Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis Doctoral

Actividad inhibitoria de compuestos reactivos contra motivos Zn-fingers sobre la infección con arenavirus

García, Cybele Carina

2004

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. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
García, Cybele Carina. (2004). Actividad inhibitoria de compuestos reactivos contra motivos Zn-fingers sobre la infección con arenavirus. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3719_Garcia

Cita tipo Chicago:
García, Cybele Carina. "Actividad inhibitoria de compuestos reactivos contra motivos Zn-fingers sobre la infección con arenavirus". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3719_Garcia

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Facultad de Ciencias Exactas
y Naturales
Universidad de Buenos Aires

Actividad inhibitoria de compuestos reactivos contra motivos *Zn-fingers* sobre la infección con arenavirus

Autora: Lic. Cybele Carina García

Directora: Dra. Elsa Beatriz Damonte

Laboratorio de Virología
Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencas Exactas y Naturales
2004

3719

Trabajo de tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

A mis padres

"La investigación es un oficio serio, pero es también una forma de juego. El mejor juego y la mejor investigación se hacen cuando divierten. Esta diversión se ve estimulada por lo inesperado, por la curiosidad, la emoción del descubrimiento, y la victoria. Las recompensas son agradables también. Los factores que disminuyen lo divertido de la investigación, disminuyen la calidad de la investigación"

"Research is a serious business, but is also a form of play. The best playing and the best research, is done when it is fun. Fun is stimulated by unpredictability, by curiosity, the thrill of discovery, and victory. Rewards are nice too. Factors that reduce fun in research reduce the quality of the research"

M. B Shimkin

"Man and Beast". Adventures in Cancer Epidemiology. Cancer Research 34: 1525, 1974.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado, en su mayor parte, en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, donde he vivido increíbles momentos de alegría y satisfacción. He disfrutado la realización del mismo desde el inicio hasta su fin, y no podría haber sido posible sin la brillante idea, dirección y criterio científico de la Dra. Elsa Damonte, además del apoyo invalorable de todos los integrantes del laboratorio. Es una gran emoción poder hoy agradecer especialmente:

A mi directora, la Dra. Elsa Damonte. A pesar de que las palabras no serán suficientes, quisiera expresar en primer lugar mi agradecimiento, por haberme abierto las puertas del laboratorio, por estar siempre dispuesta a enseñarme todo y darme tantas oportunidades para aprender y crecer científicamente; en segundo lugar, mi admiración por su constante esfuerzo, dedicación y energía en esta profesión; y por último, mi cariño por compartir conmigo el día a día. Me siento tan afortunada de haber trabajado a su lado todos estos años. Eternamente gracias!!!

A la Dra. Celia Coto, principalmente por su constante empuje y apoyo en cada uno de mis pasos; por disfrutar conmigo mis pequeños logros; por compartir sus magníficas experiencias, anécdotas y toda su sabiduría. Gracias por todo su cariño!

A Nelly y Luis, por todo lo que me enseñaron con inmensa paciencia todas las miles de veces que necesité, tan seriamente, pero siempre con risas de por medio, eso es invalorable! por ser admirables docentes y científicamente geniales; por hacer del laboratorio un hogar, en el cual es imposible no sentirse a gusto; por ser tan buenos y preocuparse por mí siempre. Mil gracias!

A Andre, Pau y *San*, por todos los excelentes momentos compartidos, dentro y fuera del "lab"; por hacerme reír tanto en las interminables horas que pasamos discutiendo y reflexionando sobre los arenavirus, ciencia y "la vida" en general; por darme siempre una mano, o un abrazo, en el momento justo; por haberme bancado en la distancia; por enseñarme tantas cosas (en la mesada, en la compu, en las clases, en las meriendas) y soportar mi particular carácter todos los días; por ser verdaderas compañeras y amigas. Gracias! Muchas gracias!!!

A Carlos, por haberme enseñado con tanta paciencia a trabajar con los ratones, sin hacerles daño! por todas las clases compartidas, y por estar siempre dispuesto a ayudarme, con la mejor onda.

A todos los integrantes del laboratorio de Virología. Es un placer trabajar con Uds, guardo todas esas horas en el "lab" como experiencias fantásticas. Gracias *Erina, Laura T., Flavia, Vivi, Mónica,*

Isabel, Félix, Susana M., Diego, Patricia, Laura A. y *Guille* por tratarme tan bien! y muy especialmente a *Josefina* y a *Susana B.* por su inmensa generosidad, cariño y amistad.

A toda la gente del Departamento de Química Biológica, por la excelente predisposición para ayudarme siempre. En particular, a toda la gente del laboratorio de *Genética Bacteriana* (*Jime, Julia* y *Nancy*), *Biología Molecular, Inmunología* y *Análisis Biológicos*; al *Dr. Juan Carlos Calvo* y a los secretarios *Luis* y *Martín*. También a *Constanza, Carlos Lima* y *Nora D' accorso* del *Departamento de Química Orgánica,* por su ayuda con la nomenclatura de los compuestos y tantas otras cosas que necesité.

A la Dra. Maria Salvato, por invitarme a su laboratorio, darme un espacio y permitirme ser un integrante más del grupo; por su calidez humana y ofrecerme su hogar. *A Mahmoud*, por compartir conmigo su mesada y todos sus reactivos, por guiarme y ayudarme con toda su experiencia técnica; por su excepcional amabilidad. *A Nadia, Juan David, Juan Carlos y Dimitry* por su invalorable ayuda y los divertidos momentos vividos. A *Neda*, por hacer hacerme sentir como "en casa" y brindarme su sincera amistad.

A mis incondicionales amigas, *Belén, Gra, Lupe* y *María*; gracias por haber recorrido conmigo todo este camino, acompañándome en todo momento, con el mismo apoyo de siempre. Gracias por estar en las buenas y en las malas! *A mis amigos, Germán, Juani, Pablo, Cora, Jime, Manuel y Juan*, por los buenos momentos compartidos. *A Lau*, por seguir acompañándome, imposible olvidar nuestro laboratorio debajo del escritorio! *A mis amigos que están lejos*, pero siguen cerca a pesar que el tiempo pasa, y pasa...*Fabi, Fer, Luly* y *Fran,* y muy en especial, a *Grace*, por estar siempre, por darle una inmensa alegría a mi vida y, por su sincera y gran amistad.

A mi abuelo, por hacer hasta lo imposible para verme bien. *A mis tíos* y *primas,* por su cariño.

A René, por su amor, su generosidad infinita, su apoyo permanente en éste y todos mis sueños; por agregarle magia a mi vida y hacerme sentir que todo es posible!

A mi hermana Maia, por haberme ayudado todas las veces que necesité; por su constante interés en mi trabajo; por la fuerza que me transmite; por permitirme compartir todas sus cosas y de ese modo hacerme sentir tan cerca suyo, y por quererme tanto! siempre estaré a tu lado!

A mis padres, por darme la posibilidad de hacer lo que me apasiona; por haberme enseñado a disfrutar del estudio; por su incansable contención y apoyo; por cuidarme TANTO y amarme tal cual soy!

A todos, MUCHÍSIMAS GRACIAS!!!!!!!!!

Los resultados de esta Tesis han sido publicados en forma parcial en las siguientes revistas científicas:

- *Differential inhibitory action of two azoic compounds against arenaviruses*
C.C. García, N.A. Candurra, E.B. Damonte.
The International Journal of Antimicrobial Agents 21, 319-324, 2003.

- *Mode of inactivation of arenaviruses by disulfide-based compounds*
C.C. García, N.A. Candurra, E.B. Damonte.
Antiviral Research 55, 437-446, 2002.

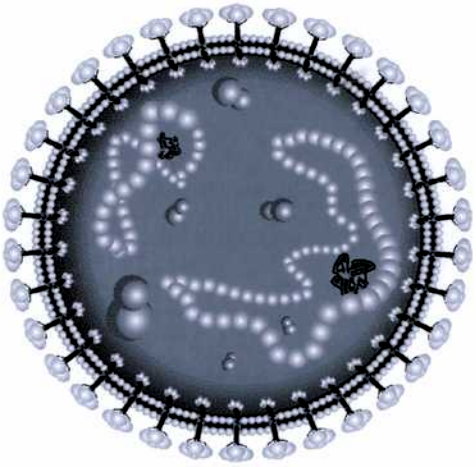
- *Antiviral and virucidal activities against arenaviruses of zinc-finger active compounds*
C.C. García, N.A. Candurra, E.B. Damonte.
Antiviral Chemistry & Chemotherapy 11, 231-238, 2000.

El presente trabajo se realizó con financiación proveniente de:

ANPCyT, CONICET, UBA, UNESCO-ASM y Fundación Antorchas.

Parte del mismo fue llevado a cabo en el laboratorio de virología de la Dra. Maria Stella Salvato, *Institute of Human Virology, University of Maryland, Baltimore, USA.*

Actividad inhibitoria de compuestos reactivos contra motivos *Zn-fingers* sobre la infección con arenavirus



Página

Resumen 1

Abstract 3

Abreviaturas 5

Introducción

I. 1. Los arenavirus 8

I. 2. Propiedades estructurales y genómicas de los arenavirus 11

I. 3. Proteínas virales 14

I. 4. Proteína Z 16

I. 5. Infección viral, célula huésped y animales de laboratorio 19

I. 6. El virus Junín y la Fiebre hemorrágica argentina 19

I. 7. Tratamiento y prevención de la FHA 21

I. 8. El ciclo replicativo y los posibles blancos para agentes terapéuticos 23

I. 9. Motivos *RING fingers*: nuevo punto de ataque en la quimioterapia antiviral 27

I.10. Nuevos compuestos reactivos contra motivos *Zn fingers* con posible uso antiviral 30

Objetivos

O. 1. Objetivos generales 33

O. 2. Objetivos específicos 33

Materiales y métodos

MM.1. Compuestos utilizados 34

MM.2. Células y virus 36

MM.3. Ensayo de citotoxicidad 37

MM.4. Determinación de la actividad antiviral 38

a. Ensayo de inhibición del número de placas (plaqueo directo) 38

b. Ensayo de inhibición del rendimiento viral 38

MM.5. Efecto de la adición ó remoción del compuesto a distintos tiempos 39

MM.6. Determinación de la actividad virucida por contacto directo con los compuestos 40
c. En función de la concentración 40
d. En función del tiempo 40
e. En función de la temperatura 40
MM.7. Marcación de viriones con radioisótopos y su purificación 40
MM.8. Acción de los compuestos sobre la adsorción e internalización de los viriones 41
MM.9. Análisis de la transcripción y replicación de viriones inactivados 42
MM.10. Efecto de los inhibidores sobre la síntesis de proteínas virales por radioinmunoprecipitación 47
MM.11. Efecto de los inhibidores sobre la síntesis de proteínas virales por *Western blot* 48
MM.12. Análisis de la capacidad antigénica de las glicoproteínas de viriones inactivados 49
MM.13. Efecto de los inhibidores sobre las proteínas de los viriones purificados 49
MM.14. Purificación de la proteína de fusión GST-Z-LCMV 50
MM.15. Efecto de los inhibidores sobre la proteína Z purificada 51
MM.16. Efecto de los inhibidores sobre la transcripción y replicación viral en células infectadas 51
MM.17. Efecto de los inhibidores sobre la transcripción de *prh* 53
MM.18. Análisis del patrón de distribución de PRH en las células infectadas y tratadas 54
MM.20. Efecto de los inhibidores sobre la expresión de antígenos virales 54

Resultados

R. I. Evaluación de la actividad biológica de los compuestos 56
R. I.1. Actividad citotóxica y antiviral 56
R. I.2. Actividad virucida 58
R. II. Compuestos virucidas 62
R. II. 1. Eficiencia virucida contra arenavirus del Nuevo y Viejo Mundo 62
R. II. 2. Estudio de los parámetros que afectan la inactivación 66

R. II. 3. Mecanismo de acción inactivante de compuestos virucidas 67
R.II. 3. 1. Adsorción e internalización 67
R.II. 3. 2. Transcripción y replicación 69
R.II. 3. 3. Síntesis de proteínas virales 71
R. II. 4. Estudio de la y funcionalidad de las glicoproteínas de membrana de viriones inactivados: capacidad antigénica 73
R. III. La proteína Z es el blanco de acción 75
R. III. 1. Comparación de los efectos antiviral y virucida de los compuestos contra los arenavirus, HSV-1 y VSV 75
R. III. 2. Efecto de los inhibidores sobre las proteínas de viriones purificados 77
R. III. 3. Purificación de la proteína de fusión GST-Z-LCMV 80
R. III. 4. Efecto de los inhibidores sobre la proteína Z purificada 81
R. IV. Acción del NSC20625 en la célula infectada: su efecto sobre la interacción de Z con proteínas celulares 84
R. IV.1. Efecto del NSC20625 sobre la transcripción y replicación viral 84
R. IV.2. Efecto del NSC20625 en la transcripción de *prh* 86
R. IV.3. Efecto del NSC20625 sobre el patrón de distribución de PRH en las células infectadas 87
R. V.Compuestos no virucidas 90
R. V. 1. Espectro de acción antiviral contra arenavirus 90
R. V. 2. Efecto del tiempo de adición ó remoción del ANNB sobre la acciónantiviral 91
R. V. 3. Efecto del ANNB sobre la adsorción e internalización viral 93
R. V. 4. Efecto del ANNB sobre la síntesis de proteínas virales 94
R. V. 5. Expresión de antígenos virales en presencia de ANNB 95
R. V. 6. Comparación del efecto del ANNB sobre la producción de virus extracelular y asociado a células 96
Discusión 98
Conclusiones 108
Referencias 111

Resumen

Los virus de la familia *Arenaviridae* incluyen patógenos humanos causantes de severas fiebres hemorrágicas, como los virus Lassa (LASV) y Junín (JUNV). La proteína Z de los arenavirus, posee un motivo *RING finger* altamente conservado entre los distintos arenavirus, necesario para la interacción con proteínas celulares y virales, y por lo tanto es un punto de ataque ideal para la quimioterapia antiviral contra las fiebres hemorrágicas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la actividad inhibitoria de compuestos electrofílicos reactivos con motivos *Zn fingers*, provistos por el National Cancer Institute (USA), comprobar que Z es el blanco de acción de dichos compuestos y demostrar que su rol es esencial en el ciclo de multiplicación viral. Los compuestos, que incluyeron disulfuros alifáticos y aromáticos, derivados azoicos e hidrazidas fueron inicialmente evaluados por su capacidad inhibitoria sobre la infección de células Vero contra los arenavirus JUNV y Tacaribe (TCRV). De un total de 15 compuestos ensayados, 2 presentaron similar eficacia en sus propiedades antivirales y virucidas, 6 presentaron una actividad virucida superior a su efecto antiviral, 3 fueron estrictamente antivirales, 1 ejerció únicamente acción inactivante y 2 fueron inactivos. Los compuestos inactivantes mostraron ser efectivos también contra el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV), arenavirus prototipo de la familia. El análisis de los parámetros (tiempo y temperatura) que afectan la inactivación de JUNV y TCRV, demostró que la cinética de inactivación es rápida y que la reacción es dependiente de la temperatura, ya que no hubo inactivación del virus a 4°C. La interacción entre el virus y el compuesto inactivante lleva a un bloqueo del ciclo de multiplicación viral a nivel de la transcripción y replicación, ya que el mismo se adsorbe y penetra en las células con igual eficacia que el virus control, pero no se detecta RNA correspondiente a los genes N, GPC y Z, en los viriones inactivados. Este hecho se verificó por la ausencia total de síntesis de proteínas virales cuando se infectan células con virus inactivado. Sin embargo, los viriones inactivados mantienen la funcionalidad de las proteínas externas, ya que se observaron títulos comparables de anticuerpos neutralizantes en animales inoculados con viriones inactivados con respecto a los inoculados con JUNV y TCRV infecciosos, indicando así la preservación de la capacidad antigénica de las glicoproteínas luego del tratamiento inactivante. La acción diferencial de estos agentes sobre HSV-1 y los arenavirus confirma que la proteína Z de los arenavirus juega no sólo un rol regulatorio durante el ciclo viral, sino que tiene también importancia estructural, ya que los compuestos ejercen su acción tanto en la célula infectada, como directamente sobre el virión. Los resultados del estudio del efecto inhibitorio sobre la proteína Z purificada de LCMV y LASV, indicarían que los compuestos están dirigidos particularmente hacia la proteína Z de los arenavirus, interaccionando con ella y provocando su multimerización, con la consiguiente pérdida de funcionalidad y capacidad infectiva del virión. Por otro lado, se sabe que la infección con LCMV conduce a la recolalización de cuerpos nucleares de la proteína celular con homeodominios ricos en prolina (PRH) al citoplasma de la célula infectada. En células infectadas con LCMV se observó que el tratamiento

con NSC20625 inhibe la replicación del RNA viral, sin afectar la transcripción del gen celular *prh*. Además, el tratamiento con NSC20625, no sólo inhibió la expresión de la proteína viral Z en las células infectadas con LCMV, sino que además revirtió el patrón de distribución de la proteína PRH al patrón de PRH observado en células normales. Por último, el compuesto azoico ANNB mostró un amplio rango de acción contra los arenavirus, ya que fue también inhibidor de la multiplicación de otras cepas de JUNV, así como de TCRV, Pichinde y LCMV. El estudio del modo de acción antiviral manifestó que el ANNB afecta las etapas tardías del ciclo de multiplicación viral; esto se comprobó al observar que ni las etapas tempranas de adsorción e internalización viral, ni la síntesis y expresión de proteínas virales estaban afectadas. La producción de virus asociado a células está igualmente afectada que el virus extracelular, por lo que el ANNB estaría bloqueando el correcto ensamblado dentro de la célula.
Estos resultados demuestran por primera vez que una proteína esencial para los arenavirus es el blanco de acción de compuestos que representan agentes antivirales promisorios contra estos patógenos, mostrando similar eficacia *in vitro* que la ribavirina, la única droga conocida que ha sido ensayada en los pacientes infectados con arenavirus.

Palabras claves: Arenavirus; Virus Junín; Virus Tacaribe; Virus de la Coriomeningitis linfocitaria; Actividad antiviral; Actividad virucida; Inhibidores *Zn-finger*; Compuestos azoicos; Compuestos disulfuros

Abstract

The *Arenaviridae* family includes several human pathogens like Lassa virus (LASV) and Junín virus (JUNV) causing hemorrhagic fevers. The Z protein of arenavirus presents a highly conserved RING finger motif which turns this protein an attractive target for antiviral therapy. In the present study, we have evaluated fifteen selected Zn fingers reactive compounds, provided by the National Cancer Institute, for their capacity to act as inhibitors of arenavirus infection. From the total of compounds evaluated against JUNV and Tacaribe (TCRV), 2 presented similar effectiveness in their antiviral and virucidal properties, 6 presented a virucidal activity superior to the antiviral effect, 3 were exclusively antivirals, 1 exerted only virucidal action and 2 were totally inactive. The virucidal compounds demonstrated to be effective also against the Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). The time course of virucidal activity showed that the inactivation started a few minutes after addition of the compound to the virus suspension and proceeded in a time-dependent manner. Arenavirus inactivation was also energy-dependent since a temperature higher than 30°C was required to destroy virus infectivity. The mode of inactivation of these compounds rendered non-infectious virus particles but preserving the conformational integrity of the virion glycoproteins. This conclusion was supported by the following results: binding of inactivated virions to cellular receptor was performed with the same efficacy as native virions; internalization via fusion between viral and endosome membranes was not affected in inactivated virions; after inoculation of adult mice with 10^4 PFU of either JUNV and TCRV control or treated virus with NSC20625, comparable levels of antibodies were detected indicating that the inmunogenecity of viral glycoproteins was preserved. In order to further understand the antiviral mechanism we studied the transcription and replication of inactivated JUNV virions on Vero cells by detection of the N, GPC and Z genes. No amplification products were detected, demonstrating a blockade in viral transcription. The differential inhibitory action observed against arenavirus and HSV-1 confirmed that Z is playing structural and regulatory roles during the multiplication cycle. These zinc finger inhibitors were reported to establish disulfides linkages between zinc finger motifs in proteins. The results obtained after investigating the extent of Z multimer formation exhibited significant altered patterns showing high-molecular-weight multimers, suggesting the establishment of inter-and possibly intramolecular disulfide bonds, leading to the formation of Z multimers. It has been reported that LCMV gene expression and replication affect the subcellular localization of PRH in human hepatocytes and that the PRH protein can be physically associated with the arenavirus Z protein. It was observed that the treatment with NSC20625 of LCMV infected-cells inhibited the replication of the viral RNA, without affecting the transcription of the cellular gene *prh*. The NSC20625 treatment, not only inhibited the expression of Z viral protein in LCMV infected-cells, but in addition, reverted the distribution pattern of PRH protein in these treated cells to the observed pattern of PRH in normal cells. On the other hand, the azoic compound ANNB showed a broad spectrum of action against arenavirus, since it was also inhibitor of the multiplication of several strains of

JUNV, as well as of TCRV, Pichinde and LCMV. The mode of action showed that ANNB affects late stages of the viral multiplication cycle; this was verified when observing that neither the early stages of adsorption and internalization, nor the viral protein synthesis and expression were affected. The production of associated virus to cells was affected, so the ANNB would be blocking the correct assembly within the cell.

The present work demonstrate for the first time that an arenavirus protein is the target of compounds that represent a promising class of agents against highly pathogenic arenaviruses showing similar effectiveness *in vitro* to the ribavirin, the only well-known drug that has been used in patients with hemorrhagic fevers caused by arenavirus.

Key words: Arenavirus; Junín Virus; Tacaribe Virus; Lymphocytic choriomeningitis Virus; Antiviral activity; Virucidal activity; Zn-finger inhibitors; Azoic compounds; Disulfides compounds

Abreviaturas

AABSSN: azosulfamida

AB: azobenceno

ADA: azodicarbonamida

ADF: 1,1'-Azobis(N,N-dimetilformamida)

ALLV: virus Allpahuayo

AMAV: virus Amaparí

Amp: ampicilina

AMV: a*vian myeloblastosis virus*

ANNB: ácido 2-(2 nitroso-1-naftilazo) benzoico

AT-2: aldrithiol-2

BCNV: virus Bear Canyon

BSA: albúmina sérica bovina

CAPH: 2-fenilhidrazida del ácido 2-(carbamoiltio) acético

CC: control de células

CC_{50} : concentración citotóxica 50 %

CI_{50} : concentración inactivante 50 %

CPXV: virus Cupixi

C-terminal: carboxilo terminal

CV: control de virus

DABCO: 1,4-diazabiciclo octano

DAPI: 4´,6-diamino-2-fenil indol

DMSO: dimetilsulfóxido

DO: densidad óptica

ECL: *enhanced chemiluminescence*

FLEV: virus Flexal

GST-Z-LCMV: proteína de fusión glutatión transferasa-proteína Z de LCMV

GTOV: virus Guanarito

HIV: virus de la inmunodeficiencia humana

HSV: virus herpes simplex

i.p: intraperitoneal

ICTV: *International Committee on Taxonomy of Virus*

IPPYV: virus Ippy

IS: índice de selectividad

h: hora

JUNV: virus Junín

kDa: kiloDalton

LASV: virus Lassa

LATV: virus Latino

LB: medio Luria Bertoni

LCMV: virus de la Coriomeningitis linfocitaria

m.i: multiplicidad de infección

MACV: virus Machupo

MEM: medio esencial minimo

min: minutos

MM: medio de mantenimiento celular

MOBV: virus Mobala

MOPV: virus Mopeia

MTT: (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio

NCI: *National Cancer Institute*

NSC624152: (*trans*)- 4,5-dihidroxi-1,1-dióxido-1,2-ditiano

NSC203: 3-nitrofenil disulfuro

NSC20625: disulfuro de 1-(2-guanidino) fenilo

NSC4493: bis (2-(N´-(2, 4-dicloro-benzal)) carboxamida-1-bencen) disulfuro

NSC624151: (*cis*)-4,5-dihidroxi-1,1-dióxido-1,2-ditiano

NSC677459: 2,2'-dibenzotiazol disulfuro

N-terminal: amino terminal

OLVV: virus Oliveros

p.i: post infección

PAMV: virus Pampa

PARV: virus Paraná

PBS: solución salina de fosfatos

PICV: virus Pichinde

PIRV: virus Pirital

PM: peso molecular

PMSF: fenil-metil-sulfonil-fluoruro

PPO: 2,5-difeniloxazol

PVDF: fluoruro de polivinilideno

SABV: virus Sabiá

seg: segundo

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

TAMV: virus Tamiami

TCRV: virus Tacaribe

TED: tetraetil-tiuran disulfuro

U: unidades

UFP: unidades formadoras de placas

WWAV: virus Whitewater Arroyo

INTRODUCCIÓN

I. 1. Los arenavirus

Los virus son estudiados tanto por causar graves enfermedades en humanos, animales y plantas, como por ser herramientas muy útiles para corroborar fenómenos biológicos, químicos, genéticos y en biología molecular en general. Los arenavirus son de particular interés en ambos aspectos. La familia *Arenaviridae* está constituída por 23 miembros; 22 especies reconocidas por el "*International Committee on Taxonomy of Virus*" y una nueva especie tentativa (Romanowski, 2004, comunicación personal). Todos ellos, se encuentran antigénicamente relacionados (Wulff *et al.*, 1977; Buchmeier *et al.*, 1981) y clasificados de acuerdo a la región geográfica donde fueron aislados, en 2 grupos: los del Viejo Mundo y los arenavirus del Nuevo Mundo (*Tabla I. 1*).

El grupo del Viejo Mundo o Complejo Lassa-Coriomeningitis linfocitaria está compuesto por: el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV) (Armtrong y Lillie, 1934), el virus Lassa (LASV) (Frame *et al.*, 1970), el virus Mopeia (MOPV) (Wulff, *et al.*, 1977), el virus Mobala (MOBV) (Gonzalez *et al.*, 1983) y el virus Ippy (IPPYV) (Swanepoel *et al.*, 1985). El grupo del Nuevo Mundo o Complejo Tacaribe, comprende 3 linajes filogenéticos designados A, B y C. El linaje A incluye: el virus Tamiami (TAMV) (Jennings *et al.*, 1970), el virus Paraná (PARV) (Webb *et al.*, 1970), el virus Pichinde (PICV) (Trapido y San Martín, 1971), el virus Flexal (FLEV) (Pinheiro *et al.*, 1977), el virus Whitewater Arroyo (WWAV) (Fulhorst *et al.*, 1996), el virus Pirital (PIRV) (Fulhorst *et al.*, 1997), el virus Allpahuayo (ALLV) (Moncayo *et al.*, 2001), y el recientemente aislado, virus Bear Canyon (BCNV) (Fulhorst *et al.*, 2002). El linaje B incluye: el virus Junín (JUNV) (Parodi *et al.*, 1958), el virus Tacaribe (TCRV) (Downs *et al.*, 1963), el virus Machupo (MACV) (Johnson *et al.*, 1965), el virus Amaparí (AMAV) (Pinheiro *et al.*, 1966), el virus Guanarito (GTOV) (Salas *et al.*, 1991), el virus Sabiá (SABV) (Coimbra *et al.*, 1994, Gonzalez *et al.*, 1996) y el virus Cupixi (CPXV) (Charrel *et al.*, 2002). El linaje C incluye: el virus Latino (LATV) (Webb *et al.*, 1973), el virus Oliveros (OLVV) (Bowen *et al.*, 1996) y la especie tentativa, el virus Pampa (PAMV) (Lozano *et al.*, 1997).

Tabla I.1. Especies de la familia *Arenaviridae.*

Especies	*Acrónimo*	*Región*
Arenavirus del Viejo Mundo		
Ippy	IPPYV	Africa central
Lassa [a]	LASV	Oeste de Africa
Coriomeningitis linfocitaria [a1]	LCMV	Europa, América, Asia
Mobala	MOBV	Africa central
Mopeia	MOPV	Mozambique, Zimbawe
Arenavirus del Nuevo Mundo		
Allpahuayo	ALLV	Perú
Amaparí	AMAV	Brasil
Bear Canyon	BCNV	Estados Unidos
Cupixi	CPXV	Brasil
Flexal [b]	FLEV	Brasil
Guanarito [a]	GTOV	Venezuela
Junín [a]	JUNV	Argentina
Latino	LATV	Bolivia
Machupo [a]	MACV	Bolivia
Pampa	PAMV	Argentina
Paraná	PARV	Paraguay
Pichinde	PICV	Colombia
Pirital	PIRV	Venezuela
Oliveros	OLVV	Argentina
Sabiá [a]	SABV	Brasil
Tacaribe [b]	TCRV	Trinidad
Tamiami	TAMV	Estados Unidos
Whitewater Arroyo [c]	WWAV	Estados Unidos

[a] Virus patógeno para el hombre, causante de severa fiebre hemorrágica.
[a1] Virus patógeno para el hombre, causante de meningitis aséptica.
[b] Virus asociado sólo con infecciones en personal de laboratorio.
[c] Virus recientemente implicado como posible agente infeccioso para el hombre.

El LCMV, probablemente originario de Europa, es el virus prototipo de la familia. Este virus está asociado a una aguda meningitis aséptica en humanos (Baird & Rivers, 1938) y es el único con distribución casi mundial, todos los demás tienen una distribución geográficamente restringida (*Figura I.1*), que estaría asociada a su reservorio natural. Todos los arenavirus son transmitidos por roedores, con dos excepciones, el TCRV, que infecta murciélagos del género *Artibeus,* y el SABV cuyo reservorio no se conoce.

Un aspecto importante de la familia es que varios de sus miembros son patógenos para el hombre, causantes de severas enfermedades con síndrome hemorrágico. Estos arenavirus se encuentran incluídos en la lista de "Agentes Patógenos de Categoría A", del "*Center for Disease Control and Prevention*" (CDC). Entre ellos encontramos, dentro del grupo del Viejo Mundo, al LASV, responsable en África de la fiebre de Lassa, que se estima causa entre 300.000 y 500.000 infecciones y aproximadamente 5.000 muertes anuales (McCormick *et al.*, 1987; Bowen *et al.*, 2000). La fiebre de Lassa es una enfermedad endémica en varios países africanos. Las cepas comprenden 4 linajes, 3 de los cuales se han encontrado en Nigeria y el cuarto en Guinea, Liberia y Sierra Leona (Bowen *et al.*, 2000). Entre los patógenos para el hombre del Nuevo Mundo, se encuentran: el JUNV, agente de la fiebre hemorrágica argentina (FHA); el MACV, agente de la fiebre hemorrágica boliviana; el GTOV, en Venezuela (Tesh *et al.*, 1994) y, el SABV, en Brasil. Recientemente se le ha adjudicado al WWAV tres casos aislados de fibre hemorrágica, en el oeste de Estados Unidos (CDC, 2000).

La transmisión persona a persona ha ocurrido raramente y bajo determinadas condiciones. Se han reportado casos donde claramente MACV y LASV han sido responsables de transmisiones entre personas hospitalizadas y personal médico (CDC, 1994), por lo que la necesidad de tomar precauciones cuando se trabaja con muestras biológicas de pacientes infectados o con ellos mismos, directamente, es vital.

Cabe destacar que todos los miembros patógenos encontrados en Sudamérica pertenecen al linaje B, sugiriendo la posibilidad de que estos fenotipos altamente patogénicos sean el resultado de la evolución de un antecesor común.

La emergencia de los arenavirus está asociada íntimamente con características ecológicas de sus específicos roedores huéspedes, donde estos virus pueden establecer infecciones virémicas crónicas. En las últimas décadas, el reconocimiento de un nuevo arenavirus se ha dado, aproximadamente, cada 3 años.

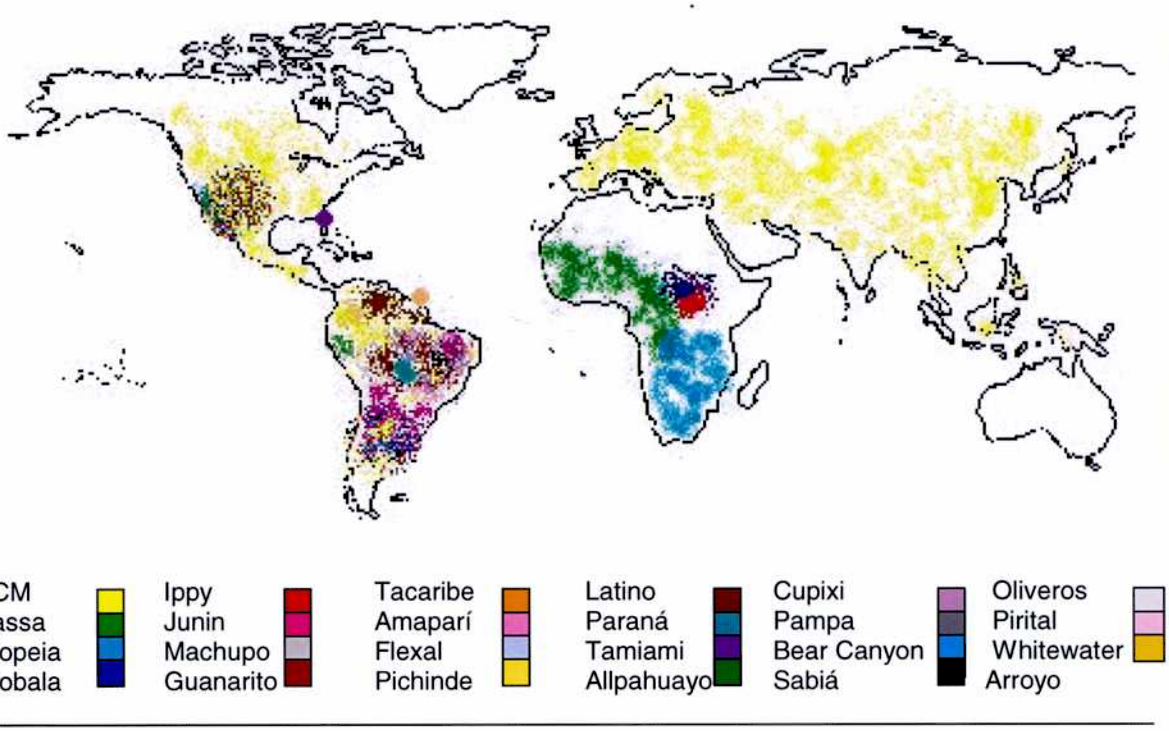


Figura I.1. Distribución mundial de los arenavirus.

I. 2. Propiedades estructurales y genómicas de los arenavirus

Los miembros de la familia *Arenaviridae* son virus envueltos, con una bicapa lipídica que adquieren en el momento de la brotación del virus. Sin embargo, la composición lipídica de los arenavirus no es la misma que la de la membrana plasmática de las células infectadas (Rosas, 1984). Durante la brotación también se incluye parte del citoplasma adyacente a la membrana, conteniendo ribosomas celulares, que dan el aspecto arenoso bajo microscopía electrónica, característica

física que le da el nombre "arena" (Farber & Rawls, 1975; Murphy & Whitfield, 1975).

El genoma de los arenavirus contiene dos fragmentos de RNA de simple cadena, llamados L (*large*) y S (*small*) (*Figura I. 2*), con un tamaño aproximado de 7 y 3,5 kb, respectivamente. Este genoma viral, constituído por 2 especies de RNA y con doble polaridad de lectura (estrategia codificante "ambisentido"), codifica para las 4 proteínas virales que han sido detectadas como productos de expresión. El segmento S codifica las principales proteínas estructurales: la proteína de la nucleocápside (NP) y el precursor de las glicoproteínas de membrana (GPC), que es procesado proteolíticamente durante el ciclo de replicación viral, para producir las dos glicoproteínas de envoltura, la glicoproteína expuesta en superficie GP1 y la glicoproteína de transmembrana GP2. El fragmento L expresa la RNA polimerasa L, dependiente de RNA, y una pequeña proteína de 11 kDa llamada Z, con función y localización poco conocida. Aunque los RNA S y L contienen secuencias codificantes en sentido de lectura correcto, no son directamente traducidos y es por ello que los arenavirus se comportan como virus RNA de cadena negativa (-RNA), con la transcripción como primer proceso biosintético, luego del desnudamiento (*Figura I. 3*).

Los fragmentos L y S no están presentes en cantidades equimolares, ni en el virión, ni en la célula infectada. El fragmento S siempre ha sido encontrado como el mayoritario (Romanowski & Bishop, 1983; Southern *et al.*, 1987; Iapalucci *et al.*, 1994), y la relación L:S no excede 2:5. Las secuencias nucleotídicas del extremo 3' de ambos fragmentos son conservadas y la secuencia complementaria opuesta se encuentra en el extremo 5' del RNA genómico, produciendo estructuras secundarias denominadas "mango de sartén" (*panhandle*), responsables de la forma circular de la nucleoproteína, observada por microscopía electrónica.

Si bien la replicación transcurre en el citoplasma celular, posiblemente el núcleo celular juegue un papel importante en el agregado del CAP (*catabolite activator protein*) en el extremo 5' del mRNA transcripto de los arenavirus. Asimismo, se cree que la membrana nuclear sería requerida como soporte estructural de la transcripción y replicación viral. Otra característica importante de

los arenavirus es que los RNA no son poliadenilados (Singh *et al.*, 1987; Southern *et al.*, 1987).

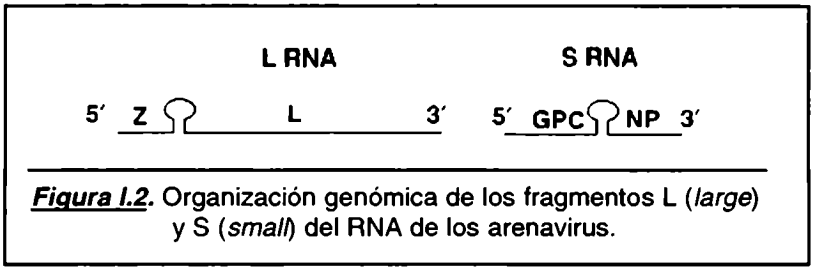


Figura I.2. Organización genómica de los fragmentos L (*large*) y S (*small*) del RNA de los arenavirus.

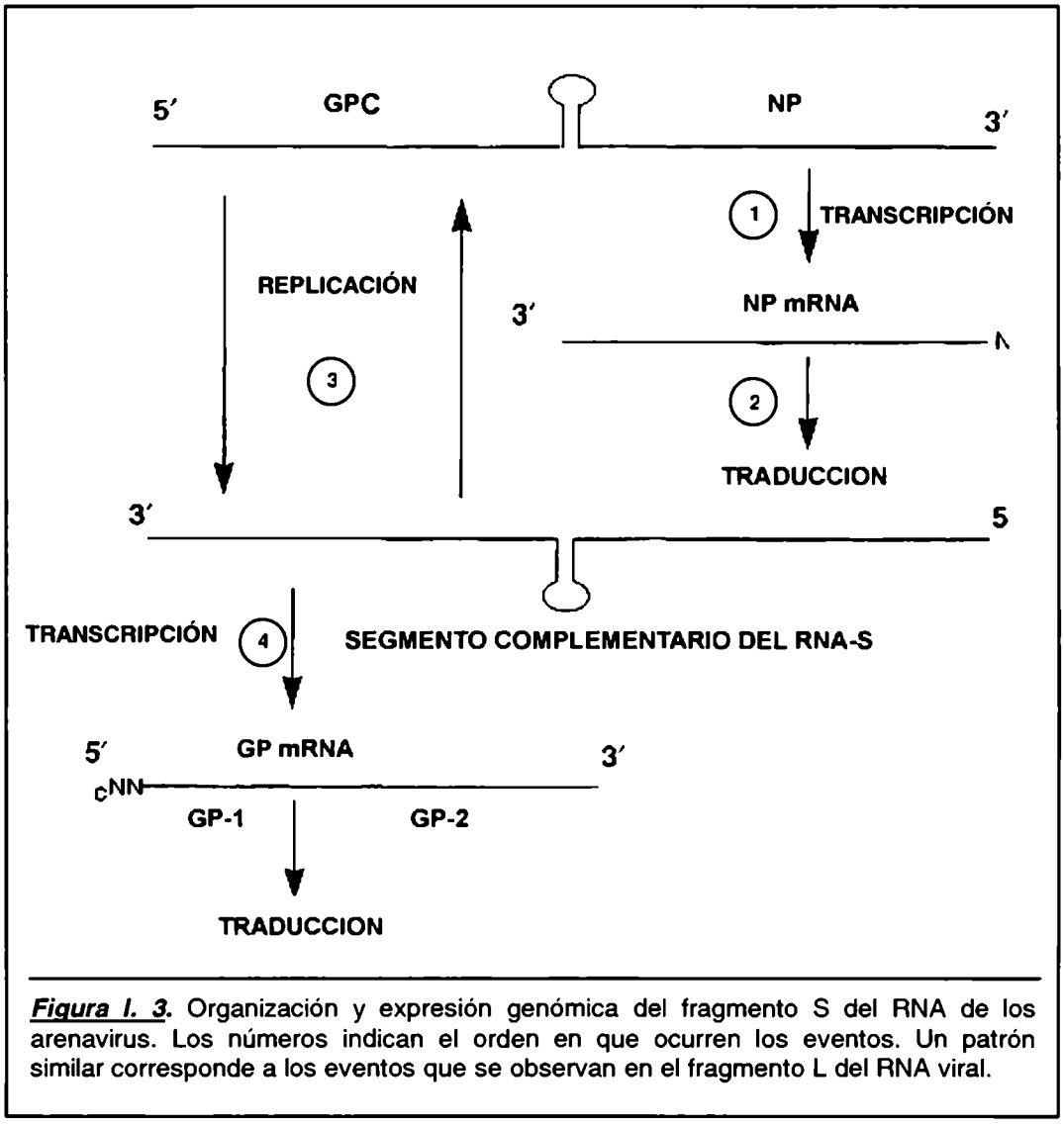


Figura I. 3. Organización y expresión genómica del fragmento S del RNA de los arenavirus. Los números indican el orden en que ocurren los eventos. Un patrón similar corresponde a los eventos que se observan en el fragmento L del RNA viral.

I. 3. Proteínas virales

Respecto de los arenavirus, son escasos al presente los conocimientos sobre la real participación de las proteínas virales (*Figura I. 4*) en la infección tanto *in vivo* como *in vitro*. Las glicoproteínas virales, y muy especialmente la glicoproteína externa GP1, han sido las más estudiadas por su importancia en la respuesta inmune del huésped a la infección y su rol en las etapas iniciales y finales del ciclo de multiplicación, posibilitando la entrada, exocitosis y brotación viral (Burns & Buchmeier, 1993; Castilla *et al.*, 1994; Damonte *et al.*, 1994; Candurra & Damonte, 1997; Candurra *et al.*, 1999; Strecker *et al.*, 2003).

El precursor de las glicoproteínas GPC (70-80 kDa) es clivado post-traduccionalmente en la célula infectada para dar origen a las glicoproteínas de envoltura GP1 y GP2. Se ha observado que el correcto clivaje es fundamental para la formación de partículas infectivas de JUNV, LASV y LCMV (Damonte *et al.*, 1994; Candurra *et al.*, 1997; Lenz *et al.*, 2001; Kunz *et al.*, 2003). La secuencia señal es larga y contiene dominios hidrofóbicos, teniendo posiblemente una función adicional en el transporte de las glicoproteínas o durante el ensamblaje de la partícula viral. El clivaje ocurre en una etapa tardía en el Golgi medio o trans-Golgi, para LCMV y JUNV (Wright *et al.*, 1990; Candurra *et al.*, 1997), pero en una etapa más temprana en retículo endoplasmático, en LASV (Beyer *et al.*, 2003), y requiere una previa glicosilación y recorte. GP1 deriva de la posición N-terminal de GPC y el clivaje ocurre en un único motivo conservado en todos los arenavirus, con excepción del TCRV (Burns *et al.*, 1991; Lenz *et al.*, 2000). Cantidades equimolares de ambas glicoproteínas son encontradas en el virión. GP1 (40-46 kDa), es la glicoproteína expuesta de superficie con 4-11 sitios posibles de N-glicosilación (Auperin *et al.*, 1984; Wright *et al.*, 1990; Clegg *et al.*, 1991). Debido a la gran heterogeneidad de GP1 revelada por electroforesis, se especula que no todos los potenciales sitios de glicosilación son siempre utilizados. GP2 (35 kDa) es la proteína integral de membrana y contiene 1-4 sitios posibles de N- glicosilación y

un dominio transmembrana. El C-terminal contiene residuos cargados y se piensa que interactúa con NP en el citosol, así como en el interior del virión.

La nucleoproteína NP (60-68 kDa) es la proteína estructural más abundante de los arenavirus. Estudios en PICV han revelado que NP representa el 70 % de las proteínas presentes en el virión, siendo 1.530 las moléculas de NP presentes. La NP se encuentra asociada al RNA del virión formando estructuras llamadas "cuentas de collar" (*string of bead-like estructures*), observadas por microscopía electrónica (Young & Howard, 1983). NP puede ser fosforilada en etapas tardías de una infección aguda y esta forma de NP aumenta de manera notoria durante infecciones persistentes *in vitro* (Howard & Buchmeier, 1983). En células infectadas, NP es localizada exclusivamente en el citoplasma celular, pero acumulaciones de un fragmento de degradación de 28 kDa han sido evidenciadas en el núcleo de células infectadas con PICV (Young *et al.*, 1987). La secuencia de NP posee un alto grado de conservación entre los distintos arenavirus y su función principal sería la protección del RNA dentro de la célula infectada.

La proteína L es la RNA polimerasa dependiente de RNA (180-200 kDa) (Salvato *et al.*, 1989; Lukashevich *et al.*, 1997). Es un componente de la nucleocápside viral, ya que su actividad ha sido asociada a esta estructura. Posee motivos conservados en todas las RNA polimerasas dependientes de RNA, así como regiones conservadas que han sido encontradas sólo en las polimerasas de los arenavirus y los bunyavirus.

La proteína Z fue la última en ser reportada, cuando se conocieron las secuencias completas del fragmento L de LCMV, TCRV y LASV (Salvato & Shimomaye, 1989; Iapalucci *et al.*, 1989; Djavani *et al.*, 1997). Recientemente, han sido publicadas también las secuencias completas de PICV y de los miembros patógenos restantes de la familia: GTOV, MACV, JUNV y SABV (Número de acceso al Banco de genes: AF427517 (Zhang *et al.*, 2001); Nc-005082; NC-005079; NC-005080; Ay358026 (Bowen *et al.*, 2003).

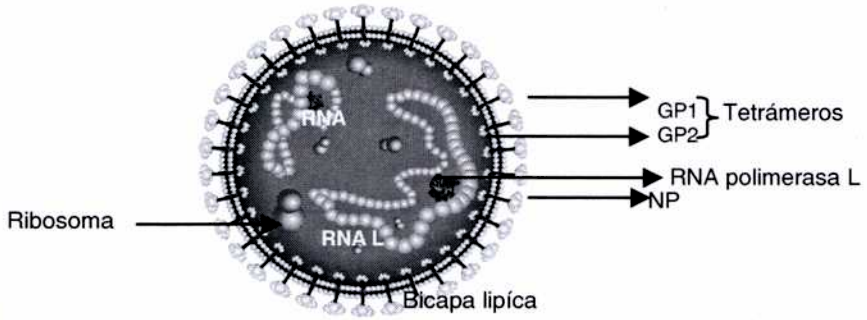


Figura I. 4. Representación de de la estructura de una partícula viral. (A. Featherstone & C. Clegg, CAMR).

I. 4. Proteína Z

Esta pequeña proteína estructural del virión, de 11 kDa, contiene un importante motivo *RING finger*, altamente conservado en los distintos arenavirus, que usa residuos de cisteínas (C) e histidina (H) para unir Zn, del tipo C3HC4 (*Figura I.5*). Se sabe que la proteína Z juega diferentes roles durante el ciclo de multiplicación viral, aunque no se han dilucidado aún todas sus funciones y esto es motivo de controversia. Inicialmente, se reportó que Z sería requerida para la síntesis de mRNA y replicación genómica (Garcin *et al.*, 1993). Sin embargo, trabajos posteriores realizados con LCMV y TCRV han demostrado, respectivamente, que ambos procesos son independientes de la presencia de Z, y por otro lado, se le ha asignado una actividad inhibitoria sobre la síntesis de RNA viral (Cornu *et al.*, 2002; Jácamo *et al.*, 2003). Su expresión en bajos niveles, durante las etapas tempranas del ciclo de multiplicación, sería suficiente para afectar la expresión de un factor celular necesario para iniciar la síntesis de RNA. Este efecto regulatorio negativo sobre la síntesis del RNA podría contribuir a las propiedades no citopatogénicas de los arenavirus, por lo que se adjudicaría a Z un importante papel en el establecimiento de infecciones persistentes (Cornu *et al.*, 2001). Recientemente, se ha demostrado que células que expresan

transientemente la proteína Z son resistentes a la infección con arenavirus (Cornu *et al.*, 2004), un fenómeno típico de las células persistentemente infectadas (Ellenberg *et al.*, 2004).

Así también, por la hidrofobicidad detectada en Z (*Figura I.5*), se le ha adjudicado un papel análogo al de la proteína de matriz de otros virus envueltos, durante la morfogénesis, por lo que sería necesaria para la brotación de la partícula viral (Salvato *et al.*, 1993; Strecker *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2003). El aumento abrupto de los niveles de expresión de Z en etapas tardías del ciclo sería requerido para la maduración y brotación del virus, ya que a través de sus motivos *RING finger* mediaría interacciones entre proteínas que contribuirían a reclutar las proteínas, celulares y virales, involucradas en este evento (Pérez *et al.*, 2003). Asimismo, se ha demostrado la interacción de Z con varias proteínas celulares, lo que podría estar asociado a su función regulatoria en la infección (Campbell Dwyer *et al.*, 2000). Este rol regulatorio-estructural sería esencial tanto en la infección aguda como en la persistente, ya que tanto el mRNA de Z, como la proteína Z son empaquetados en los viriones (Salvato *et al.*, 1992). Se ha descripto la interacción entre la proteína Z de LCMV y distintas proteínas del huésped: la proteína de leucemia promielocítica (PML), la proteína de homeodominios ricos en prolina (PHR), proteínas ribosomales (P0, P1 y P2) y el factor de la iniciación de la traducción en eucariotas 4E (eIF4E), sugiriendo que este tipo de interacción entre proteína viral y proteínas celulares pueda explicar ciertas características únicas de las infecciones con arenavirus, tal como la falta de citopatogenicidad y la capacidad de causar fiebres hemorrágicas (Borden *et al.*, 1998, Topcu *et al.*, 1999, Campbell Dwyer *et al.*, 2000; Djavani *et al.*, 2001). Se sabe que mediante la interacción con eIF4E, Z reprime la producción de proteínas celulares, como la ciclina D1, evitando así la multiplicación celular (Campbell Dwyer *et al.*, 2000). Esta interacción Z/eIF-4 sería un mecanismo estratégico viral para retrasar la multiplicación viral y así establecer la persistencia en células infectadas. Por otro lado, la interacción de Z con PML conlleva a la relocalización de cuerpos nucleares de PML al citoplasma de células infectadas, mecanismo que ha sido postulado en LCMV como estrategia

viral para aumentar la citopatogenicidad durante las infecciones (Borden *et al.*, 1998).

Por otro lado, se ha reportado la presencia de un motivo conservado de miristilación en el extremo N-terminal de Z (*Figura I.5*) (Maurer-Stroh & Eisenhaber, 2004). Trabajos con LCMV, sugirieron una interacción entre Z y NP (Salvado *et al.*, 1992), sin embargo se ha reportado recientemente para TCRV, que Z no interactuaría con NP, sino que lo haría solamente con la polimerasa L (Jácamo *et al.*, 2003). Por el contrario, en los últimos meses, otro grupo ha revelado la interacción entre Z y NP en LASV (Eichler *et al.*, 2004), por lo que aún quedan incógnitas por resolver.

La interacción Z-L propuesta estaría directamente relacionada con la acción inhibitoria de Z sobre la síntesis de RNA viral (Jácamo *et al.*, 2003) y dependería de la integridad del motivo RING en la secuencia de Z, aunque éste no sería suficiente y un motivo "tardío" (*late domain*) también sería necesario para el correcto funcionamiento de la proteína (*Figura I.5*). Estos dominios tardíos ricos en prolinas son similares a los descriptos en las proteínas Gag y M de varios virus (Wills *et al.*, 1994; Craven *et al.*, 1999). Las proteínas Z de cepas no patogénicas de LCMV (ARM y Mx) contienen un único motivo tardío del tipo PPPY, mientras que la cepa patógena WE sólo presenta un motivo PPY cerca del C-terminal, que no reúne los requisitos para ser considerado un motivo tardío. Por otra parte, la proteína Z del arenavirus patógeno LASV, presenta 2 motivos tardíos, el PTAP y el PPPY, separados por 8 aminoácidos. Así también, en los arenavirus del Nuevo Mundo, se ha observado en PICV otro motivo rico en prolinas, el PSAP, mientras que TCRV no presenta ningún motivo tardío característico. Estos motivos tendrían influencia en el grado de patogenicidad de los virus de la familia, siendo fundamentales para el ensamblaje y la brotación de la partícula viral (Pérez *et al.*, 2003).

Finalmente, anticuerpos contra Z se han detectado en sueros humanos en regiones endémicas para la fiebre de Lassa, primera evidencia de la inmunogenicidad de esta pequeña proteína durante la infección humana (Gunther *et al.*, 2001).

Estos recientes trabajos demuestran que el correcto funcionamiento de la proteína Z depende de la integridad de la misma y es esencial para el cumplimiento de distintas etapas del ciclo de multiplicación viral.

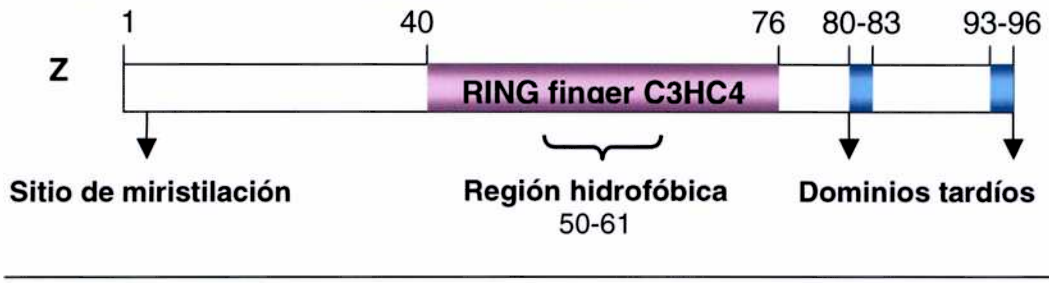


Figura I.5. Representación esquemática de la secuencia de la proteína Z.

I. 5. Infección viral, célula huésped y animales de laboratorio

Los arenavirus infectan una gran variedad de tipos celulares de diferentes especies, con una eficiencia de multiplicación variable. La progenie viral es liberada luego de 12-16 h de iniciada la infección (Mersich *et al.*, 1981), aunque para ensayos en el laboratorio, la producción viral es detectable recién luego de 24 h p.i.

En general, la replicación de los arenavirus ocurre sin afectar la síntesis de macromoléculas celulares y sin producir citopatogenicidad. Únicamente bajo ciertas condiciones, dependiendo de la cepa viral o de la proporción de partículas interferentes en la población viral, tiene un efecto en la biosíntesis celular y se observa una respuesta citolítica (Friedlander *et al.*, 1984; López & Franze-Fernández, 1985; Candurra *et al.*, 1990). La línea celular Vero, de riñón de mono verde africano, es uno de los pocos tipos celulares donde se puede observar el efecto citopático y por lo tanto es el sistema usado para titular virus en ensayo de placas. La infección de células con arenavirus está caracterizada por 2 fases; luego de un periodo inicial de activa producción viral, que puede estar o no asociada con efectos citopáticos, los cultivos celulares rápidamente progresan hacia un estado prolongado de persistencia viral (Ellenberg *et al.* 2002; 2004).

El modelo animal más utilizado para estudios *in vivo* es el cobayo, aunque también se utilizan ratones, hámsters lactantes y monos adultos (Scolaro *et al.*, 1991; Coto *et al.*, 1978).

I. 6. El virus Junín y la Fiebre hemorrágica argentina

El virus Junín, aislado por primera vez de un caso humano en 1958, es el agente etiológico de la FHA, enfermedad que se reconoce en formas clínicas leves y graves. JUNV es comúnmente aislado de los órganos y fluídos corporales de tres especies de roedores: *Calomys musculinus, C. laucha* y *Akodon azarae*, aunque también se ha aislado de *Mus musculus* (Sabatini *et al.*, 1974) y *Oligoryzomys flavescens* (Mills *et al.*, 1991). Sin embargo, el principal reservorio es *Calomys musculinus*, ya que ha sido el de mayor distribución en el área endémica y su persistente viremia ha sido evidenciada tanto en la naturaleza como en el laboratorio (Carballal *et al.*, 1986). Este roedor abunda en las áreas de agricultura, especialmente en las plantaciones de maíz y trigo, desde marzo hasta julio. Estos roedores sufren infecciones crónicas con JUNV y liberan virus al medio ambiente en forma persistente, cumpliendo así con el ciclo de mantenimiento en la naturaleza. Los seres humanos son infectados a través de abrasiones en la piel o por inhalación de aerosoles o polvo contaminado con orina, saliva o sangre de los ratones infectados (Maiztegui *et al.*, 1986).

Durante las últimas tres décadas el área endémica de la FHA fue extendiéndose desde su sitio original, en las plantaciones de áreas rurales de la provincia de Buenos Aires, hasta alcanzar hoy en día una vasta área de 150.000 km^2 de la zona agrícola-ganadera más importante de la Argentina (*Figura I. 6*). Esta región está habitada por 3,5 millones de personas y la población en riesgo se compone principalmente de trabajadores rurales (Maiztegui & Sabattini 1977; Maiztegui *et al.*, 1986). Existe aproximademante un total de 30.000 casos notificados (Enría & Feuillade, 1998).

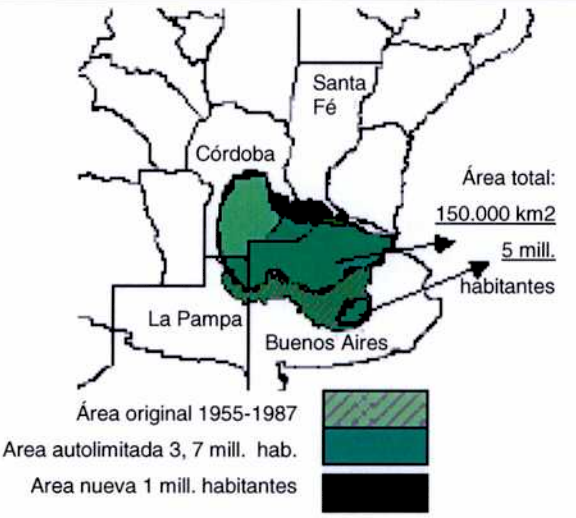


Figura I. 6. Área endémica afectada por la FHA. (www.direpi.vigia.org.ar/pdf/FHA2002-web.pdf)

Los primeros indicios de la FHA comienzan con síntomas no específicos como fiebre y mialgia, luego de un periodo de incubación de 1 o 2 semanas, que pueden extenderse a 3. Al cabo de 3-4 días de haber comenzado los síntomas, éstos se incrementan severamente, con dolor abdominal, trastornos gastrointestinales, náuseas, vómitos, constipación o diarrea, fotofobia y hasta incluso desorientación (Arribalzaga, 1955; Molteni *et al.,* 1961; Ruggiero *et al.,* 1964; Harrison *et al.,* 1999; Enria *et al.,* 1999). Así también, se observa en la persona afectada taquicardia, signos de alteraciones neurológicas, como temblor de la lengua y brazos, dolor retroocular y convulsiones. Luego de 15 días, el 80 % de los pacientes mejora notablemente, mientras que el resto de los casos sigue una marcada evolución desfavorable.

I. 7. Tratamiento y prevención de la FHA

Las zoonosis, enfermedades transmitidas entre animales y hombres, son de gran importancia para la salud pública, debido a que algunas de ellas han sido responsables de importantes epidemias, aunque esto sólo ocurre

esporádicamente. En el caso de la FHA, la epidemia más importante ha ocurrido en el año 1964, cuando se registraron 3.500 casos.

Por ensayos realizados en modelos animales, se ha demostrado que la administración pasiva de anticuerpos de origen humano, es suficiente para alcanzar la protección de monos contra el MACV (Eddy, 1975). El resultado de esta investigación sugirió la posible utilización de esta terapia en pacientes humanos con FHA. En este sentido, la eficacia del tratamiento está relacionada directamente con el título de anticuerpos neutralizantes en el plasma suministrado al paciente. La aplicación de este tratamiento durante los primeros 8 días de infección neutraliza la viremia, disminuye las alteraciones fisiológicas y reduce la incidencia de las infecciones oportunistas, disminuyendo así la tasa de mortalidad al 1-2 % de los pacientes afectados (Maiztegui *et al.*, 1979; Enría *et al.*, 1986). Sin embargo, esta terapia sólo es efectiva cuando se realiza en forma temprana luego de la infección y además se ha observado un síndrome neurológico tardío en el 10 % de los pacientes tratados (Maiztegui *et al.*, 1979).

Con respecto a la prevención de la enfermedad, se ha desarrollado una vacuna (Barrera-Oro & Eddy, 1982; Maiztegui *et al.*, 1990), que no ha mostrado efectos adversos en ensayos con primates y ha pasado exitosamente una serie de pruebas clínicas en EEUU y en nuestro país. La cepa vacunal a virus vivo Junín Candid #1 (*candidate 1*) presenta un alto grado de atenuación de la virulencia, sin embargo ha sido utilizada únicamente en grupos de riesgo para inducir la respuesta inmune (Maiztegui *et al.*, 1998). Aún con una vacuna adecuada, todavía no realmente disponible, brotes ocasionales pueden ocurrir por cambios ecológicos en el reservorio o la aparición de nuevas cepas o especies, por lo que la necesidad de disponer de agentes quimioterapéuticos efectivos para el tratamiento, se mantiene preponderante.

La única droga conocida actualmente en uso es la ribavirina. La ribavirina (1- β- D- ribofuranosil-1, 2, 4- triazol- 3- carboxamida) (*Figura I. 7*), un análogo de guanosina, mostró inhibición contra los arenavirus, tanto *in vitro* como en modelos animales (Jahrling *et al.*, 1980; Weissenbacher *et al.*, 1986; McKee *et al.*, 1988; Lucia *et al.*, 1989). Este compuesto posee un amplio espectro de acción con otros

virus también, a través de 3 mecanismos diferentes. Luego de la fosforilación, como monofosfato, actúa como inhibidor competitivo de la inosín-monofosfato deshidrogenasa (IMPH), bloqueando la conversión del IMP a monofosfato de xantosina (XMP), un precursor de la biosíntesis de guanosín-trifosfato (GTP) y dGTP, por lo que disminuye el GTP intracelular (Streeter *et al.*, 1973). Asi también, la ribavirina puede ser fosforilada a la forma 5-trifosfato, afectando así la iniciación y la elongación del mRNA viral por inhibición competitiva con las enzimas que agregan el CAP en el extremo 5´ del mRNA y polimerasa virales (Goswami *et al.*, 1979; Glibert & Knight, 1986). Por último, un reciente mecanismo propuesto es su acción mutagénica. Todos los virus con genomas de RNA poseen una alta tasa de mutación durante sus replicaciones debido a la pobre fidelidad de las RNA polimerasas. Este mecanismo sería una ventaja evolutiva para así poder escapar a presiones selectivas, sin embargo la acción de la ribavirina aumenta notablemente estos errores llegando a producir mutaciones letales (Crotty *et al.*, 2000, 2001; Ruiz-Jarabo *et al.*, 2003).

La administración de ribavirina, es el método preferido para el tratamiento de la fiebre de Lassa (Mc Cormick *et al.*, 1986), aunque se han registrados efectos colaterales como trombocitopenia y anemia (Weissenbacher *et al.*, 1986; McKee *et al.*, 1988). Respecto de JUNV, se ha demostrado que la ribavirina es inhibidora *in vitro* pero no reduce la mortalidad en casos avanzados de FHA (Enria *et al.*, 1994). Por lo tanto, aunque es la única terapia utilizada actualmente para el tratamiento de fiebres hemorrágicas en humanos, su acción no es específica y tiene grandes desventajas para el uso terapéutico.

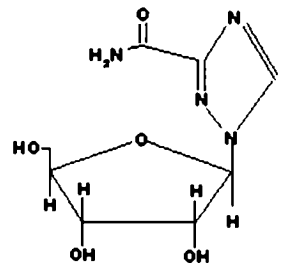


Figura I. 7. Estructura química de la ribavirina, la única droga terapeútica en uso contra las fiebres hemorrágicas.

I. 8. El ciclo replicativo y los posibles blancos para agentes terapéuticos

El control de las enfermedades virales a través del uso de agentes quimioterapéuticos de bajo costo, con mínimos efectos colaterales y sin provocar resistencia viral, es un camino con metas a largo plazo. El entendimiento del ciclo replicativo de multiplicación viral (*Figura I. 8*) proporciona la información necesaria para el diseño racional de drogas antivirales.

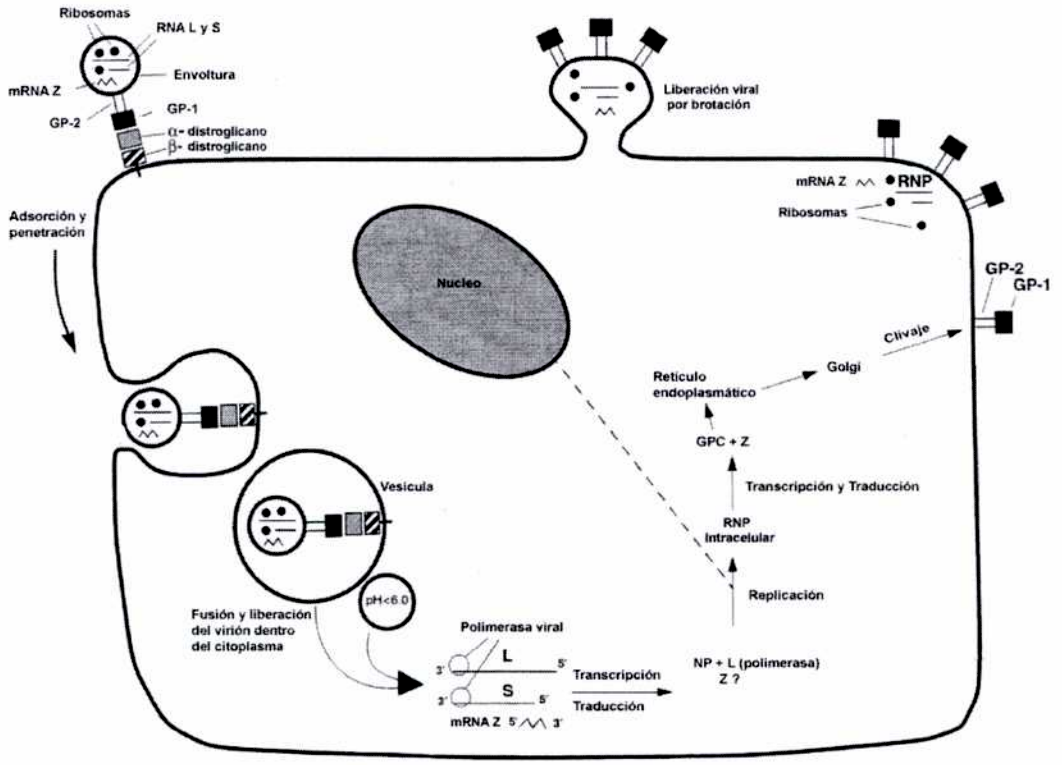


Figura I. 8. Esquema del ciclo de multiplicación de los arenavirus (Meyer *et al.*, 2002).

Los compuestos antivirales comúnmente utilizados o que están siendo evaluados actualmente en pruebas clínicas, pertenecen a distintas categorías, de acuerdo al punto de ataque dentro del ciclo de multiplicación viral en el cual intervienen. Las etapas de multiplicación viral que pueden ser puntos de ataque son:

a) Adsorción:

El ciclo de replicación viral comienza con la adsorción del virus a la superficie de la célula huésped. La GP1 parecería ser la responsable de la unión al receptor celular de la membrana plasmática. Recientemente el α-distroglicano (∝-DG) fue identificado como receptor celular, aunque no ha sido demostrado para todos los miembros de la familia (Kunz *et al.*, 2001).

La inhibición de la adsorción se ha logrado en LCMV y LASV con la adición del receptor soluble ∝-DG *in vitro* (Cao *et al.*, 1998). Asimismo, diferentes tipos de polisulfatos (dextran sulfato, heparina, pentosan sulfato) han sido descriptos como potentes inhibidores selectivos de JUNV y TCRV (Andrei & De Clerq, 1990; Witvrouw *et al.*, 1994). Sin embargo, la aplicación clínica de estos agentes (receptores solubles y sustancias polianiónicas) no ha sido todavía evaluada.

b) Internalización:

Luego de la unión al receptor celular, la internalización viral involucra un proceso endocítico, que incluye la inclusión de los viriones en vesículas, seguido de una fusión entre el virus y las membranas endosomales, y este proceso es pH dependiente.

La inhibición con agentes lisosomotrópicos (cloruro de amonio, cloroquina) fue la primera evidencia de esta ruta endosomal. Los compuestos que aumentan el pH de los endosomas fueron efectivos, bloqueando la internalización de varios arenavirus (Glushakova & Lukashevich, 1989; Castilla *et al.*, 1994, 2001; Borrow & Oldstone, 1994). Otros estudios demostraron que esta fusión está catalizada por el complejo de las GP, las cuales luego de la exposición a pH ácido, pasan por cambios conformacionales donde GP2 queda expuesta y GP1 se disocia irreversiblemente (Di Simone *et al.*, 1994; Castilla *et al.*, 1994; Di Simone & Buchmeier, 1995). Inhibidores de la ATPasa protónica, como la bafilomicina A1 y la canconamicina A, han mostrado ser efectivos inhibidores de la internalización viral (Castilla *et al.*, 2001).

Todos estos compuestos fueron muy útiles para estudiar esta etapa del ciclo de multiplicación viral, sin embargo, la mayoría interfieren con procesos celulares vitales y no tienen perspectivas terapéuticas.

c) Transcripción y replicación del RNA:

Como se ha mencionado en *I.7*, la ribavirina interfiere en estos procesos y ha sido empleada para el tratamiento de la fiebre de Lassa, aunque no es efectiva contra la JUNV. Durante tratamientos con esta droga, se han registrados efectos colaterales, debido a su acción inespecífica, por lo que tiene grandes desventajas para el uso terapéutico. Otros análogos de nucleósidos mostraron también efectos inhibitorios de la replicación comparables, *in vitro*, sin embargo los índices de selectividad (IS) no son muy promisorios.

d) Maduración de proteínas y transporte exocítico:

Varios aspectos del procesamiento y modificación de proteínas virales son conocidos y pueden ayudar en la búsqueda de nuevos blancos antivirales. La inhibición de la primera N-glicosilación y de la adición de manosas, con tunicamicina, bloquea el clivaje y el transporte del GPC no glicosilado y esto lleva a la reducción de liberación de partículas infectivas (Padula & Martínez Segovia, 1984; Wright *et al.*, 1989, 1990). Estudios con monensín y brefeldina A, compuestos que bloquean el procesamiento y transporte al Golgi, sugieren que el clivaje proteolítico y subsecuente transporte de GP1 y GP2 a la membrana celular, es un requisito para la formación de partículas infectivas (Damonte *et al.*, 1994; Candurra & Damonte, 1997). Estos inhibidores de la glicosilación no son selectivos, pero la dilucidación de la secuencia de clivaje de LASV, ofrece la posibilidad de diseñar sustratos análogos para bloquear el clivaje de GPC y así realizar un tratamiento terapéutico para la fiebre de Lassa.

La formación de viriones infectivos depende también de la miristilación de GPC, una modificación de esta proteína detectada en JUNV (Cordo, comunicación personal), ya que análogos del ácido mirístico mostraron inhibición en la producción de partículas de JUNV y TCRV (Cordo *et al.*, 1999). Se cree que esta

miristilación de GPC juega un rol importante en la interacción de las GP de envoltura y la membrana plasmática durante el ensamblaje o brotación. El proceso exocítico de las GP también puede ser afectado por compuestos que alteran la composición o propiedades de la membrana plasmática, como es el caso del ácido láurico, un inhibidor efectivo contra los arenavirus JUNV y TCRV (Bartolotta *et al.*, 2001), que bloquea la inserción adecuada de las GP en la membrana plasmática.

e) Ensamblaje y brotación:

Estas son las etapas menos conocidas en los arenavirus, ya que desde las primeras imágenes de microscopía electrónica mostrando viriones brotando de la membrana plasmática (Murphy *et al.*, 1970), no se ha avanzado mucho más. La presencia de ribosomas de la célula huésped en los viriones y la evidencia de más de una copia de cualquiera de los fragmentos de RNA (S o L) en los mismos (Romanowski, 1993), sugieren que esta etapa no es un evento muy preciso. Las interacciones entre las proteínas virales entre sí, así también como con componentes del citoesqueleto, juegan un rol importante en la encapsidación de partículas virales con envoltura. Esto hace que las proteínas virales de los arenavirus interaccionen entre sí. Estudios de fraccionamiento celular demostraron este tipo de asociación entre las proteínas de JUNV y el citoesqueleto celular (Candurra *et al.*, 1999), sugiriendo que el citoesqueleto estaría involucrado en las primeras etapas del ensamblaje y brotación viral.

Otros estudios realizados en LCMV indican que NP interactuaría con GP2 (Burns & Buchmeier, 1991), ambas proteínas parecen estar asociadas a la membrana viral, ya que segregan como proteínas hidrofóbicas luego de tratar con detergentes a los viriones. Se han propuesto otros mecanismos alternativos para el ensamblaje de las partículas, aunque, como ya se ha mencionado, recientemente, se han publicado trabajos que avalan la asignación a Z de un rol análogo a la proteína de matriz.

I. 9. Motivos *RING fingers*: nuevo punto de ataque en la quimioterapia antiviral

Casi todos los procesos biológicos involucran interacciones específicas entre macromoléculas y las mismas dependen de los dominios estructurales presentes. Hay por lo menos 14 clases diferentes de motivos *Zn fingers*, de acuerdo a como se diferencian en su naturaleza y rearreglo con los residuos que unen los átomos de Zn. En la *Figura I. 9* se muestran algunos ejemplos.

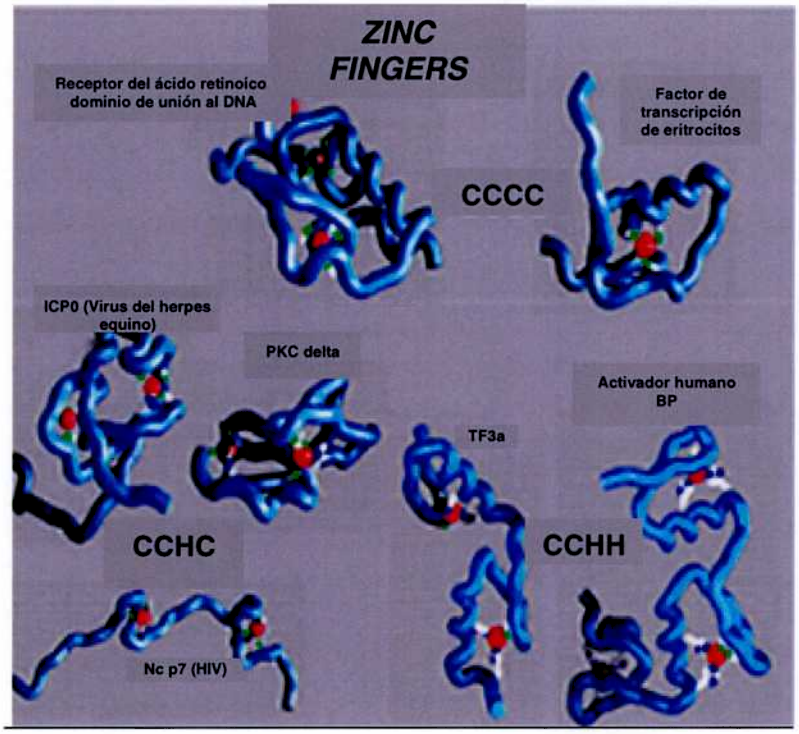


Figura I. 9. Algunos ejemplos de motivos *Zn fingers* (www.achillion.com/what_is_zinc.cfm).

Estos pequeños dominios son capaces de plegarse e interactuar con átomos de Zn, formando estructuras muy estables. Estudios experimentales revelan que cuando el Zn es removido, estos residuos interaccionan entre sí formando grandes estructuras (Frankel *et al.,* 1987). Esta asociación coordinada entre la unión del Zn y el correcto plegamiento de la proteína tiene muchísimas consecuencias tanto

químicas como biológicas y podría ser de gran importancia para el entendimiento de las funciones de las proteínas que contienen estos dominios, ya que han sido localizadas tanto en núcleo como en citoplasma y probablemente, a través de esa secuencia participan en interacciones proteína-proteína. La correcta coordinación de Zn entre los residuos de C e H es necesaria para esta interacción (Berg *et al.*, 1996; Moriuchi *et al.,* 1994; Hu *et al.,* 1994; Borden *et al.,* 1995).

En los arenavirus se ha demostrado que hay dos proteínas con capacidad de unir Zn: la proteína NP y la proteína Z. La NP tiene un dominio *Zn finger* clásico en su extremo C-terminal del tipo $CX_2HX_{23}CX_4C$ (Salvato *et al.*, 1992), a través del cual se asociaría íntimamente al RNA (Tortorici *et al.*, 2001). Mientras que la proteína Z posee un dominio *zinc finger* particular, denominado *RING* (Salvato *et al.*, 1989).

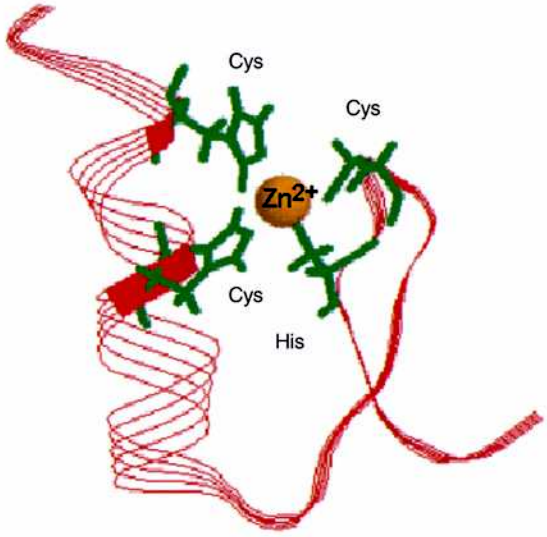


Figura I. 10. Representación de uno de los dos motivos *RING finger* presentes en la proteína Z (www.web-books.com/MoBio/Free/Ch4F2.htm).

El dominio *RING* (*Figura I. 10*) es una de las clases de secuencias identificadas que une Zn++, que está presente en numerosas proteínas animales y vegetales (Berg *et al.*, 1996). Son 8 los residuos que unen los 2 átomos de Zn en

este particular motivo. Las secuencias que contienen este motivo se encuentran superpuestas (Barlow *et al.*, 1994), siendo el primer, segundo, quinto y sexto residuo el que coordina un átomo de Zn, mientras que el tercer, cuarto, séptimo y octavo residuo, unen el segundo átomo de Zn.

La secuencia consenso definida para los motivos *RING fingers* es:

$$C\ X_2\ C\ X_{(9\text{-}39)}\ C\ X_{(1\text{-}3)}\ H\ X_{(2\text{-}3)}\ \underset{\uparrow}{C/H}\ X_2\ C\ X_{(4\text{-}48)}\ C\ X_2\ C$$

Los motivos *RING* están subcategorizados a su vez en *RING*-HC y *RING*-H2, dependiendo si es una cisteína o una histidina, el animoácido que ocupa el quinto sitio de coordinación (posición señalada en la secuencia) (Joazeiro *et al.*, 2000).

La proteína Z de los arenavirus presenta en su secuencia un motivo *RING*-HC, donde el orden de los residuos es el siguiente:

$$\mathbf{C}\ X_2\ \mathbf{C}\ X_9\ \mathbf{C}\ X_2\ \mathbf{H}\ X_2\ \mathbf{C}\ X_2\ \mathbf{C}\ X_{10}\ \mathbf{C}\ X_2\ \mathbf{C}$$

La conservación que este motivo muestra entre las distintas cepas de un mismo virus, lo han tornado un blanco potencial en la quimioterapia antiviral.

I. 10. Nuevos compuestos reactivos contra motivos *Zn fingers* con posible uso antiviral

En la búsqueda de blancos alternativos contra JUNV, se ha estudiado en los últimos años la funcionalidad de las proteínas virales durante las etapas tempranas y tardías del ciclo de multiplicación, junto con la evaluación de la actividad de compuestos naturales y sintéticos, como tricotecenos producidos a partir de epibiontes de *Baccharis coridifolia* (García *et al.*, 2001), nuevos derivados de tiosemicarbazonas (García *et al.*, 2003) y aceites esenciales extraídos de plantas argentinas (García *et al.*, 2003), con el fin de identificar sustancias de aplicación terapéutica. Así ha surgido la consideración de la proteína Z como un blanco atractivo para la terapia antiviral, ya que el motivo *RING finger* presente en

su secuencia se halla altamente conservado y sería esencial para la replicación viral. En los últimos años, se han descripto péptidos antivirales que compiten con el motivo *Zn-finger* de la proteína M1 del virus Influenza (Judd *et al.*, 1997), y se han reportado numerosos estudios con diversos agentes químicos que inhiben la replicación del HIV, actuando sobre el motivo *Zn-finger* de la proteína de la nucleocápside retroviral p7. Estos agentes modifican covalentemente las interacciones entre los átomos de zinc y las cisteínas tioladas de los motivos *zinc fingers*, provocando la eyección del Zn, la consecuente pérdida de la estructura nativa de la proteína (*Figura I. 11*) y finalmente la interrupción de la replicación viral (Rice *et al.*, 1993, 1995, 1996, 1997a & b, Tummino *et al.*, 1996; Turpin *et al.*, 1996, 1999).

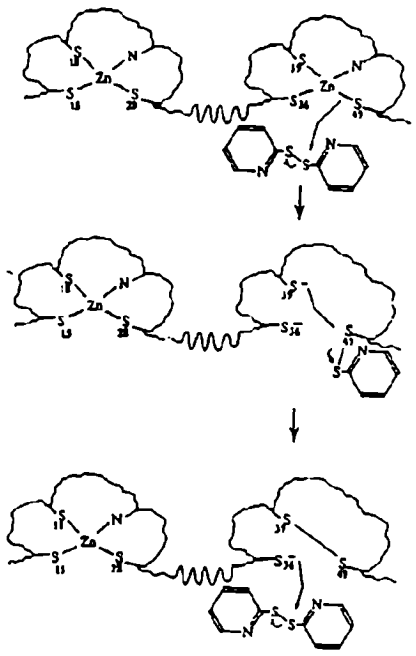


Figura I. 11. Mecanismo de acción propuesto para los inhibidores reactivos contra los motivos *Zn fingers* de la p7 de HIV-1 (Hathout *et al.*, 1996).

A través de este mecanismo de acción, mediante interacciones compuesto-*Zn finger* de la p7, los mismos parecerían bloquear el ensamble y desarmardo del HIV.

El estudio de la especificidad de estos compuestos ha demostrado que los mismos no afectan a proteínas celulares que presentan motivos *Zn fingers* en su secuencia (Huang *et al.*, 1998). Actualmente, uno de estos agentes, la azodicarbonamida (ADA), está siendo evaluada en Europa, en pruebas clínicas, fase II, contra HIV (Goebel *et al.*, 2001; de Clerq, 2001, 2002), en pacientes avanzados de SIDA.

El presente trabajo de Tesis presenta los resultados de la evaluación de numerosos compuestos electrofílicos reactivos contra los motivos *Zn fingers* de la p7 de HIV-1, como antivirales contra los arenavirus, asimismo la caracterización de su modo de acción. Los compuestos fueron provistos por el Laboratorio de Mecanismos de Drogas Antivirales, *National Cancer Instiute-Frederick Cancer Research and Development Center,* SAIC, Frederick, USA, a través de un convenio de transferencia tecnológica CA-MTA 1 3998 96.

OBJETIVOS

O. 1) Objetivos generales

Los objetivos generales de este trabajo están dirigidos a contribuir en el desarrollo de una terapia antiviral contra las fiebres hemorrágicas causadas por los arenavirus, mediante la identificación de un nuevo blanco de ataque común para todos los miembros virales de la familia.
Bajo este enfoque se propone utilizar compuestos reactivos contra motivos *Zn finger* como herramientas para estudiar la función de la proteína Z.

O. 2) Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este trabajo son: estudiar el mecanismo de inhibición de compuestos reactivos contra motivos *Zn finger* en los arenavirus, comprobar que la proteína Z es el blanco de acción y demostrar que la misma es esencial en el ciclo de multiplicación viral de los arenavirus.

MATERIALES y MÉTODOS

MM. 1. Compuestos utilizados

Se utilizaron 15 agentes electrofílicos de diversa estructura química, provistos todos por el *National Cancer Institute*, Frederick, MD, USA. Se prepararon soluciones madres 100 mM de los compuestos en dimetilsulfóxido (DMSO) y luego se guardaron a -70°C hasta su uso.

Como se puede observar en la *Figura MM. 1*, de acuerdo a las distintas estructuras químicas, los compuestos fueron agrupados en 2 categorías bien diferenciadas: los disulfuros y los derivados azoicos.

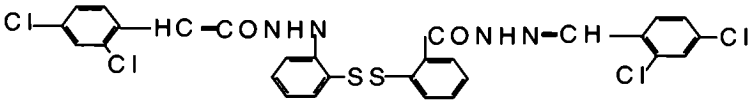
Entre los compuestos disulfuros encontramos a su vez 3 clases: los disulfuros alifáticos, en los cuales el puente disulfuro une 2 cadenas alifáticas; los disulfuros aromáticos intermoleculares, en los que el puente disulfuro une 2 moléculas aromáticas; y los ditianos, en los que el puente disulfuro está incluído dentro del anillo aromático. Los compuestos disulfuros se encuentran nombrados de acuerdo al número NSC (el número de identificación interna del National Cancer Institute) correspondiente, a excepción de los compuestos comerciales: aldrithiol-2 (AT-2) y tetraetiltiuran-disulfuro (TED) (SIGMA, USA).

Los compuestos azoicos a su vez comprendieron derivados con estructuras aromáticas y alifáticas, y derivados reducidos en el grupo azo, como las hidrazidas. Este grupo de compuestos fueron identificados con siglas que corresponden a la abreviatura del nombre de cada uno de ellos, según la nomenclatura IUPAC.

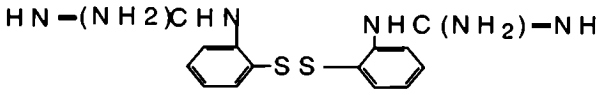
La ribavirina (Sigma-Aldrich, USA) fue utilizada como compuesto de referencia.

Compuestos Disulfuros

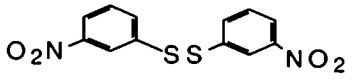
NSC4493
Bis (2-(N´-(2, 4-dicloro-benzal)) carboxamida-1-bencen) disulfuro



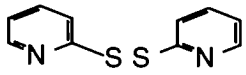
NSC20625
Disulfuro de 1-(2-guanidino) fenilo



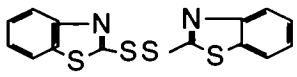
NSC203
3-Nitrofenil



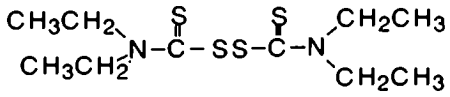
AT-2
Aldrithiol-2



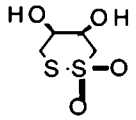
NSC677459
2,2'-Dibenzotiazol disulfuro



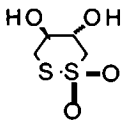
TED (NSC25953)
Tetraetil-tiuran disulfuro



NSC624151
(*cis*)-4,5-Dihidroxi-1,1-dióxido-1,2-ditiano

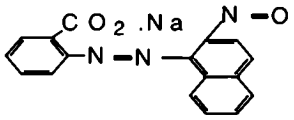


NSC624152
(*trans*)- 4,5-Dihidroxi-1,1-dióxido-1,2-ditiano

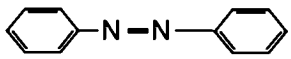


Compuestos Azoicos

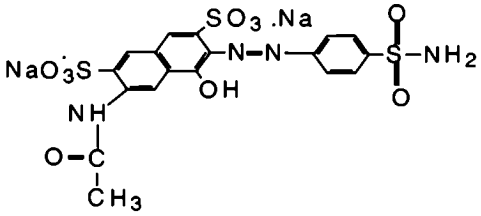
ANNB
Ácido 2-(2 nitroso-1-naftilazo) benzoico



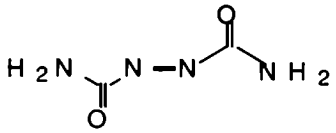
AB
Azobenceno



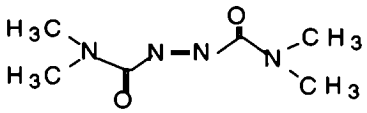
AABSSN
Azosulfamida



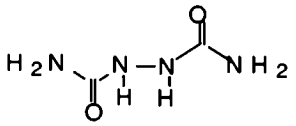
ADA
Azodicarbonamida



ADF
1,1'-Azobis(N,N-dimetilformamida)



Biurea



CAPH
2-Fenilhidrazida del ácido 2-(carbamoiltio) acético

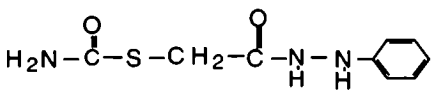


Figura MM. 1. Estructura química de los compuestos reactivos con motivos *Zn fingers*.

MM. 2. Células y virus

Para los ensayos con JUNV, TCRV y PICV, se utilizaron únicamente las células Vero (ATCC CCL 81), línea celular proveniente de riñón de mono verde africano adulto *Cercopithecus aethiops*. Las mismas fueron crecidas en medio mínimo esencial Eagle (MEM) (GIBCO, USA) suplementado con 5 % de suero de ternera inactivado y 50 µg/ml de gentamicina (Sigma, USA). Para el medio de mantenimiento (MM) la concentración de suero fue reducida a 1,5 %. El medio de plaqueo consistió en MEM en doble concentración suplementado con 4 % de suero de ternera inactivado y 100 µg/ml de gentamicina, mezclado con volúmenes iguales de metilcelulosa 1,4 % (Sigma, USA). Cuando los cultivos se incubaron en estufa con 4 % CO_2, los medios se suplementaron con 20 µM de buffer HEPES (Sigma, USA).

Para los estudios realizados con LCMV, se utilizaron células Vero E6 (ATCC, CCL 1586, C1008), la línea celular de riñón de hámster bebé, BHK-21 (ATCC, CRL8544), y la línea celular proveniente de hepatoma humano, HepG2 (ATCC HB-8065). Las células BHK-21 y HepG2 fueron crecidas en MEM, suplementado con 10% de suero de ternera inactivado, 1,5 g/l de bicarbonato de sodio, 1 mM de piruvato de sodio y 2 mM de L-glutamina. Para el MM la concentración de suero fue reducida a 5 %.

En los diferentes ensayos se utilizaron tres cepas de JUNV: la cepa IV_{4454}, naturalmente atenuada (Contigiani *et al.*, 1977), la cepa atenuada para cobayos XJCl3, derivada de la cepa patógena prototipo XJ (de Guerrero *et al.*, 1969) y la variante atenuada para ratones lactantes Cl67, obtenida por mutagénesis a partir de XJCl3 (Scolaro *et al.*, 1987).

Otros arenavirus ensayados fueron: TCRV, cepa TRLV 11573 (Downs *et al.*, 1963), PICV, cepa 3739 y LCMV, cepas WE y Armstrong (ARM), respectivamente. Además, se utilizó la cepa F del HSV-1 y la cepa Indiana de VSV.

Los stocks de trabajo de los arenavirus se prepararon en células Vero con una multiplicidad de infección (m.i) de 0,1 UFP/cél., a excepción de LCMV, que se

propagó en células BHK. Para todos los arenavirus, se dejó adsorber el inóculo por 1 h a 37°C. Luego se procedió a retirarlo y se cubrieron las células con MM. El sobrenadante de LCMV se cosechó al segundo y tercer día post infección (p.i.); para el resto de los virus, el sobrenadante se cosechó al cuarto y quinto día p.i. Todos los stocks fueron almacenados a -70 °C hasta su uso. Título de los stocks: 10^6 -10^7 UFP/ml.

Para HSV-1 y VSV, los stocks se prepararon en células Vero, con una m.i que varió entre 0,1 y 0,01 UFP/célula. Se dejó adsorber por 1 h a 37 °C. Luego se procedió a retirar el inóculo y se cubrieron las células con MM. Transcurridas 24 hs. y observando un ataque del 90% de la monocapa por la acción citopática viral, se lisaron las células mediante dos ciclos de congelamiento y descongelamiento. Se eliminaron los restos celulares por centrifugación durante 15 min a 10000 x *g* y se guardó el sobrenadante a -70°C hasta su posterior uso. Título de los stocks: 10^7 -10^8 UFP/ml.

MM. 3. Ensayo de citotoxicidad

Se utilizó el ensayo colorimétrico del MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) (Sigma-Aldrich, USA) (Mosmann, 1983). Este compuesto es clivado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa para dar un compuesto azul (cristales de formazán), siendo la cantidad de cristales proporcional al número de células viables presentes. Las monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 96 cavidades fueron tratadas con diluciones seriadas al medio de los compuestos, por triplicado durante 48 hs. a 37°C. Transcurrido este tiempo, se agregaron 10 µl de una solución de MTT (5 mg/ml) en cada cavidad y se incubó a 37°C durante 2 h. Seguidamente, se descartaron los sobrenadantes y los cristales de formazán fueron disueltos en 200 µl de etanol. Se determinó la densidad óptica, utilizando un lector de microplacas a una longitud de onda de prueba de 492 nm y una longitud de referencia de 690 nm. Se calculó la CC_{50}, concentración citotóxica del compuesto que reduce el 50 % de la

viabilidad celular, con el promedio de absorbancia, tomando como control monocapas tratadas sólo con el disolvente del compuesto (DMSO).

MM. 4. Determinación de la actividad antiviral

a. Ensayo de inhibición del número de placas (plaqueo directo)

Se infectaron monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 24 pocillos, con HSV-1 o VSV, a una m.i de 0,1 UFP/cél. Se ensayó cada dilución por duplicado. Luego de 1 h de adsorción a 37°C, se descartó el inóculo, y las células se cubrieron con medio de plaqueo conteniendo o no distintas concentraciones de los compuestos. A las 48 h de incubación a 37°C, las células infectadas con HSV-1 o VSV se fijaron con formol al 10 % y luego se tiñeron con cristal violeta.

b. Ensayo de inhibición del rendimiento viral

Para los arenavirus, monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 24 cavidades, fueron infectadas con 0,1 ml del virus correspondiente a una m.i de 0,1 UFP/cél. Luego de una hora de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y las células fueron cubiertas con MM, conteniendo diluciones seriadas al medio del compuesto en estudio. Las microplacas fueron mantenidas durante 48 h a 37°C en estufa de CO_2 hasta el momento de la cosecha de los sobrenadantes. Luego se titularon los sobrenadantes por el método de UFP en células Vero. Para ello se inocularon distintas diluciones del virus, se dejó adsorber durante 1 h a 37 °C y luego se cubrió la monocapa con 1 ml de medio de plaqueo. A los 7 días p.i las células fueron fijadas con formol y teñidas con cristal violeta.

Para HSV-1 y VSV, se infectaron monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 24 pocillos, con una m.i de 0,01 UFP/cél. Luego de 1 h de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y se cubrieron las monocapas con MM conteniendo o no distintas concentraciones de los compuestos. Luego de 24 h de incubación a 37°C, se tituló el virus del sobrenadante mediante el método de UFP

en células Vero. Antes de la titulación, los cultivos se sometieron a 2 ciclos de congelamiento y descongelamiento para romper las células y se eliminaron los restos celulares por centrifugación durante 15 min a 10000 x *g*. El porcentaje de inhibición se calculó con respecto a los controles infectados y sin tratar.

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \frac{\text{título de la muestra}}{\text{título del control}} \times 100$$

Se calcula además, la CE_{50} y la CE_{90} como la concentración efectiva del compuesto que reduce la infectividad viral en un 50 % y 90 % respectivamente.

Para la titulación de infectividad asociada a célula de los arenavirus, se procesaron las monocapas una vez cosechado el sobrenadante, lavando tres veces con PBS (buffer fosfato salino) y agregando MM. Luego se realizaron dos ciclos de congelamiento y descongelamiento y se centrifugó a 10000 x *g* por 10 min para separar los restos celulares. Con el sobrenadante obtenido se procedió de igual forma que con el sobrenadante extracelular.

MM. 5. Efecto de la adición o remoción del compuesto a distintos tiempos

Para el ensayo de adición, monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades fueron infectadas con JUNV o TCRV a una m.i de 0,1 UFP/cél. Luego de 1 h de adsorción a 4°C (considerada hora 0 p.i), se cubrieron las células con MM. A distintas horas p.i. se agregó una concentración del compuesto que inhibe el rendimiento en un 90 % de acuerdo al ensayo de actividad antiviral (*MM. 4.b*), excepto los controles, que no fueron tratados con compuestos. Para el ensayo de remoción, luego de la hora de adsorción a 4°C, se incubaron las células con MM conteniendo el compuesto y se lo removió a los distintos tiempos. Los sobrenadantes de células infectadas se cosecharon en todos los casos a las 24 h p.i. para su posterior titulación por el método de UFP.

MM. 6. Determinación de la actividad virucida por contacto directo con los compuestos

a. En función de la concentración

Suspensiones conteniendo $5x10^4$ UFP de virus se incubaron, con distintas diluciones del compuesto correspondiente, en baño a 37°C durante 90 min. Como control se incubó en las mismas condiciones la suspensión viral con igual volumen de MM. Luego se realizaron diluciones de las distintas mezclas y se procedió a su titulación por UFP en células Vero, tomando en cuenta que en las diluciones ensayadas sobre las células los compuestos no ejercieran efecto antiviral. Se calculó para cada compuesto el porcentaje de infectividad remanente respecto del control, y a partir de esos datos, se determinó la CI_{50} (concentración inactivante 50 %: concentración de compuesto que inactiva el 50 % de la suspensión viral).

b. En función del tiempo

Las incubaciones de las muestras conteniendo $5x10^4$ UFP de virus con la dilución adecuada del compuesto se realizaron durante 0, 15, 30, 60 y 90 min, respectivamente. Para el tiempo 0, se colocó la mezcla en hielo una vez finalizada su preparación. A los tiempos indicados, las muestras se titularon por UFP.

c. En función de la temperatura

Las incubaciones de las muestras conteniendo $5x10^4$ UFP de virus con la dilución adecuada del compuesto, se realizaron a 4, 20, 30, 37 y 40°C, respectivamente. Luego de 90 min de incubación, las muestras se titularon por el método de UFP.

MM. 7. Marcación de viriones con radioisótopos y su purificación

Monocapas de células Vero crecidas en botellas de plástico T 75 fueron infectadas con JUNV y TCRV respectivamente a una m.i de 1 UFP/cél. A las 72 h p.i. se incorporó la marca radioactiva, mezcla de ^{35}S-metionina y ^{35}S-cisteína

(Expre^{35}S^{35}S, 25 µCi/ml, NEN, USA), al medio sin metionina ni cisteína y se incubó durante 24 h en estufa de CO_2 a 37°C. Concluído el período de marcación, se cosechó el sobrenadante (4to día p.i), repitiéndose el procedimiento durante 24 h más y luego de este tiempo, se cosechó el sobrenadante nuevamente (5todía p.i) para juntar ambos sobrenadantes. Seguidamente se procedió a clarificar la muestra mediante una centrifugación a 5000 x *g* durante 15 min. Luego se concentró el sobrenadante por medio de una ultracentrifugación (Beckman SW28, 26000 rpm, 2 h, 4°C). El pellet fue resuspendido por sonicación y luego fue sometido a gradiente discontinuo de sacarosa (15 %-60 %) (Beckman SW55 Ti, 46000 rpm, 1.5 h, 4°C). La interfase fue colectada con pipeta Pasteur y nuevamente fue sometida a ultracentrifugación (Beckman SW55 Ti, 46000 rpm, 1,5 h, 4°C). El pellet fue resuspendido por sonicación, con el agregado de 100 µl de buffer TES (Tris 0,01 M, NaCl 0,1 M, EDTA 0,001 M, pH 7,4).

MM. 8. Acción de los compuestos sobre la adsorción e internalización de los viriones

Para el ensayo de adsorción, se inocularon células Vero a 4°C con JUNV o TCRV purificado y marcado con EXPRE^{35}S^{35}S (5x10^8 dpm/ml y 1.3x10^7 UFP/ml) a una m.i de 1 UFP/cél. en presencia o ausencia del compuesto en estudio. Luego de 0 y 40 min de incubación a esa temperatura, los cultivos se lavaron y solubilizaron en NaOH 0,1 N - SDS 1 %, cuantificándose el virus adsorbido en un contador de centelleo (Wallac 1409 DSA, USA). Para el ensayo de internalización, después de la adsorción durante 1 h a 4°C en ausencia de compuesto, se incubaron los cultivos durante 0 y 60 min a 37°C en presencia o ausencia del compuesto correspondiente, luego se lavaron con PBS y se trataron con 1 mg/ml de proteinasa K para remover el virus adsorbido no penetrado. El tratamiento enzimático se frenó agregando 1 mM de fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) en PBS conteniendo 3 % de albúmina, y se solubilizaron las células con NaOH-SDS para cuantificar el virus penetrado.

Para los ensayos de adsorción e internalización con viriones marcados previamente inactivados con los compuestos durante 1,5 h a 37°C, se realizó una ultracentrifugación (Beckman SW55 Ti, 46000 rpm, 1,5 h, 4°C) para separar el compuesto y luego se procedió de la misma forma que se mencionó anteriormente.

MM. 9. Análisis de la transcripción y replicación de viriones inactivados

Monocapas de 10^6 células Vero crecidas en botellas T25 se infectaron con 10^6 UFP de JUNV ó JUNV inactivado con 100 µM del compuesto correspondiente, durante 1,5 h a 37°C y luego de 48 h de incubación se procesaron las células para la obtención de RNA. La extracción de RNA se realizó utilizando el kit comercial TOTALLY RNA (Ambion, USA) (Chomczyski & Sachi, 1987; Albariño *et al.*, 1997). Luego se realizaron 2 extracciones con fenol-cloroformo, tras las cuales se rescató la fase acuosa, conteniendo el ácido nucleico. Para la primera extracción, la solución utilizada tuvo una composición de fenol pH 6: cloroformo: isoamílico, en una relación 25:24:1. La segunda extracción se realizó, utilizando una solución ácida (pH 4,7) de fenol: cloroformo, en una relación 5:1. Posteriormente la fase acuosa fue suplementada con 1 vol. de isopropanol y 0,1 vol. de acetato de sodio 3 M, manteniéndose a –70°C durante 20 min, para la precipitación del RNA presente en la solución. Después de la centrifugación de 15 min, el *pellet* obtenido se lavó con etanol 70%, se secó en evaporador a 4°C (Savant) y se resuspendió en 20 µl de H_2O bidestilada estéril.

El RNA extraído de cada muestra fue utilizado como molde para la síntesis de cDNA (copyDNA). Los *primers* utilizados (*Figuras MM. 2 y 3*) para las reacciones fueron:

-vN (186): 5´GGCATCCTTCAGAACATC 3´, *primer* complementario a las secuencias ubicadas en el extremo 5´ del mRNA de NP.

-vG (GPC1): 5´ATGGGGCAATTCATCAG 3´, *primer* complementario a la secuencia ubicada en el extremo 3´ del RNA S genómico complementario de JUNV.

-Z/WE F89.HindIII (89-105): 5'-AAGCTTATGGGCCAAGGCAAGTC-3', *primer* complementario a la secuencia ubicada en el extremo 3´ del RNA L genómico complementario de LCMV-WE.

Para la síntesis de cDNA, se tomaron 3,5 µl de cada muestra de RNA y se agregaron 4 µl de una solución, conteniendo 2 µl del *primer* correspondiente en una concentración 10 µM y 2 µl de buffer 5x para la transcriptasa reversa (RT) de AMV (*Avian Myeloblastosis Virus*) polimerasa (Promega, USA). Esta mezcla se incubó a 95°C por 5 min para desarmar las estructuras secundarias que pudiera tener el RNA y luego a 0°C por 1 min. Posteriormente se agregó 0,24 µl de hidroximetilmercurio 0,1 M. Se incubó durante 7 min a temperatura ambiente, para luego agregar 0,24 µl de β-mercaptoetanol (β-Me-OH) 1 M y 2 µl de una solución conteniendo los 4 dNTPs y 4 unidades de la enzima responsable de la retrotranscripción. El volumen final de reacción fue 10 µl. La concentración final de los reactivos fue 2 µM de cada uno de los *primers*, 1mM de cada uno de los dNTPs y 0,4 U/µl de AMVRT. La reacción se llevó a cabo a 42°C durante un período de 2 h. Transcurrido este tiempo, se agregó a la reacción 2 µl de polímero de acrilamida lineal de concentración 2,5 µg/ml, 3 µl de acetato de sodio 3 M, 75 µl de H_2O bidestilada y 270 µl de etanol 96%. Luego se incubó a –70°C durante 30 min, para favorecer la precipitación del cDNA obtenido. El *pellet* resultante se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 10 µl de H_2O bidestilada estéril. La cuantificación de RNA obtenido se realizó a través de la medición de absorbancia a 260 nm.

El cDNA sintetizado se empleó como molde en reacciones de PCR. El volumen final de reacción fue 10 µl. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en presencia de buffer de reacción 1x (Promega, USA), dNTPs 0,2 mM, *primers* 1 µM, Cl_2Mg 1,5 mM y Taq polimerasa 0,025 U/µl (Promega, USA).

Para amplificar el cDNA obtenido a partir de la síntesis con vN (186), se realizó una PCR utilizando los siguientes *primers (Figura MM. 2)*:

-vcN (ARENA): 5´ CGCACAGTGGATCCTAGGC 3´, *primer* complementario a las secuencias ubicadas en los extremos 3´ del RNA S genómico y 3´del RNA S genómico complementario de la mayoría de los arenavirus.

-vN (186) (J2): 5´ GGCATCCTTCAGAACATC 3´, *primer* complementario a las secuencias ubicadas en los extremos 5´ del mRNA de NP.

Las condiciones de la PCR fueron: 30 seg a 94°C, 35 ciclos de 10 seg a 94°C, 20 seg a 48°C, 20 seg a 72°C y un ciclo de 5 min a 72°C.

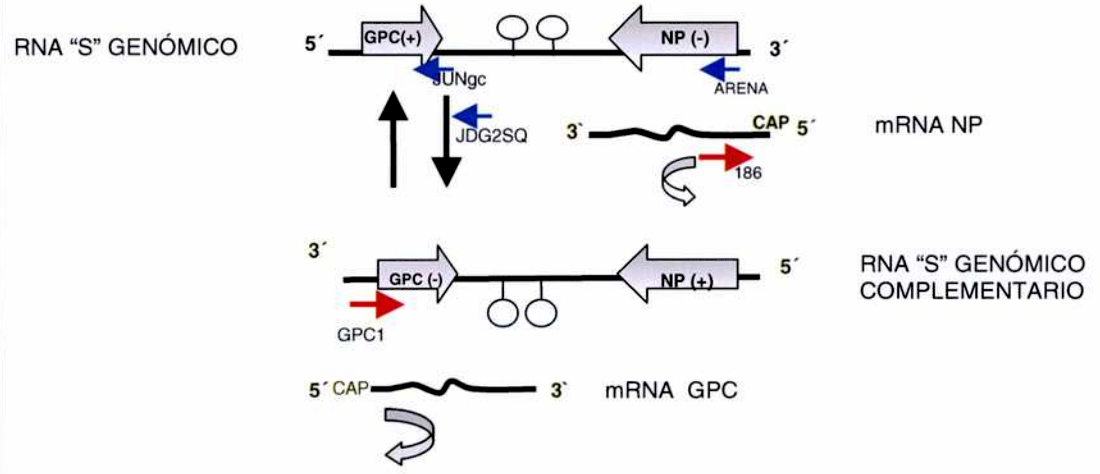


Figura MM. 2. Esquema del fragmento S del RNA genómico. En flechas rojas se indican los *primers* utilizados para la síntesis del cDNA correspondiente. En flechas azules se indican los *primers* utilizados para la amplificación de segmentos específicos mediante PCR.

Para amplificar el cDNA obtenido a partir de la síntesis con vG (GPC1), se realizó una PCR anidada utilizando los siguientes *primers*:

Primers externos:

-vG (GPC1): 5´ ATGGGGCAATTCATCAG 3´, *primer* complementario a la secuencia ubicada en el extremo 3´ del RNA S genómico complementario de JUNV.

-vcG (JDG2SQ): 5´ CCCCTTAATGTAAAGATGGC 3´, *primer* complementario a la secuencia ubicada en el extremo 5´ de la secuencia de GPC en el RNA S genómico de JUNV.

Las condiciones de la primera PCR fueron: 30 seg a 94°C, 40 ciclos de 15 seg a 94°C, 20 seg a 50°C, 30 seg a 72°C y un ciclo de 5 min a 72°C.

Primers internos:

-vG (GPC1): 5´ ATGGGGCAATTCATCAG 3´, *primer* complementario a la secuencia ubicada en el extremo 3´ del RNA S genómico complementario de JUNV.

-vcG3 (JUNgc): 5´ CAACCACTTTTGTACAGGT 3´, *primer* complementario a la secuencia ubicada en el extremo 5´ de la secuencia genómica de GPC en el RNA S genómico de JUNV.

Las condiciones de la segunda PCR fueron: 30 seg a 94°C, 40 ciclos de 15 seg a 94°C, 20 seg a 52°C, 20 seg a 72°C y un ciclo de 5 min a 72°C.

El cDNA sintetizado con el *primer* específico para Z, F89 HindIII, fue utilizado para reacciones de PCR; las amplificaciones fueron llevadas a cabo en presencia de buffer de reacción 1x (Promega, USA), dNTPs 0,2 mM, Cl_2Mg 1,5

mM y Taq polimerasa 0,025 U/µl (Promega, USA), en volúmenes finales de 50 µl, utilizando los siguientes *primers* específicos para Z/WE, 1 µM (*Figura MM. 3*):

-Z/WE F119 Hind III: 5´GACACCAGCAATACAGGCAG 3´, *primer* complementario a la secuencia ubicada en el extremo 3´ del RNA L genómico complementario de LCMV-WE.

-Z/WE R361 XhoI (340-361): 5'-CTCGAGTTACTCCTCATAGG GAGGTAGG-3', *primer* complementario a la secuencia ubicada en el extremo 5´ del RNA L genómico de LCMV-WE.

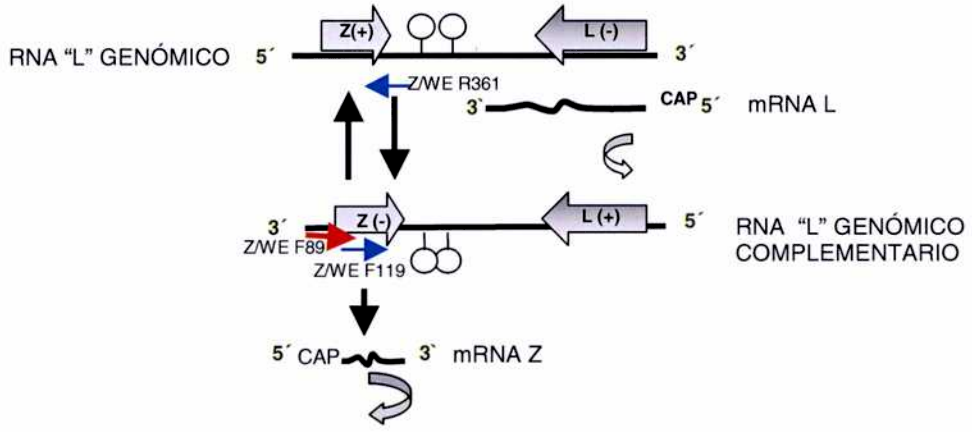


Figura MM. 3. Esquema del fragmento L del RNA genómico. La flecha roja indica el primer utilizado para la síntesis del cDNA correspondiente. En flechas azules se indican los primers utilizados para la amplificación de segmentos específicos mediante PCR.

Todas las amplificaciones fueron analizadas en geles de agarosa-TAE 1,5 %, y teñidos luego con bromuro de etidio para visualizar las bandas correspondientes a los segmentos genómicos amplificados.

MM. 10. Efecto de los inhibidores sobre la síntesis de proteínas virales por radioinmunoprecipitación

Monocapas de células Vero fueron infectadas con JUNV ó TCRV a una m.i de 1 UFP/cél. Luego de 1 h. de adsorción, se agregó MM conteniendo o no el correspondiente compuesto. A las 48 hs. p.i. se realizó un ayuno previo durante 1,5 h. en medio sin metionina ni cisteína. Luego se incorporó la marca radioactiva (Expre^{35}S^{35}S, 100 µCi/ml, NEN, USA) y se incubó durante 3 h. Concluído el período de marcación, las células se lavaron 3 veces con PBS y se lisaron con 75 µl de buffer RIPA (0,15 M NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 0,4 mM PMSF, 1 % deoxicolato de sodio, 0,01 M Tris-HCl pH 7,4). La suspensión celular fue congelada y descongelada 3 veces, agregando en cada ciclo inhibidores de proteasas (aprotinina, PMSF, cocktail de proteasas (4-aminoetil-sulfonil-fluorurobenceno (AEBSF), bestatina, pepstatina A), SIGMA, USA), sonicada y centrifugada 10 min a 10000 x *g*. El sobrenadante se utilizó como fuente de antígenos virales para su posterior inmunoprecipitación y electroforesis en gel de poliacrilamida.

Para el análisis de la síntesis de proteínas virales en células infectadas con viriones inactivados, las células Vero fueron infectadas con JUNV ó TCRV inactivados previamente a 37°C durante 1,5 h y luego se procedió de igual forma como se describió anteriormente.

Para la inmunoprecipitación, los sobrenadantes se incubaron con suero de conejo anti-JUNV o suero de cobayo anti-TRCV, respectivamente, a una dilución de 1/50, durante 30 min a 37°C y 90 min a 4 °C. Luego se utilizó como medio de arrastre de los complejos inmunes, 30 µl de proteína A-sefarosa y se dejó incubar durante otros 30 min a 37°C y 90 min a 4 °C. Se realizaron tres ciclos de lavado con buffer RIPA, se resuspendió en buffer para muestra de electroforesis (Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, SDS 5 %, glicerol 10 %, β-Me-OH 2 %, azul de bromofenol 0,005 %) y se hirvió a 100°C por 2 min.

Las proteínas virales marcadas se sometieron a electroforesis en minigeles de poliacrilamida (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 con SDS 10%) 12 ó 18 %, según las

proteínas estudiadas, con un concentrador de 4 % (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 con SDS 10 %). En los mismos geles se sembraron patrones de peso molecular. Las corridas se llevaron a cabo durante 50 min a 150 V y 90 mA. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron en azul brillante de Coomassie R250 al 0,25 % en metanol:agua:ácido acético glacial (50:50:10) para marcar las bandas de los marcadores de peso molecular y luego se decoloraron con la misma mezcla pero sin colorante.

Los geles desteñidos se sometieron a fluorografía, realizando 3 lavados de 1 h cada uno con distintas concentraciones crecientes de DMSO, luego se incubó en una solución de 2,5-difeniloxazol (PPO) durante 3 h, se secaron y se expusieron con una película Agfa Curix RPI a -70°C durante el tiempo adecuado.

MM. 11. Efecto de los inhibidores sobre la síntesis de proteínas virales por *Western blot*

Monocapas de células Vero E6 fueron infectadas con LCMV a una m.i de 1 UFP/cél. Luego de la hora de adsorción, se agregó MM conteniendo o no el disulfuro NSC20625 (40 µM). A las 48 h p.i. las células se lavaron con PBS y se lisaron con 500 µl de buffer RIPA. Las proteínas virales se sometieron a electroforesis en minigeles de poliacrilamida 12 ó 15 %, según las proteínas estudiadas. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore, USA) durante toda la noche. Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche descremada durante 30 min a T° ambiente. Para revelar las bandas específicas se utilizó un antisuero de cobayo anti-LCMV en una dilución 1:400, a 4°C, durante 2 h. Se realizó un control con anticuerpo anti-β-actina. Como anticuerpo secundario se utilizó anti IgG de cobayo conjugado con peroxidasa (SIGMA, USA), 1:10000, durante 1 h a T° ambiente. Para la detección de los complejos inmunes se utilizó ECL™ *(Enhanced chemiluminescence)* (Amersham-Pharmacia, USA).

Para el análisis de la síntesis de proteínas virales en células infectadas con viriones inactivados, las células Vero E6 fueron infectadas con LCMV inactivado

previamente a 37°C durante 1,5 h con el compuesto NSC20625 (100 µM) y luego se procedió de igual forma como se describió anteriormente.

MM. 12. Análisis de la capacidad antigénica de las glicoproteínas de viriones inactivados

Se inocularon 4 grupos de 6 ratones OF1 de 4-6 semanas de vida cada uno, por vía intraperitoneal (i.p) con 0,1 ml conteniendo respectivamente 10^4 UFP de JUNV ó TCRV, inactivado ó no con el compuesto NSC20625 (100 µM) durante 1,5 h a 37°C. Cada 15 días, durante los primeros 2 meses, los ratones fueron sangrados e inoculados nuevamente con la misma dosis. Al día 150 se inocularon los animales con $2x10^4$ UFP de cada virus, y luego de 7 días fueron sangrados por última vez. Al momento de cada sangrada, se extrajo sangre de la cola de los animales y se procesó cada muestra mediante una centrifugación de 20 min a 4000 rpm a 4°C, rescatando el sobrenadante para la obtención de sueros. Seguidamente se realizaron neutralizaciones mezclando diluciones al medio de cada uno de los sueros previamente inactivados a 56°C durante 30 min, con 100 UFP de JUNV ó TCRV, respectivamente. Las mezclas se incubaron durante 30 min a 37°C. La infectividad residual se cuantificó por el método de UFP.

MM. 13. Efecto de los inhibidores sobre las proteínas de viriones purificados

Para los ensayos realizados con JUNV, alícuotas de 10 µl de JUNV purificado y marcado según *MM. 7*, fueron incubadas ó no, con el compuesto NSC20625 (100 µM) durante 1,5 h a 37°C. Las muestras fueron resuspendidas en buffer para muestra de electroforesis, conteniendo ó no, β-Me-OH (condiciones reductoras y no reductoras, respectivamente), y sometidas a corridas electroforéticas en geles de SDS - poliacrilamida 17 %, en condiciones reductoras y no reductoras, respectivamente. Finalizada la corrida electroforética, se realizó una fluorografía, se secó el gel y se lo dejó exponer el tiempo adecuado.

Para los ensayos realizados con LCMV, alícuotas de 10 µl de LCMV purificado, fueron incubadas con el compuesto AT-2 (100 µM) durante 1,5 h a 37°C. Luego se realizó una corrida electroforética en geles de poliacrilamida, en condiciones reductoras y no reductoras, respectivamente, y las bandas proteicas fueron reveladas por *Western blot*, como se describió en *M M. 11.* Para revelar las bandas correspondientes a Z, se utilizó un antisuero de conejo anti-Z-LCMV en una dilución 1:600, a 4°C, durante toda la noche con agitación. Como anticuerpo secundario se utilizó anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (SIGMA, USA), 1:10000, durante 1 h a T° ambiente.

MM. 14. Purificación de la proteína de fusión GST-Z- LCMV

Se inocularon 5 ml de medio Luria Bertoni (LB) adicionado con 100 µg/ml de ampicilina (Amp) con *E.coli/BL21* conteniendo el plásmido pGEX-2T/Z-LCMV (Borden *et al.*, 1998b). Se incubó el cultivo a 37°C con agitación durante toda la noche. A la mañana siguiente, se transfirió el cultivo bacteriano a un erlenmeyer conteniendo 500 ml de medio LB suplementado con Amp (100 µg/ml) y se lo dejó crecer a 37°C, hasta alcanzar la fase logarítmica (DO_{A600}= 0,5). Luego se indujo la expresión de la proteína de fusión mediante el agregado de isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 0,4 mM y dejándose crecer el cultivo por 3 h más, a 37°C con agitación. Las células fueron centrifugadas a 10000 rpm (Beckman JAL-10500), durante 10 min a 4°C, lavadas con PBS frío y centrifugadas nuevamente. El *pellet* de bacterias fue resuspendido en 30 ml de PBS adicionado con 750 µl de una mezcla de inhibidores de proteasas (SIGMA, USA), y se sometió la muestra a varios ciclos de congelamiento y descongelamiento, agregando siempre PMSF 1 mM luego de cada ciclo. Para lograr la lisis celular completa, se sonicó la muestra y se agregó 0,5 % de Tween 20 para incrementar la solubilización de la proteína. El lisado fue clarificado a 12000 rpm (Beckman JA-12), durante 15 min a 4°C, luego el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, el pH fue ajustado a 7,4 con NaOH 1 M y filtrado a través de un filtro con poro de 45 µm. Luego, el filtrado conteniendo la proteína de

fusión GST-Z-LCMV fue sometido a una columna de glutatión (Amersham-Pharmacia, USA). Por último, con el objetivo de purificar la proteína se realizó una digestión con trombina para liberar así la proteína Z.

MM. 15. Efecto de los inhibidores sobre la proteína Z purificada

5 µl de proteína Z-LCMV purificada (219 µg/ml) fueron incubados durante 1,5 h con los compuestos NSC20625, AT-2 y ADA, con concentraciones finales de los compuestos en el rango 0,1-10 mM. Luego del tratamiento, las muestras fueron corridas en geles de SDS - poliacrilamida 18 %, en condiciones reductoras y no reductoras, respectivamente, y reveladas por *Western blot*, como se describió en *MM. 13.*

MM. 16. Efecto de los inhibidores sobre la replicación viral en células infectadas

Monocapas de 2 x10^6 células HepG2 crecidas en botellas T25 se infectaron con 2x10^6UFP de LCMV, cepa WE. Luego de la hora de adsorción, se agregó MM conteniendo o no el compuesto NSC20625 (40 µM). Todas las muestras fueron procesadas a las 48 h p.i. para la obtención de RNA. La extracción de RNA se realizó utilizando el kit comercial TRIzol (Gibco BRL-Life Technologies, USA). El kit Qiagen RNase-free DNase fue utilizado para asegurar que no haya contaminación con DNA. La cuantificación de RNA obtenido se realizó a través de la medición de absorbancia a 260 nm. El RNA extraído de cada muestra fue utilizado como molde para la síntesis de cDNA. Se tomaron 2 µg de cada muestra de RNA y se los llevó a un volumen final de 8 µl. Se agregaron 2 µl de *random primers* en una concentración 10 µM, 4 µl de buffer 5x para la transcriptasa reversa de AMVB polimerasa (Promega, USA), 1 µl de una solución conteniendo los 4 dNTPs, 1 µl (4 U) de la enzima responsable de la retrotranscripción, 1 µl de RNasin (Promega, USA) y 3 µl de H_2O libre de RNAsas. El volumen final de reacción fue de 20 µl. La reacción se llevó a cabo a 42°C durante un período de 1h.

El cDNA sintetizado con *random primers* se empleó como molde en la reacción de una *real time* PCR. El volumen final de reacción fue de 25 µl. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en presencia de buffer de reacción Master mix 2xSYBR (Applied Biosystems, USA) y *primers* 1 µM. Los gráficos de las amplificaciones fueron expresados como cantidades relativas (QR), calculadas con los valores de C_T analizados con el sofware 5700 SDS (Perkin-Elmer Systems), donde:

C_T es el número mínimo de ciclos de PCR (amplificaciones) necesario para que el producto de amplificación sea detectado por el aparato. A menor valor de C_T, mayor es la concentración de sustrato con el que se inicia la reacción. Los valores de C_T fueron normalizados usando la amplificación del gen celular *gapdh* como control interno. Se realizó un ánalisis de disociación de los productos de PCR para confirmar especificidad de la reacción.

C_T : n ciclos de PCR

ΔC_T: es la diferencia entre el promedio de los valores de C_T de las muestras de interés (Z) y los valores de C_T de los controles internos (*gapdh*) (ΔC_T= C_T Z - C_T gapdh).

$\Delta\Delta C_T$: es la diferencia entre los valores promedio de ΔC_T para el gen de interés en las condiciones control (células infectadas y no tratadas) y el promedio de los valores de C_T de cada muestra ($\Delta\Delta C_T$= ΔC_T Z de células controles - ΔC_T Z de células tratadas).

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

Para las reacciones de amplificación mencionadas se utilizaron *primers* específicos para el gen de Z/WE:

-Z/WE F89.HindIII (89-105): 5'-AAGCTTATGGGCCAAGGCAAGTC-3', *primer* complementario a la secuencia ubicada en el extremo 3´ del RNA L genómico complementario de LCMV-WE (*Figura MM. 3*).

-Z/WE R361.XhoI (340-361): 5'-CTCGAGTTACTCCTCATAGGGAGG TAGG-3', *primer* complementario a la secuencia ubicada en el extremo 5´ del segmento genómico Z del RNA L genómico de LCMV-WE (*Figura MM. 3*).

Las condiciones de la PCR fueron: 4 min a 94°C, 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 1 min a 60°C, 2 min a 72°C y un ciclo de 10 min a 72°C.

Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa, como se indicó anteriormente en *MM. 9.*

MM. 17. Efecto de los inhibidores sobre la transcripción de *prh (proline-rich homeobox)*

Monocapas de 2 x10^6 células HepG2 crecidas en botellas T25 se infectaron con 2x10^6 UFP de LCMV, cepa WE. Se realizó la extracción de RNA, y se lo utilizó como molde para la síntesis de cDNA, tal como se describió en *MM. 16.* Luego se realizó una reacción de PCR, siendo el volumen final de reacción de 10 µl.

Se utilizaron los *primers* específicos para el gen *prh*:

-PRH (Forward): 5´ AGGAAAGGCGGCCAGGTGAG 3´

-PRH (Reverse): 5´ TTATTGCTTTGAGGGTTCTCCTG 3´

Las condiciones de la PCR fueron: 4 min a 94°C, 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 1 min a 60°C, 2 min a 72°C y un ciclo de 10 min a 72°C. Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa como se indicó anteriormente en *MM. 9.*

MM. 18. Análisis del patrón de distribución de PRH en las células infectadas y tratadas

Células HepG2 fueron crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 12 pocillos e infectadas con LCMV, cepa WE a una m.i de 1. Luego de la hora de adsorción a 37°C, las células se lavaron y fueron cubiertas con MM, conteniendo 40 µM de NSC20625. Las microplacas fueron mantenidas durante 72 h a 37°C en estufa de CO_2 hasta el momento de la cosecha de los sobrenadantes. Luego se titularon los sobrenadantes por el método de UFP en células Vero E6, para confirmar la acción inhibitoria del compuesto. Al mismo tiempo las células fueron fijadas con metanol durante 10 min a – 20°C para ser luego incubadas con antisuero de conejo anti-Z (1:400) y antisuero de conejo anti-PRH (1:200) durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS y luego se colocó durante 30 min a temperatura ambiente, un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón (1:100) conjugado con el fluorocromo correspondiente, 5(6)-isotiocianato de fluoresceína (FITC) o rojo Texas (1:100), respectivamente (Jackson Immunoresearch, USA). Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 0.1%, luego con PBS y finalmente con agua. Los lavados fueron todos de 5 min. Al finalizar se realizó una tinción con DAPI (4´,6-diamino-2-fenil indol) para revelar los núcleos. Los cubreobjetos se montaron en Vectoshield (Vector Laboratorios, USA). Los filtros correspondientes fueron usados en forma independiente (568 nm de excitación para rojo y 488 nm de excitación para verde). Para su análisis se realizó una superposición de imágenes, observadas en un microscopio confocal láser (Zeiss).

MM. 19. Efecto de los inhibidores sobre la expresión de antígenos virales

Monocapas de células Vero crecidas sobre cubre objetos en microplacas de 24 cavidades fueron infectadas a una m.i de 0,1 UFP/cél con 0,1 ml de JUNV. Luego de 1 hora de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y se trató con ANNB (50 µM). Pasadas 24 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes para su titulación por UFP y se lavaron las monocapas 3 veces con PBS.

Para realizar la inmunofluorescencia citoplamática se fijaron las células con metanol por 10 min a -20°C. Luego del período de fijación se realizaron 3 lavados con PBS, en ambos casos, y se agregó 50 µg/ml de IgG de cabra por 15 min a 37°C como bloqueante.

Para revelar los antígenos virales se utilizó suero policlonal de conejo anti-JUNV. Por último se realizó una incubación con suero anti-IgG de conejo conjugado con fluoresceína, por 30 min a 37°C. Luego de un lavado final con agua, las células fueron montadas en una solución tamponada de glicerol conteniendo 2,5 % de 1,4-diazabiciclo octano (DABCO). El porcentaje de células fluorescentes en cada preparación fue calculado de 20 campos ópticos seleccionados al azar, tomando como control las monocapas infectadas y sin tratar.

RESULTADOS

R. I. Evaluación de la actividad biológica de los compuestos

R. I.1. Actividad citotóxica y antiviral

Con el fin de establecer la efectividad antiviral contra los arenavirus de la serie de 15 agentes electrofílicos presentados en la *Figura MM. 1*, se evaluó la citotoxicidad y la capacidad inhibitoria de estos compuestos contra JUNV y TCRV.

En primer lugar, se midió la citotoxicidad de los compuestos en células Vero por el método del MTT, para determinar la CC_{50} (*Tablas R.1* y *2*). Luego, se determinó la actividad antiviral mediante un ensayo de inhibición del rendimiento viral de JUNV y de TCRV, en células Vero, con el próposito de establecer la CE_{50}. En este último caso, las concentraciones ensayadas para cada uno de los compuestos estuvieron todas dentro del rango de viabilidad celular determinada previamente en el ensayo de citotoxicidad. Finalmente, se calculó el índice de selectividad (IS), que es la relación CC_{50}/CE_{50} (*Tablas R. 1* y *2*).

Tabla R. 1. Actividad citotóxica y antiviral contra los arenavirus JUNV y TCRV de compuestos disulfuros

Compuestos	CC_{50} (µM)	CE_{50} (µM)		IS	
		JUNV	TCRV	JUNV	TCRV
Aromáticos					
NSC4493	363,2	36,5	20,6	10,0	17,7
NSC20625	94,4	9,3	3,6	10,2	26,2
NSC203	143,1	19,8	12,5	7,2	11,5
AT-2	>400,0	55,1	37,5	>7,3	>10,7
NSC677459	>400,0	100,0	84,8	>4,0	>4,7
Alifáticos					
TED	9,7	4,6	NH	2,1	NH
Ditianos					
NSC624151	>400,0	17,0	42,6	>23,5	>9,4
NSC624152	352,8	38,2	11,4	9,2	30,9
Ribavirina	>400,0	18,3	NH	>21,8	NH

CC_{50}: concentración citotóxica 50 %, determinada en células Vero, luego de 48 h de incubación con cada compuesto, mediante el método del MTT. **CE_{50}**: concentración efectiva 50 %, determinada mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral de JUNV y TCRV, en células Vero a las 48 h de infección. **IS**: índice de selectividad, CC_{50}/ CE_{50}. **I**: inactivo. **NH**: no hecho.

Los disulfuros presentados en la *Tabla R. 1* mostraron valores de CE_{50} en el rango de 3,6 -100 µM. El disulfuro alifático TED fue sumamente tóxico. Los disulfuros aromáticos NSC203, AT-2 y NSC677459 mostraron una actividad moderada, contra ambos arenavirus, con IS entre 4 -11,5. Por último, los más activos, todos ellos con IS más elevados, al menos contra uno de ambos arenavirus, fueron los ditianos NSC624151 y NSC624152 y los aromáticos NSC4493 y NSC20625. Este último mostró siempre valores de CE_{50} menores a la del resto de los compuestos. En todos los ensayos se utilizó la ribavirina como sustancia de referencia. Los compuestos más selectivos mostraron IS similares o superiores al compuesto de referencia.

Tabla R. 2. Actividad antiviral contra los arenavirus JUNV y TCRV de compuestos azoicos

Compuestos	CC_{50} (µM)	CE_{50} (µM)		IS	
		JUNV	TCRV	JUNV	TCRV
Azoicos					
ANNB	363,7	6,5	26,2	56,0	13,9
AB	>400,0	19,7	35,2	>20,3	>11,4
AABSSN	>400,0	>100,0	>100,0	I	I
ADA	>200,0	>100,0	>100,0	I	I
ADF	>200,0	>100,0	>100,0	I	I
Reducidos					
Biurea	>200,0	42,1	NH	>4,8	
CAPH	257,7	8,9	20,5	29,0	12,6

CC_{50}: concentración citotóxica 50 %, determinada en células Vero, luego de 48 h de incubación con cada compuesto, mediante el método del MTT. **CE_{50}**: concentración efectiva 50 %, determinada mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral de JUNV y TCRV, en células Vero a las 48 h de infección. **IS**: índice de selectividad, CC_{50}/ CE_{50}. **I**: inactivo. **NH**: no hecho.

En general, los compuestos azoicos mostraron menor acción inhibitoria que los disulfuros. De los compuestos presentados en la *Tabla R. 2*, los compuestos AABSSN, ADA y ADF fueron inactivos, la biurea mostró actividad moderada y AB, ANNB y CAPH mostraron interesantes valores de CE_{50}, con IS >10.

R. I. 2. Actividad virucida

Con el propósito de evaluar si la acción antiviral observada se debía al bloqueo de algún paso del ciclo de replicación viral o estaba dirigida directamente hacia la partícula viral en sí misma, se estudió la actividad virucida de todos los compuestos ensayados. Como se observa en las *Tablas R. 3* y *4*, se determinaron las CI_{50} contra JUNV y TCRV de los diversos compuestos. El comportamiento de

los mismos fue muy variable, algunos mostraron un potente efecto inactivante en tanto que otros no afectaron la capacidad infectiva de los viriones.

Con los resultados obtenidos, se calculó la relación CE_{50}/CI_{50} (*Tablas R. 3 y 4*), para así poder clasificar los compuestos de acuerdo a sus propiedades antivirales y/o virucidas.

Tabla R. 3. Actividad virucida de disulfuros

Compuestos	CI_{50} (µM)		CE_{50}/CI_{50}	
	JUNV	TCRV	JUNV	TCRV
Aromáticos				
NSC4493	4,2	5,9	8,7	3,5
NSC20625	0,7	1,3	13,3	2,8
NSC203	1,8	1,6	11,0	7,8
AT-2	5,0	1,6	11,2	23,4
Alifáticos				
NSC677459	> 50,0	> 50,0	< 2,0	< 1,7
TED	8,1	NH	0,6	NH
Ditianos				
NSC624151	3,2	0,4	5,3	106,5
NSC624152	3,2	0,2	11,9	57,0

CI_{50}: concentración inactivante 50 %, determinada mediante inactivación a 37°C durante 1,5 h. **CE_{50}/CI_{50}** : relación entre concentración efectiva 50 % (*Tabla R. 1*) y concentración inactivante 50 %. **I**: inactivo. **NH**: no hecho.

Tabla R. 4. Actividad virucida de compuestos azoicos

Compuestos	CI_{50} (μM)		CE_{50}/CI_{50}	
	JUNV	TCRV	JUNV	TCRV
Azoicos				
ANNB	>100,0	>100,0	< 0,01	< 0,3
AB	>100,0	>100,0	< 0,2	< 0,4
AABSSN	>100,0	>100,0	I	I
ADA	7,6	5,3	>13,1	>18,9
ADF	>100,0	>100,0	I	I
Reducidos				
Biurea	>100,0	>100,0	< 0,4	
CAPH	31,3	6,3	0,3	3,9

CI_{50}: concentración inactivante 50 %, determinada mediante inactivación a 37°C durante 1,5 h. **CE_{50}/CI_{50}** : relación entre concentración efectiva 50 % (*Tabla R. 2*) y concentración inactivante 50 %. **I**: inactivo. **NH**: no hecho

De acuerdo a los valores calculados, los agentes se clasificaron en 4 categorías diferentes:

1) Los compuestos con capacidad antiviral y virucida; en esta categoría claramente se diferencian 2 clases de agentes: a) aquéllos cuya relación CE_{50}/CI_{50} está alrededor de 1, es decir presentan similar eficacia en ambos tipos de reacciones, inhibición del rendimiento viral en la célula infectada o inactivación directa del virión fuera de la célula. Los mismos son: TED y CAPH; b) compuestos con una relación CE_{50}/CI_{50} >> 1, es decir cuya actividad virucida es superior al efecto antiviral en la célula, como lo son los disulfuros aromáticos NSC20625, NSC4493, NSC203 y el AT-2, y los ditianos NSC624151 y NSC624152. Debe notarse que hay un amplio rango de relación actividad antiviral/actividad virucida, según el compuesto y el virus.

2) Los compuestos antivirales que no poseen una acción inactivante, como el disulfuro aromático NSC677459 y los compuestos azoicos ANNB, AB y la biurea.

3) Los compuestos que no ejercen una acción antiviral pero sí son inactivantes, como ADA.

4) Los compuestos totalmente inactivos, como los azoicos AABSSN y ADF.

En base a los resultados obtenidos hasta acá, se seleccionaron los compuestos más activos por su acción virucida (NSC20625, AT-2, NSC624151 y NSC6142152 en la clase 1b, y ADA en la clase 3) ó antiviral (ANNB en la clase 2), fin de estudiar sus propiedades y modo de acción.

R. II. Compuestos virucidas

R. II.1. Eficiencia virucida contra arenavirus del Nuevo y Viejo Mundo

En esta categoría se incluyen los compuestos que son estrictamente inactivantes, como es el caso del compuesto azoico ADA, pero además los compuestos que, si bien presentaron una acción antiviral, son mucho más efectivos como inactivantes, sugiriendo que la acción antiviral en realidad podría deberse principalmente a su gran actividad virucida. Este es el caso de los disulfuros aromáticos NSC20625, AT-2 y los ditianos NSC624151 y NSC624152.

Las diferencias en la capacidad virucida y antiviral de estos compuestos se evidencia claramente al analizar la respuesta en función de la dosis para ambas actividades biológicas en ensayos de inactivación de virus e inhibición del rendimiento, respectivamente (*Figura R. 1)*.

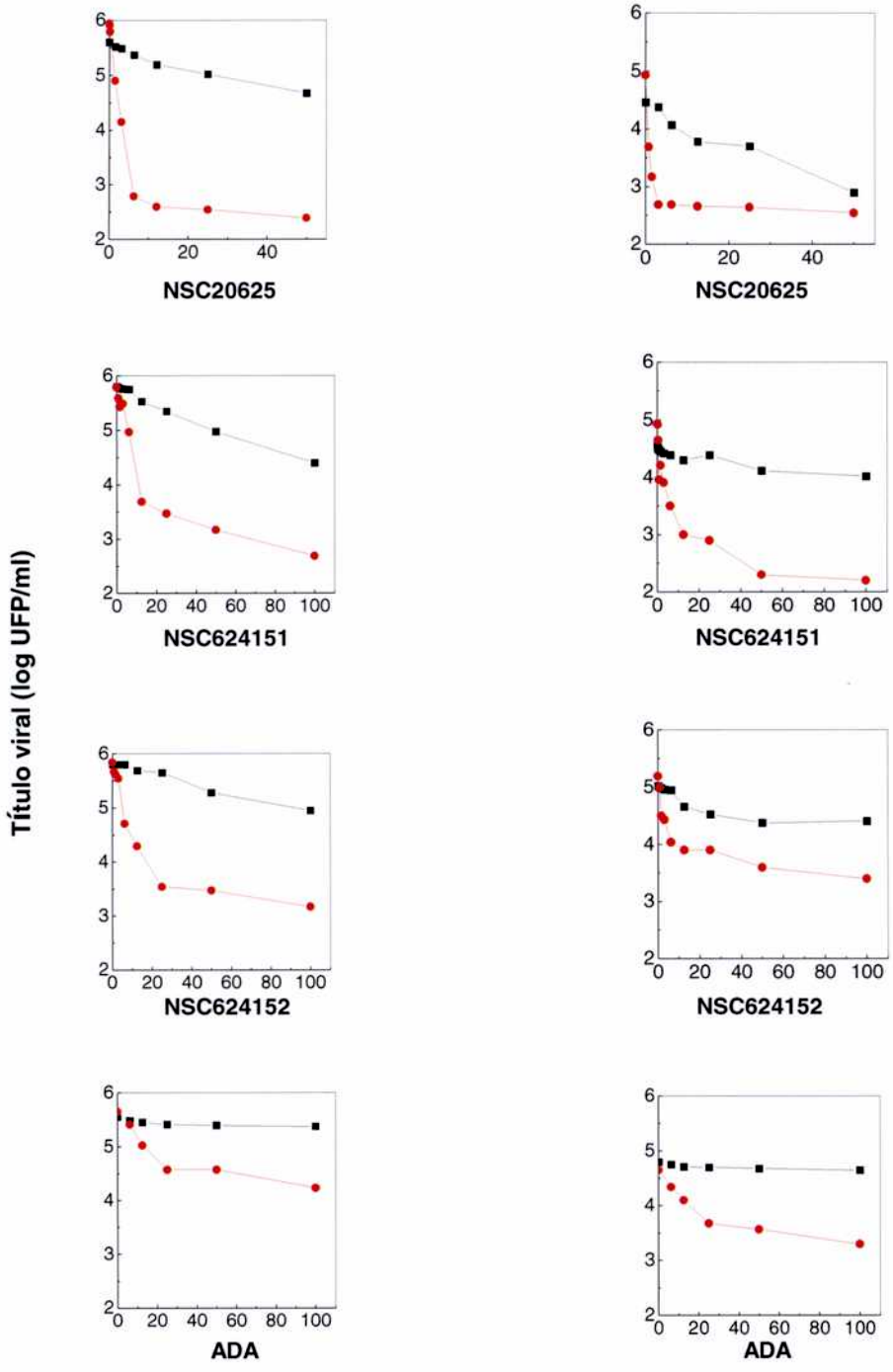


Figura R. 1. Respuesta en función de la dosis para ambas actividades biológicas contra JUNV y TCRV. Actividad antiviral (■) medida por inhibición del rendimiento viral a las 48 h p.i. Actividad virucida (●) determinada por inactivación directa del virus durante 1,5 h a 37°C; la infectividad remanente se tituló por UFP. Los datos representan el promedio de datos de experimentos independientes.

Se observa que el disulfuro aromático NSC20625 fue capaz de reducir el valor del título, de JUNV y TCRV, más de 1 logaritmo cuando fue colocado en las células, inmediatamente después de la adsorción viral. La actividad virucida que presentó este compuesto fue mucho más notoria, llegando a inactivar casi el 99,9% de las partículas virales presentes en la suspensión (con una disminución en el título de 2,5-3 logaritmos). Así también, los ditianos NSC624151 y NSC624152 fueron efectivos inhibidores de la replicación viral, llegando a reducir el valor del título de ambos virus hasta un máximo de 1 logaritmo, luego del tratamiento con los compuestos durante 48 h p.i. Las curvas de inhibición del rendimiento correspondientes a ambos compuestos fueron similares. Al igual que con NSC20625, la actividad virucida de estos ditianos fue mucho más efectiva que la acción antiviral, ya que luego de la inactivación el valor del título viral remanente, tanto para JUNV como para TCRV, cayó entre 2-3 logaritmos. Por último, la azodicarbonamida, no presentó actividad antiviral contra ninguno de los virus, siendo sólo efectiva directamente contra la partícula viral.

El potente efecto inactivante de esta serie de compuestos se evidenció aún más al calcular las CE_{90} y CI_{90}, a partir de los datos de la *Figura R. 1* y comparar los valores correspondientes.

Tabla R. 5. Eficiencia virucida contra JUNV y TCRV

Compuesto	CI_{90} (µM)		CE_{90} (µM)	
	JUNV	TCRV	JUNV	TCRV
NSC20625	1,6	3,1	50,0	37,6
AT-2	12,0	6,3	94,2	48,0
NSC624151	8,0	3,1	73,3	>100,0
NSC624152	6,1	6,2	100,0	>100,0
ADA	45,8	32,5	>100,0	>100,0

CI_{90}: concentración inactivante 90%, determinada mediante el ensayo de inactivación directa durante 1,5 h. a 37°C. **CE_{90}**: concentración efectiva 90 %, determinada mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral, en células Vero a las 48 hs. de infección.

Excepto para ADA, los valores de CI_{90} en general se mantuvieron por debajo de 10 µM contra los 2 virus (*Tabla R. 5*). Por el contrario, las CE_{90} mostraron valores superiores a 50-100 µM.

También se incorporó al estudio el LCMV, virus prototipo de la familia, perteneciente al grupo del Viejo Mundo, para comprobar así la eficacia de los compuestos contra otro tipo de arenavirus. En la *Tabla R. 6* se muestran los valores obtenidos luego de evaluar ambas actividades biológicas contra los compuestos virucidas seleccionados.

Tabla R. 6. Actividad virucida y antiviral contra LCMV

Compuesto	LCMV	
	CI_{50} (µM)	CE_{50} (µM)
NSC20625	3,5	8,7
AT-2	6,2	14,0
NSC624151	25,0	6,8
NSC624152	19,3	4,5
ADA	12,5	>100

CI_{50}: concentración inactivante 50 %, determinada mediante el ensayo de inactivación directa durante 1,5 h a 37°C. **CE_{50}**: concentración efectiva 50 %, determinada mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral, en células Vero E6 a las 48 h de infección.

Todos los compuestos mostraron valores de CI_{50} comparables entre los distintos arenavirus (*Tablas R. 3, 4 y 6*), confirmando que son inactivantes no sólo de JUNV y TCRV, ambos virus pertenecientes al grupo del Nuevo mundo, sino también de LCMV. El compuesto más efectivo fue el disulfuro NSC20625. Sin embargo, para el LCMV los valores de CE_{50} y CI_{50} no mostraron diferencias tan significativas, aunque se observó una disminución mayor del título viral en los ensayos de inactivación.

R. II. 2. Estudio de los parámetros que afectan la inactivación

Además de la concentración del compuesto, se analizó el efecto de distintas condiciones de incubación (tiempo y temperatura) sobre la acción inactivante de los compuestos contra los arenavirus JUNV y TCRV.

Como se observa en la *Figura R. 2*, la pérdida de infectividad comenzó a los pocos minutos de estar el virus en contacto con los compuestos, siendo el efecto inactivante importante ya a los 30 min de incubación. Los gráficos muestran el perfil de una cinetica de primer orden. ADA fue el compuesto que presentó la cinética de inactivación fue más lenta. El disulfuro NSC20625 se mostró nuevamente como el más efectivo agente virucida, capaz de inactivar el 95 % de las partículas virales en 20 min. y más del 99,9 % de JUNV luego de 90 min.

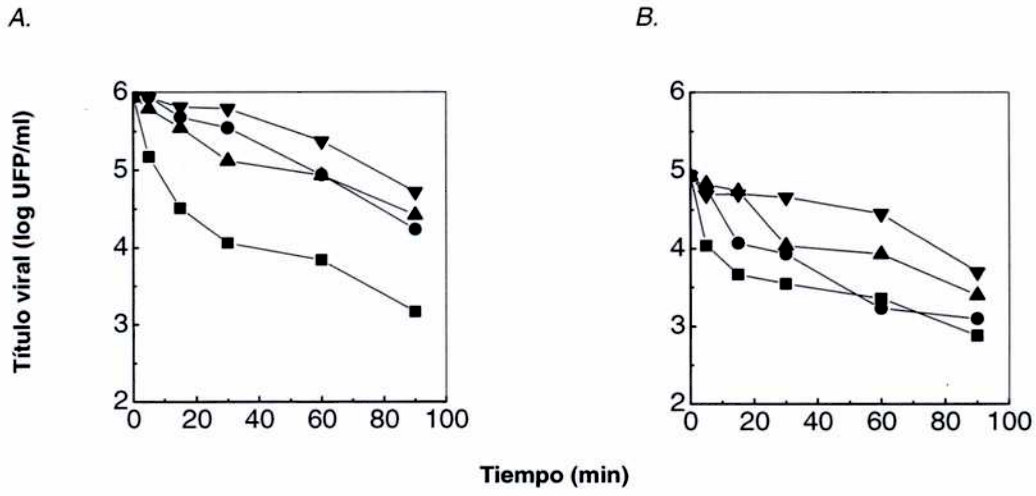


Figura R. 2. Actividad virucida en función del tiempo. Mezclas de $5x10^4$ UFP de JUNV (*A*) ó TCRV (*B*) se incubaron a 37°C durante distintos tiempos con cada compuesto (NSC20625 (■), NSC624151 (●) y NSC624152 (▲), 20 µM; ADA, 50 µM (▼)), luego las muestras se diluyeron y se tituló la infectividad remanente por UFP.

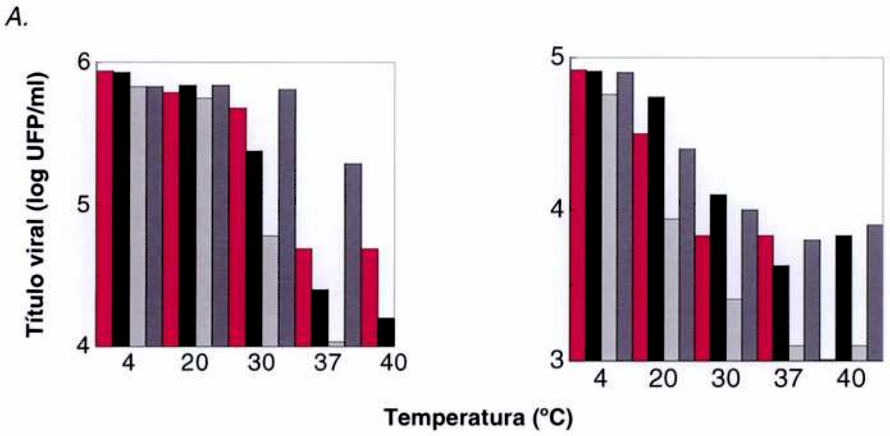


Figura R. 3. Actividad virucida en función de la temperatura. Mezclas de 5 x 10^4 UFP de JUNV (*A*) ó TCRV (*B*) se incubaron 1.5 h. a distintas temperaturas con cada compuesto (NSC20625 ■, NSC624151■ y NSC624152 □, 20 µM; ADA ■, 50 µM). Luego las muestras se diluyeron y se tituló la infectividad remanente por UFP.

Además, como se muestra en la *Figura R. 3* se comprobó que la interacción entre los compuestos y los viriones es dependiente de la temperatura, ya que a 4ºC los compuestos no tuvieron ningún efecto sobre los mismos, siendo máxima la inactivación a los 37- 40ºC.

R. II. 3. Mecanismo de acción inactivante de compuestos virucidas

Para intentar dilucidar el modo de acción de los compuestos virucidas, se estudió la capacidad de las partículas virales inactivadas con estos agentes, de llevar a cabo las distintas etapas del ciclo de replicación viral, y establecer así dónde se encuentra bloqueada la infección.

R. II. 3.1. Adsorción e internalización

En primer lugar, se midió la unión a células Vero de viriones marcados radioactivamente e incubados con MM o con los compuestos NSC20625 y NSC624152, durante 1,5 h a 37ºC (*Figura R. 4 A).*

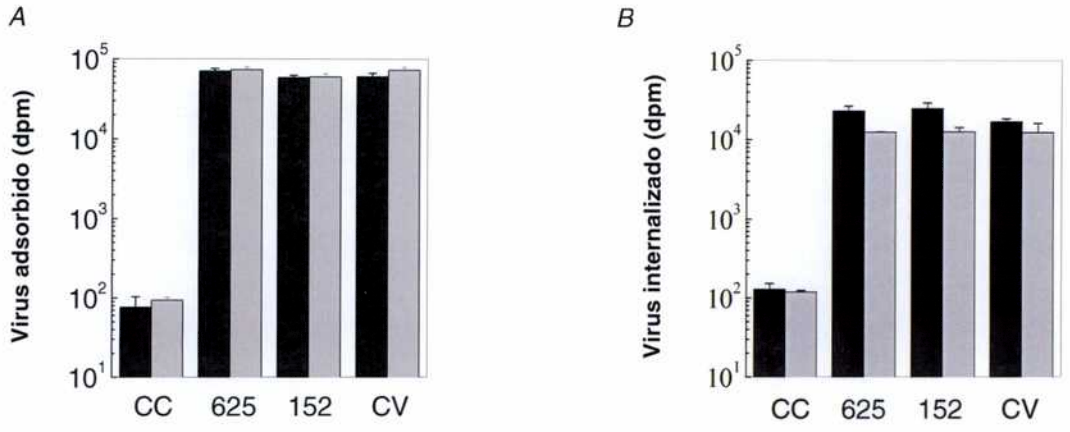


Figura R. 4. Adsorción e internalización de viriones de JUNV (barras negras) y TCRV (barras grises) marcados radioactivamente. Para la adsorción (A), se inocularon células Vero con la suspensión viral purificada y marcada con EXPRE^{35}S^{35}S (5x10^8 dpm/ml y 1,3 x 10^7 UFP/ml) e inactivada previamente con el compuesto correspondiente (20 µM) durante 1,5 h a 37°C. Luego de 0 y 40 min de incubación a 4°C, se cuantificó el virus adsorbido en un contador de centelleo. Para la internalización (B), después de la adsorción a 4°C, se incubaron los cultivos durante 0 y 60 min a 37°C, y se solubilizaron para cuantificar el virus internalizado. **CC**: control celular; **625**: viriones inactivados previamente con NSC20625; **152**: viriones inactivados previamente con NSC624152; **CV**: control viral.

Para la internalización (*Figura R. 4 B)*, después de la adsorción a 4°C, se incubaron los cultivos durante 0 y 60 min a 37°C, para permitir la entrada del virus a la célula.

Los resultados obtenidos demuestran que la cantidad de virus inactivado adsorbido e internalizado fue similar al del virus control, indicando que estos viriones inactivados con los compuestos NSC20625 y NSC624152, entran a la célula, es decir que se adsorben y penetran de la misma forma que los viriones sin tratamiento. A partir de estos resultados se puede inferir que aparentemente la funcionalidad biológica de las glicoproteínas de envoltura GP1 y GP2 se preserva luego del tratamiento con el compuesto inactivante, ya que la unión de los viriones inactivados al receptor celular ocurre con la misma eficiencia que en los viriones nativos y la internalización vía fusión entre las membranas virales y endosomales no está afectada en los viriones inactivados.

R. II. 3. 2. Transcripción y replicación

A continuación se estudió si los viriones inactivados e internalizados en las células Vero eran capaces de transcribir y replicar su RNA.

Para ello, se realizó una reacción de RT-PCR a partir del RNA extraído de células Vero infectadas con JUNV y JUNV inactivado con NSC20625. A las 48 h p.i. se extrajo el RNA para luego sintetizar cDNA con el *primer* "vN (186)" que es complementario a la secuencia del extremo 5' del mRNA de NP. Posteriormente se llevó a cabo la amplificación de un segmento de 186 pb con los *primers* específicos "vN (186)" y "vcN (ARENA)", este último complementario a los extremos 3´ de las formas genómica y genómica complementaria del RNA S.

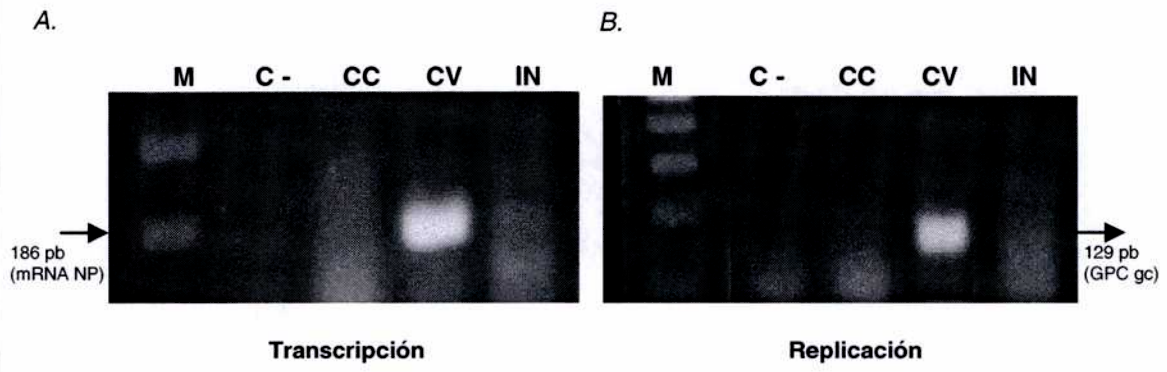


Figura R. 5. Transcripción y replicación de viriones inactivados. Células Vero se infectaron con JUNV y JUNV inactivado con NSC20625 (100 µM) respectivamente, luego de 48hs de incubación se procesaron para la obtención de RNA y se lo utilizó para la síntesis de cDNA. Las reacciones de RT-PCR se realizaron utilizando primers específicos para la amplificación del mRNA de NP (A) y de la forma genómica complementaria del RNA viral (B). **M**: marcadores moleculares; **C-** : control negativo; **CC**: control celular; **CV**: control viral; **IN**: células infectadas con JUNV inactivado previamente con NSC20625 (100 µM).

Como se muestra en la *Figura R. 5. A*, en las calles donde se sembraron las muestras provenientes de células infectadas con virus inactivado con los compuestos, no se observan las bandas correspondientes al segmento de 186 pb del mRNA de NP, por lo que la transcripción estaría bloqueada.

El *primer* vN (186) también es complementario a la secuencia del extremo 5' del RNA genómico complementario, por lo que podría suponerse que tampoco hay replicación en los viriones inactivados.

Para verificar la ausencia de replicación viral en el virus inactivado, el RNA extraído anteriormente fue utilizado como molde para una reacción de RT-PCR anidada, para amplificar un segmento genómico de 129 pb correspondiente al gen GPC en el RNA genómico complementario. Luego de sintetizar cDNA con el *primer* "vG (GPC1)" (*Figura MM. 2*), se llevó a cabo la primera amplificación con los *primers* "vG (GPC1)" y "vcG (JDG2SQ)" y posteriormente, se realizó una segunda amplificación con los *primers* "vG (GPC1)" y "vcG3 (JUNGC)" (*Figura MM. 2*). En la *Figura R. 5. B* se muestra que las bandas correspondientes al segmento de 129 pb del gen GPC genómico complementario están ausentes, confirmando así que no hay replicación viral en los viriones previamente tratados con los disulfuros.

Asimismo, se estudió la capacidad de replicación del RNA L de los viriones de LCMV inactivados con el compuesto NSC20625. Para ello, células HepG-2 fueron infectadas con LCMV y LCMV inactivado con el disulfuro, y a las 48 hs. p.i. se extrajo el RNA para luego sintetizar cDNA con el *primer* "Z/WE F89 Hind III" complementario a la secuencia del extremo 3' del RNA L genómico complementario (*Figura MM.3*).

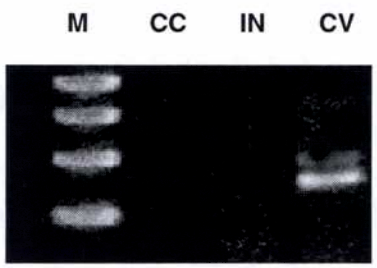


Figura R. 6. Transcripción y replicación de viriones inactivados. Células HepG2 se infectaron con LCMV y LCMV inactivado con NSC20625 (100 µM) respectivamente, luego de 48 h de incubación se procesaron para la obtención de RNA y se lo utilizó para la síntesis de cDNA. Las reacciones de RT-PCR se realizaron utilizando primers específicos, complementarios a un segmento del gen viral Z. Calles: **M**: marcadores; **CC**: control celular; **IN**: células infectadas con LCMV inactivado con NSC20625 (100 µM); **CV**: células infectadas con LCMV.

Como se muestra en la *Figura R. 6*, en la *calle* ***IN*** correspondiente a la muestra del virus inactivado con el compuesto, no se observa ningún producto de amplificación, por lo que se confirma que la replicación en estos viriones estaría bloqueada.

R. II. 3. 3 Síntesis de proteínas virales

Para descartar la posibilidad de que los viriones inactivados sinteticen proteínas, se analizó esta etapa del ciclo viral en células Vero infectadas con JUNV y TCRV inactivados previamente con los compuestos virucidas NSC20625 y NSC624152, y con JUNV y TCRV sin inactivar. En la *Figura R. 7. A* se muestra que los viriones de JUNV inactivados no fueron capaces de sintetizar las proteínas virales, ya que no se observan bandas correspondientes a las proteínas mayoritarias NP, GPC y GP1. Los mismos resultados se obtuvieron para TCRV (*Figura R. 7. B*).

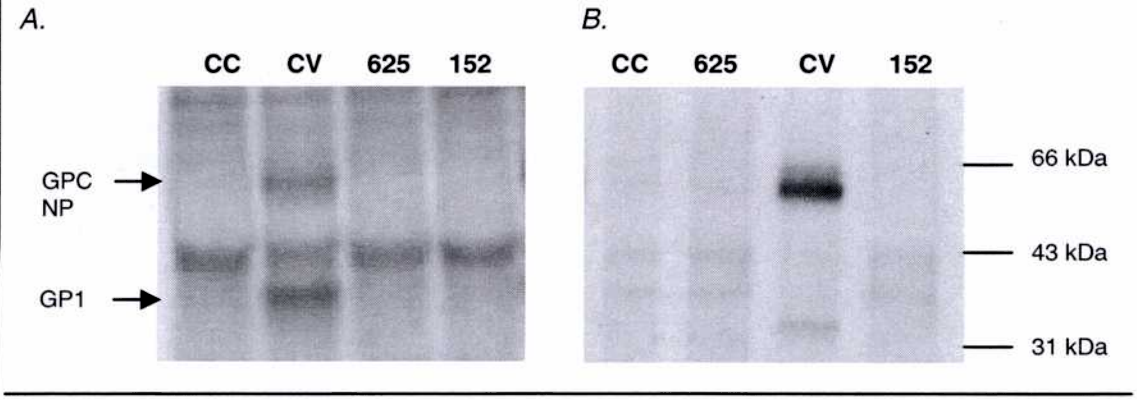


Figura R. 7. Síntesis de proteínas virales. Suspensiones virales de JUNV (A) y TCRV (B) fueron incubadas con MM o con los compuestos (20 µM) durante 1,5 h. a 37°C; luego se infectaron células Vero con las distintas suspensiones virales. A las 48 hs se realizó un pulso con EXPRE^{35}S^{35}S (100 µCi/ml), se inmunoprecipitaron las proteínas virales y se corrieron en un gel desnaturalizante. Calles: **CC:** control celular; **CV:** control viral; **625:** virus inactivado con *NSC20625*; **152:** virus inactivado con NSC625152.

También, se estudió la capacidad de sintetizar proteínas de viriones inactivados de LCMV. La *Figura R. 8* muestra que las células infectadas con suspensiones de LCMV previamente tratadas con el compuesto NSC20625, son incapaces de sintetizar sus proteínas, ya que no se observaron las bandas correspondientes a las proteínas virales.

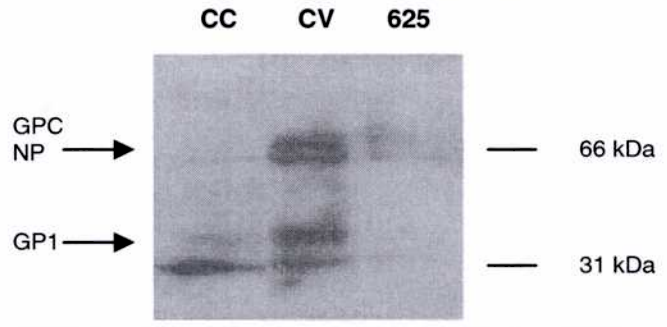


Figura R. 8. Síntesis de proteínas virales. Se infectaron células Vero E6 con LCMV inactivado con el compuesto NSC20625 (40 µM) y LCMV sin inactivar. A las 48 hs las células se lisaron y las proteínas virales se sometieron a electroforesis y fueron transferidas a una membrana. Para revelar las bandas específicas se utilizó un antisuero de cobayo anti-LCMV y como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de cobayo conjugado con peroxidasa. Calles: **CC:** control celular; **CV:** control viral; **625:** virus inactivado con NSC20625.

R. II. 4. Estudio de la funcionalidad de las glicoproteínas de membrana de viriones inactivados: capacidad antigénica

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento directo con el compuesto disulfuro NSC20625 parecería no alterar la integridad biológica de las glicoproteínas de envoltura GP1 y GP2, dada la capacidad de los viriones tratados de unirse al receptor y entrar a la célula.

A fin de corroborar la funcionalidad de las glicoproteínas, se estudió la antigenicidad de los viriones inactivados. Para ello, se inocularon 2 grupos de 6 ratones OF-1 con JUNV y TCRV inactivados con NSC20625, y otros 2 grupos de animales con el correspondiente virus infeccioso. A distintos tiempos se determinó el título de anticuerpos neutralizantes presentes en los sueros de los animales.

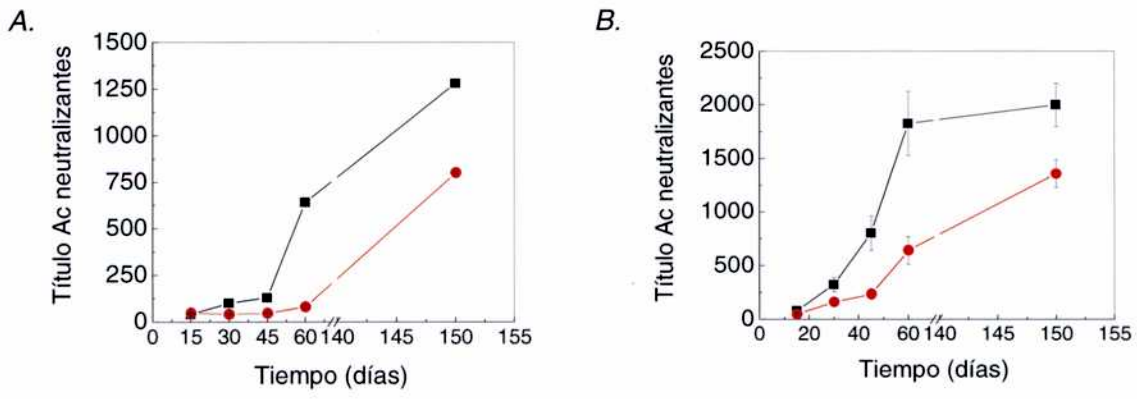


Figura R. 9. Capacidad antigénica de las glicoproteínas de membrana de viriones inactivados. Los animales (n=6) fueron inoculados con 10^4 UFP del correspondiente virus. Cada 15 días, durante los primeros 2 meses, fueron sangrados e inoculados nuevamente. Al día 150 se inocularon los animales con $2x10^4$ UFP. Las neutralizaciones se realizaron mezclando diluciones al medio de los sueros con 100 UFP de JUNV (*A*) ó TCRV (*B*) respectivamente, durante 1 h a 37°C. La infectividad residual se cuantificó por el método de UFP.

La *Figura R. 9* muestra que en ratones inoculados con virus inactivado (JUNV ó TCRV) con NSC20625 hubo inducción de anticuerpos neutralizantes, confirmando la capacidad antigénica de las glicoproteínas en los viriones inactivados. Las diferencias que se observan comparando los títulos de anticuerpos neutralizantes en animales inoculados con virus inactivado y virus infeccioso, podrían deberse a una mínima replicación del virus en el animal, provocando así una amplificación en su capacidad de inducir anticuerpos.

El conjunto de experimentos presentados en los items de esta sección, permiten concluir, que estos compuestos inactivan la infectividad del virión generando partículas que conservan la capacidad antigénica de sus glicoproteínas, entran a la célula, pero no pueden realizar ningún proceso de biosíntesis de componentes virales.

R. III. La proteína Z es el blanco de acción

Trabajos recientes han propuesto que Z cumple tanto funciones regulatorias como estructurales dentro del ciclo de replicación viral (Jácamo *et al.*, 2003; Perez *et al.*, 2003; Strecker *et al.*; 2003; Cornu *et al.*, 2004). Por lo tanto, si los inhibidores estudiados actúan sobre el motivo *RING finger* de la proteína Z, podrían ejercer su acción sobre las funciones regulatorias y/o estructurales de Z durante el ciclo, directamente sobre la Z que forma parte de la partícula viral o bien en ambos casos. El objetivo de los siguientes experimentos fue demostrar la interacción de los compuestos con la proteína Z.

R. III.1. Comparación de los efectos antiviral y virucida de los compuestos contra los arenavirus, HSV-1 y VSV

Como una primera aproximación, para establecer la especificidad de acción de estos compuestos contra los motivos *zinc fingers* de proteínas virales, se estudió su efecto sobre virus no relacionados a los arenavirus que poseen o no proteínas con estas características. Para ello, se eligieron el HSV-1, que posee una proteína regulatoria no estructural, ICP0, con motivo *RING finger* en su secuencia (Moriuchi *et al.*, 1994), y el virus VSV, carente de este tipo de motivo en todas sus proteínas.

La *Figura R. 10* muestra las curvas correspondientes a las actividades antiviral y virucida de 3 compuestos contra HSV-1. Se observa una acción antiviral significativa, con inhibición en el rendimiento dependiente de la dosis. Por el contrario, no se produce inactivación de HSV-1, ni aún a las máximas concentraciones ensayadas. Dado que ICP0 no es una proteína estructural del virión, estos resultados preliminares apoyarían una probable reactividad de los compuestos ensayados con el motivo *RING finger* de esta proteína en HSV-1.

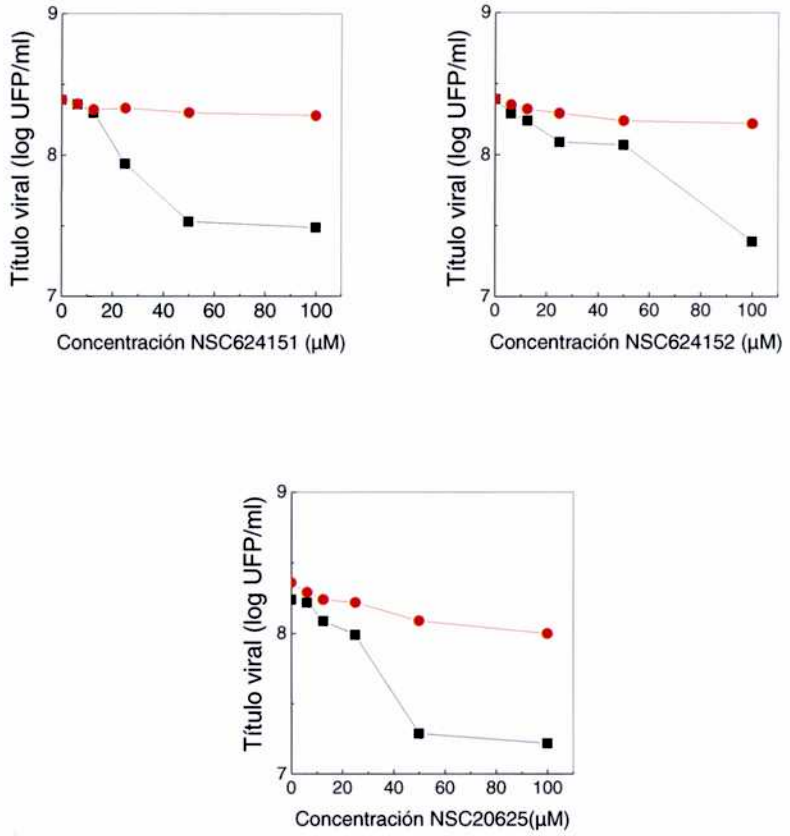


Figura R. 10. Actividad antiviral (■) y virucida (●) contra HSV-1. La actividad antiviral se determinó mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral, en células Vero a las 24 h p.i. La actividad virucida se determinó mediante el ensayo de inactivación directa durante 1,5 h. a 37°C y la infectividad remanente se determinó por UFP.

A partir de los datos de la *Figura R.10*, se calcularon las CE_{50} y CI_{50} de los compuestos (*Tabla R. 7)*. Los valores de CE_{50} contra HSV-1, estuvieron dentro del rango 20,8- 49,3 µM, mostrando valores comparables con los obtenidos para los arenavirus (*Tabla R. 1)*. Por el contrario, ambos ensayos (antiviral y virucida) realizados con el NSC20625 contra VSV mostraron resultados negativos (*Tabla R. 7*).

Tabla R. 7. Actividad antiviral y virucida contra HSV-1 y VSV

Compuestos	Actividad antiviral CE_{50} (µM)		Actividad virucida CI_{50} (µM)	
	HSV-1	VSV	HSV-1	VSV
NSC20625	29,0	>100	>100	>100
NSC624151	20,8	>100	>100	>100
NSC624152	49,3	NH	>100	NH

CE_{50}: concentración efectiva 50 %, determinada mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral, en células Vero a las 24 h de infección. **CI_{50}**: concentración inactivante 50 %, determinada mediante el ensayo de inactivación directa durante 1,5 h. a 37°C.

En consecuencia, para los virus probados en este estudio sólo hubo acción inhibitoria de los compuestos frente a virus que poseen proteínas con motivos *Zn-fingers.*

R. III. 2. Efecto de los inhibidores sobre las proteínas de viriones purificados

A fin de estudiar posibles alteraciones en las proteínas del virus por su interacción con los compuestos inactivantes, se analizaron las proteínas de viriones purificados e inactivados a través de corridas electroforéticas en condiciones reductoras y no reductoras.

Para esto, se analizaron 2 sistemas: JUNV-NSC20625 y LCMV-AT-2.

1) JUNV-NSC20625: el virus marcado radioactivamente, purificado e inactivado con el compuesto NSC20625 fue sometido a una corrida electroforética, en condiciones reductoras y no reductoras. Para visualizar las bandas proteicas del virus marcado, se realizó una fluorografía.

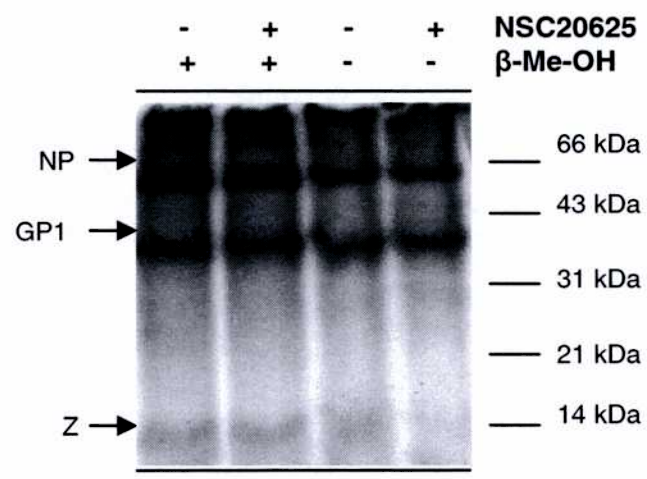


Figura R. 11. Efecto del NSC20625 sobre las proteínas de viriones purificados. Células Vero fueron infectadas con JUNV a una m.i de 1 UFP/cél. A las 72 h p.i. se incorporó la marca radioactiva (Expre^{35}S^{35}S, 25 µCi/ml, NEN, USA). Los sobrenadantes fueron cosechados al 4to y 5to día p.i., purificados a través de gradiente discontinuo de sacarosa (15-60 %) e inactivados con el compuesto NSC20625 (10 mM) durante 1,5 h a 37°C. Las proteínas virales se corrieron en condiciones reductoras (+β-Me-OH) y no reductoras (-β-Me-OH), respectivamente, y luego fueron reveladas por fluorografía.

Luego del tratamiento con el compuesto NSC20625, cuando se analizan las proteínas virales en condiciones reductoras se observan las bandas habituales correspondientes a las mismas: GP1, NP y Z (*Figura R. 11*). Cuando la corrida electroforética se realiza en condiciones no reductoras, disminuye notablemente la intensidad de la banda correspondiente a la proteína Z en los viriones inactivados respecto de los viriones no tratados, permaneciendo inalteradas las proteínas restantes.

2) LCMV-AT-2: el virus purificado e inactivado con el compuesto NSC20625, fue sometido a una corrida electroforética, en condiciones reductoras y no reductoras, como se mencionó anteriormente. Para visualizar las bandas proteicas del virus purificado, se realizó un ensayo de *Western blot*.

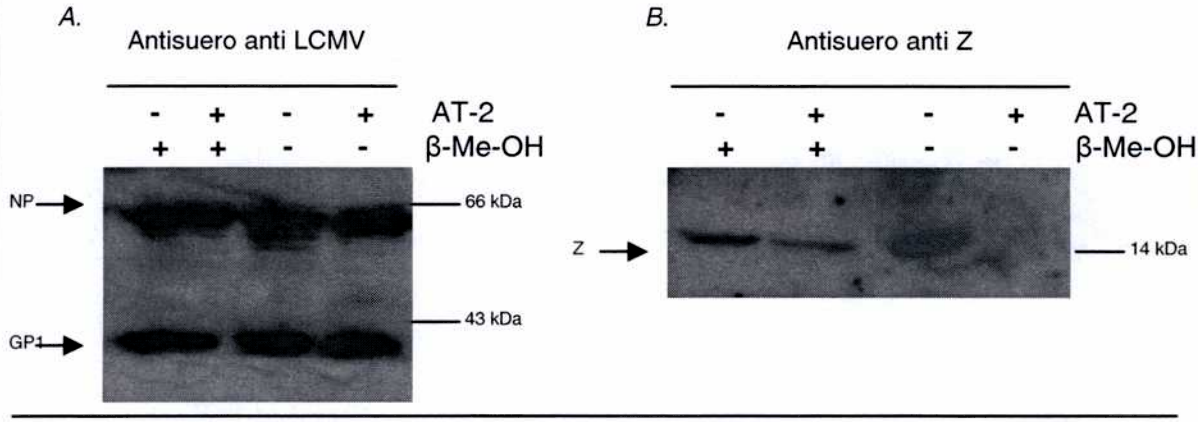


Figura R. 12. Células BHK fueron infectadas con LCMV a una m.i de 1 UFP/cél. Los sobrenadantes fueron cosechados entre las 24 y 72 h, purificados a través de gradiente discontinuo de sacarosa (15-60 %) e inactivados con el compuesto AT-2 (10 mM) durante 1,5 h a 37°C. Las proteínas virales se corrieron en condiciones reductoras (+β-Me-OH) y no reductoras (-β-Me-OH), respectivamente. Luego fueron transferidas a una membrana y, por último, reveladas con antisuero de cobayo anti-LCMV (*A*) y antisuero de conejo anti-Z (*B*), respectivamente, según las proteínas analizadas.

Como se muestra en la *Figura R. 12 B,* en los viriones inactivados, la banda correspondiente a la proteína Z está ausente, cuando la corrida electroforética se realiza en condiciones no reductoras, permaneciendo a su vez inalteradas las proteínas NP y GP-1, cuando son tratadas en las mismas condiciones (*Figura R. 12 A*).

A pesar de las dificultades para visualizar Z, estos resultados sugieren que la acción de los compuestos estaría dada particularmente sobre la proteína Z. La interacción Z-compuesto provocaría cambios que se manifiestan a través de alteraciones en la migración electroforética. La proteína NP, a pesar de presentar también un motivo *Zn finger* en su secuencia y tener capacidad de unir Zn (Tortorici *et al.,* 2001) aparentemente no es afectada. Asimismo, no se observan cambios en el perfil electroforético de GP1, lo que confirma que estos compuestos no alteran la integridad de la misma, de acuerdo a los resultados sobre sus funciones biológicas.

R. III. 3. Purificación de la proteína de fusión GST-Z-LCMV

Dadas las dificultades en visualizar una suficiente cantidad de proteína Z en las preparaciones de virus purificado y poder demostrar claramente su interacción con los compuestos, se decidió estudiar el efecto de estos agentes directamente sobre la proteína Z pura recombinante.

Con el fin de purificar la proteína recombinante Z de LCMV clonada en el vector pGEX-2T (Borden *et al.*, 1998b), se procedió según se describe en *MM. 14*. En la *Figura R. 13* se muestran los distintos pasos de la purificación.

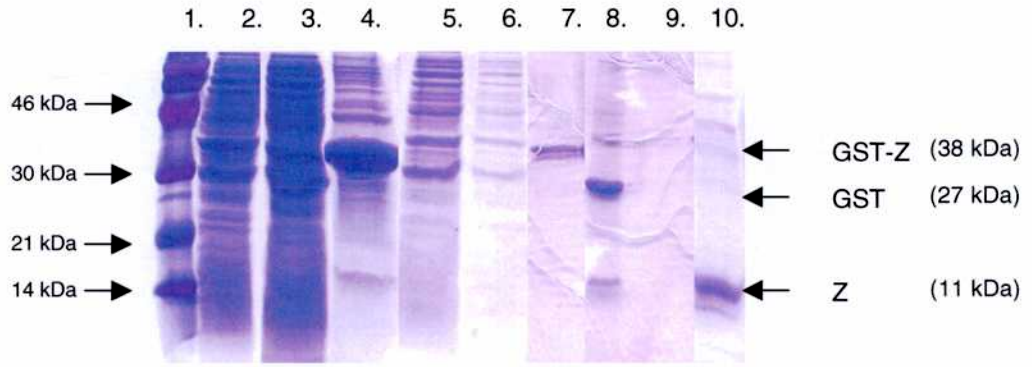


Figura R. 13. Purificación de la proteína de fusión GST-ArmZ. LB (100 µg/ml de Amp.), inoculado con *E.coli/BL21* conteniendo el plásmido pGEX-2T/Z-LCMV se incubó a 37°C hasta una DO_{A600}= 0.5. Se agregó IPTG (0.4 mM) para inducir la expresión de la proteína de fusión, dejándose crecer el cultivo por 3 h más, y luego se centrifugó a 10000 rpm (Beckman JAL-10500), 10 min a 4°C. El pellet se resuspendió en PBS con 750 µl de inhibidores de proteasas, se sonicó y se agregó 0.5% de Tween 20. El lisado se filtró (45 µm), y fue sometido a una columna de glutatión. Se realizó una digestión con trombina para liberar Z. Muestras de los distintos pasos de purificación fueron sembradas en un gel de poliacrilamida 15 % y reveladas con Coomassie Blue. *Calles:* **1**. marcadores moleculares; **2**. total del lisado (20 µl); **3**. 2 hs de inducción con IPTG (20 µl); **4**. 3 hs de inducción con IPTG (20 µl); **5**. 1er eluído (columna) (20 µl); **6**. 2do eluído (columna) (20 µl); **7**. bolitas de glutatión (columna) (10 µl); **8**. digestión con trombina (20 µl); **9**.1era elución luego de la trombina (20 µl); **10**. proteína Z (20 µl).

Como se observa en la *Figura R. 13*, la inducción con IPTG fue muy eficaz, aumentando notablemente la expresión de la proteína de fusión GST-Z-LCMV, luego de 3 h de incubación (*Figura R. 13, calle 4*). Inmediatamente después, el

lisado bacteriano fue sembrado en una columna de glutatión, se realizaron 2 lavados con PBS y se sembró una muestra de las bolitas de glutatión en el gel, para verificar que la proteína de fusión había quedado retenida en ellas (*Figura R. 13, calle 7*). Finalmente se realizó una digestión con trombina (*Figura R. 13, calle 8*), para liberar la proteína de interés por elución (*Figura R. 13, calle 10*). El rendimiento de la purificación fue muy bajo, dado que la concentración final de porteína obtenida fue de 219 µg/ml; sin embargo, la cantidad obtenida fue suficiente para realizar los ensayos posteriores.

R. III. 4. Efecto de los inhibidores sobre la proteína Z purificada

La proteína Z purificada en el paso anterior fue utilizada para estudiar el efecto de los compuestos inactivantes sobre la misma. Para ello, soluciones de proteína fueron puestas en contacto con los compuestos NSC20625, AT-2 y ADA, en una concentración 10 mM, luego corridas en geles de poliacrilamida, en condiciones reductoras y no reductoras, transferidas a una membrana y finalmente reveladas con un antisuero específico de conejo anti-Z.

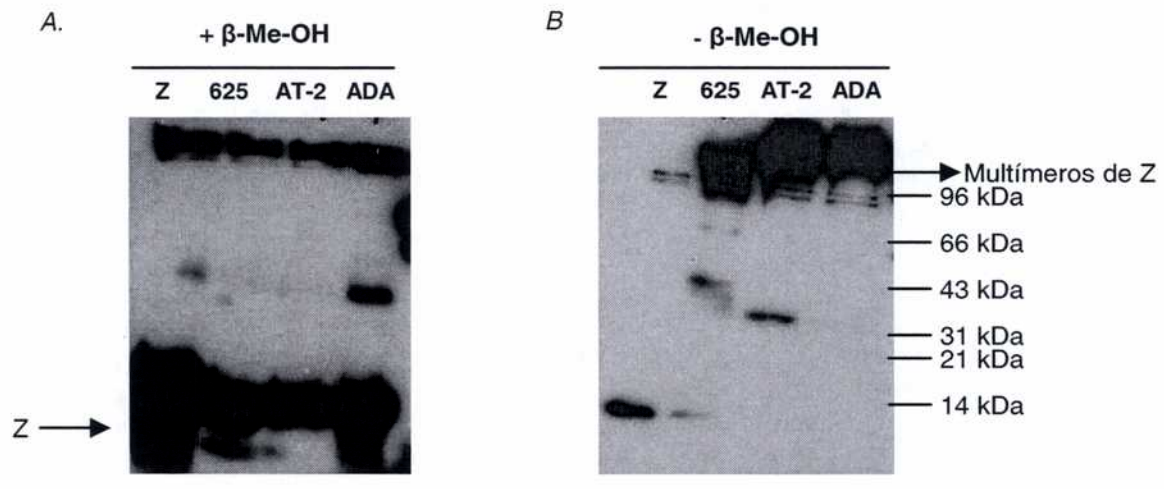


Figura R. 14. Efecto de los inhibidores sobre la proteína Z purificada. La proteína purificada Z de LCMV fue incubada durante 1,5 h con 10 mM de: NSC20625, AT-2 y ADA. Las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida 18 %, en condiciones reductoras *(A)* y no reductoras *(B)*, y transferidas a una membrana de PVDF. Las membranas fueron reveladas con un antisuero de conejo anti-Z en una concentración 1:600.

La *Figura R. 14 A* muestra que cuando la electroforesis se realiza en condiciones reductoras (+ β-Me-OH), no existen diferencias significativas, ni en la migración, ni en las intensidades de las bandas correspondientes a la proteína Z luego del tratamiento con los compuestos, comparado con el correspondiente control; sin embargo, cuando la corrida electroforética se realiza en condiciones no reductoras (-β-Me-OH) (*Figura R. 14 B*), el antisuero específico anti-Z revela multímeros de alto peso molecular (>>100 kDa), en las calles donde fueron sembradas las muestras correspondientes al tratamiento con los distintos compuestos.

La interacción de Z con cada compuesto fue dependiente de la concentración de compuesto utilizada. Esto se comprobó realizando los mismos ensayos anteriores con los compuestos AT-2 y ADA en distintas concentraciones crecientes: 0,1 mM, 1 mM y 10 mM, respectivamente. La intensidad de la banda correspondiente a los multímeros de Z fue incrementándose al aumentar la concentración de AT-2 y ADA (*Figura R. 15*).

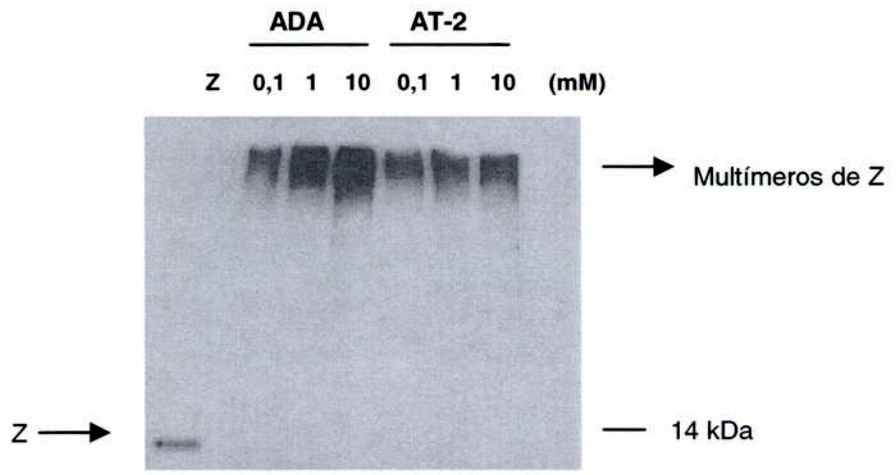


Figura R. 15. Efecto de distintas concentraciones de compuesto en la formación de multímeros de Z purificada. 5 µl de proteína purificada Z de LCMV fueron incubados durante 1,5 h con los compuestos AT-2 y ADA, en distintas concentraciones finales: 0,1, 1 y 10 mM, respectivamente. Las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida 18 %, en condiciones reductoras y no reductoras, y transferidas a una membrana. Las membranas fueron reveladas con un antisuero de ratón anti-Z en una concentración 1:600.

Se realizó un estudio similar con la proteína recombinante purificada Z de LASV, clonada y purificada por el grupo de la *Dra. M. Salvato.*

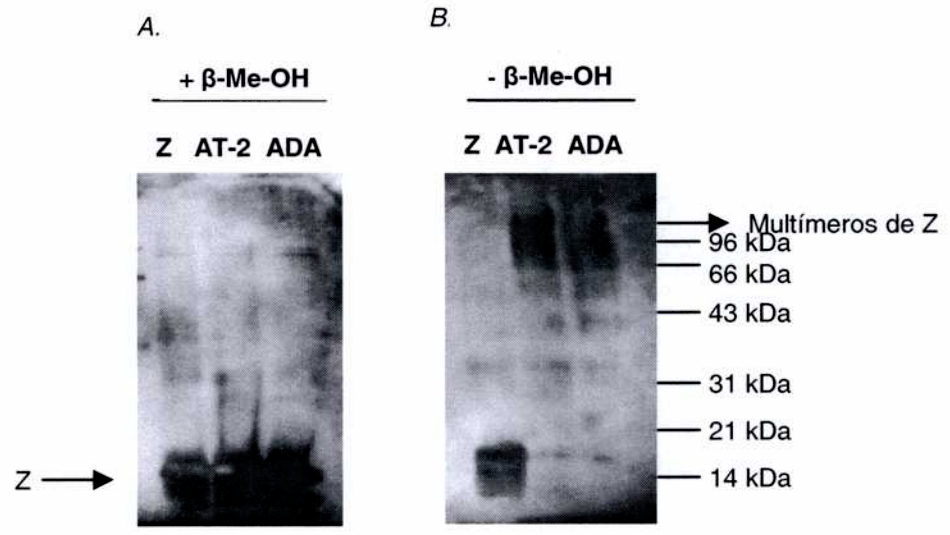


Figura R. 16. Efecto de los inhibidores sobre la proteína Z-LASV purificada. 1 µl de proteína purificada Z de LASV (1mg/ml) fue incubada durante 1,5 h con 10 mM de AT-2 y ADA, respectivamente. Las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida 18 %, en condiciones reductoras (*A*) y no reductoras (*B*), y transferidas a una membrana. Las membranas fueron reveladas con un antisuero de ratón anti-ZLASV en una concentración 1:600. *Calles:* ***1***. Z; ***2.*** Z + AT-2; **3**. Z + ADA.

La *Figura R. 16 B* muestra la aparición de multímeros de Z, luego del tratamiento con los compuestos, al igual que se observó para LCMV.

Las bandas de alto peso molecular observadas en los experimentos expuestos en esta sección, indicarían que los compuestos interaccionan con la proteína Z de los arenavirus, provocando la eyección del Zn y por consiguiente su multimerización, tal como propone el mecanismo de acción de estos compuestos esquematizado en la *Figura I.10.*

R. IV. Acción del NSC20625 en la célula infectada: su efecto sobre la interacción de Z con proteínas celulares

Como se ha mencionado en *I.4*, es conocida la interacción de Z con varias proteínas celulares durante la infección con arenavirus. Asimismo, se ha descripto que los compuestos que clasificamos en el grupo 1.b (*Resultados I*) tienen alto poder inactivante sobre los viriones, pero también inhiben la producción viral en células infectadas *(Tabla R. 1, Figura R. 1)* Por lo tanto, para corroborar los resultados presentados en *Resultados III*, sobre el papel de Z como blanco de estos compuestos, se propuso estudiar el efecto que producen los mismos, en la interacción de Z con la proteína celular PRH.

La infección con LCMV afecta la localización subcelular de PRH en células derivadas de hepatomas humanos (Djavani, comunicación personal). Esta relocalización se daría a través de la interacción de los respectivos motivos *zinc finger* de secuencias proteicas de Z y PRH (Topcu *et al.*, 1999). Para poder inferir algo más sobre este mecanismo, se decidió investigar si el tratamiento con NSC20625 de células infectadas con LCMV podía bloquear o alterar este tipo de interacción, y por otro lado demostrar que el compuesto disulfuro ejerce una acción específica sobre la proteína viral, sin afectar a la proteína celular PRH.

R. IV. 1. Efecto del NSC20625 sobre la replicación viral

Como se mostró en la *Tablas R. 1 y 6*, NSC20625 tiene capacidad de inhibir la producción de virus infectivo en células Vero infectadas, tanto con JUNV, TCRV ó LCMV con valores de CE_{50} en el rango de 3,6 - 9,3 µM.

Se demostró que la funcionalidad biológica de las glicoproteínas virales en las etapas tempranas de adsorción y de internalización, no se ven afectadas por este compuesto.

Por lo tanto, para conocer si en la célula infectada con arenavirus y tratada con NSC20625 luego de la adsorción, hay replicación del RNA viral, a las 48 h y 72 h p.i., se extrajo el RNA total, para luego sintetizar el cDNA con el *primer* "Z/WE F89.Hind III" (*Figura MM. 3*), y amplificado mediante PCR.

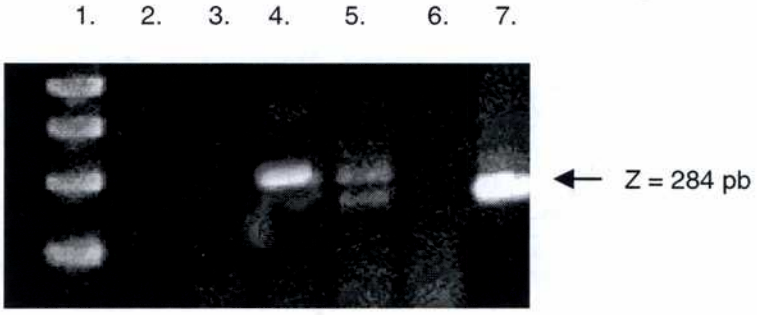


Figura R. 17. Efecto del NSC20625 sobre la transcripción y replicación viral en células infectadas con LCMV. Células HepG-2 se infectaron con 10^6 UFP de LCMV y se trataron con NSC20625 (40 µM) inmediatamente después de la adsorción; luego de 48 hs. de incubación se procesaron para la obtención de RNA y se lo utilizó para la síntesis de cDNA. La amplificación del cDNA se realizó mediante una reacción de PCR utilizando *primers* específicos, complementarios a un segmento del gen viral Z. Calles: **1**. Marcadores; **2**. Células; **3**. Células tratadas con NSC20625 (48 h p.i.); **4**. Células infectadas con LCMV (48 h p.i); **5**. Células infectadas con LCMV y tratadas con NSC20625 (48 h p.i); **6**. Control negativo; **7**. Control positivo.

Como se muestra en la *Figura R. 17, calle 5*, donde se sembró la muestra proveniente de células infectadas y posteriormente tratadas con NSC20625, se observaron pequeñas diferencias en la intensidad de las bandas correspondientes al gen Z, con respecto a las bandas correspondientes a las muestras de células infectadas y sin tratar (*Figura R. 17, calle 4*).

Para analizar esta pequeña diferencia, se realizó una reacción de *real time-PCR* a partir de las mismas muestras de RNA, pero en este caso los cDNAs se sintetizaron con *random primers,* para evitar falsos negativos. Como control, se realizó una amplificación simultánea del gen celular *gapdh*, utilizando *primers* específicos para dicho gen. Así se evidenció aproximadamente un 99 % de inhibición (2 logaritmos) de la replicación del RNA viral en las células infectadas con LCMV y luego tratadas con el compuesto NSC20625 durante 48 h. La inhibición fue incluso mayor (2,5 logaritmos), cuando el compuesto estuvo presente durante 72 h p.i (*Figura R. 18*).

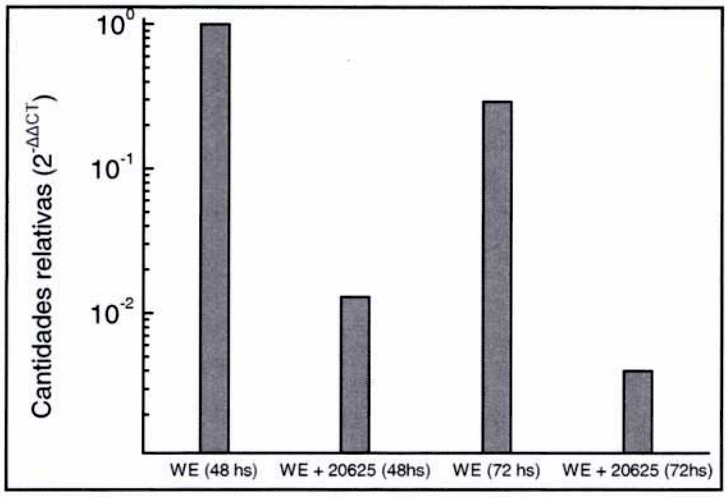


Figura R. 18. Efecto del NSC20625 sobre la transcripción y replicación viral en células infectadas con LCMV. Se infectaron células HepG-2 con 10^6 UFP de LCMV e inmediatamente después de la adsorción, se trataron con 40 µM de NSC20625 durante 48 h y 72 h p.i. Se extrajo el RNA y se sintetizaron los cDNAs con *random primers*, y luego se analizaron los productos de amplificación con una reacción de *real time-PCR* utilizando *primers* específicos para el gen Z. Una amplificación simultánea del gen celular *gapdh* fue utilizada como control. Los resultados se expresan como cantidades relativas (*MM. 16*).

En conclusión, la inhibición en el rendimiento viral por tratamiento de la célula infectada con NSC20625, está asociada a una marcada inhibición en la replicación del RNA viral. Con estos datos no se puede inferir sobre el evento anterior, la transcripción de L.

R. IV. 2. Efecto del NSC20625 en la transcripción de *prh*

Para descartar la acción del compuesto NSC20625 sobre la proteína celular PRH y a su vez, verificar la especificidad sobre la proteína viral Z, se estudió el efecto del compuesto en la transcripción de *prh*, mediante una reacción de RT-PCR. Para ello, células HepG-2 no infectadas e infectadas con LCMV se trataron con 40 µM de NSC20625, y a las 48 h y 72 h p.i. se extrajo el RNA para luego sintetizar cDNA con *random primers*. Posteriormente se llevó a cabo una reacción de PCR con los *primers* específicos, para amplificar un segmento de *prh*. Asimismo, se realizó una amplificación con *primers* específicos para *gapdh*, como control celular.

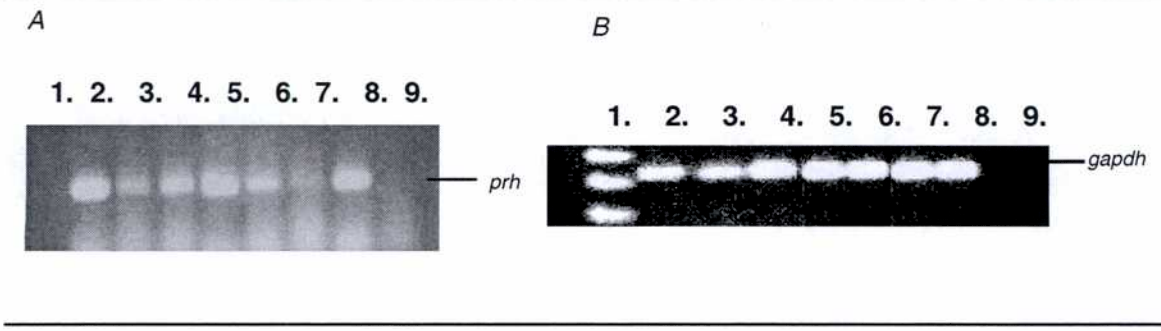


Figura R. 19. Efecto del NSC20625 sobre la transcripción de prh. Se infectaron células HepG-2 con 10^6 UFP de LCMV e inmediatamente después de la adsorción, se trataron con 40 µM de NSC20625 durante 48 h y 72 h p.i. Se extrajo el RNA, se sintetizaron los cDNAs con random primers, y luego se amplificaron los productos con una reacción de PCR utilizando primers específicos para el gen celular *prh* (A). Una amplificación simultánea de gapdh fue utilizada como control (B). Calles: **1.** marcadores moleculares; **2.** células no tratadas; **3.** células tratadas con NSC20625 (48 h pi); **4.** células infectadas con LCMV (48 h p.i); **5.** células infectadas con LCMV y tratadas con NSC20625 (48 h p.i); **6.** células tratadas con NSC20625 (72 h p.i); **7.** células infectadas con LCMV (72 h p.i); **8.** células infectadas con LCMV y tratadas con NSC20625 (72 h p.i); **9.** control negativo.

Como se muestra en la *Figura R. 19*, no hay diferencias significativas en la intensidad de las bandas correspondientes al segmento amplificado, indicando que el disulfuro NSC20625 no afecta la transcripción de *prh*.

R. IV. 3. Efecto del NSC20625 sobre el patrón de distribución de PRH en las células infectadas

Para analizar el efecto de NSC20625 sobre la interacción entre la proteína Z y la proteína celular PRH, se estudió mediante microscopía confocal la localización subcelular de la PRH en las células infectadas con LCMV y tratadas inmediatamente después de la adsorción con el compuesto.

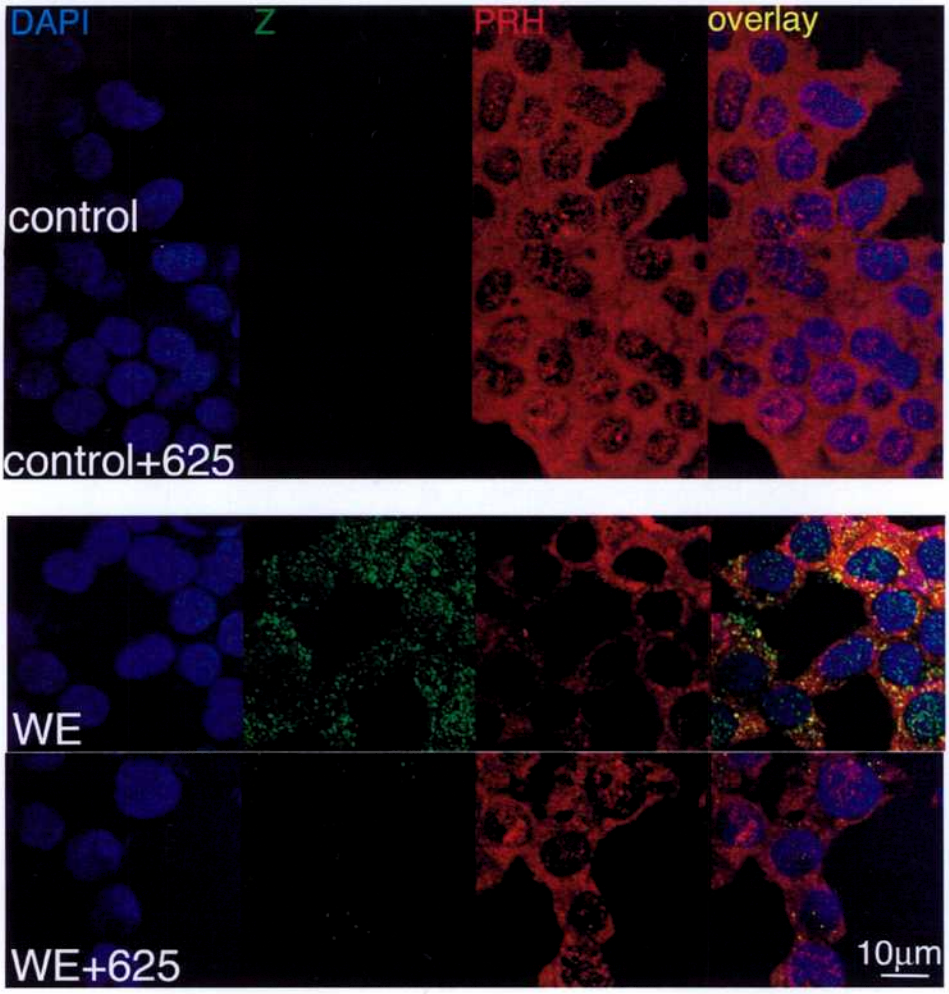


Figura R. 20. Efecto del NSC20625 sobre el patrón de distribución de PRH en las células infectadas. Células HepG-2 crecidas en cubreobjetos, fueron infectadas con LCMV con una m.i de 1 y tratadas con NSC20625 (40 µM) durante 72 h p.i., luego se fijaron con metanol, se realizó una tinción con DAPI (azul) para marcar los núcleos celulares y se procedió a revelarlas con una mezcla de antisueros anti-Z (verde) y anti-PRH (rojo). Las imágenes de microscopía confocal (1000 X) muestran el patrón de distribución de la proteína celular PRH. Los filtros para FITC y rojo Texas fueron usados en forma independiente. La superposición de las imágenes se muestra en amarillo. **Control**: células no infectadas; **Control+625**: células no infectadas, tratadas con NSC20625; **WE**: células infectadas con LCMV, cepa WE; **WE+625**: células infectadas con LCMV, cepa WE, tratadas con NSC20625.

Como se puede observar en la *Figura R. 20,* el patrón de distribución de PRH en las células infectadas con LCMV a las 72 h p.i. (*Figura R. 20, WE-PRH*), se altera respecto al observado en las células sin infectar (*Figura R. 20, control-PRH*). Por el contario, el patrón de distribución de la proteína celular en las células infectadas y tratadas con el compuesto *(Figura R. 20, WE+625)*, no presenta diferencias significativas, comparado con el patrón de distribución de la PRH, en las células sin infectar. Además, se observa una inhibición en la expresión de la proteína Z en estas células tratadas. No sabemos si esto se debe a una falta de reconocimiento, de la proteína alterada, por el anticuerpo ó falta de expresión de Z. Estas diferencias, estarían confirmando que la redistribución de PRH observada en las células infectadas dependería de la presencia de Z y se estaría debiendo a una interacción entre la proteína celular y la proteína viral Z, probablemente a través de los respectivos motivos *RING fingers* presentes en sus correspondientes secuencias. El tratamiento con el compuesto NSC20625 disminuye notablemente la expresión de Z detectada por inmunofluorescencia y por consiguiente la redistribución de la proteína celular estaría afectada.

R. V. Compuestos no virucidas

En esta categoría se encuentran aquellos compuestos que no ejercen ningún efecto virucida sobre los viriones, sino que actúan inhibiendo exclusivamente alguna etapa del ciclo de replicación viral dentro de la célula infectada. Estos compuestos propiamente antivirales son: el disulfuro aromático NSC677459 y los azoicos ANNB, AB y biurea.

De ellos, se eligió el compuesto azoico ANNB para un estudio más detallado de sus propiedades antivirales, por ser el compuesto más activo y con el mejor índice de selectividad para JUNV y TCRV (*Tabla R. 2*).

R. V. 1. Espectro de acción antiviral contra arenavirus

Para evaluar el espectro de acción del ANNB contra los arenavirus, se ensayaron por rendimiento viral otras 2 cepas de JUNV, la cepa atenuada XJCl3 y la mutante termosensible derivada de XJCl3, Cl67. Además también se evaluó la acción de estos compuestos contra otros arenavirus, como PICV y LCMV. Los resultados se observan en la *Tabla R. 8,* donde también se incluyeron la cepa IV4454 de JUNV y TCRV.

Tabla R. 8. Espectro de la actividad antiviral contra los arenavirus

Virus y cepa		ANNB CE_{50} (µM)
JUNV		
	IV4454	6,5
	XJCl3	36,8
	Cl67	43,7
TCRV		26,2
PICV		25,0
LCMV		34,1

CE_{50}: concentración efectiva 50%, determinada mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral de los arenavirus, en células Vero a las 48 hs. de infección.

ANNB mostró un amplio rango de acción contra todos los arenavirus, obteniéndose valores de CE_{50} dentro de un rango de 6,5- 43,7 µM. La cepa IV4454 de JUNV fue la más susceptible a la acción de este compuesto.

R. V.2. Efecto del tiempo de adición ó remoción del ANNB sobre la acción antiviral

Para determinar si el compuesto afecta etapas tempranas o tardías del ciclo de replicación viral, se estudió la infuencia del tiempo de adición o remoción del compuesto ANNB en un ensayo de inhibición del rendimiento viral.

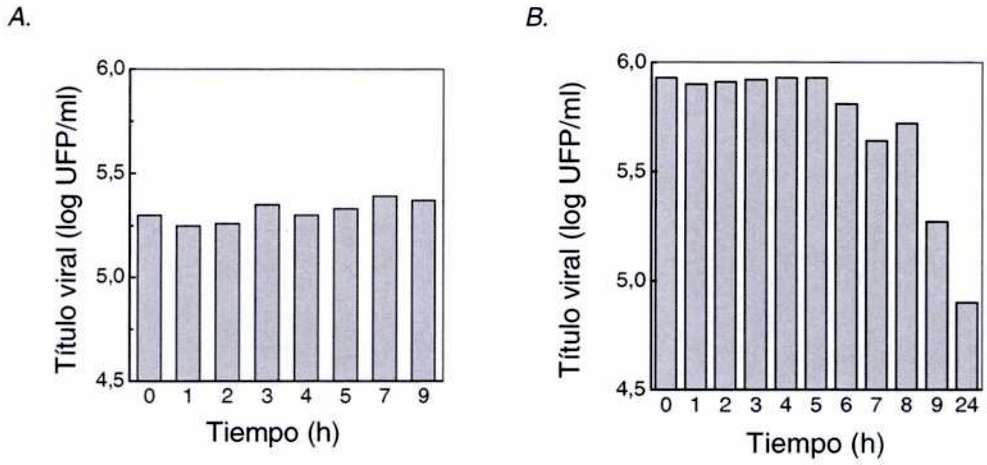


Figura R. 21. *Influencia del tiempo de adición (A) ó remoción (B) del compuesto ANNB sobre la actividad antiviral contra JUNV. (A).* Se infectaron células Vero con JUNV (m.i= 0,1), luego de la adsorción a 4°C, se removió el inóculo y se agregó MM conteniendo 25 µM de ANNB inmediatamente (tiempo=0) ó a los diferentes tiempos p.i. *(B).* Otra serie de cultivos infectados se incubó con MM conteniendo ANNB inmediatamente después de la adsorción y luego se removió el compuesto a los distintos tiempos indicados. En todos los casos, a las 24 h p.i. se midió el rendimiento de virus en los sobrenadantes celulares por UFP. Los valores se expresan como % de inhibición respecto del control sin tratamiento.

En la *Figura R. 21 A* se observa que los niveles de inhibición del rendimiento viral se mantienen en valores comparables si el compuesto se agrega inmediatamente después de la adsorción ó cuando es agregado al MM luego de 9 h p.i., por lo que estaría afectando etapas tardías del ciclo de multiplicación viral. Este resultado se corroboró también mediante el ensayo de remoción del compuesto, donde se observa (*Figura R. 21 B*) que el agente azoico debe estar presente por lo menos 9 h, para que ejerza un efecto antiviral importante, tiempo que coincide con las etapas finales del primer ciclo de multiplicación viral dentro de la célula. Resultados similares fueron obtenidos en experimentos realizados con TCRV (datos no mostrados).

R. V. 3. Efecto del ANNB sobre la adsorción e internalización viral

Para verificar que efectivamente el ANNB no ejerce su acción durante las primeras etapas del ciclo de multiplicación, se determinó el efecto del mismo sobre la adsorción viral. Para ello se midió la cantidad de partículas virales de JUNV y TCRV marcadas radioactivamente, unidas a las células Vero luego de 0 y 40 min de incubación a 4°C para prevenir la internalización viral.

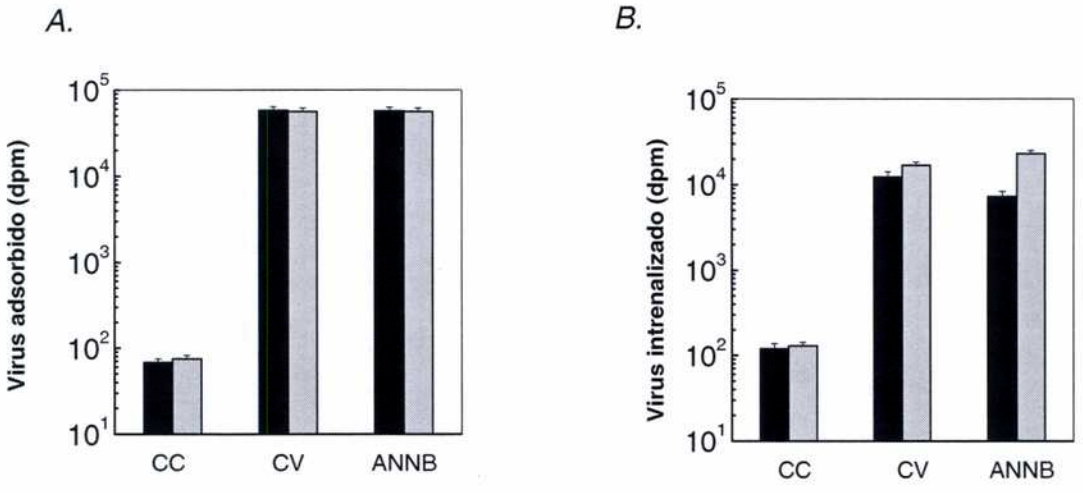


Figura R. 22. Efecto del ANNB sobre la adsorción e internalización de los virus JUNV (barras negras) y TCRV (barras grises). Para la adsorción (A), se inocularon células Vero con la suspensión viral marcada con EXPRE^{35}S^{35}S y luego de 0 y 40 min de incubación a 4°C en presencia o ausencia de ANNB, se cuantificó el virus adsorbido en un contador de centelleo. Para la internalización *(B)*, después de la adsorción a 4°C en ausencia del compuesto, se incubaron los cultivos durante 0 y 60 min a 37°C en presencia o ausencia de ANNB (50 µM) y, luego midió el virus internalizado. **CC**: control celular; **CV**: control viral; **ANNB**: tratamiento con el compuesto en el momento indicado.

Como se muestra en la *Figura R. 22 A*, tanto en las células infectadas en ausencia de ANNB como en el caso donde el compuesto estuvo presente, la cantidad de virus adsorbido luego de 40 min de incubación fue la misma, demostrándose así que esta etapa no está siendo afectada por el compuesto.

El paso siguiente fue estudiar la internalización viral, etapa temprana que transcurre inmediatamente después de la adsorción. Para analizar el probable

efecto del ANNB en la misma, se adsorbió el virus marcado radioactivamente en ausencia de ANNB y luego se elevó la temperatura a 37°C para permitir la internalización en presencia o ausencia del compuesto. Los resultados obtenidos demuestran en la *Figura R. 22 B* que la cantidad de virus internalizado en presencia del ANNB fue similar que en las células sin tratamiento, indicando que este agente tampoco actúa sobre esta etapa.

R. V. 4. Efecto del ANNB sobre la síntesis de proteínas virales

A continuación se procedió a estudiar el efecto del compuesto sobre la síntesis de proteínas virales en células Vero infectadas con JUNV y TCRV.

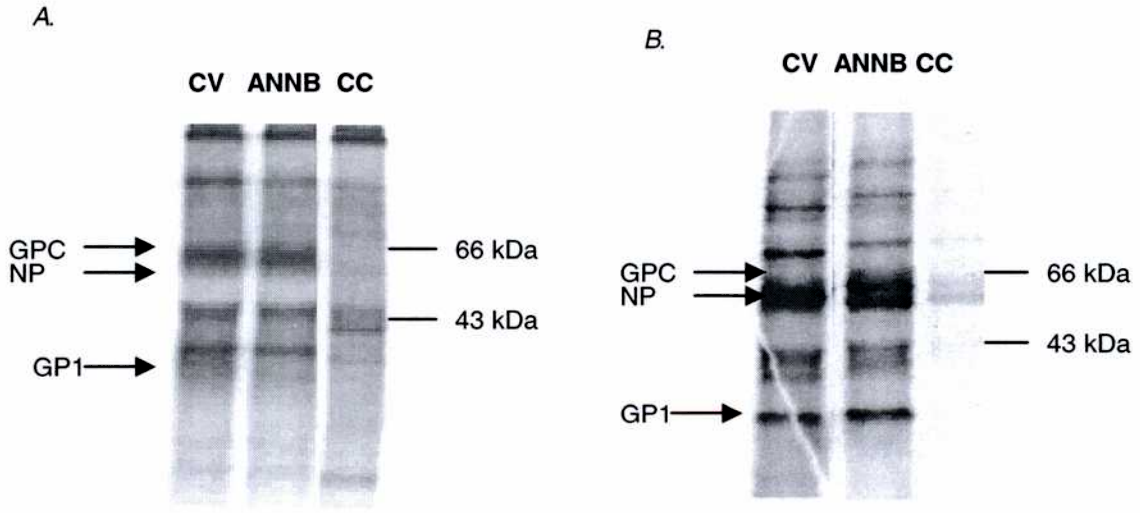


Figura R. 23. Efecto del ANNB sobre la síntesis de proteínas virales. Células Vero fueron infectadas con JUNV *(A)* ó TCRV *(B)* a una m.i de 1 UFP/cél., e incubadas con MM conteniendo o no ANNB (50 µM). A las 48 h p.i. las células se marcaron radioactivamente en presencia de ANNB y se lisaron con buffer RIPA. Las proteínas virales fueron inmunoprecipitadas con suero de conejo anti-JUNV y de cobayo anti-TCRV, respectivamente, y se sometieron a electroforesis. **CV**: control viral; **ANNB**: tratamiento con ANNB; **CC**: control celular.

Las *Figuras R. 23 A* y *B* muestran que no se observaron diferencias significativas en las intensidades de las bandas ni en la migración de las mismas entre los cultivos infectados con JUNV y TCRV sin tratamiento y los respectivos cultivos tratados con el compuesto, indicando que el mismo no afecta la síntesis de proteínas de estos arenavirus.

R. V. 5. Expresión de antígenos virales en presencia de ANNB

Si bien el compuesto ANNB no afectó la síntesis de proteínas, se estudió mediante una inmunofluorescencia indirecta citoplasmática si los mismos interferían en la expresión de antígenos virales en las células. El porcentaje de células fluorescentes en cada preparación fue calculado en 20 campos ópticos seleccionados al azar, tomando como control las monocapas infectadas sin tratar. Como se observa en la *Figura R. 24*, los resultados indicaron que en las células tratadas con ANNB no disminuyó significativamente la marcación de antígeno viral, ni hubo cambios en el patrón de fluorescencia observado con respecto a la distribución típica de las células infectadas no tratadas.

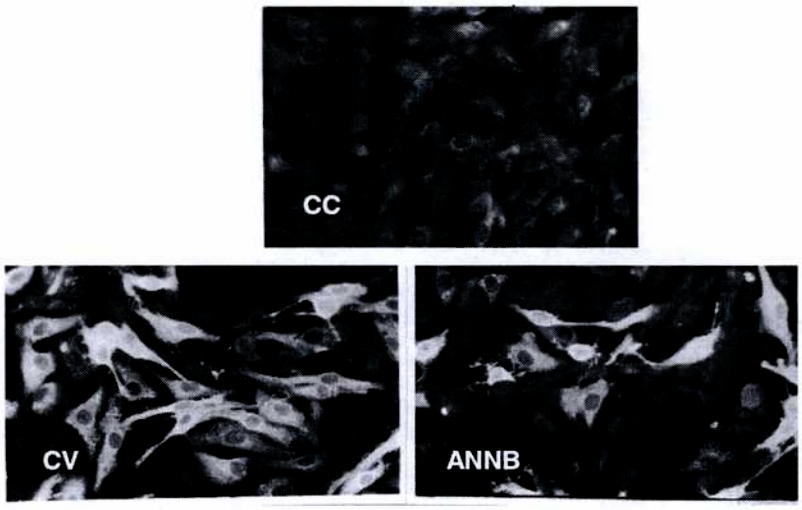


Figura R. 24. Expresión de antígenos virales en presencia de ANNB. Células Vero crecidas sobre cubre objetos se infectaron con JUNV y se trataron con MM conteniendo ANNB (50 µM). A las 24 h p.i. los antígenos virales se revelaron con suero de conejo anti-JUNV y suero anticonejo conjugado con fluoresceína. **CC**: control celular; **CV**: control viral; **ANNB**: tratamiento con ANNB. A: 400X.

R. V. 6. Comparación del efecto del ANNB sobre la producción de virus extracelular y asociado a células

A fin de verificar si las partículas virales llegan a ensamblarse correctamente sin ser liberadas al medio extracelular, se estudió el efecto inhibitorio del compuesto ANNB sobre las partículas virales asociadas a las células. Para ello, se infectaron células con JUNV ó TCRV, respectivamente, y luego de 48 h p.i se procesaron las monocapas celulares, realizando ciclos de congelamiento y descongelamiento, para liberar el virus intracelular. La infectividad se tituló por UFP.

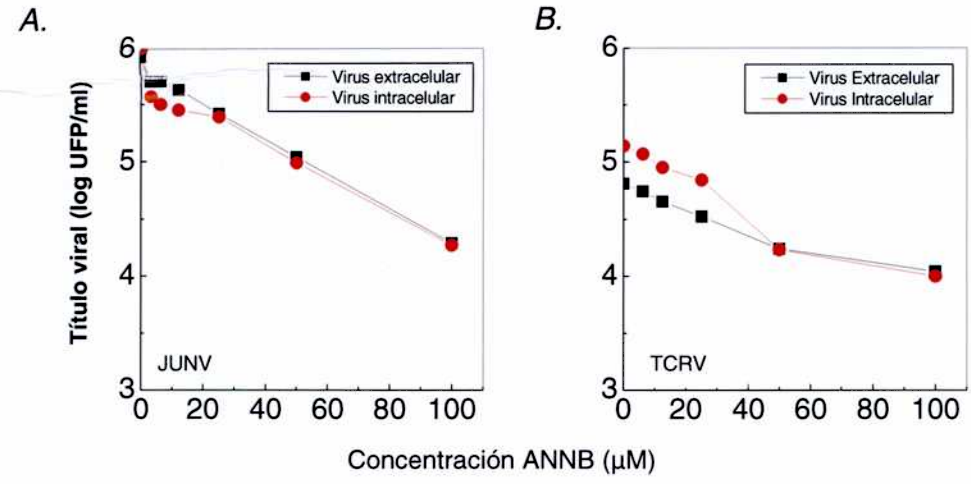


Figura R. 25. Comparación del efecto de ANNB sobre la producción de virus extracelular y asociado a células de JUNV (A) y TCRV (B). Actividad antiviral sobre el virus extracelular (■) e intracelular (■) medida por inhibición del rendimiento viral a las 48 h p.i. y titulada por UFP.

Como se observa en la *Figura R. 25*, la producción de virus asociado a células está igualmente afectada que el virus extracelular, por lo que el compuesto estaría bloqueando el correcto ensamblado del virus dentro de la célula.

A partir de los distintos resultados presentados se puede inferir que ANNB bloquea etapas tardias del ciclo de multiplicación viral, después de la síntesis de proteínas virales, impidiendo el ensamblaje de partículas infecciosas. Esto sugiere que la proteína Z también podría ser el blanco de este compuesto, dada la participación recientemente de Z en la morfogénesis de los arenavirus LCMV y LASV.

DISCUSIÓN

Discusión

El presente trabajo de investigación demostró la actividad de diversos compuestos anti-retrovirales, reactivos con motivos *Zn fingers*, contra varios arenavirus. Los compuestos ensayados, todos ellos provistos por el *National Cancer Institute* (USA), incluyeron una selecta colección de agentes electrofílicos con una variada estructura química y distintos grupos funcionales. Estos compuestos fueron reportados como inhibidores del HIV-1, actuando a través de modificaciones químicas del motivo *Zn finger* de la proteína retroviral NCp7 (Rice *et al.*, 1996; Witvrouw *et al.*, 1997; Berthoux *et al.*, 1999).

En los arenavirus, la presencia de dominios *Zn fingers* también ha sido descripta. Diferentes estudios revelaron un clásico motivo *Zn finger* cerca del carboxilo terminal de la secuencia de la proteína de la nucleocápside de LCMV y JUNV (Salvato & Shimomaye, 1989; Tortorici *et al.*, 2001), demostrando además, que la misma une Zn *in vitro*. Asimismo, la pequeña proteína Z, codificada por el segmento L del RNA viral, contiene un particular motivo *Zn finger* del tipo C3HC4, llamado *RING-finger*, que también une Zn *in vitro* (Salvato & Shimomaye, 1989). Aunque, la real función de Z dentro del ciclo de replicación viral de los arenavirus continúa siendo poco conocida, su participación sería esencial para la normal replicación viral.

La alta conservación que muestra el motivo *RING finger* de Z en los diferentes arenavirus, fue la razón que llevó a considerarlo como posible blanco de acción para los agentes reactivos con NCp7, y estudiar la posible utilidad terapéutica de los mismos.

Los agentes anti-retrovirales evaluados contra los arenavirus fueron agrupados según sus grupos funcionales principales en 2 grandes categorías: los compuestos disulfuros y los compuestos azoicos. Para analizar la selectividad de estos compuestos, se realizaron estudios de citotoxicidad, ensayos de inhibición del rendimiento viral y ensayos de inactivación directa.

De un total de 15 compuestos ensayados inicialmente contra JUNV y TCRV, se observó que: los compuestos TED y CAPH presentaron similar eficacia

en sus propiedades antivirales y virucidas; los disulfuros NSC20625, NSC4493, NSC203, Aldrithiol-2, NSC624151 y NSC624152 presentaron una actividad virucida superior a su efecto antiviral; el disulfuro aromático NSC677459 y los azoicos ANNB, AB y biurea, fueron propiamente antivirales; el compuesto ADA ejerció únicamente acción inactivante y los azoicos AABSSN y ADF, resultaron inactivos.

La mayoría de los compuestos activos correspondieron a agentes disulfuros. Esta diferencia podría relacionarse con una interacción más débil entre los grupos "azo" de dichos compuestos electrofílicos y el motivo *RING finger*, en comparación con el ataque nucleofílico del anillo aromático de los disulfuros hacia esta secuencia, aunque se deberá ensayar una amplia variedad de compuestos y realizar estudios químicos más precisos, para así poder establecer alguna relación entre la estructura y la actividad antiviral de los mismos contra los arenavirus.

Dentro de los compuestos virucidas, el disulfuro aromático NSC20625 y los ditianos NSC624151 y NSC624152 también fueron capaces de actuar dentro de la célula infectada, reduciendo el rendimiento viral en el sobrenadante extracelular en más de 1 logaritmo luego de 48 h de tratamiento. Sin embargo, la actividad virucida que presentaron estos compuestos fue mucho más notoria, llegando a inactivar casi el 99,9 % de las partículas virales presentes en la suspensión (con una disminución en el título de 2,5-3 logaritmos). Una probable explicación de los distintos efectos observados podría llegar a ser la falta de estabilidad de estos compuestos durante las largas incubaciones a 37°C en las células infectadas; hasta el momento no hay datos certeros sobre la estabilidad de los compuestos en tiempos prolongados.

Cuando se analizó la efectividad de estos 3 compuestos virucidas, junto con otros inactivantes, el AT-2 y el azoico ADA, contra LCMV, se confirmó el gran efecto inhibitorio de los mismos, ya que mostraron valores de CI_{50} comparables con los obtenidos para JUNV y TCRV; aunque, para el arenavirus del Viejo Mundo, los valores de CE_{50} y CI_{50} no mostraron diferencias tan marcadas, se observó también una disminución mayor del título viral en los ensayos de inactivación.

Los estudios de cinética de inactivación demostraron que todos estos compuestos fueron inactivantes de los virus JUNV y TCRV a los pocos minutos de estar en contacto con el virus. En el caso del NSC20625, el disulfuro más activo, el 95 % de la infectividad quedó bloqueada, luego de 20 min de inactivación. Estas reacciones de inactivación (interacción compuesto-virus) mostraron ser dependientes de la temperatura, ya que no se observó un efecto virucida a bajas temperaturas, siendo la inactivación máxima a 37-40°C.

El análisis del modo de inactivación de estos compuestos demostró que las partículas virales inactivadas cumplen las etapas tempranas de adsorción e internalización de igual manera que los viriones no tratados. Sin embargo, la ausencia de amplificación de segmentos de los genes codificantes para las principales proteínas virales, NP, GPC y Z, indica que la transcripción y replicación de estos viriones inactivados están totalmente bloqueadas. Así también, se corroboró la falta de las proteínas virales luego de la infección con estas partículas. Por lo tanto, el efecto virucida de estos compuestos conduce a partículas virales incapaces de cumplir con los procesos de biosíntesis.

Es muy probable que este mecanismo de inactivación viral involucre la difusión de los compuestos a través de la bicapa lipídica de la envoltura viral para interactuar específicamente con el blanco interno, la proteína Z, sin afectar el resto de las proteínas virales. Esta hipótesis, junto con los resultados del estudio de las etapas tempranas, sugiere que los compuestos destruyen la infectividad viral, preservando la integridad de las glicoproteínas de envoltura GP1 y GP2, requeridas para el reconocimiento del receptor y para desencadenar la fusión entre las membranas endosomales durante la entrada del virus a la célula, respectivamente (Castilla *et al.*, 1994; Di Simone *et al.*, 1994).

El estudio de la capacidad antigénica de GP1 y GP2, a través de la inoculación de ratones con partículas de JUNV y TCRV inactivadas, mostró una inducción de anticuerpos neutralizantes, confirmando la preservación de la integridad de las mismas luego del tratamiento. Las diferencias que se observaron comparando los títulos de anticuerpos neutralizantes en animales inoculados con virus inactivado y virus infeccioso, podrían deberse a una mínima replicación del

virus en el animal, provocando así una amplificación en su capacidad de inducir anticuerpos. Debe notarse que el virus inactivado se inoculó en los ratones sin el agregado de ningún adyuvante, sustancias normalmente utilizadas para incrementar la capacidad antigénica de un inmunógeno inactivado.

Este tipo de inactivación tendría ciertas ventajas frente a otros métodos, como el uso de calor o formaldehído, ya que al no alterar las glicoproteínas, podría servir para estudiar en detalle la funcionalidad y propiedades inmunopatogénicas de una partícula viral con su conformación externa intacta, pero no infectiva (Rossio *et al.*, 1998). Por otro lado, podría ser de interés, desde el punto de vista de las perspectivas de desarrollo de una potencial vacuna mejorada, contra las fiebres hemorrágicas, donde la partícula viral inmunogénica se encuentre entera. Las vacunas a virus inactivado han tenido éxito en numerosos casos (Clemens *et al.*, 1995; Cranage *et al.*, 1992; Murdin *et al.*, 1996; Murphey-Corb *et al.*, 1989; Potash, 1968), sin embargo, con algunos agentes, la inactivación implica la desnaturalización de las proteínas de superficie, con lo cual, muchas veces no han sido efectivas a largo plazo.

En nuestro país, se han realizados varios intentos en el desarrollo de vacunas inactivadas contra la FHA, utilizando antígenos inactivados con formaldehído, exposición a colorantes fotoactivos, radiación ultravioleta y hasta acetona (Parodi *et al.*, 1965; Martínez Segovia *et al.*, 1980; D´Aiutolo *et al.*, 1979; Carballal *et al.*, 1985; Videla *et al.*, 1989). Aunque las pruebas de vacunas inactivadas no han sido exitosas, no deberíamos descartar nuevos métodos de inactivación como una opción inmunogénica contra las fiebres hemorrágicas. En los últimos años, se ha utilizado la cepa atenuada Candid#1 para vacunar la población de mayor riesgo en la zona endémica de FHA, habiéndose logrado una efectiva reducción en la incidencia de la enfermedad (Enria *et al.*, 1999). Sin embargo, las contraindicaciones de la administración de vacunas a virus vivo, asociadas especialmente al alto riesgo de replicación del virus, llevan a considerar entonces el desarrollo de una vacuna más segura, ya sea por inactivación viral o por ingeniería genética (DNA recombinante). El diseño de la misma debe considerar: eliminar el riesgo de reversión de la virulencia, eliminar el riesgo de

infecciones persistentes, permitir su uso en poblaciones con edad reproductiva, mejorar su estabilidad durante su almacenamiento, disminuir su costo, y permitir el uso de la misma en los roedores reservorios, abriendo así una posibilidad al control de la FHA (Enria *et al.*, 2002). Una última consideración sería que la misma protegiera contra todos los arenavirus. Mientras tanto, indudablemente la vacuna a virus vivo Candid #1 seguirá siendo una gran oportunidad para la población en riesgo.

Otra gran utilidad de estos compuestos virucidas podría ser el uso de los mismos como desinfectantes luego de trabajos experimentales dentro del laboratorio, disminuyendo el riesgo de los peligros asociados a infecciones originadas por la manipulación de stocks virales de alto título o muestras de productos biológicos, como fluídos sanguíneos de animales de laboratorio infectados con arenavirus, promoviendo así, la seguridad de los investigadores que cumplen estas tareas.

Por otro lado, la efectividad del disulfuro NSC20625 y los ditianos NSC6241521 y NSC624152 de inactivar viriones tanto de JUNV y TCRV como de LCMV, son resultados que se correlacionan con la acción inactivante mostrada por dichos compuestos contra HIV, lo que llevaría a pensar en un mecanismo de acción similar para estos distintos virus. Se ha demostrado que la actividad anti-retroviral de NSC20625, NSC624151, NSC624152, el Aldrithiol-2 y otros disulfuros, está asociada a la eyección del átomo de Zn de la proteína NCp7, provocando la formación de multímeros de esta proteína y la subsecuente inactivación del virión (Rein *et al.*, 1996; Tummino *et al.*, 1996, 1997; Rice *et al.*, 1997). Cabe resaltar que los compuestos más activos *in vitro* contra los arenavirus son los que han mostrado mayor eficacia en la eyección de Zn de la NCp7 de HIV (Rice *et al.*, 1996). Más aún, el análisis del efecto de NSC20625, Aldrithiol-2 y el compuesto azoico ADA, directamente sobre la proteína recombinante purificada Z de los arenavirus LCMV y LASV, demostró que los mismos también provocan la multimerización de dicha proteína.

Se requieren ensayos experimentales adicionales para una completa explicación que abarque las diferencias en el comportamiento de los distintos

grupos de compuestos, y revelar si los coincidentes efectos inactivantes de estos compuestos contra los arenavirus y retrovirus se asocian a una interacción similar entre los mismos y las proteínas que unen Zn, y que, como consecuencia de la reacción compuesto-proteína, el virión pierde su infectividad por eyección del Zn a partir de la proteína Z o lo hace a través de otro mecanismo.

A pesar de que los resultados obtenidos luego del tratamiento con NSC20625 de viriones de JUNV y LCMV purificados no muestran alteraciones en la proteína NP, faltaría analizar el efecto de los mismos directamente sobre la NP recombinante purificada, ya que, si bien es distinto, esta proteína también posee un motivo *Zn finger* en su secuencia. Sin embargo, el conjunto de datos obtenidos en este estudio sugieren que la acción de estos compuestos estaría dirigida particularmente hacia la proteína Z de los arenavirus, interaccionando con ella, provocando la formación de multímeros de alto peso molecular y por consiguiente, la pérdida de funcionalidad.

También se ha analizado si las modificaciones provocadas en Z por el tratamiento con NSC20625 tienen a su vez un efecto sobre las interacciones entre Z y proteínas celulares. Estudios recientes mostraron que la proteína Z de LCMV interactúa con varias proteínas celulares, entre ellas, PML, PRH y eIF4E, y se ha sugerido que este tipo de interacción entre proteína viral y proteínas celulares puede explicar ciertas características únicas de las infecciones con arenavirus (Borden *et al.*, 1998a). La relocalización de cuerpos nucleares de PML al citoplasma de células infectadas con LCMV es un mecanismo que también ha sido reportado para herpesvirus, adenovirus, papovavirus y papilomavirus (Moller *et al.*, 2003). Además, en los arenavirus, se ha demostrado la existencia de una asociación física de PRH tanto con Z como con PML. Esta interacción PRH-Z sería una estrategia viral para aumentar la patogenicidad durante las infecciones. En el caso de LCMV, se observa que infecciones de células derivadas de hepatocitos humanos con cepas patógenas llevan a alterar significativamente el patrón de distribución de PRH, pasando del núcleo al citoplasma de la célula infectada, y afectando las funciones celulares regenerativas de esta proteína, por lo que se llegaría en forma más rápida a una destrucción del hígado (Djavani,

comunicación personal). Sin embargo, este fenómeno no ocurre cuando la infección se realiza con cepas avirulentas.

El tratamiento con NSC20625 de células infectadas con la cepa patógena WE de LCMV revierte el patrón de distribución alterado de la PRH a un patrón normal, además de observarse una marcada inhibición en la expresión de la proteína Z. Esta reducción puede deberse a una menor expresión de esta proteína ó a que la alteración producida en la misma por interacción con el compuesto impida el reconocimiento por anticuerpos específicos. Asimismo, se demostró que el tratamiento con NSC20625 de células infectadas con arenavirus inhibe específicamente la replicación del RNA viral, sin afectar la transcripción del gen celular *prh*. Estas diferencias estarían confirmando que la redistribución de PRH observada en las células infectadas dependería de la presencia de Z y se estaría debiendo a una interacción entre la proteína celular y la proteína viral Z, probablemente a través de los respectivos motivos *RING fingers* presentes en sus correspondientes secuencias. Estudios moleculares complementarios se deberán llevar a cabo para dilucidar mejor dicho mecanismo.

Dentro de los compuestos propiamente antivirales, el compuesto azoico ANNB fue seleccionado para estudiar su modo de acción, ya que presentó alto IS contra JUNV y TCRV. Cuando se analizó el efecto de este compuesto en las etapas tempranas del ciclo, como la adsorción y la internalización, no se observó ningún tipo de acción inhibitoria. Al estudiar el efecto del ANNB sobre la síntesis de proteínas virales en células infectadas y tratadas posteriormente con el compuesto, no se vió alterado el patrón electroforético de bandas correspondientes a las proteínas virales mayoritarias. Con experimentos de tiempo de adición y remoción de ANNB, se confirmó que el compuesto afecta etapas tardías del ciclo viral. Por otro lado, el efecto inhibitorio del compuesto se evidenció tanto en la producción viral extracelular, como en el virus asociado a célula. Todos estos resultados sugieren que el compuesto ANNB estaría bloqueando el correcto ensamblado del virus dentro de la célula y no la brotación.

En el caso de HIV-1, se sabe que otros inhibidores retrovirales propiamente antivirales, que también provocan la eyección de Zn de la NCp7, afectan

mayoritariamente los pasos de la maduración viral intracelular a través de efectos post-traduccionales en las células infectadas, impidiendo a la proteasa de HIV-1 el reconocimiento del precursor de la NCp7 como sustrato, bloqueando así el procesamiento de los precursores e impidiendo la maduración de las proteínas virales.

En los arenavirus, la formación de partículas virales podría ser bloqueda en células tratadas con ANNB, debido a una falla, aún no dilucidada, en el ensamblaje viral. Esto conduce a pensar que la proteína Z también podría ser el blanco de este compuesto, dada la participación recientemente descripta de Z en la morfogénesis de los arenavirus LCMV y LASV (Stecker *et al.*, 2003). Debido a las múltiples funciones de Z en el ciclo de multiplicación, otras causas podrían ser: un inadecuado transporte de las proteínas virales, un bloqueo en el procesamiento post-traduccional o una ineficiente interacción, ya sea, entre las proteínas virales o entre las proteínas y el genoma viral, requeridos para la correcta maduración.

Muchos estudios demuestran que Z es la contraparte de la proteína de matriz, encontrada en otros RNA virus y ausente en los arenavirus (Salvato *et al.*, 1993; Strecker *et al.*, 2003), por lo que tendría gran importancia estructural, esencial para la formación y brotación del virus y no sólo un rol regulatorio, mediando interacciones entre proteínas durante el ciclo viral.

Esta importancia estructural y regulatoria de Z dentro del ciclo viral, explicaría también los efectos diferenciales entre los compuestos inactivantes (NSC20625, AT-2, NSC624151, NSC624152, y ADA). Dentro de este grupo, todos parecerían inactivar a la partícula viral de manera similar, causando la multimerización de Z. El efecto antiviral de NSC20625, AT-2, NSC624151 y NSC624152 en las células lleva a pensar que esta reacción también ocurre dentro de la célula durante la replicación viral. Sin embargo, no se observa este efecto inhibitorio dentro de la célula cuando se realiza el tratamiento con ADA. La diferencia podría deberse a la fácil reducción a biurea de este compuesto dentro del ambiente celular, perdiendo así su capacidad inactivante dentro de la célula infectada. Por otro lado, los resultados expuestos en este trabajo sugieren que el NSC20625 ejercería su acción antiviral en la célula infectada a través de un

mecanismo diferente al del ANNB, o por lo menos en distintas etapas del ciclo viral. Experimentos adicionales son requeridos para dilucidar si ambos mecanismos de acción (antiviral y virucida) están asociados a una interacción similar de los compuestos con los motivos *Zn fingers*, como ha sido reportado para los retrovirus.

Por último, si el correcto mecanismo de acción de estos compuestos es la entrada por difusión simple, atravesando la bicapa lipídica de la membrana viral y llegando a la proteína blanco con la subsiguiente oxidación de las cisteínas tioladas en el motivo *Zn finger*, entonces cualquier agente oxidante suave, lo suficientemente hidrofóbico para penetrar la membrana podría ser considerado como un potencial agente antiviral. Obviamente, el número de tales tipos de compuestos es extremadamente grande. Sin embargo, los ensayos experimentales muestran que muchos de estos compuestos exhiben una severa toxicidad en los cultivos celulares, no así otros pocos. Parecería posible que la citotoxicidad de algunos compuestos se encuentre limitada, debido a que el ambiente intracelular está protegido contra los destructivos agentes levemente oxidantes (Kosower *et al.*, 1978). Esta protección celular podría reducir el daño de estos compuestos hacia la célula huésped, en comparación con la acción directa que ejercen los mismos sobre la partícula viral extracelular, que carece de este mecanismo protector, y que además, se encuentra en permanente replicación, dejando una célula para infectar otra, siendo aún más vulnerable a la acción del compuesto en el medio extracelular, como es el caso de los disulfuros inactivantes. Las proteínas celulares con motivos *Zn fingers* en su secuencia cumplen papeles importantes y son esenciales para el normal funcionamiento de la maquinaria de la célula. Se han realizado estudios sobre la citotoxicidad de los compuestos electrofílicos anti-retrovirales, y se ha demostrado que los mismos no poseen efectos citopáticos sobre estas proteínas, siendo el efecto específico sobre la proteína viral, aún en tiempos prolongados de incubación. Existen evidencias experimentales que demuestran que 3 de estos compuestos anti-retrovirales, reactivos contra los motivos *Zn fingers* de NCp7, entre ellos el ditiano NSC624151,

no tuvieron ningún impacto sobre las funciones de proteínas celulares que poseen motivos *Zn fingers* en sus secuencias (Huang *et al.*, 1998).

En conclusión, este trabajo ha permitido demostrar por primera vez que una proteína esencial para la multiplicación de los arenavirus es el blanco de acción de compuestos que representan agentes antivirales y virucidas promisorios contra las fiebres hemorrágicas. La eficacia de estos agentes sobre los arenavirus, más la falta de efectos citotóxicos en cultivos celulares *in vitro*, son indicios de verdaderos índices de selectividad que aumentan las perspectivas futuras de esta clase de compuestos para probar su eficacia *in vivo* contra los arenavirus, en modelos animales como cobayos o monos.

CONCLUSIONES

Conclusiones

De un total de 15 compuestos ensayados inicialmente contra JUNV y TCRV, se observó que: los compuestos TED y CAPH presentaron similar eficacia en sus propiedades antivirales y virucidas; los disulfuros NSC20625, NSC4493, NSC203, Aldrithiol-2, NSC624151 y NSC624152 presentaron una actividad virucida superior a su efecto antiviral; el disulfuro aromático NSC677459 y los azoicos ANNB, AB y biurea, fueron propiamente antivirales; el compuesto ADA ejerció únicamente acción inactivante y los azoicos AABSSN y ADF, fueron inactivos.

Los compuestos inactivantes mostraron valores de CI_{50} dentro del rango 0,2-7,6 µM y fueron efectivos también contra el LCMV, virus perteneciente al grupo del Viejo Mundo.

El estudio de los parámetros que afectan la inactivación (tiempo y temperatura) demostró que la pérdida de infectividad comenzó a los pocos minutos de estar el virus en contacto con los compuestos y que la interacción entre compuesto-viriones es dependiente de la temperatura.

El estudio de la capacidad del virus inactivado de cumplir las etapas tempranas del ciclo de replicación viral demostró que el mismo se adsorbe y penetra en las células con igual eficacia que el virus control.

Se comprobó la ausencia del RNA correspondiente a los genes N, GPC y Z, en los viriones inactivados, lo que implica que tanto la transcripción como la replicación están bloqueadas.

El virus inactivado no es capaz de sintetizar las proteínas, por lo tanto estas partículas entran a la célula, pero no logran completar el ciclo de multiplicación viral.

Se detectaron títulos similares de anticuerpos neutralizantes en animales inoculados con viriones inactivados, indicando así la capacidad de las glicoproteínas para inducir la respuesta de anticuerpos; esto sugiere que los viriones inactivados mantienen la funcionalidad de las proteínas externas.

La acción inhibitoria diferencial de los compuestos sobre los arenavirus y HSV-1 confirma que la proteína Z juega no sólo un rol regulatorio durante el ciclo viral, sino que tiene importancia estructural, ya que los compuestos ejercen su acción tanto en la célula infectada, como directamente sobre el virión.

Los resultados del estudio del efecto inhibitorio directamente sobre Z indicarían que los compuestos están dirigidos particularmente hacia esta proteína, interaccionando con ella y provocando su multimerización, con la consiguiente pérdida de funcionalidad y capacidad infectiva del virión.

El tratamiento con NSC20625 de células infectadas con LCMV inhibió la replicación del RNA viral, sin embargo, la transcripción del gen celular *prh*, no se fue afectada por el compuesto.

El tratamiento con NSC20625, no sólo inhibió la expresión de la proteína viral Z en las células infectadas con LCMV, sino que además revirtió el patrón de distribución de la proteína PRH en estas células a un patrón normal.

El compuesto azoico ANNB mostró un amplio rango de acción contra los arenavirus, ya que fue también inhibidor de la multiplicación de otras cepas de JUNV, así como de TCRV, PICV y LCMV.

El modo de acción antiviral manifestó que el ANNB afecta las etapas tardías del ciclo de multiplicación viral.

El compuesto ANNB no afecta las etapas tempranas de adsorción e internalización viral, ni la síntesis y la expresión de proteínas virales.

Al igual que el virus extracelular, la producción de virus asociado a células está afectada por el ANNB.

El compuesto azoico ANNB estaría bloqueando el correcto ensamblado dentro de la célula.

Es la primera vez que se demuestra que una proteína esencial para la multiplicación de los arenavirus es el blanco de acción de compuestos que representan agentes antivirales promisorios contra las fiebres hemorrágicas mostrando similar eficacia *in vitro* que la ribavirina, la única droga conocida que ha sido ensayada en los pacientes infectados con arenavirus.

REFERENCIAS

Referencias

Albariño C.J., Ghiringhelli P.D., Posik D.M. *et al.* (1997). Molecular characterization of attenuated junin virus strains. J. Gen. Virol. **78**:1605-1610.

Armstrong, C & Lillie, R. (1934). Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. Public Health Republic. **49**, 1019-1027.

Andrei, G. & E. De Clercq (1990). "Inhibitory effect of selected antiviral compounds on arenavirus replication in vitro." Antiviral Res **14** (4-5): 287-99.

Arribalzaga R.A. (1955). Una nueva enfermedad epidémica a germen desconocido: hipertermia, nefrotóxica, leucopénica y enantemática. Día del médico (Buenos Aires) 27: 1204-1210.

Auperin, D. D., M. Galinski, *et al.* (1984). "The sequences of the N protein gene and intergenic region of the S RNA of pichinde arenavirus." Virology **134** (1): 208-19.

Baird, R.D. & Rivers, T.M. (1938). Relationship of lymphocytic choriomeningitis to acute aseptic meningitis (Wallgren). Am. J. Public Health **28**, 47.

Barlow PN, Luisi B, Milner A, Elliott M, Everett R. (1994). Structure of the C3HC4 domain by 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. A new structural class of zinc-finger. J Mol Biol. 237(2):201-11.

Barrera Oro, J & Eddy, G. (1982). Characteristics of candidate live attenuated Junín virus vaccine. Fourth International Conference of Comparative Virology, Alberta, Canadá.

Bartolotta, S., C. C. Garcia, *et al.* (2001). "Effect of fatty acids on arenavirus replication: inhibition of virus production by lauric acid." Arch Virol **146** (4): 777-90.

Berg JM & Shi Y (1996) The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. Science 271, 1081-1085.

Berthoux, L., Péchoux, C., Darlix, J.L., 1999. Multiple effects of an anti-human immunodeficiency virus nucleocapsid inhibitor on virus morphology and replication. J. Virol. 73, 10000-10009.

Beyer, W. R.; Popplau, D.; Garten, W.; von Laer, D.; Lenz, O. (2003) Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J. Virol.*, *77*, 2866-2872.

Borden KL, Lally JM, Martin SR, O'Reilly NJ, Etkin LD, Freemont PS. (1995). Novel topology of a zinc-binding domain from a protein involved in regulating early Xenopus development. EMBO J. 1;14(23):5947-56.

Borden, K. L., E. J. Campbell Dwyer, *et al.* (1998a). "An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm." J Virol **72** (1): 758-66.

Borden, K. L., E. J. Campbell Dwyer, *et al.* (1998b). "Two RING finger proteins, the oncoprotein PML and the arenavirus Z protein, colocalize with the nuclear fraction of the ribosomal P proteins." J Virol **72** (5): 3819-26.

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

Bowen, M. D., C. J. Peters, *et al.* (1996). "Oliveros virus: a novel arenavirus from Argentina." Virology **217** (1): 362-6.

Bowen, M. D., P. E. Rollin, *et al.* (2000). "Genetic diversity among Lassa virus strains." J Virol **74**(15): 6992-7004.

Buchmeier, M. J., H. A. Lewicki, *et al.* (1981). "Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis and pichinde viruses: generation, characterization, and cross-reactivity with other arenaviruses." Virology **113** (1): 73-85.

Burns, J. W. & M. J. Buchmeier (1991). "Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus." Virology **183** (2): 620-9.

Burns JW & Buchmeier MJ (1993). Chapter 2: Glycoproteins of the Arenavirus, 17-35. In The Arenaviridae. Salvato MS. Plenum Press, NewYork and London.

Campbell Dwyer, E. J., H. Lai, *et al.* (2000). "The lymphocytic choriomeningitis virus RING protein Z associates with eukaryotic initiation factor 4E and selectively represses translation in a RING-dependent manner." J Virol **74** (7): 3293-300.

Candurra, N. A., L. A. Scolaro, *et al.* (1990). "A comparison of Junin virus strains: growth characteristics, cytopathogenicity and viral polypeptides." Res Virol **141** (5): 505-15.

Candurra, N. A. & E. B. Damonte (1997). "Effect of inhibitors of the intracellular exocytic pathway on glycoprotein processing and maturation of Junin virus." Arch Virol **142** (11): 2179-93.

Candurra, N. A. & E. B. Damonte (1999a). "[Inhibition of Junin virus multiplication by caffeine]." Rev Argent Microbiol **31** (3): 135-41.

Candurra NA, Lago MJ, Maskin L & Damonte EB (1999b) Involvement of cytoskeleton in Junin virus multiplication. *Journal of General Virology* **80**:147-156.

Cao, W., M. D. Henry, *et al.* (1998). "Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus." Science **282** (5396): 2079-81.

Carballal, G, Videla C, Oubiña J, *et al.*,(1985). Antígenos inactivados de virus Junín. Medicina (Bs Aires) 45:153-158.

Carballal, G., C. Videla, *et al.* (1986). "Experimental infection of Akodon molinae (Rodentia, Cricetidae) with Junin virus." J Med Virol **19** (1): 47-54.

Castilla, V., S. E. Mersich, *et al.* (1994). "The entry of Junin virus into Vero cells." Arch Virol **136** (3-4): 363-74.

Castilla, V., L. M. Palermo, *et al.* (2001). "Involvement of vacuolar proton ATPase in Junin virus multiplication." Arch Virol **146** (2): 251-63.

CDC. Center for Disease Control and Prevention, 1994. Bolivian hemorrhagic fever-El Beni Department, Bolivia, 1994. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. **43**, 943-946.

CDC. Center for Disease Control and Prevention, 2000. Fatal illnesses associated with a new world arenavirus-California, 1999-2000. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. **49**, 709-711.

Charrel, R. N., H. Feldmann, *et al.* (2002). "Phylogeny of New World arenaviruses based on the complete coding sequences of the small genomic segment identified an evolutionary lineage produced by intrasegmental recombination." Biochem Biophys Res Commun **296** (5): 1118-24.

Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. Anlytical Biochemistry **162**, 156-159.

Clegg, J. C., S. M. Wilson, *et al.* (1991). "Nucleotide sequence of the S RNA of Lassa virus (Nigerian strain) and comparative analysis of arenavirus gene products." Virus Res **18**(2-3): 151-64.

Clemens R, Safary A, Hepburn C, Roche W, Stanbury W, Andre F. (1995). Clinical experience with an inactivated hepatitis vaccine. J. Infect. Dis. 171, (Suppl.1), S44-S49.

Coimbra, T.; Nassar, E.; Burattini, M.; De Souza, L.; Ferreira, I.; Rocco, I.; Travassos Da Rosa, A.; Vasconcelos, P.; Pinheiro, F.; LeDuc, J.; Rico-Hesse, R.; Gonzalez, J.; Jahrling, P. & Tesh, R. (1994). New arenavirus isolated in Brazil. Lancet **343**, 391-392.

Contigiani MS, Sabattini MS (1977) Virulencia diferencial de cepas de virus Junín por marcadores biológicos en ratones y cobayos. Medicina (Bs. Aires) 37 (Suppl. 3): 244-251.

Cordo, S. M., N. A. Candurra, *et al.* (1999). "Myristic acid analogs are inhibitors of Junin virus replication." Microbes Infect **1**(8): 609-14.

Cornu TI, de la Torre JC. (2001). RING finger Z protein of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) inhibits transcription and RNA replication of an LCMV S-segment minigenome. J Virol. **75** (19):9415-26.

Cornu TI, de la Torre JC. (2002). Characterization of the arenavirus RING finger Z protein regions required for Z-mediated inhibition of viral RNA synthesis. J Virol. **76** (13):6678-88.

Cornu TI, Feldmann H, de la Torre JC. (2004). Cells expressing the RING finger Z protein are resistant to arenavirus infection. J Virol. **78** (6):2979-83.

Coto CE & León ME (1978) Susceptibilidad exacerbada del ratón de 10 días a la infección con arenavirus. Medicina 38: 281-289.

Cranage M, Baskerville A, Ashworth L, Dennis M, Cook N, Sharpe S, Farrar G, Rose J, Kitchin P, Greenaway P. (1992) Intrarectal challenge of macaques vaccinated with formalin-inactivated simian immunodeficiency virus. Lancet 339: 273-274.

Crotty, S.; Maag, D.; Arnold, J. J.; Zhong, W.; Lau, J. Y. N.; Hong, Z.; Andino, R.; Cameron, C. E. (2000) The broad-spectrum antiviral ribonucleotide, ribavirin, is an RNA virus mutagen. *Nature Medicine*, *6*, 1375-1379.

Crotty, S.; Cameron, C. E.; Andino, R. (2001) RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *98*, 6895-6900.

D´Aiutolo A, Lampuri J, Coto C (1979). Reactivación del virus Junín inactivado por la luz ultravioleta. Medicina (Bs Aires) 39: 801.

Damonte, E. B.; Mersich, S. E.; Candurra, N. A. (1994) Intracellular processing and transport of Junin virus glycoproteins influences virion infectivity. *Virus Res.*, *34*, 317-326.

De Clercq E. (2001). New developments in anti-HIV chemotherapy. Curr Med Chem. (13):1543-72.

De Clercq E. (2002) Highlights in the development of new antiviral agents. Mini Rev Med Chem. (2):163-75.

Di Simone, C., M. A. Zandonatti, *et al.* (1994). "Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike." Virology **198** (2): 455-65.

Di Simone, C. & M. J. Buchmeier (1995). "Kinetics and pH dependence of acid-induced structural changes in the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein complex." Virology **209** (1): 3-9.

Djavani, M., I. S. Lukashevich, *et al.* (1997). "Completion of the Lassa fever virus sequence and identification of a RING finger open reading frame at the L RNA 5' End." Virology **235** (2): 414-8.

Djavani, M., J. Rodas, *et al.* (2001). "Role of the promyelocytic leukemia protein PML in the interferon sensitivity of lymphocytic choriomeningitis virus." J Virol **75** (13): 6204-8.

Downs WG, Anderson CR, Spence L, Aitken THG, Greenhall AH (1963). Tacaribe virus, a new agent isolated from Artibeus bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies. Am J Trop Med Hyg **12**: 640-646.

Eddy, G. A., F. S. Wagner, *et al.* (1975). "Protection of monkeys against Machupo virus by the passive administration of Bolivian haemorrhagic fever immunoglobulin (human origin)." Bull World Health Organ **52** (4-6): 723-7.

Ellenberg P, Edreira M, Lozano M, Scolaro L. (2002). Synthesis and expression of viral antigens in Vero cells persistently infected with Junin virus. Arch Virol. **47** (8):1543-57.

Ellenberg P, Edreira M, Scolaro L. (2004). Resistance to superinfection of Vero cells persistently infected with Junin virus. Arch Virol. **149** (3):507-22.

Eichler R, Strecker T, Kolesnikova L, Ter Meulen J, Weissenhorn W, Becker S, Klenk HD, Garten W, Lenz O. (2004). Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP). Virus Res. **100** (2):249-55.

Enria, D., S. G. Franco, *et al.* (1986). "Current status of the treatment of Argentine Hemorrhagic Fever." Med Microbiol Immunol (Berl) **175** (2-3): 173-6.

Enría, D.A., Maiztegui, J.I., 1994. Antiviral treatment of Argentine hemorrhagic fever. Antiviral Res. **23**, 23-31.

Enria, D., Feuillade, M.R., Levis, S., Briggiler, A.M., Ambrosio, A.M., Saavedra, M.C., Becker, J.L., Riera, L., Calderón, G., Pini, N., Sottosanti, J., Avilés, G. García, J., Sabattini, M., 1999. Impact of vaccination of a high-risk population for Argentine hemorrhagic fever with a live-attenuated Junin virus vaccine. In: Saluzzo, J.F., Dodet, B. (Eds.), Factors in the emergence and control for rodent-borne viral diseases, Elsevier, Paris, pp. 273-279.

Enria D & Barrera Oro JG (2002). Junin Virus Vaccines. In: Arenaviruses II. The Molecular Pathogenesis of Arenavirus Infection. Editado por MBA Oldstone, Springer-Verlag Berlin Heidelberg , pp139-157.

Farber F.E:, Rawls W.E. (1975) Isolation of ribosome-like structures from Pichinde virus. J. Gen. Virol. **26**: 21-31.

Frame J.D., Baldwin J.M., Gocke D.J., Troup J.M. (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.

Frankel AD, Berg JM, Pabo CO. (1987). Metal-dependent folding of a single zinc finger from transcription factor IIIA. Proc Natl Acad Sci U S A. **84** (14):4841-5.

Friedlander, A. M., P. B. Jahrling, *et al.* (1984). "Inhibition of mouse peritoneal macrophage DNA synthesis by infection with the arenavirus Pichinde." Infect Immun **43** (1): 283-8.

Fulhorst, C. F., M. D. Bowen, *et al.* (1996). "Isolation and characterization of Whitewater Arroyo virus, a novel North American arenavirus." Virology **224** (1): 114-20.

Fulhorst, C.F., Bowen, M.D., Salas, R.A., de Manzione, N.M.C., Duno, G., Utrera, A., Ksiazek, T.G., Peters, C.J., Nichol, S.T., de Miller, E., Tovar, D., Ramos, B., Vasquez, C., Tesh, R.B. (1997). Isolation and characterization of Pirital virus, a newly discovered South American arenavirus. Am. J. Trop. Med. Hyg. **56**, 548-553.

Garcia CC, Brousse BN, Carlucci MJ, Moglioni AG, Martins Alho M, Moltrasio GY, D'Accorso NB, Damonte EB. (2003). Inhibitory effect of thiosemicarbazone derivatives on Junin virus replication in vitro. Antivir Chem Chemother. **14** (2):99-105.

Garcin, D., Rochat, S., Kolakofsky, D., 1993. The Tacaribe arenavirus small zinc finger protein is required for both mRNA synthesis and genome replication. J. Virol. **67**, 807-812.

Gilbert, B.E. & Knight, V. (1986). Biochemestry and clinical application of ribavirin. Antimicrob. Agents Chemother. **30**, 201-205.

Glushakova, S. E. & I. S. Lukashevich (1989). "Early events in arenavirus replication are sensitive to lysosomotropic compounds." Arch Virol **104** (1-2): 157-61.

Goebel Frank-D, Hemmer R, Schmit JC, Bogner JR, de Clercq E, Witvrouw M, Pannecouque C, Valeyev R, Vandevelde M, Margery H, Tassignon JP. (2001). Phase I/II dose escalation and randomized withdrawal study with add-on azodicarbonamide in patients failing on current antiretroviral therapy. AIDS;**15**:33-45.

Gonzalez, J. P., J. B. McCormick, *et al.* (1983). "An arenavirus isolated from wild-caught rodents (Pramys species) in the Central African Republic." Intervirology **19** (2): 105-12.

Gonzalez, J. P., M. D. Bowen, *et al.* (1996). "Genetic characterization and phylogeny of Sabia virus, an emergent pathogen in Brazil." Virology **221**(2): 318-24.

Goswami, B.B., Borek, E., Sharma, O.K., Fujitaki, J. & Smith, R.A. (1979). The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits capping of mRNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. **89**, 830-836.

Guerrero L.B. de, Weissenbacher M.C., Parodi A.S. (1969) Inmunización contra la fiebre hemorrágica argentina con una cepa atenuada del virus Junín; I: estudio de una cepa modificada del virus Junín, inmunización de cobayos. Medicina (Buenos Aires) 29:1-5.

Gunther S, Kuhle O, Rehder D, Odaibo GN, Olaleye DO, Emmerich P, ter Meulen J, Schmitz H. (2001) Antibodies to Lassa virus Z protein and nucleoprotein co-occur in human sera from Lassa fever endemic regions. Med Microbiol Immunol (Berl) **189** (4):225-9.

Hathout Y, Fabris D, Han M, Sowder II R, Henderson L, Fenselau C. (1996) Characterization of intermediates in the oxidation of Zinc fingers in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein p7. Drug, Metabolism and Disposition, 24, 12, 1395-1400.

Harrison, L. H., N. A. Halsey, *et al.* (1999). "Clinical case definitions for Argentine hemorrhagic fever." Clin Infect Dis **28**(5): 1091-4.

Howard, C. R. & M. J. Buchmeier (1983). "A protein kinase activity in lymphocytic choriomeningitis virus and identification of the phosphorylated product using monoclonal antibody." Virology **126** (2): 538-47.

Hu HM, O'Rourke K, Boguski MS, Dixit VM. (1994). A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. J Biol Chem. **269** (48):30069-72.

Huang M, Maynard A, Turpin JA, Graham L, Janini GM, Covell DG & Rice WG (1998) Anti-HIV agents that selectively target retroviral nucleocapsid protein zinc fingers without affecting cellular zinc finger proteins. Journal of Medicinal Chemistry **41**:1371-1381.

Iapalucci S, Lopez N, Rey O, Zakin MM, Cohen GN & Franze-Fernandez MT (1989) The 5'region of Tacaribe virus L RNA encodes a protein with a potential metal binding domain. *Virology* **173** :357-361.

Iapalucci, S., A. Chernavsky, &. (1994). "Tacaribe virus gene expression in cytopathic and non-cytopathic infections." Virology **200** (2): 613-22.

Jácamo R, López N, Wilda M, Franze-Fernandez MT. (2003). Tacaribe virus Z protein interacts with the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis. J Virol. **77**(19):10383-93.

Jahrling, P.B., Hesse, R.A., Eddy, G.A., Johnson, K.M., Callis, R.T. & Stephen, E.L. (1980). Lassa virus infection of rhesus monkeys: Pathogenesis and treatment with ribavirin. J. Infect. Dis. **141**, 580-589.

Jennings, W.L., Lewis, A.L., Sather, G.E., Pierce, L.V. & Bond, J.O. (1970). Tamiami virus in the Tampa Bay area. Am. J. trop. Med. Hyg. **19**, 527-536.

Joazeiro CA, Weissman AM. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. Cell. **102** (5):549-52.

Johnson K.M., Wiebenga N.H., Mackenzie R.B., Kuns M.L., Tauraso N.M., Shelotov A., Webb P.A., Justines G.J., Beye H.K. (1965). Virus isolations from human cases of hemorrhagic fever in Bolivia. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **118**:113-118.

Judd AK, Sanchez A, Bucher DJ, Huffman JH, Bailey K, Sidwell RW (1997). In vivo anti-influenza virus activity of a zinc-finger peptide. Antimicrob. Agents Chemother. **41**, 687-692.

Kosower N & Kosower E. (1978). The glutathione status of cells. Int. Rev. Cytol., 54:109-160.

Kunz, S., N. Sevilla, *et al.* (2001). "Molecular analysis of the interaction of LCMV with its cellular receptor [alpha]-dystroglycan." J Cell Biol **155**(2): 301-10.

Kunz, S.; Edelmann, K. H.; de la Torre, J. C.; Gorney, R.; Oldstone, M. B. A. (2003) Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions. *Virology, 314*, 168-178.

Lenz, O., J. ter Meulen, *et al.* (2000). "Identification of a novel consensus sequence at the cleavage site of the Lassa virus glycoprotein." J Virol **74** (23): 11418-21.

Lenz, O.; ter Meulen, J.; Klenk, H. D.; Seidah, N. G.; Garten, W. (2001) The Lassa virus glycoprotein precursor GPC is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98*, 12701-12705.

Lopez, R. and M. T. Franze-Fernandez (1985). "Effect of tacaribe virus infection on host cell protein and nucleic acid synthesis." J Gen Virol **66 (Pt 8)**: 1753-61.

López, N., Scolaro, L., Rossi, C., Jácamo, R., Candurra, N., Pujol, C., Damonte, E.B., Franze-Fernández, M.T., (2000). Homologous and heterologous glycoproteins induce protection against Junin virus challenge in guinea pigs. J. Gen. Virol. **81**, 1273-1281.

Lucia, H. L., D. H. Coppenhaver, et al. (1989). "Arenavirus infection in the guinea pig model: antiviral therapy with recombinant interferon-alpha, the immunomodulator CL246,738 and ribavirin." Antiviral Res **12**(5-6): 279-92.

Lukashevich, I. S., M. Djavani, *et al.* (1997). "The Lassa fever virus L gene: nucleotide sequence, comparison, and precipitation of a predicted 250 kDa protein with monospecific antiserum." J Gen Virol **78 (Pt 3)**: 547-51.

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

Maiztegui, J.I., Fernández, N., Damilano, A.J., (1979). Efficacy of immune plasma in treatment of Argentine hemorrhagic fever and association between treatment and a late neurological syndrome. Lancet ii 8154, 1216-1217.

Maiztegui, J., M. Feuillade, *et al.* (1986). "Progressive extension of the endemic area and changing incidence of Argentine Hemorrhagic Fever." Med Microbiol Immunol (Berl) **175**(2-3): 149-52.

Maiztegui, J; Barrera Oro, J.; Feuillade, M; Peters, C.; Vallejos, D & Mc Kee, K. (1990). Inoculation of human volunters with Candid #, a live attenuated Junín virus vaccine candidate. VIIIth International Congress of Virology, Berlín, Germany. Abstract Book, pp. 111.

Maiztegui, J.I., McKee, K.T., Barrera Oro, J.G., Harrison, L.H., Gibbs, P.H., Feuillade, M.R., Enría, D.A., Briggiler, A.M., Levis, S.C., Ambrosio, A.M., Halsey, N.A., Peters, C.J., the AHF Study Group, (1998). Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine hemorrhagic fever. J. Infect. Dis. 177, 277-283.

Martínez Segovia Z de, Arguelles G, Tokman (1980) Capacidad antigénica del virus Junín inactivado mediante oxidación fotodinámica. Medicina (Bs aires) 40: 156-160.

Maurer-Stroh S. & Eisenhaber F., (2004). Myristoilation of viral and bacterial proteins. TRENDS in Microbiology, 12, 4, 179-185.

McCormick, J. B. (1986). "Clinical, epidemiologic, and therapeutic aspects of Lassa fever." Med Microbiol Immunol (Berl) **175** (2-3): 153-5.

McCormick, J. B., P. A. Webb, *et al.* (1987). "A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever." J Infect Dis **155** (3): 437-44.

Mc Cormick, J. (1990). Arenaviruses. En: Virology, segunda edición. Editado por Fields, B.N. & Knipe, D. M. New York. Raven Press. pp: 1245-1267.

McKee KT, Huggins JW, Trahan CJ & Mahlandt BG (1988) Ribavirin prophylaxis and therapy for experimental Argentine hemorrhagic fever. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**:1304-1309.

Mersich, S. E., E. B. Damonte, *et al.* (1981). "Induction of RNA polymerase II activity in Junin virus-infected cells." Intervirology **16** (2): 123-7.

Meyer BJ, de la Torre JC & Southern PJ. (2002). Arenaviruses: Genomic RNAs, Transcription and Replication. In: Arenaviruses I. The Epidemiology, Molecular and Cell Biology of Arenaviruses. Editado por MBA Oldstone, Springer-Verlag Berlin Heidelberg , pp139-157.

Mills, J. N., G. E. Calderon, *et al.* (1991). "[New findings on Junin virus infection in rodents inside and outside the endemic area of hemorrhagic fever in Argentina]." Medicina (B Aires) **51** (6): 519-23.

Mills, J. N., J. G. Barrera Oro, *et al.* (1996). "Characterization of Oliveros virus, a new member of the Tacaribe complex (Arenaviridae: Arenavirus)." Am J Trop Med Hyg **54** (4): 399-404.

Moller A & Schmitz M (2003). Viruses as hijackers of PML nuclear bodies. Arch. Immunol. Ther. Exp, 51, (5) 295-300.

Molteni H.D., Guarinos H.C., Petrillo C.O., Jaschek F.R.J. (1961). Estudio clínico estadístico sobre 338 pacientes afectados por la fiebre hemorrágica

epidémica del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires. Semana Med. **118**: 838-855.

Moncayo, A. C., C. L. Hice, *et al.* (2001). "Allpahuayo virus: a newly recognized arenavirus (arenaviridae) from arboreal rice rats (oecomys bicolor and oecomys paricola) in northeastern Peru." Virology **284** (2): 277-86.

Moriuchi H, Moriuchi M, Cohen JI. (1994). The RING finger domain of the varicella-zoster virus open reading frame 61 protein is required for its transregulatory functions. Virology. **205** (1):238-46.

Mosmann T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Meth. **65**, 55-63.

Murdin A., Barreto I, Plotkin S. (1996). Inactivated poliovirus vaccine: past and present experience. Vaccine, 14: 735-746.

Murphey-Corb M, Martin L, Davison-Fairburn B, Montelaro R, Miller M, West M, Ohkawa S, Baskin G, Zhang J, Putney S, Allison A, Eppstein D. (1989). A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques. science, 246: 1293-1297.

Murphy, F.A., Webb, P:A., Johnson, K.M., Whitfield, S.G. & Chappell, W.A. (1970). Arenaviruses in Vero cells: Ultrastructural studies. J. Virol. **6**, 507-518.

Murphy, F. A., Whitfield S.G. (1975). Morphology and morphogenesis of arenaviruses. Bull WHO **52**: 409-419.

Padula, P. J. & Z. M. de Martinez Segovia (1984). "Replication of Junin virus in the presence of tunicamycin." Intervirology **22** (4): 227-31.

Parodi AS, Greenway DJ, Ruggiero HR, Rivero S, Frigerio MJ, de la Barrera M, Mettler N, Garzón F, Boxaca M, Guerrero LB, Nota NR (1958) Sobre la etiología del brote epidémico de Junín. El Día Médico 30: 2300-2302.

Parodi A, de Guerrero L, Weissenbacher M (1965). Fiebre hemorrágica argentina: vacunación con virus Junín inactivado. Ciencia e Investigación 21:132-133.

Perez M, Craven RC, de la Torre JC. (2003). The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies. Proc Natl Acad Sci U S A. **100** (22):12978-83.

Pinheiro F.P., Shope R:E:, Andrade A.H.P., Bensabath G., Cacios G.V., Casals J. (1966). Amaparí, a new virus of the Tacaribe group from rodents and mites of Amapa territory, Brazil. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **122**: 531-535.

Pinheiro F.P., Woodall J.P., Travassos da Rosa P.A., Travassos da Rosa J.F. (1977). Studies on arenaviruses in Brazil. Medicina (Buenos Aires) **37**: 175-181.

Potash L. (1968) Methods in human virus vaccine preparation. Methods Virol., 4:371-464.

Rein, A., Ott, D.E., Mirro, J., Arthur, L.O., Rice, W., Henderson, L.E., 1996. Inactivation of murine leukemia virus by compounds that react with the zinc finger in the viral nucleocapsid protein. J. Virol. **70**, 4966-4972.

Rein, A., D. E. Ott, *et al.* (1997). "Suppression of retrovirial replication: inactivation of murine leukemia virus by compounds reacting with the zinc finger in the viral nucleocapsid protein." Leukemia **11 Suppl 3**: 106-8.

Rice, W. G., C. A. Schaeffer, *et al.* (1993). "The site of antiviral action of 3-nitrosobenzamide on the infectivity process of human immunodeficiency virus in human lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(20): 9721-4.

Rice WG, Supko JG, Malspeis L, Buckheit Jr RW, Clanton D, Bu M, Graham L, Schaeffer CA, Turpin JA, Domagala J, Gogliotti R, Bader JP, Halliday SM, Coren L, Sowder II RC, Arthur LO & Henderson LE. (1995). Inhibitors of HIV nucleocapsid protein zinc fingers as candidates for the treatment of AIDS. Science **270**, 1194-1196.

Rice, W.G., Turpin, J.A., Schaeffer, C.A., Graham, L., Clanton, D., Buckheit Jr., R.W., Zaharevitz, D., Summers, M.F., Wallquist, A., Covell, D.G. (1996). Evaluation of selected chemotypes in coupled cellular and molecular target-based screens identifies novel HIV-1 zinc finger inhibitors. J. Med. Chem. 39, 3606-3616.

Rice, W.G., Baker, D.C., Schaeffer, C.A., Graham, L., Bu, M., Terpening, S., Clanton, D., Schultz, R., Bader, J.F., Buckheit Jr., R.W., Field, L., Singh, P.K., Turpin, J.A. (1997a). Inhibition of multiple phases of human immunodeficiency virus type 1 replication by a dithiane compound that attacks the conserved zinc fingers of retroviral nucleocapsid proteins. Antimicrob. Agents Chemother. **41**, 419-426.

Rice WG, Turpin JA, Huang M, Clanton D, Buckheit Jr RW, Covell DG, Wallquist A, McDonnell NB, DeGuzman RN, Summers MF, Zalkow L, Bader JP, Haugwitz R & Sausville EA (1997b). Azidocarbamide inhibits HIV-1 replication by targeting the nucleocapsid protein. *Nature Medicine* **3**:341-345.

Romanowski, V. & D. H. Bishop (1983). "The formation of arenaviruses that are genetically diploid." Virology **126** (1): 87-95.

Romanowski, V. (1993). Genetic organization of Junín virus, the ethiological agent of argentine hemorrhagic fever. In The Arenaviridae, editado por M. S. Salvato, serie: The Viruses (Wagner, R. & Frankel Conrat, H. Eds.). Plenum Press, New York. pp. 51-83.

Rosas, M. (1984). Bioquímica de virus: estructura de la envoltura del virus Junín. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Rossio, J.L., Esser, M.T., Suryanarayana, K., Schneider, D.K., Bess Jr., J.W., Vazquez, G.M., Wiltrout, T.A., Chertova, E., Grimes, M.K., Sattentau, Q., Arthur, L.O., Henderson, L.E., Lifson, J.D. (1998). Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. J. Virol. **72**, 7992-8001.

Ruggiero H.R., Ruggiero H., Gonzalez-Cambaceres C., Cintora F.A, Maglio F., Magnoni C.C, Astarloa L.N, Squassi G.J., Giacosa A., Fernandez D (1964). Argentine hemorrhagic fever. II. Clinical studies. Rev Asoc. Méd. Argentina, **78**: 281-294.

Ruiz-Jarabo, C. M.; Ly, C.; Domingo, E.; de la Torre, J. C. (2003) Lethal mutagenesis of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *Virology, 308*, 37-47.

Sabattini, M. S., J. G. Barrera Oro, *et al.* (1974). "[Activity of lymphocytic choriomeningitis virus in the endemic area of Argentine hemorrhagic fever (AHF) II. Isolation from a field Mus musculus captured in Southeast Cordoba]." Medicina (B Aires) **34** (4): 313-20.

Salas, R., N. de Manzione, *et al.* (1991). "Venezuelan haemorrhagic fever." Lancet **338** (8774): 1033-6.

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

Salvato, M., E. Shimomaye, *et al.* (1989b). "The primary structure of the lymphocytic choriomeningitis virus L gene encodes a putative RNA polymerase." Virology **169** (2): 377-84.

Salvato, M.S., Schweighofer, K.J., Burns, J., Shimomaye, E.M. (1992). Biochemical and immunological evidence that the 11-kDa zinc-binding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus. Virus Res. **22**, 185-198.

Salvato, M.S., 1993. Molecular biology of the prototype arenavirus, lymphocytic choriomeningitis virus. In: Salvato, M.S. (Eds.), The Arenaviridae. Plenum Press, New York, pp. 133-156.

Saurin AJ, Borden KLB, Boddy MN & Freemont PS (1996) Does this have a familiar RING? *Trends in Biochemical Science* **246**:208-213.

Scolaro LA, Mersich SE, Damonte EB. (1987) Attenuation in the virulence of a mutant of Junin virus in suckling mice. Rev Argent Microbiol. 19 (1):9-17.

Scolaro LA, Mersich SE, Damonte EB (1991). Experimental infection of suckling mice with a host range mutant of Junin virus. Journal of virology **34**, 237-240.

Singh, M. K., F. V. Fuller-Pace, *et al.* (1987). "Analysis of the genomic L RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus." Virology **161**(2): 448-56.

Southern, P. J., M. K. Singh, *et al.* (1987). "Molecular characterization of the genomic S RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus." Virology **157**(1): 145-55.

Strecker T, Eichler R, Meulen J, Weissenhorn W, Dieter Klenk H, Garten W, Lenz O. (2003). Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles. J Virol. **77** (19):10700-5. Erratum in: J Virol. 2003 **77**(23):12927.

Streeter, D. G.; Witkowski, J. T.; Khare, G. P.; Sidwell, R. W.; Bauer, R. J.; Robins, R. K.; Simon, L. N. (1973) Mechanism of action of 1-(-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *70*, 1174-1178.

Swanepoel, R., P. A. Leman, *et al.* (1985). "Identification of Ippy as a Lassa-fever-related virus." Lancet **1**(8429): 639.

Tesh, R. B., P. B. Jahrling, *et al.* (1994). "Description of Guanarito virus (Arenaviridae: Arenavirus), the etiologic agent of Venezuelan hemorrhagic fever." Am J Trop Med Hyg **50** (4): 452-9.

Topcu Z, Mack DL, Hromas RA, Borden KL. (1999). The promyelocytic leukemia protein PML interacts with the proline-rich homeodomain protein PRH: a RING may link hematopoiesis and growth control. Oncogene. **18** (50):7091-100.

Tortorici, M.A., Ghiringhelli, P.D., Lozano, M.E., Albarino, C.G., Romanowski, V., (2001). Zinc-binding properties of Junin virus nucleocapsid protein. J. Gen. Virol. **82**, 121-128.

Trapido H., San Martín C. (1971) Pichinde virus. A new virus of the Tacaribe group from Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg. **20** :631-641.

Tummino, P. J., J. D. Scholten, *et al.* (1996). "The in vitro ejection of zinc from human immunodeficiency virus (HIV) type 1 nucleocapsid protein by disulfide benzamides with cellular anti-HIV activity." Proc Natl Acad Sci USA **93** (3): 969-73.

Tummino, P.J., Harvey, P.J., McQuade, T., Domagala, J., Gogliotti, R., Sanchez, J., Song, Y. Hupe, D., (1997). The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nucleocapsid protein zinc ejection activity of disulfide benzamides and benzisothiazolones: correlation with anti-HIV and virucidal activities. Antimicob. Agents Chemother. 41, 394-400.

Turpin JA, Terpening SJ, Schaeffer CA, Yn G, Glover CJ, Felsted RL, Sausville EA, Rice WG. (1996) Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 zinc fingers prevent normal processing of Gag precursors and result in the release of noninfectious virus particles. J Virol **70**:6180-9.

Turpin, J. A., Y. Song, *et al.* (1999). "Synthesis and biological properties of novel pyridinioalkanoyl thiolesters (PATE) as anti-HIV-1 agents that target the viral nucleocapsid protein zinc fingers." J Med Chem **42**(1): 67-86.

Videla C, Carballal G, Remorini P *et al.*, (1989). Formalin inactivated Junin virus: immunogenicity and protection assays. J Med Virol, 29: 215-220.

Webb P.A., Johnson K.M, Hibbs J.B., Kuns M.L. (1970). Paraná, a new Tacaribe complex virus from Paraguay. Arch Gesamte Virusforschung **32**: 379-388.

Webb P.A., Johnson K.M., Peters C.J., Justines G. (1973). Behavior of Machupo and Latino viruses in *Calomys callosus* from two geographic areas in Bolivia. In: Lehmann-Grube F (ed) Lymphocytic choriomeningitis virus and other arenaviruses. Springler Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 313-322.

Weissenbacher, M. C., M. M. Avila, *et al.* (1986). "Effect of ribavirin and immune serum on Junin virus-infected primates." Med Microbiol Immunol (Berl) **175** (2-3): 183-6.

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

Witvrouw, M., Desmyter, J., & de Clercq, E. (1994). Antiviral portrait series. 4. Polysulfates as inhibitors of HIV and other envelopep viruses. Antivir. Chem. Chemother. **5**, 345-359.

Witvrouw, M., Balzarini, J., Pannecouque, C., Jhaumeer-Laulloo, S., Esté, J.A., Schols, D., Cherepanov, P., Schmit, J.C., Debyser, Z., Vandamme, A.M., Desmyter, J., Ramadas, S.R., De Clercq, E. (1997). SRR-SB3, a disulfide-containing macrolide that inhibits a late stage of the replicative cycle of human immunodeficiency virus. Antimicrob. Agents Chemother. **41**, 262-268.

Wright, K.E, Salvato, M.S. & Buchmeier, M.J. (1989). Neutralizing epitopes of lymphocytic choriomeningitis virus are conformational and require both glycosylation and disulfide bonds for expression. Virology **171**, 417-426.

Wright, K. E.; Spiro, R. C.; Burns, W.; Buchmeier, M. J. (1990) Post-translational processing of the glycoproteins of lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology, 177*, 175-183.

Wulff, H. and J. V. Lange (1975). "Indirect immunofluorescence for the diagnosis of Lassa fever infection." Bull World Health Organ **52**(4-6): 429-36.

Wulff, H., B. M. McIntosh, *et al.* (1977). "Isolation of an arenavirus closely related to Lassa virus from Mastomys natalensis in south-east Africa." Bull World Health Organ **55** (4): 441-4.

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

Young, P. R., A. C. Chanas, *et al.* (1987). "Localization of an arenavirus protein in the nuclei of infected cells." J Gen Virol **68 (Pt 9)**: 2465-70.

ELSA B. DAMONTE

Cybele Carina García