo reaccionó con 368-382 y 370-382, con títulos mucho más bajos que los AcMs.

Sin embargo, cuando se hicieron las reacciones en solución e inmunoblots, todas las secuencias fueron capaces de bloquear en cierto grado la unión del policlonal a GP-2 (Fig. 27). Esta es otra evidencia de la diferente reactividad de una secuencia unida a una fase sólida, que, de acuerdo con los trabajos de Houghten

et al. (136,150) puede atribuirse a diferencias en el tipo de asociaciones entre las moléculas de péptido al variar la longitud del mismo.

Los ensayos con los péptidos con deleciones amino y carboxiterminales en ELISA con el suero anti-LCM dieron el mismo resultado, en líneas generales, que los ensayos con los AcMs (Tabla 16). Se comprobó que los residuos Cys-Asn 370-371 son importantes, ya que su eliminación abolió toda reactividad, y que suprimiendo los cinco residuos carboxiterminales no hay alteración de la reactividad (Experimento 2, Tabla 16).

Cuando se ensayaron las secuencias con las sustituciones puntuales correspondientes a Lassa y Pichindé (Fig. 28) no se observaron diferencias. En este aspecto el anticuerpo policlonal se comportó como el monoclonal 33.6.

En cambio la secuencia que corresponde a los residuos 378-390 de Pichindé (Cys-Asn-Tyr-Thr-Lys-Phe-Trp-Tyr-Ile-Asn- Glu- Thr- -Ile), equivalente al segmento 370-382 de LCM, con la salvedad de que Ser 373 está cambiada por Thr y los cinco residuos carboxiterminales (Leu-Glu-His-Ala-Lys en LCM) están sustituidos por los de Pichindé, presentó distinta reactividad: mientras la secuencia de LCM bloqueó totalmente la unión a GP-2, la de

Pichindé no lo hizo en la misma proporción (Fig.28). Esto indica que el extremo carboxilo está involucrado de alguna manera en la respuesta inmune policlonal. Cabe recordar al respecto que existe al menos un epítipo más en GP-2 de LCM, GP-2C, en el que podría intervenir el extremo carboxilo del péptido 370-382, ya que los epítipos en GP-2 están parcialmente superpuestos (91).

El anterior es un resultado que debe destacarse: mientras 9-7.9 no diferenció entre 378-390 de Pichindé y 370-382 de LCM, el anticuerpo policlonal sí lo hizo. Geysen et al., trabajando con péptidos de virus aftoso señalaron la menor especificidad de los sueros antipéptido cuando se los compara con sueros antiviruses (141). Atribuyeron la diferencia a que el suero antipéptido reconoce mayor número de conformaciones que el suero antiviruses.

En nuestro caso no se comparó el suero antiviruses con un suero antipéptido sino con un AcM antiviruses, el cual mostró menor especificidad que el policlonal. La diferencia puede deberse, como se dijo, a que en el policlonal existen uno o más componentes contra el extremo carboxilo del virus (Leu-Glu-His-Ala-Lys) que no reaccionan con el péptido sustituido (Ile-Asn-Asp-Thr-Ile), o a que el AcM reacciona con diferentes conformaciones adoptadas por el péptido.

Para completar esta parte del trabajo se realizaron ensayos preliminares para determinar si las secuencias 368-382 y 370-382 pueden servir como reactivos para detectar infecciones por arenavirus. Se utilizaron sueros de convalescientes de infecciones con Junín, Lassa, LCM y Pichindé. Estas muestras habían sido provistas por los Drs. Robert Shope, de la Yale Arbovirus Research Unit, y Joseph McCormick, del Center for Disease Control, Atlanta. Sobre un total de 36 muestras, 23 se encontraban codificadas, de manera que se desconocía cuáles provenían de individuos infectados

Se realizaron ensayos de ELISA con 370-382 y 368-382. La unión a 370-382 no fue buena, ya que en muchos casos la densidad óptica obtenida fue muy baja. Con 368-382, en cambio, se obtuvieron resultados alentadores, pese a la gran dispersión de los datos (Fig.29). Sobre un total de 36 muestras ensayadas, se obtuvieron 31 positivos verdaderos, 3 falsos negativos y 3 falsos positivos, o sea un 85% de positivos reales.

Las variaciones individuales son normales en este tipo de ensayo. Por ejemplo, Rumpold y colaboradores encontraron gran variabilidad en el grado de reacción de sueros humanos con péptidos derivados del antígeno nuclear de EBV, existiendo también casos "raros", en que los antisueros reaccionaban con

alguna otra secuencia no relacionada con la inmunodominante (170). Sueros de pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida presentaron densidades ópticas que variaron entre 0.6 y 1.6 al reaccionar con un péptido derivado de la proteína gp41 del virus de la inmunodeficiencia humana; pese a esa gran dispersión los autores encontraron reactividad con el péptido en el 100 % de los casos estudiados (171,172).

Para tener un doble control sobre la utilidad potencial de nuestras secuencias para la detección de anticuerpos antiarenavirus se enviaron placas sensibilizadas con los péptidos 353-370, 370-382 y 378-391 al Dr. Peter Jahrling, de U.S.A.M.R.I.I.D., Fort Detrick, Maryland, quien obtuvo unión específica de sueros humanos, de cobayo y de mono Rhesus antiarenavirus a la secuencia 370-382.

El resultado de la segunda parte del trabajo demuestra que el epítopo GP-2A de LCM, conservado en la familia Arenaviridae, es inmunodominante, ya que sueros de diferentes especies infectadas con distintos arenavirus reaccionaron específicamente con los péptidos que lo representan. Esta reactividad específica sugiere que las secuencias 368-382 y/o 370-382 podrían servir como base para diseñar un reactivo para la detección de infecciones por arenavirus.

En una última etapa se trató de dilucidar cuál es la función biológica de la secuencia 370-382, mediante distintos ensayos. Se trató de determinar si el AcM 33.6 está involucrado en algún mecanismo de neutralización, ya fuera en presencia de complemento o como agonista de otros AcMs (173), con resultados negativos en ambos casos. También dieron resultado negativo las experiencias realizadas para establecer si el mismo AcM está relacionado con la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (151).

La estimulación ejercida por el péptido 370-382 de la proliferación de linfocitos desafiados con LCM es el resultado más prometedor: la secuencia podría estar involucrada en la inmunidad celular, que ha sido sugerido podría ser responsable de la protección cruzada entre el virus Tacaribe y Junín en los estadios tempranos de la infección con el primero (101,104).

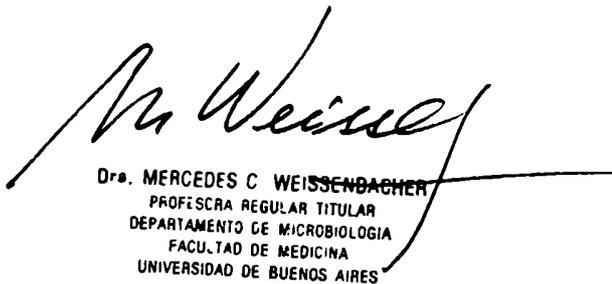
El alto grado de conservación de la secuencia sugiere también que podría estar involucrada en algún mecanismo protector del virus, no del huésped infectado, como han indicado Geysen et al. analizando secuencias conservadas en distintos serotipos de aftosa (143). Pero la inmunodominancia del segmento 368-382 puede considerarse argumento contrario a esta hipótesis.

Conocer el papel jugado por una secuencia inmodominante en una proteína viral es necesario para evaluar su potencial uso como vacuna. Aunque las opiniones sobre la utilidad de los péptidos sintéticos como antígenos vacunantes son disímiles, son elementos que deben tenerse en cuenta para futuros estudios debido a sus propiedades inmunogénicas, ya que es posible que se desarrollen en el futuro las condiciones necesarias para superar los problemas que su uso presenta en la actualidad. Schwartz ha opinado que "no hay futuro" para las vacunas a péptido sintético, a menos que se trabaje con secuencias que provoquen la producción de anticuerpos neutralizantes, ya que en el caso de que se trate de secuencias que induzcan inmunidad celular la respuesta inmune dependerá de la carga genética de cada individuo, ya que este tipo de respuesta involucra al antígeno mayor de histocompatibilidad (174). De todas maneras, este investigador considera que, dada la complejidad de los mecanismos protectores en la respuesta inmune, las vacunas a péptido sintético no son posibles.

En el caso de que la secuencia elegida corresponda exactamente a un epítopo continuo neutralizante, inclusive en lo que hace a su estructura terciaria (160), las posibilidades de provocar una respuesta de anticuerpos protectores es muy alta, como lo

demuestra la inmunización contra aftosa obtenida por Bittle et al. en cobayos (175) y Piccone et al. en ratones (176). Se ha señalado, sin embargo, que la mayoría de los epitopes son discontinuos (133), y que para seleccionar adecuadamente la secuencia a sintetizar como inmunógeno sería necesario conocer la estructura tridimensional del virión (160,177).

Evidentemente son necesarios más estudios para dilucidar el rol de la secuencia 368-378 y su posible utilidad como elemento de diagnóstico o inmunógeno. La secuenciación de otras proteínas de arenavirus y la obtención de nuevos AcMs contribuirán de manera fundamental a estos objetivos.



Dra. MERCEDES C. WEISSENDACHER  
PROFESORA REGULAR TITULAR  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES



## Referencias

- 1.- Howard CR (1987): Arenaviruses. En "Perspectives in Medical Virology", Vol. 2. Ed. A.J. Zuckerman. Elsevier, Amsterdam/New York.
- 2.- Gonzalez JP (1985): Les Arenavirus d'Afrique. Essai pour une definition d'un complexe viral original. Tesis doctoral. Universite de Clermont Ferrand II. Francia.
- 3.- Saluzzo JF, Adam F, McCormick JB y Digoutte JP (1988): Lassa fever virus in Senegal. J. Infect. Dis. 157: 605.
4. Vitullo AD, Hodara VL y Merani MS (1987): Effect of persistent infection with Junin virus on growth and reproduction of its natural reservoir, Calomys musculinus. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37: 663-669.
- 5.- Vitullo AD y Merani MS (1988): Is vertical transmission sufficient to maintain Junin virus in Nature? J. Gen. Virol. 69: 1437-1440.
- 6.- Armstrong CR y Lillie RD (1934): Experimental lymphocytic chorioningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. Public Health Rep. (Washington) 49: 1019-1027.

- 7.- Rivers TM y Scott TFM (1936): Meningitis in man caused by a filterable virus.II. Identification of the etiological agent. J. Exp. Med. 63: 415-432.
- 8.- Traub E (1935): A filterable virus recovered from white mice. Science 81: 298-299.
- 9.- Arribalzaga RA (1955): Una nueva enfermedad epidemica a germen desconocido: hipertermia nefrotoxica, leucopenica y enantemica. Dia Medico 27: 1204-1210.
- 10.- Rugiero HR, Rugiero H, Gonzalez Cambaceres C, Cintora FA, Maglio F, Magnoni C, Astarloa L, Squassi G, Giacocatini MSA, Fernandez D (1964): Fiebre Hemorragica Argentina. II. Estudio clinico descriptivo. Rev. Asoc. Med. Arg. 78:281-290.
- 11.- Parodi AS, Greenway DJ, Rugiero HR, Rivero E, Frigerio MJ, Mettler NE, Garzon F, Boxaca MC, Guerrero LB de, Nota NR (1958): Sobre la etiologia del brote epidemico de Junin. El Dia Medico 30: 2300-2302.
- 12.- Sabattini MS, Gonzalez del Rio LE, Vega VR (1977): Natural and experimental infection of rodents with Junin virus. Medicina (Buenos Aires) 37 (Supl 3):149-161.

- 13.- Enria D, Garcia Franco S, Ambrosio AM, Vallejos D, Levis S, Maiztegui J (1986): Current status of the treatment of Argentine Hemorrhagic Fever. *Med. Microbiol. Immunol.* 175: 173-176.
- 14.- Maiztegui J, Feuillade M y Briggiler A (1986): Progressive extension of the endemic area and changing incidence of Argentine Hemorrhagic Fever. *Med. Microbiol. Immunol.* 175: 149-152.
- 15.- Johnson KM (1965): Epidemiology of Machupo virus infection. III. Significance of virological observations in man and animals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14: 816-818.
- 16.- Peters CJ (1984): Arenaviruses. *Textbook of Human Virology*. Ed. RB Belsha, pp 513-545. PSG Publishing Company, Inc. Littleton, Massachusetts.
- 17.- Buckley SM, Casals J y Downs WG (1970): Isolation and antigenic characterization of Lassa virus. *Nature (London)* 227: 174
- 18.- Casals, J (1977): Serological reactions with arenaviruses. *Medicina (Buenos Aires)* 37 (Supl 3) 59-68.4.- Auperin DD, Galinski M, y Bishop DHL (1984): The sequences of the N protein gen and intergenic region of the S RNA of Pichinde arenavirus. *Virology* 134: 208-219.

- 19.- Buckley SM y Casals J (1970): Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. III. Isolation and characterization of the virus. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19: 680-691.
- 20.- Frame JB, Baldwin JM, Gocke DJ, Troub JM (1970): Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. I. Clinical description and pathological findings. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19: 670-676.
- 21.- McCormick JB, Webb PA, Krebs JW, Johnson KM y Smiyh ES (1987): A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever. J. Infect. Dis. 155:437-444.
- 22.- Murphy FA, Webb PA, Johnson KM y Whitfield SG (1969): Morphological comparison of Machupo with lymphocytic choriomeningitis virus: basis for a new taxonomic group. J. Virol. 4: 535-541.
- 23.- Murphy FA (1975): Arenavirus taxonomy, a review. Bull W.H.O. 52: 389-391.
- 24.- Matthews REF (1982): Classification and nomenclature of viruses. Intervirology 17: 1-200.

- 25.- Welsh RM y Buchmeier MJ (1979): Protein analysis of defective interfering lymphocytic choriomeningitis virus and persistently infected cells. *Virology* 96: 503-515.
- 26.- Weber EL, Guerrero LB de y Boxaca MC (1985): MRC-5 cells, a model for Junin virus infection. *J. Gen. Virol.* 66: 1179-1183.
- 27.- Alche LE y Coto CE (1986): Antigenic variants of Junin virus isolated from infected Calomys musculinus. *Arch. Virol.* 90: 343-348.
- 28.- Hinman AR, Fraser DW, Douglas RG, Bowen GS, Kraus AI, Winkler WG, y Rhodes WW (1975): *Am. J. Epidemiol.* 101: 103-110.
- 29.- Boxaca MC (1970): Establecimiento y características de una sublínea de células Vero persistentemente infectadas con virus Junin. *Medicina (Buenos Aires)* 30 (Supl. 1): 50-61.
- 30.- Oldstone MBA (1987): The Arenavirus—An Introduction *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 133:1-4.
- 31.- Zinkernagel RM y Doherty PC (1979): MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cell restriction, specificity, function and responsiveness. *Adv. Immunol.* 27: 151-177.

- 32.- Oldstone MBA, Holmstoen J y Welsh RM (1977): Alteration of acetylcholine enzymes in neuroblastoma cells persistently infected with lymphocytic choriomeningitis virus. J. Cell Physiol. 91: 459-472.
- 33.- Oldstone MBA, Sinha YN, Blount P, Tishon A, Rodriguez M, von Wedel R y Lampert PW (1982): Virus-induced alterations in homeostasis: alterations in differentiated functions of infected cells in vivo. Science 218: 1125- 1127.
- 34.- Laguens RP, Cabeza Meckert P, Avila MM, Nejamkis MR, y Weissenbacher MC (1983): Infeccion cronica con virus Junin en la rata. Estudios patologicos y virologicos. Medicina (Buenos Aires) 43: 391-397.
- 35.- Weissenbacher MC, Lascano EF, Avila MM y Berria MI (1986): Chronic neurologic disease in Junin virus-infected rats. J. Med. Virol. 20: 57-65.
- 36.- Klavinskis LS, y Oldstone MBA (1989): Lymphocytic choriomeningitis virus selectively alters differentiated but not house keeping functions: block in expression of growth hormone gene is at the level of transcriptional initiation. Virology. 168: 232-235.

- 37.- Gimenez HB, Boersma DP, y Compans RW (1983): Analysis of polypeptides in Tacaribe virus-infected cells. *Virology* 128: 469-473.
- 38.- D'Aiutolo AC y Coto CE (1986/87): Vero cells persistently infected with Tacaribe virus: role of interfering particles in the establishment of the infection. *Virus Research* 6: 235-244.
- 39.- Damonte EB y Coto CE (1979): Temperature sensitivity of the arenavirus Junin isolated from persistently infected Vero cells. *Intervirology* 11: 282-287.
- 40.- Candurra NA y Damonte EB (1985): influence of cellular functions on the evolution of persistent infections. *Archives of Virology* 86: 275-282.
- 41.- Oldstone MBA (1987): Immunotherapy for virus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 134: 211-239.
- 42.- Ahmed R, Salmi A, Butler LD, Chiller JM y Oldstone MBA (1984): Selection of genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistently infected mice: role in suppression of cytotoxic T lymphocyte response and viral persistence. *J. Exp. Med.* 60:521-540.

- 43.- Oldstone MBA y Buchmeier MJ (1982): Restricted expression of viral glycoproteins in cells of persistently infected mice. Nature (London) 300: 360-362.
- 44.- Francis SJ, Southern PJ, Valsamakis A y Oldstone MBA (1987): State of viral genome and proteins during persistent lymphocytic choriomeningitis virus infections. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 133: 67-88.
45. Francis SJ y Southern PJ (1988): Molecular analysis of viral RNAs in mice persistently infected with lymphocytic choriomeningitis virus. J. Virol. 62: 1251.
- 46.- Weissenbacher MC, Laguens RP y Coto CE (1987) Argentine Hemorrhagic Fever. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 134: 80-116.
- 47.- Rabinovich RD, Lascano EF y Boxaca MC (1987): Junin virus persistence in mice. Acta Virol. 31: 86-90.
- 48.- Schmunis G, Weissenbacher MC y Parodi AS (1967): Tolerance to Junin virus in thymectomized mice. Arch. Gesamte Virusforsch. 21: 201-204.
- 49.- Nejamkis MR, Giovanniello OA, Celeste F y Nota NR (1980): Efecto de la ciclofosfamida y del suero anti-timocito sobre la

resistencia del raton adulto al virus Junin Medicina (Buenos Aires) 40: 31-37.

50.- Weissenbacher MC, Calello MA, Merani S, Oubina JR, Laguens RP, Montoro L y Carballal G (1986): Induction of Junin virus persistence in adult athymic mice. Intervirology 25: 210-215.

51.- Malumbres E, Boxaca MC, Guerrero LB de, Berria MI y Lascano EF (1984): Persistence of attenuated Junin virus strains in guinea pigs infected by IM or IC routes. J. Infect. Dis. 149: 1022.

52.- Avila MM, Samoilovich SR, Laguens RP, y Weissenbacher MC (1986): Protection of Junin virus- infected marmosets by passive administration of immune serum. Association with late neurological signs. J. Med. Virol. 21: 67-74.

53.- Ambrosio AM, Enria DA y Maiztegui JI (1986): Junin virus isolation from lympho-mononuclear cells of patients with Argentine Hemorrhagic Fever. Intervirology 25: 97-102.

54.- Vezza AC, Clewley JP, Gard GP, Abraham NZ, Compans RW y Bishop DHL (1978): Virion RNA species of the arenaviruses Pichinde, Tacaribe and Tamiami. J. Virol. 26: 485-497.

- 55.- Carter MF, Biswal NN y Rawls WE (1974): Polimerase activity of Pichinde virus. *J. Virol.* 13: 577-583.
- 56.- Leung WC, Leung MFKL y Rawls WE (1979): Distinctive RNA transcriptase, polyadenylic acid polymerase and polyuridylic acid polymerase activities associated with Pichinde virus. *J. Virol.* 30: 98-107.
- 57.- Dutko FJ, Kennedy SIF y Oldstone MBA (1981): Genome structure of lymphocytic choriomeningitis virus: cohesive complementary termini? En "The replication of Negative Strand Viruses. Eds. D.H.L. Bishop y R.W. Compans, pp 43-49. Elsevier/ North Holland, New York.
- 58.- Southern PJ, Singh MK, Riviere Y, Jacoby DR, Buchmeier MJ y Oldstone MBA (1987): Molecular characterization of the genomic S RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 157: 145-155.
- 59.- Buchmeier MJ y Parekh BS (1987): Protein structure and expression among arenaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 133: 41-57.
- 60.- Buchmeier MJ y Oldstone MBA (1979): Protein structure of lymphocytic choriomeningitis virus: evidence for a cell

associated precursors of the virus glycopeptides. *Virology* **99**: 111-120.

61.- Riviere Y, Ahmed R, Southern PJ, Buchmeier MJ y Oldstone MBA (1985): Genetic mapping of lymphocytic choriomeningitis virus pathogenicity: virulence un guinea pigs is associated with the L RNA segment. *J. Virol.* **55**: 704-708.

62.- Riviere Y (1987): Mapping arenavirus genes causing virulence. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **133**: 59-65.

63.- Riviere Y, Ahmed R, Southern PJ y Oldstone MBA (1985): Perturbation of differentiated functions during viral infection "in vivo": II. Viral reassortants map growth hormone defect at the S RNA of the lymphocytic choriomeningitis virus genome. *Virology*, **142**: 175-182.

64.- Bishop DHL y Auperin DD (1987): Arenavirus gen structure and organization. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **133**: 5-17.

65.- Franze-Fernandez MT, Zetina C, Iapalucci S, Lucero MA, Bouissou C, Lopez R, Rey O, Daheli M, Cohen GN, y Zakin MM (1987): Molecular structure and early events in the replication of Tacaribe virus RNA. *Virus Research* **7**: 309-324.

- 66.- Overton HA, Ihara T y Bishop DHL (1987): Identification of the N and NS<sub>2</sub> proteins coded by the ambisense S RNA of Punta Toro phlebovirus using monospecific antisera raised to baculovirus expressed N and NS<sub>2</sub> proteins. *Virology* 157: 338-350.
- 67.- Auperin DD, Saso D y McCormick JB (1986): Nucleotide sequence of the glycoprotein gene and intergenic region of Lassa fever virus S genome RNA. *Virology* 154: 155-167.
- 68.- Auperin DD, Galinski M y Bishop DHL (1982): The sequences of the N protein gen and intergenic region of the S RNA of Pichinde arenavirus. *Virology* 134: 208-219.
- 69.- Southern PJ y Bishop DHL (1987): Sequence comparison among arenaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 133: 19-39.
- 70.- Romanowski V, Matsura Y y Bishop DHL (1985): Complete sequence of the S RNA of lymphocytic choriomeningitis virus (WE strain) compared to that of Pichinde arenavirus. *Virus Research* 3: 101-114.
- 71.- Howard CR y Buchmeier HJ (1983): A protein kinase activity in lymphocytic choriomeningitis virus and identification of the phosphorylated product using monoclonal antibody. *Virology* 126: 538-547.

- 72.- Bruns M, Martinez Peralta L y Lehmann-Grube F (1983):  
Lymphocytic choriomeningitis virus. III. Structural proteins of  
the virion. J. Gen. Virol. 64: 599-611.
- 73.- Bruns M, Zeller W, Rohdewohld H, Lehmann-Grube F (1986):  
Lymphocytic choriomeningitis virus. IX. Properties of the  
nucleocapsid. Virology 151: 77-85.
- 74.- Harnish DG, Leung WC y Rawls WE (1981): Characterization of  
polypeptides immunoprecipitable from Pichinde virus-infected  
BHK-21 cells. J. Virol. 38: 840-848.
- 75.- Vezza AC, Gard GP, Compans RW y Bishop DHL (1977):  
Structural components of the arenavirus Pichinde. J. Virol. 23:  
776-786.
- 76.- Gard GP, Vezza AC, Bishop DHL y Compans RW (1977):  
Structural proteins of Tacaribe and Tamiami virions. Virology 83:  
84-95.
- 77.- Clegg JAC y Lloyd G (1983): Structural and cell associated  
proteins of Lassa virus. J. Gen. Virol. 64: 1127-1136.
- 78.- Gangemi JD, Rosato RR, Connell EV, Johnson EM y Eddy GA  
(1978): Structural polypeptides of Machupo virus. J. Gen. Virol.  
41: 183-188.

- 79.- Martinez Zegovia ZM y De Mitri MI (1977): Junin virus structural proteins, J. Virol. 21 579-583.
- 80.- Harnish DG, Dimock K, Bishop DHL y Rawls WE (1983): Gene mapping in Pichinde virus: assignment of viral polypeptides to genomic L and S RNA. J. Virol. 46: 638-641.
- 81.- Buchmeier MJ (1984): Antigenic and structural studies on the glycoproteins of lymphocytic choriomeningitis virus. En "Segmented Negative Strand Viruses". Eds. R.W. Compans y D.H.L. Bishop, pp 193-200. Academic Press, New York.
- 82.- Singh MK, Fuller-Pace FV, Buchmeier MJ y Southern PJ (1987): Analysis of the genomic L RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. Virology 161: 448-456.
- 83.- Kamer G y Argos P (1984): Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. Nucl. Acids Res. 12: 7269-7282.
- 84.- Buchmeier MJ, Elder JH y Oldstone MBA (1978): Protein structure of lymphocytic choriomeningitis virus: identification of the virus structural and cell associated polypeptides. Virology. 89: 133-145.

- 85.- Buchmeier MJ, Southern PJ, Parekh BS, Wooddell MK y Oldstone MBA (1987): Site-specific antibodies define a cleavage site conserved among arenavirus GPC glycoproteins. *J. Virol.* 61: 982-985.
- 86.- Hershko A y Fry M (1975): Post-translational cleavage of polypeptide chains: role in assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 44: 775-797.
87. van der Zeijst BAH, Bleumink N, Crawford LV, Swyryd EA, Stark GR (1983): Viral proteins and RNAs in BHK cells persistently infected by lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 48: 262-270.
88. Boersma DP, Saleh F, Nakamura K y Compans RW (1982): Structure and glycosylation of Tacaribe viral glycoproteins. *Virology* 123: 452-456.
- 89.- Howard CR, Lewicki HA, Allison L, Salter M y Buchmeier MJ (1985): Properties and characterization of monoclonal antibodies to Tacaribe virus. *J. Gen. Virol.* 66: 1383-1395.
- 90.- Damonte EB, Mersich SE, Candurra NA y Coto CE (1986): Cross reactivity between Junin and Tacaribe viruses as determined by

neutralization test and immunoprecipitation. *Med. Microbiol. Immunol.* 175: 85-88.

91.- Parekh BS y Buchmeier MJ (1986): Proteins of lymphocytic choriomeningitis virus: antigenic topography of the viral glycoproteins. *Virology* 153: 168-178.

92.- Allison LM, Salter M, Buchmeier MJ, Lewicki HA y Howard CR (1984): Neutralization of arenaviruses: Reaction of Tacaribe virus and variants with monoclonal antibodies. En "Segmented Negative Strand Viruses. Eds. R.W. Compans y D.H.L. Bishop, pp 209-216. Academic Press, Orlando.

93.- Howard CR (1987): Neutralization of arenaviruses by antibody. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 134: 117-130.

94.- Wulff H, Lange JV y Webb PA (1978): Interrelationships among arenaviruses measured by indirect immunofluorescence. *Intervirology* 91:344-350.

95.- Casals J, Buckley SM y Cedeno R (1975): Antigenic properties of the arenaviruses. *Bull. WHO* 52: 421-427.

96.- Coto CE, Weissenbacher MC y Calello MA (1976): Proteccion del cobayo contra la fiebre hemorragica argentina por inoculacion de virus del complejo Tacaribe. *Medicina (Buenos Aires)* 36: 9-16.

97.- Buchmeier MJ y Oldstone MBA (1978): Identity of the viral protein responsible for serologic cross-reactivity among the Tacaribe complex arenaviruses. En "Negative strand viruses and the host cell". Eds. B.W. Mahy y R.D. Barry, pp 91-97.

98.- Damonte EB, Mersich SE y Coto CE (1983): Response of cells persistently infected with arenaviruses to superinfection with homotypic and heterotypic viruses. *Virology* 129: 474-478.

99. Weissenbacher MC, Coto CE y Calello MA (1975/76): Cross-protection between Tacaribe complex viruses. Production of neutralizing antibodies against Junin virus (Argentine hemorrhagic fever) in guinea pigs infected with Tacaribe virus. *Intervirology* 6: 42-49.

100.- Weissenbacher MC, Coto CE, Calello EB, Frigerio MJ y Damonte EB (1977): Proteccion experimental contra virus Junin por inoculacion de virus Tacaribe. *Medicina (Buenos Aires)* 37 (Supl 3): 237-243.

101.- Coto CE, Damonte EB, Calello MA y Weissenbacher MC (1980): Protection of guinea pigs inoculated with Tacaribe virus against lethal doses of Junin virus. *J. Infect. Dis.* 141: 389-393.

- 102.- Samoilovich SR, Pecci Saavedra J, Frigerio MJ y Weissenbacher MC (1984): Nasal and intrathalamic inoculation of primates with Tacaribe virus. Protection against Argentina hemorrhagic fever and absence of neurovirulence. *Acta Virol.* 28: 277-281.
- 103.- Henderson JR y Downs WG (1965): Junin and Tacaribe plaque reduction in Rhesus monkey kidney cell monolayers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14: 796-797.
- 104.- Damonte EB, Coto CE, Calello MA y Weissenbacher MC (1978): Inmunizacion heterologa contra virus Junin. *Medicina (Buenos Aires)* 38: 226-232.
- 105.- Peters CJ, Jahrling PB, Liu CT, Kenyon RH, McKee KT y Barrera Oro JG (1987): Experimental studies of arenaviral hemorrhagic fevers. *Curr. Top. Microbiol. Immuno.* 134: 5-68.
- 106.- Buchmeier MJ, Lewicki HA, Tomori O y Johnson KM (1980): Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis virus react with pathogenic arenaviruses. *Nature (London)* 288: 486-487.
- 107.- Kiley MP, Swanepoel R, Mitchell SW, Lange JV, Gonzalez JP y McCormick JB (1986): Serological and biological evidence that

Lassa-complex arenaviruses are widely distributed in Africa. *Med. Microbiol. Immunol.* 175: 161-163.

108.- Gonzalez JP, Buchmeier MJ, McCormick JB, Mitchell SW, Elliot LH y Kiley MP (1984): Comparative analysis of Lassa and Lassa-like arenavirus isolates from Africa. En "Segmented Negative Strand Viruses". Eds. R.W. Compans y D.H.L. Bishop, pp 201-208. Academic Press, New York.

109.- Clegg JCS y Lloyd G (1984): The African arenaviruses Lassa and Mopeia: Biological and immunological comparisons. En "Segmented Negative Strand Viruses". Eds. R.W. Compans y D.H.L. Bishop, pp 341-347. Academic Press, New York.

110.- Kiley MP, Lange JV y Johnson KM (1979): Protection of Rhesus monkeys from Lassa virus by immunisation with closely related arenavirus. *The Lancet* 2: 738.

111.- Rowe WP, Pugh WE, Webb PA y Peters CJ (1970): Serological relationship of the Tacaribe complex of viruses to lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 5: 289-292.

112.- Peters CJ, Webb PA y Johnson KM (1973): Measurement of antibodies to Machupo virus by the indirect immunofluorescence technique. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142: 526-531.

- 113.- Buchmeier MJ, Lewicki HA, Tomori O y Oldstone MBA (1981): Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis and Pichinde viruses: generation, characterization and cross-reactivity with other arenaviruses. *Virology* 113: 73-85.
- 114.- Holland JJ (1984): Continuum of change in RNA virus genomes. En "Concepts in Viral Patogenesis". Eds. A.L. Notkins y M.B.A. Oldstone, pp 137-143. Springer Verlag.
115. Reaney DC (1982): The evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* 36: 47-73.
- 116.- McCormick JB (1986): Clinical, epidemiological and therapeutic aspects of Lassa fever. *Med. Microbiol. Immunol.* 175: 153-155.
- 117.- Rugiero HA, Magnoni C, Guerrero LB de, Milani HA, Perez Izquierdo F, Milani HL y Weber EL (1981): Persistence of antibodies and clinical evaluation in volunteers 7 to 9 years' following the vaccination against Argentine hemorrhagic fever. *J. Med. Virol.* 7: 227-232.
- 118.- Weissenbacher MC, Calello MA, Merani MS, McCormick JB y Rodriguez M (1986): Therapeutic effect of the antiviral agent

Ribavirin in Junin virus infection of primates. J. Med. Virol.  
20: 261-

119.- Wulff H, McIntosh BM, Hamner DB y Johnson KM (1977):  
Isolation of an arenavirus closely related to Lassa virus from  
Mastomys natalensis in South Africa. Bull WHO 55: 441-444.

120.- Gonzalez JP, McCormick JB, Saluzzo F, Herve HP, Johnson KM  
y Georges AJ (1983): An arenavirus isolated from wild caught  
rodents Pragmys species in Central African Republic.  
Intervirolgy 19: 105-112.

121.- Monath TP (1987): Lassa fever- New issues raised by field  
studies in West Africa. J. Infect. Dis. 155: 433-436.

122.- Chen TR (1977): In situ detection of mycoplasma  
contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258  
stain. Exp. Cell Research 104: 255-262.

123.- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ (1951): J.  
Biol. Chem. 193 265-275.

124.- Giovanniello OA, Weber EL y Rabinovich RD (1981): Un nuevo  
ensayo de placas para la cuantificacion del virus Junin. Rev.  
Asoc. Arg. Microbiol. 13: 17-22.

- 125.- Liu FT, Zinnecker M, Hamaoka T y Katz DH (1979): New procedures for preparation and isolation of conjugates of proteins and a synthetic copolymer of D-amino acids and immunochemical characterization of such conjugates. *Biochemistry* 18: 690-697.
- 126.- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 127.- Burnette WN (1981): Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112: 195-203.
- 128.- Strong DM, Ahmed AA, Thurman GB y Sell KW (1973): *In vitro* stimulation of murine spleen cells using a microculture system and a multiple automated sample harvester. *J. Immunol. Meth.* 2: 279.
- 129.- Atassi MZ (1978): Precise determination of the entire antigenic structure of lysozyme: Molecular features of protein antigenic structures and potential of surface-simulation synthesis-A powerful new concept for protein binding sites. *Immunochemistry* 15 909-936.

- 130.- Atassi ZM (1986) : Perspectives of the immunology of proteins. En "Immunobiology of proteins and peptides.III. Viral and bacterial antigens." Adv. Exp. Med and Biol. Eds. M.Z. Atassi y H.L. Bachrach, pp 1-25. Plenum press, New York/London.
- 131.- Garnier J, Osguthorpe DJ y Robson B (1978): Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. J. Mol. Biol. 120: 97-120.
- 132.- Atassi MZ (1975): Antigenic structure of myoglobin: the complete immunochemical anatomy o a protein and conclusions relating to antigenic structures of proteins. Immunochemistry 12: 423-438.
- 133.- Barlow DJ, Edwards MS y Thornton JM (1986): Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. Nature (London) 322: 747-748.
- 134.- Merrifield RB (1963): Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154.
- 135.- Wilton S, Gordon J y Dales S (1986): Identification of antigenic determinants by polyclonal and hybridoma antibodies

induced during the course of infection by vaccinia virus.  
*Virology* 148: 84-96.

136.- Houghten RA (1985): General method for the rapid solid phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 5131-5135.

137.- Henderson LE, Sowder R y Oroszlau S (1981): Protein and peptide purification by Reverse Phase High Pressure Chromatography using volatile solvents. En "Chemical Synthesis and Sequencing of peptides and proteins". Eds. Liu, Schechter, Henrikson y Condliffe. Elsevier, North Holland.

138.- Landsteiner K (1942): *J. Exp. Med.* 75: 269-276.

139.- Anderer FA (1963): Preparation and properties of an artificial antigen immunologically related to tobacco mosaic virus. *Biochim. Biophys. Acta* 71: 246-248.

140.- Kazim AL y Atassi ZM (1980): A novel and comprehensive synthetic approach for the elucidation of protein antigenic structures. *Biochem. J.* 191: 261-264.

141.- Geysen HM, Barteling SJ y Meloen RH (1985): Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for

binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 178-182.

142.- Geysen HM, Meloen RH y Barteling SJ (1984): Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 3998-4002.

143.- Meloen RH y Barteling SJ (1986): Epitope mapping of the outer structural protein VP1 of three different serotypes of foot-and-mouth disease virus. Virology 149: 55-63.

144.- Green N, Alexander H, Olson A, Alexander S, Shinnick TM, Sutcliffe JG y Lerner R (1982): Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin. Cell 28: 477-487.

145.- Heber-Katz E y Dietzschold B (1986): Immune response to synthetic herpes simplex virus peptides: the feasibility of a synthetic vaccine. Curr.Top. Mic. Immunol. 130: 51-64.

146.- Lerner RA, Green N, Alexander H, Liu FT, Sutcliffe JG y Shinnick TM (1981): Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequences of the hepatitis B genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles. Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 3403-3407.

- 147.- Dreesman GR, Sanchez Y, Ionesco-Matiu I, Sparrow JT, Six HR, Peterson DL, Hollinger B y Melnick JL (1982): Antibody to hepatitis B surface antigen after a single inoculation of uncoupled synthetic HBsAg peptides. *Nature* 295: 158-160.
- 148.- Elder JH, McGee JS, Munson M, Houghten RA, Kloetzer W, Bittle JL y Grant CK (1987): Localization of neutralizing regions of the envelope gene of Feline Leukemia Virus by using anti-synthetic peptide antibodies. *J. Virol.* 61: 8-15.
- 149.- MacFarlan RI, Dietzschold B, Koprowski I, Kiel M, Houghten RA, Lerner RA y Sutcliffe JG (1984): Localization of the immunodominant domains of rabies virus glycoprotein. En "Modern Approaches to vaccines". Eds. R.M. Chanock y R.A. Lerner, pp 139-143. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 150.- Houghten RA, Hoffmann SR y Niman HL (1986): Relative importance of position and individual amino acid residues in peptide antigen-antibody interactions: Implications in the mechanism of antigenic drift and antigenic shift. *Vaccines* 86. Cold Spring Harbor Laboratory 21-25.
- 151.- Eisen HN (1980): *Immunology: an introduction to molecular and cellular principles of the immune responses* (Second edition). Harper and Row Publishers, Philadelphia,

pp 306-307

152.- Kabat EA (1976): Structural concepts in Immunology and Immunochemistry, p.127, Holt, Rinehart y Wiston, New York.

153.- Benaceraf B (1978): Hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of I-region-specific IR-genes in macrophages and B-lymphocytes. J. Immunol. 120: 1809-1812.

154.- Poljack et al (1976): Three dimensional structure and diversity of immunoglobulins. Cold Spring Harbor Symposium 41: 639-645.

155.- Meloen RH, Puyk WC, Meijer DJA, Lankhof H, Posthumus WPA y Schaaper WHM (1987): Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides of foot-and-mouth disease virus. J. Gen. Virol. 68: 305-314.

156.- Dore I, Altschuh D, Al Moudallal Z, y Van Regenmortel MHV (1987): immunochemical studies of Tobacco Mosaic Virus- VII. Use of comparative surface accesibility of residues in antigenically related viruses for delineating epitopes recognized by monoclonal antibodies. Molecular Immunology 24: 1351-1358.

- 157.- Van Regenmortel MHV (1984): Molecular dissection of antigens by monoclonal antibodies. En "Hybridoma Technology in Agricultural and Veterinary Research" Eds. N.J. Stern y H.R. Gamb; pp 43-82. Rowman and Allanheld, Totowa, New Jersey.
- 158.- Chou PY y Fasman GD (1974): Prediction of protein conformation. *Biochem.* 13: 222-244.
- 159.- Levitt M (1978): Conformational preferences of amino acids in globular proteins. *Biochem.* 17: 4277-4285.
- 160.- Van Regenmortel MHV (1988): Predicting antigenicity in proteins and the future of synthetic peptide vaccines. En *Macromolecular Biorecognition*. Eds I. Chaiken, E. Chiancone, A. Fontana y P. Neri; pp 227-233. The Humana Press, Inc.
- 161.- Anfinsen CB (1973): Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-230.
- 162.- Wilson IA, Haft DH, Getzoff ED, Tainer JA, Lerner RA y Brenner S (1985): Identical short peptide sequences in unrelated proteins can have different conformations: A testing ground for theories of immune recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 5255-5259.

- 163.- Chou PY y Fasman GD (1978): Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47: 45-149.
- 164.- Lerner RA (1982): Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity. Nature 299: 592-596.
- 165.- Creighton TE (1984): En "Proteins, structures and molecular properties", Capitulo 2. W.H. Freeman and Company.
- 166.- Skehek JJ, Stevens DJ, Daniels AR, Douglas AR, Knossow M, Wilson IA y Wiley DC. (1984): A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong-Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 1779-1783.
- 167.- Webster RG, Kawaoka Y y Bean WJ (1986): Molecular changes in A/Chicken/Pennsylvania/83(H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>) Influenza virus associated with acquisition of virulence. Virology 149: 165-173.
- 168.- Piccone ME, Kaplan G, Giavedoni L, Domingo E y Palma EL (1988): VP1 of serotype C Foot-and-Mouth Disease viruses: Long term conservation of sequences. J. Virol. 62; 1469-1473.
- 169.- Arnon R. (1986): Peptides as immunogens: Prospects for synthetic vaccines. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 130: 1-12.

- 170.- Rumpold H, Rhodes GH, Bloch PL, Carson DA y Vaughan JH (1987): The glycine-alanine repeating region is the major epitope of Epstein-Barr nuclear antigen-1 (EBNA-1) J. Immunol. 138: 593-599.
- 171.- Gnann JW, Schwimmbeck PL, Nelson JA, Truax AB y Oldstone MBA (1987): Diagnosis of AIDS by using a 12 amino acid peptide representing an immunodominant epitope of human immunodeficiency virus. J. Infect. Dis. 156: 261.
- 172.- Gnann JW, Nelson JA y Oldstone MBA (1987): Fine mapping of an immunodominant domain in the transmembrane glycoprotein of the human immunodeficiency virus. J. Virol. 61:2639.
- 173.- Oldstone MBA (1975): Virus neutralization and virus induced immune complex disease: virus-antibody union resulting in immunoprotection or immunologic injury-two different sides of the same coin. Prog. Med. Virol. 19: 84-119.
- 174.- Schwarz RH (1986): The value of synthetic peptides as vaccines for eliciting T-cell immunity. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 130: 79-85.
- 175.- Bittle JL, Houghten RA, Alexander H, Shinnick TM, Sutcliffe JG, Lerner RA, Rowlands DJ y Brown F (1982): Protection against

Foot-and-Mouth-Disease virus with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* 298: 30-33.

176.- Piccone ME, Zuloaga G, Marcovecchio F, Arese A, Monesiglio JC y Palma EL (1988): Neutralización del virus de la fiebre aftosa O<sub>1</sub> Campos por anticuerpos inducidos por un péptido sintético. *Rev. Arg. de Microbiol.* 20: 69-75.

177.- Van Regenmortel MHV y Daney de Marcillac G (1988): An assessment of prediction methods for locating continuous epitopes in proteins. *Immunology Letters*, 17: 95-108.

178.- Mateu HG, Da Silva JL, Rocha E, De Brum DL, Alonso A, Enjuanes L, Domingo E y Barahona H (1988): Extensive heterogeneity of Foot-and-Mouth Disease virus of serotype C. *Virology* 167: 113-124.

179.- Iapalucci S, Rey O, Lopez R, Lopez N, y Franze-Fernández MT, y Boissou C, Lucero M, Cohen G y Zakin M (1989): The L RNA segment of Tacaribe virus encodes for a protein of 2210 amino acids. *Virology*, en prensa.