

Tesis Doctoral

Estrategias antivirales para la prevención y tratamiento de infecciones con arenavirus: actividad inhibitoria contra virus Junín de disulfuros y acridonas

Sepúlveda, Claudia Soledad

2012

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

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

Cita tipo APA:

Sepúlveda, Claudia Soledad. (2012). Estrategias antivirales para la prevención y tratamiento de infecciones con arenavirus: actividad inhibitoria contra virus Junín de disulfuros y acridonas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sepúlveda, Claudia Soledad. "Estrategias antivirales para la prevención y tratamiento de infecciones con arenavirus: actividad inhibitoria contra virus Junín de disulfuros y acridonas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

**Estrategias antivirales para la prevención y tratamiento de
infecciones con arenavirus: actividad inhibitoria contra virus
Junín de disulfuros y acridonas**

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

Claudia Soledad Sepúlveda

Directora de tesis: Prof. Dra. Elsa Beatriz Damonte
Director Asistente: Dra. Cybele Carina García
Consejero de Estudios: Prof. Dra. Elsa Beatriz Damonte

Lugar de trabajo: Laboratorio de estrategias antivirales

Buenos Aires, 2012

ESTRATEGIAS ANTIVIRALES PARA LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE INFECCIONES CON ARENAVIRUS: ACTIVIDAD INHIBITORIA CONTRA VIRUS JUNÍN DE DISULFUROS Y ACRIDONAS

En el presente trabajo se realizó la evaluación de la actividad biológica de diversos compuestos que incluyeron disulfuros aromáticos, disulfuros de tiuramo, tiosulfonas y acridonas, encontrándose compuestos con una muy selectiva actividad antiviral y potente efecto virucida contra varios miembros de la familia *Arenaviridae*. El disulfuro aromático NSC4492 mostró el efecto virucida más potente, y los más efectivos agentes antivirales resultaron el disulfuro de tiuramo NSC14560 y la acridona **3f**, las tiosulfonas fueron totalmente inactivas. Los compuestos antivirales NSC14560 y **3f** resultaron igualmente efectivos en distintos tipos celulares. Estudios mecanísticos de la actividad antiviral indicaron que la acción de estos compuestos parecería afectar pasos tempranos e intermedios de la infección viral, sin bloquear la entrada del virus a la célula. La síntesis del RNA viral se vio inhibida con ambos compuestos, y, para el caso de **3f**, fue posible recuperar parcialmente la infectividad y los niveles de RNA por el agregado de guanósina exógena. Los compuestos inactivantes mostraron ser efectivos también contra varios arenavirus, con una cinética de inactivación rápida y dependiente de la temperatura. El tratamiento con NSC4492 no mostró efectos sobre el autoensamblaje y la brotación de partículas tipo virales (VLPs) pero sí una alteración en el patrón electroforético de la proteína Z y una fuerte inhibición en la síntesis del RNA viral. En conclusión, se han detectado nuevos compuestos con potente y selectiva acción antiviral contra los arenavirus que parecen interferir con procesos relacionados a la síntesis de RNA viral así como agentes con fuerte capacidad inactivante de los viriones que alteran irreversiblemente proteínas virales de JUN lo que conduciría a la pérdida de la infectividad viral.

Palabras clave: Virus Junín; Arenavirus; Actividad antiviral; Actividad virucida; Compuestos disulfuros; Acridonas *N*-sustituidas; Síntesis de RNA viral; Zinc-finger

ANTIVIRAL STRATEGIES FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF INFECTIONS WITH ARENAVIRUS: INHIBITORY ACTIVITY OF DISULFIDES AND ACRIDONES AGAINST JUNIN VIRUS

In the present study we evaluated the biological activity of various compounds including aromatic disulfides, thiuram disulfide, thiosulfones and acridones finding compounds with highly selective antiviral activity and potent virucidal effect against several members of the family *Arenaviridae*. The aromatic disulfide NSC4492 showed the most potent virucidal effect, and the most effective antiviral agents were thiuram disulfide NSC14560 and acridone **3f**, the thiosulfones were totally inactive. Antiviral compounds NSC14560 and **3f** were equally effective in different cell types. Mechanistic studies of antiviral activity indicated that these compounds affect early and intermediate steps of viral infection, without blocking viral entry into cells. Viral RNA synthesis was inhibited with both compounds and, in the case of **3f**, it was possible to partially restore the infectivity and RNA levels by adding of exogenous guanosine. Inactivating compounds shown to be effective also against several arenavirus, with fast inactivation kinetics and temperature dependent. NSC4492 treatment showed no effect on the self-assembly and budding of virus-like particles (VLPs) but an alteration in the electrophoretic pattern of protein Z and a strong inhibition of viral RNA synthesis were evidenced. In conclusion, we have identified new compounds with potent and selective antiviral action against arenavirus that seem to interfere with processes related to the synthesis of viral RNA as well as inactivating agents with strong capacity of virions that alter JUNV viral proteins and lead to the loss of viral infectivity.

Keywords: Junín virus; Arenavirus; antiviral activity, virucidal activity, disulfide compounds, *N*-substituted acridones, viral RNA synthesis, Zinc-finger

Agradecimientos

Es una gran emoción para mí llegar a este momento y poder agradecer a todos aquellos que de una u otra manera formaron parte de esta historia.

A mi directora, la Dra. Elsa Damonte, le estoy inmensamente agradecida por haber confiado en mi y abrirme las puertas del laboratorio brindándome la oportunidad de aprender y desarrollarme científicamente, por llevar a delante al grupo con tanta dedicación y esfuerzo, valiéndose de sus aliados inseparables: la tenacidad y la paciencia a la hora de superar el objetivo. Por compartir conmigo el día a día, ofreciendo una oreja y dándome consejo más allá de los temas laborales. Por el afecto recibido, muchísimas gracias!

A mi directora asistente, la Dra. Cybele García, mi "Gran Maestre". Por iniciarme en el mundo de la virología y enseñarme todo. Por su constante apoyo, por transmitirme siempre todo su empuje y optimismo, por brindarse entera para lo que necesitara a todo momento. Gracias por todo Cybe, por darme el ejemplo a seguir en esta carrera, por interesarte en mis cosas, y por todo el afecto que me brindaste en estos años.

A Nelly, Luis y Vivi, quiero agradecerles ser excelentes docentes y compañeros y compartir conmigo todas sus experiencias con el virus Junín, dándome consejo y ayudándome siempre con la mejor predisposición y el buen humor que los caracteriza.

A Ana, con quien que en los últimos tiempos hemos compartido nuestras experiencias tanto laborales como cotidianas, por su interés, por ayudarme tantas veces completándome los experimentos y por contagiarme su chispa y alegría.

A los chicos del laboratorio, Caro, Ceci, Jose, Flor, Pablo, Eli, Andre, Sandra, Pau, Eri, Carlitos, Guada, Laurita, Diego y Flavia, por todos los excelentes momentos compartidos, tanto dentro como fuera del laboratorio, por compartir sus opiniones y brindarme su amistad.

A los no tan chicos del laboratorio, Monieque, Carlos, Susan y Laura, por haberme transmitido siempre su invaluable experiencia científica y por su excelente predisposición.

A Guille e Isabel, por mimarme y tratarme tan bien durante todos estos años.

A todos los integrantes del laboratorio de virología, con los cuales compartí muchas horas de trabajo y almuerzos en un clima afectuoso.

Al grupo del comedor y anexo mesitas, foro maravilloso donde cotidianamente se debaten todas las artes y oficios de este mundo, y de donde es imposible no llevarse cada día un nuevo aporte al conocimiento.

A la Dra. Norma D'Accorso y su grupo de trabajo del CIHIDECAR-CONICET del dpto. de Qca. Orgánica de la FCEyN-UBA, por facilitarme parte de los compuestos estudiados en este trabajo de tesis, por su muy buena predisposición y amabilidad.

A la Dra. Nora López, del Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein (CEVAN-CONICET), por darme la posibilidad de aprender en su laboratorio nuevas técnicas que me permitieron completar mi trabajo de tesis y por sus valiosos comentarios al respecto. A Jessica, por el tiempo dedicado.

A Seba, porque sin su aliento y empuje esto nunca se hubiese iniciado, por hacerme sentir cada día todo su amor y apoyo.

A mis dos amores, Valen y Manu, por llenar de amor y alegría cada día de mi vida.

A mis padres, por su apoyo y por transmitirme los valores que hoy hacen que sea la persona que soy y que pueda enfrentarme al futuro con esperanza y convicciones.

A Julián, pieza clave en esta historia, sin su ayuda fundamental esto hubiese resultado casi imposible.

A mi familia y amigos, por todo el apoyo y sus palabras de aliento en este proyecto concluido con tanto esfuerzo.

A todos, muchísimas gracias!

A Seba.

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

Sepúlveda CS, García CC, Fascio ML, D'Accorso NB, Docampo Palacios MI, F Pellón R, Damonte EB (2012). Inhibition of Junin virus RNA synthesis by an antiviral acridone derivative. *Antiviral Res* 93(1):16-22.

Sepúlveda CS, García CC, Damonte EB (2010). Inhibition of arenavirus infection by thiuram and aromatic disulfides. *Antiviral Res* 87(3):329-37.

Sepúlveda CS, Fascio ML, Mazzucco MB, Palacios ML, Pellón RF, García CC, D'Accorso NB, Damonte EB (2008). Synthesis and evaluation of N-substituted acridones as antiviral agents against haemorrhagic fever viruses. *Antivir Chem Chemother* 19(1):41-7.

El presente trabajo se realizó con la financiación proveniente de:

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- Universidad de Buenos Aires (UBA).
- Agencia Nacional para la Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

Índice

Abreviaturas	4
Introducción	
I 1. Las fiebres hemorrágicas y los arenavirus	7
I 2. El impacto de los arenavirus como agentes emergentes	7
I 3. Importancia clínica de los arenavirus	10
I 4. Control de la enfermedad: prevención y tratamiento	11
I 5. El virión y el ciclo de multiplicación viral	13
I 6. Las proteínas virales	16
I 7. Estrategias antivirales	20
I 7. 1. Inhibidores dirigidos a blancos virales	20
Glicoproteínas de la envoltura	20
La proteína Z	22
Otras drogas y estrategias	24
I 7. 2. Inhibidores dirigidos a blancos celulares	25
Metabolismo de nucleósidos	25
Maduración de proteínas	26
Alteraciones en lípidos de membrana	27
Sistemas de transporte y señalización celular	28
I 8. Las acridonas como antivirales	28
Objetivos	30
Materiales y Métodos	
MM 1. Líneas celulares	31
MM 2. Virus	32
MM 3. Compuestos	33
MM 3. 1. Disulfuros y tiosulfonas	33
MM 3. 2. Derivados de acridonas <i>N</i> -sustituidas	34
MM 4. Ensayo de citotoxicidad	35
MM 4. 1. Método del MTT	35
MM 4. 2. Síntesis de proteínas celulares	35
MM 5. Determinación de la actividad antiviral	36
MM 6. Efecto del pretratamiento de las células con los compuestos sobre la actividad antiviral	37
MM 7. Reversibilidad de la acción antiviral	37
MM 8. Efecto de la adición del compuesto a distintos tiempos	37
MM 9. Determinación de la actividad virucida	38
MM 9. 1. En función de la concentración de compuesto	38
MM 9. 2. En función del tiempo de incubación	38
MM 9. 3. En función de la temperatura de incubación	38
MM 10. RT-PCR en tiempo real	39
MM 11. Acción de los compuestos sobre la adsorción de los viriones	41

MM 11.	1. Ensayo de adsorción de JUNV por infectividad	41
MM 11.	2. Ensayo de adsorción de JUNV por RT-PCR en tiempo real	42
MM 12.	Acción de los compuestos sobre la internalización de los viriones	42
MM 13.	Efecto de los inhibidores sobre el desnudamiento de JUNV	42
MM 14.	Efecto de los inhibidores sobre la expresión de antígenos virales. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta	43
MM 15.	Efecto de los inhibidores sobre las proteínas recombinantes de JUNV expresadas en células Vero	43
MM 16.	Ensayos de formación de VLPs y medición de la actividad del minigenoma pS-CAT	44
MM 16.	1. Plásmidos	44
MM 16.	2. Efecto de NSC4492 sobre la generación de VLPs producidas por la expresión de únicamente la proteína Z (Z-VLPs)	45
MM 16.	3. Efecto de NSC4492 sobre la expresión del minigenoma pS-CAT y la infectividad de VLPs completas	46

Resultados

Capítulo I. Evaluación de la actividad biológica de los compuestos: citotoxicidad, actividad antiviral y actividad virucida

R I 1.	Evaluación de la citotoxicidad y actividad inhibitoria contra JUNV	48
R I 2.	Actividad inhibitoria contra arenavirus del Viejo y Nuevo Mundo	53
R I 3.	Evaluación de la citotoxicidad de los compuestos con actividad antiviral por otras metodologías	55
R I 3.	1. Efecto de los compuestos sobre la síntesis de proteínas celulares	55
R I 3.	2. Efecto de los compuestos sobre la proliferación de células Vero	56
R I 4.	Conclusiones	57

Capítulo II. Caracterización de la actividad virucida del disulfuro aromático NSC4492

R II 1.	Efecto de las condiciones de incubación sobre la actividad inactivante	59
R II 2.	Estudio del blanco de acción	
R II 2.	1. Efecto de NSC4492 sobre el complejo GP	60
R II 2.	2. Efecto de NSC4492 sobre la proteína Z	61
R II 2.	3. Efecto de NSC4492 sobre la RNP	63
R II 3.	Capacidad replicativa de los viriones inactivados con NSC4492	65
R II 3.	1. Síntesis de RNA viral de los viriones inactivados con NSC4492	65
R II 3.	2. Expresión de antígenos virales de los viriones inactivados con NSC4492	66
R II 4.	Efecto de NSC4492 sobre otros virus no relacionados	66
R II 5.	Conclusiones	69

Capítulo III. Caracterización de la actividad antiviral del disulfuro de tiuramo NSC145460

R III 1.	Parámetros que afectan la actividad antiviral	71
R III 1.	1. Influencia del inóculo viral sobre la actividad antiviral de NSC14560	71

R III 1.	2.	Efecto de NSC14560 sobre la replicación de JUNV en distintos tipos celulares	72
R III 1.	3.	Estabilidad del efecto de NSC14560 sobre la multiplicación viral en función del tiempo de infección	73
R III 2.		Mecanismo de acción del compuesto NSC14560	74
R III 2.	1.	Efecto del pre-tratamiento de células con el compuesto NSC14560	74
R III 2.	2.	Influencia del tiempo de adición de NSC14560 sobre la acción antiviral	75
R III 2.	3.	Efecto de NSC14560 sobre la adsorción e internalización viral	76
R III 2.	4.	Efecto de NSC14560 sobre el desnudamiento viral	78
R III 2.	5.	Efecto de NSC14560 sobre la síntesis de RNA viral	79
R III 2.	6.	Efecto de NSC14560 sobre la expresión y localización de antígenos virales	80
R III 2.	7.	Efecto de NSC14560 sobre la expresión y localización de las proteínas recombinantes NP, GPC/G1 y Z de JUNV	81
R III 2.	8.	Efecto de NSC14560 sobre la liberación de partículas virales	82
R III 2.	9.	Reversibilidad de la acción antiviral de NSC14560	82
R III 2.	10.	Efecto de NSC14560 sobre la replicación de otros virus	83
R III 3.		Conclusiones	84

Capítulo IV. Caracterización de la actividad antiviral de los derivados de acridonas N-sustituidas

R IV 1.		Influencia del inóculo viral sobre la actividad antiviral	85
R IV 2.		Reversibilidad de la acción antiviral	86
R IV 3.		Mecanismo de acción antiviral	87
R IV 3.	1.	Efecto sobre la infección por pretratamiento de células y viriones	87
R IV 3.	2.	Influencia del tiempo de adición de 3f sobre la acción antiviral	88
R IV 3.	3.	Efecto de 3f sobre la adsorción e internalización viral	89
R IV 3.	4.	Efecto de 3f sobre la síntesis de RNA viral	90
R IV 3.	5.	Efecto de 3f sobre la expresión de los antígenos virales en células infectadas	92
R IV 3.	6.	Reversión de la actividad antiviral de 3f por el agregado de guanósina exógena	93
R IV 3.	7.	Efecto del tratamiento de células con 3f antes de la infección por tiempos prolongados	96
R IV 3.	8.	Efecto de 3f sobre la liberación de partículas virales	98
R IV 4.		Conclusiones	98

Discusión 100

Bibliografía 114

Abreviaturas

α -DG: α -dístroglicano

ALLV: virus Allpahuayo

AMAV: virus Amaparí

BCNV: virus Bear Canyon

BSA: albúmina sérica bovina

C: residuo cisteína

CC: control celular

CC₅₀: concentración citotóxica 50%

CE₅₀: concentración efectiva 50%

CHPV: virus Chapare

CI₅₀: concentración inactivante 50%

CPXV: virus Cupixi

C-terminal: extremo carboxilo terminal

CV: control viral

DABCO: 1,4-diazabíciclo octano

DENV: virus dengue

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxinucleótidos trifosfato

ECL: *enhanced chemiluminescence*

eIF4E: factor de iniciación de la traducción en eucariotas 4E

FH: fiebre hemorrágica

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FLEV: virus Flexal

G: residuo glicina

GP: complejo viral de glicoproteínas

GP1: glicoproteína viral 1

GP2: glicoproteína viral 2

GPC: precursor de las glicoproteínas (antes del clivaje)

GTOV: virus Guanarito

h: hora

H: residuo histidina

HCV: virus de la hepatitis C
HIV: virus de la inmunodeficiencia humana
HSV: virus herpes simplex
HTS: *high-throughput screening*
ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus
IPPV: virus Ippy
IS: índice de selectividad
JUNV: virus Junín
kDa: kiloDalton
L: RNA-polimerasa viral dependiente de RNA
LASV: virus Lassa
LATV: virus Latino
LCMV: virus de la coriomeningitis linfocitaria
LD: dominios tardíos
m.i.: multiplicidad de infección
mAc: anticuerpo monoclonal
MACV: virus Machupo
MEM: medio mínimo esencial Eagle
min: minutos
MM: medio de mantenimiento
MOBV: virus Mobala
MOPV: virus Mopeia
MP: medio de plaqueo
MPA: ácido micofenólico
MTT: 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil bromuro de tetrazolio
MV: virus Sarampión
NCI: *National Cancer Institute*
NM: Nuevo Mundo
NP: nucleoproteína viral
N-terminal: extremo amino terminal
OLVV: virus Oliveros
p.i.: post-infección
P: residuo prolina
PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida

PARV: virus Paraná
PBS: buffer fosfato salino
PICV: virus Pichindé
PIRV: virus Pirital
PM: peso molecular
PML: proteína oncogénica de leucemia promielocítica
PMSF: fenilmetanosulfonil fluoruro
PPO: 2.5-difeniloxazol
PRH: proteína de homeodominios ricos en prolina
PV: virus Polio
PVDF: fluoruro de polivinilideno
RIB: ribavirina
RIG-1: proteína del gen inducible por ácido retinoico
RIPA: ensayo de radioinmunoprecipitación
RNA: ácido ribonucleico
RNP: ribonucleoproteína
SABV: virus Sabiá
SDS: dodecil sulfato de sodio
seg: segundo
SFB: suero fetal bovino
SSP: péptido señal estable
ST: suero de ternera
TAMV: virus Tamiami
TCRV: virus Tacaribe
TfR1: receptor 1 de transferrina
UFP: unidades formadoras de placa
VLP: partícula tipo viral o similar a virus
VM: Viejo Mundo
VSV: virus de la estomatitis vesicular bovina
WWAV: virus Whitewater Arroyo
Z: proteína viral de matriz

| Introducción

I 1. Las fiebres hemorrágicas y los arenavirus

Las fiebres hemorrágicas virales (FH) son zoonosis capaces de causar brotes locales dramáticos y devastadores en el hombre. Los agentes etiológicos son cuatro tipos de virus con genoma de RNA muy diferentes clasificados en las familias *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Filoviridae* y *Flaviviridae*. Estos virus pueden, a menudo, producir una infección subclínica o un leve síndrome febril, pero las formas más severas de enfermedades hemorrágicas están asociadas con morbilidad y mortalidad extremadamente altas.

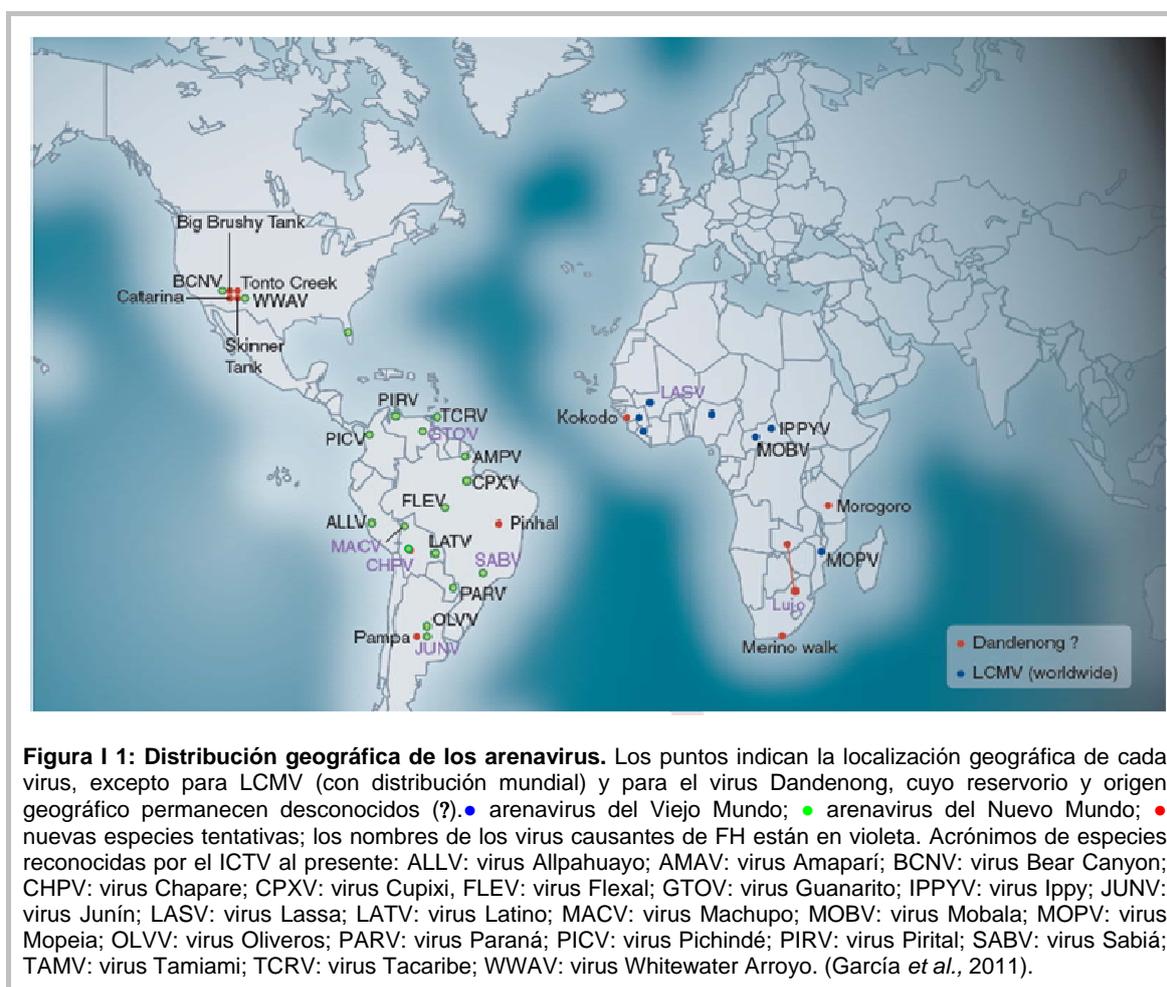
A pesar de esta amenaza para la salud humana y aunque distintos tipos de compuestos se evaluaron para la inhibición de agentes causantes de FH (Sidwell & Smee, 2003; Damonte *et al.*, 2004; Tseng 2005, Leyssen *et al.*, 2008), no se dispone actualmente de una quimioterapia específica y segura.

Arenaviridae es la familia que contiene el mayor número de virus que causan FH. Los arenavirus Lassa (LASV), Junín (JUNV), Machupo (MACV), Guanarito (GTOV) y Sabiá (SABV), son los agentes mejor conocidos causantes de FH en África Occidental, Argentina, Bolivia, Venezuela y Brasil, respectivamente, mientras que Chapare (CHPV) (Delgado *et al.*, 2008) y el virus Lujo (Briese *et al.*, 2009) son recientes aislamientos de casos graves en Bolivia y Sudáfrica, respectivamente, de los cuales CHPV fue clasificado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) como una nueva especie de la familia (Salvato *et al.*, 2010). El patógeno más importante de los arenavirus es LASV que infecta a más de 300.000 personas por año en áreas endémicas provocando la muerte de varios miles (McCormick & Fisher-Hoch, 2002).

I 2. El impacto de los arenavirus como agentes emergentes

Los arenavirus están incluidos en un género único, *Arenavirus*, integrado actualmente por 23 especies reconocidas por el ICTV que se clasifican en dos grupos distintos: el Nuevo Mundo (NM) o complejo Tacaribe, que comprende dieciocho especies de virus nativos de América, y el Viejo Mundo (VM) o complejo Lassa-coriomeningitis linfocítica, que incluye cuatro virus de África y el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) de distribución mundial (Salvato *et al.*, 2010) (Figura 1). Esta clasificación se basó inicialmente en la región geográfica de aislamiento y la reactividad cruzada serológica entre especies de virus (Howard, 1993).

Con la única excepción del virus Tacaribe (TCRV) que infecta a los murciélagos, un reducido número de especies estrechamente relacionadas de roedores son los hospedadores naturales de cada arenavirus, estableciéndose una infección persistente sin enfermedad manifiesta en su hospedador (Salazar-Bravo *et al.*, 2002). Consecuentemente, la distribución regional de los virus se limita a las zonas que están pobladas por sus reservorios. LCMV, la especie prototipo de la familia, es el único con amplio rango geográfico ya que el hospedador natural es el ratón doméstico *Mus musculus/Mus domesticus*, distribuido en los cinco continentes (Figura 1).



Los análisis filogenéticos más recientes de datos de secuencias de genomas apoyaron la división VM-NM y también permitieron la clasificación de ambos conjuntos en linajes o clados. El complejo VM consiste en un linaje único formado por LCMV y los virus africanos LASV, Mopeia (MOPV), Mobala (MOBV) e Ippy (IPPYV). En el complejo NM, quince virus sudamericanos fueron agrupados en tres linajes designados como A, B y C (Bowen *et al.*, 1996; Charrel *et al.*, 2008; Salvato *et al.*, 2010). Los arenavirus causantes de FH en Sudamérica JUNV, MACV, GTOV, SABV y

CHPV están incluidos en el linaje B junto con los no patogénicos TCRV, Amapari (AMAV) y Cupixi (CPXV). El linaje A contiene los virus Allpahuayo (ALLV), Flexal (FLEV), Paraná (PARV), Pichindé (PICV) y Pirital (PIRV) y el clado C está formado por Latino (LATV) y Oliveros (OLVV). Finalmente, los arenavirus norteamericanos Bear Canyon (BCNV), Tamiami (TAMV) y Whitewater Arroyo (WWAV) están distinguidos de los arenavirus sudamericanos en un linaje separado incluido en el clado A, llamado A/Rec, debido a la naturaleza del segmento S del genoma de RNA de estos virus, el cual aparentemente, derivó de una recombinación intrasegmental (Charrel *et al.*, 2002; Archer & Rico-Hesse, 2002).

Debido a su capacidad de establecer infecciones virémicas crónicas en determinados roedores hospedadores, los arenavirus son agentes típicos de enfermedades endémicas emergentes. De hecho, ha ocurrido un aumento de la emergencia de nuevos arenavirus en los últimos años, ya sea porque los seres humanos se infectan accidentalmente causando una enfermedad alarmante o como resultado de un estudio sistemático de la presencia del virus, del genoma del virus o de anticuerpos en roedores nativos. Así, se propusieron once nuevos aislamientos a partir de humanos y roedores en América, África y Australia para ser considerados como integrantes de la familia (Figura 1) (Lecompte *et al.*, 2007; Vieth *et al.*, 2007; Cajimat *et al.*, 2007, 2008; Milazzo *et al.*, 2008; Palacios *et al.*, 2008, 2010; Briese *et al.*, 2009; Günther *et al.*, 2009; Charrel & de Lamballerie, 2010). El virus Lujo produjo FH severa (Briese *et al.*, 2009) en tanto el virus Dandenong resultó letal para pacientes inmunocomprometidos (Palacios *et al.*, 2008; Charrel & de Lamballerie, 2010). Aunque el estado taxonómico preciso de estos virus todavía debe ser abordado, es esperable que el número de miembros de *Arenaviridae* crezca en la medida que se produzcan nuevos contactos humanos con los reservorios, se produzcan mejoras en los estudios epidemiológicos o se desarrollen nuevas herramientas para el descubrimiento de patógenos. Sobre la base de aparición de nuevas especies, se estima que un nuevo arenavirus podría emerger cada tres años en promedio, una predicción que parecería ser superada en los últimos años.

Además del alto riesgo para el humano de adquirir una infección severa por arenavirus en las regiones endémicas, el aumento de los viajes aéreos internacionales ha contribuido al transporte de LASV desde su nicho en África occidental a otras áreas geográficas, generando un peligro para la población local. Hasta el momento, 27 casos importados de fiebre de Lassa se registraron en Europa, Estados Unidos, Israel y

Japón (Drosten *et al.*, 2003; Macher & Wolfe, 2006; Kitching *et al.*, 2009; Atkin *et al.*, 2009).

I 3. Importancia clínica de los arenavirus

Desde que se reconocieron como arenavirus causantes de FH en humanos, SABV, MACV y GTOV produjeron casos muy esporádicos en sus regiones endémicas, a diferencia de JUNV y LASV que generan periódicos brotes anuales de la enfermedad y representan la principal amenaza para la salud.

La fiebre de Lassa es una amenaza siempre presente y cada vez más probable para grandes comunidades de África, representando una de las enfermedades tropicales más postergadas y dañinas. La mayor incidencia se reporta en Sierra Leona, Guinea, Liberia y Nigeria, debido a la presencia del reservorio, la rata *Mastomys natalensis* (Lecompte *et al.*, 2006), con reportes de 20-30% de la población adulta infectada con LASV (Richmond & Baglole, 2003). La ruta más importante de transmisión humana es a través del contacto con excreciones de roedores infectados, pero además LASV es el único arenavirus para el que se ha reportado transmisión de persona a persona intrafamiliar o intrahospitalaria frecuente (McCormick *et al.*, 2002; Kernéis *et al.*, 2009). Alrededor del 80% de las infecciones humanas son asintomáticas, los casos clínicos de fiebre de Lassa son difíciles de diagnosticar porque los síntomas y signos son indistinguibles de los de otras enfermedades febriles. El período de incubación es de 7-21 días, seguido de fiebre, malestar general, dolor de garganta, dolores musculares, y progresando a las manifestaciones gastrointestinales, conjuntivitis, dolor fuerte en el pecho y dolor abdominal (McCormick *et al.*, 2002; Richmond & Baglole, 2003). Los pacientes con un desenlace fatal tienen carga viral muy alta desde las etapas iniciales de la enfermedad y no pueden limitar la propagación del virus, debido a una marcada inmunosupresión y a la falta de una respuesta inmune adaptativa, manteniendo una viremia alta no controlada a través de todo el período de la enfermedad. La tasa de letalidad es del 1%, pero se estima en 20-30% de los pacientes hospitalizados, y la sordera neurosensorial es la secuela crónica mayor en los pacientes recuperados (Cummins *et al.*, 1990).

JUNV es el agente causante de la FH argentina en la región agrícola de la pampa húmeda. La exposición de los humanos ocurre a través de lesiones en la piel o por inhalación de aerosoles contaminados con secreciones de su principal reservorio, el roedor *Calomys musculinus*, en coincidencia con el momento de las cosechas (abril

a julio), típicamente como una enfermedad estacional y ocupacional. En general, la incidencia y severidad de las infecciones humanas con JUNV son significativamente menores en comparación con LASV, con 100-1000 casos notificados por año y una tasa de caso-fatalidad de alrededor del 15% en ausencia de tratamiento (Enría *et al.*, 2008). Luego de 1-2 semanas de incubación, se manifiestan síntomas iniciales inespecíficos, con fiebre, dolor muscular, astenia, inflamación de ganglios linfáticos, petequias cutáneas y dolor retroocular. Más del 80% de los pacientes mejora durante la segunda semana de la enfermedad, manteniendo una respuesta inmune humoral detectable con eliminación viral, mientras que el resto son propensos a empeorar presentando graves manifestaciones hemorrágicas o neurológicas, shock e infecciones bacterianas (Enría *et al.*, 2008).

Además de los virus causantes de FH, el arenavirus prototipo LCMV también puede infectar a los humanos, resultando generalmente en una forma asintomática o una enfermedad transitoria suave. Sin embargo, LCMV también ha sido involucrado como agente etiológico de meningitis aséptica en humanos. En particular, la infección humana por LCMV es de considerable interés en pediatría en los casos de infección congénita, cuando la transmisión vertical de humano a humano puede causar la muerte o secuelas neurológicas y retraso mental (Barton & Mets, 2001; Jameison *et al.*, 2006). La infección horizontal de humano a humano sólo se ha documentado en algunas circunstancias excepcionales en las que LCMV fue adquirido a través del trasplante de tejidos infectados con resultados fatales, lo que representa un nuevo riesgo potencial para los pacientes inmunocomprometidos (Fisher *et al.*, 2006).

I 4. Control de la enfermedad: prevención y tratamiento

Como en la mayoría de las infecciones virales, la vacunación es el método de elección para la prevención de las FH por arenavirus. El desarrollo de vacunas contra LASV y JUNV se intentó durante los últimos 40 años empleando diversos enfoques. Se ha logrado una vacuna viva atenuada efectiva contra JUNV llamada Candid 1, a través de un esfuerzo de cooperación internacional. La vacunación de la población de riesgo con Candid 1, que se inició en Argentina en 1991, mostró una eficacia protectora superior o igual a 84% y ha dado lugar a una reducción constante de la FH argentina en los últimos años (Maiztegui *et al.*, 1998; Enría & Barrera Oro, 2002). Para LASV, la situación parece ser más compleja, quizá debido a la diferente contribución en la respuesta de anticuerpos y de células T para controlar la infección por arenavirus

de NM y VM. Los proyectos en curso más recientes incluyen vacunas recombinantes competentes en replicación que expresan las glicoproteínas de LASV basadas en diferentes vectores virales como el virus de la estomatitis vesicular (Geisbert *et al.*, 2005), MOPV (Lukashevich *et al.*, 2008) y la cepa 17D de fiebre amarilla (Bredenbeek *et al.*, 2006). Estas tres vacunas recombinantes produjeron respuesta protectora en modelos animales, pero hasta la fecha no ha tenido lugar ningún ensayo en seres humanos.

La terapia actual contra las infecciones de arenavirus incluye el tratamiento con ribavirina (RIB), un análogo de guanósina que afecta la síntesis de RNA y presenta amplio espectro de actividad antiviral contra virus con genoma de RNA, y la administración pasiva de suero de convaleciente con alto título de anticuerpos específicos. Para LASV, el tratamiento recomendado es la administración intravenosa de RIB en los primeros 6 días de la enfermedad (McCormick *et al.*, 1986). Sin embargo, el medicamento no es eficaz para el tratamiento de infecciones avanzadas de LASV y también pierde eficacia si se administra por vía oral; también se recomienda como agente profiláctico en casos de posible exposición a LASV, pero su utilidad no ha sido sistemáticamente estudiada (Crowcroft *et al.*, 2002; Haas *et al.*, 2003; Bossi *et al.*, 2004). Además, el tratamiento con RIB puede producir reacciones secundarias indeseables como la trombocitosis y anemia hemolítica y su uso está restringido en mujeres embarazadas debido a la sospecha de su potencial teratogénico (McCormick *et al.*, 1986; Fisher-Hoch *et al.*, 1992; Enría & Maiztegui, 1994).

La evaluación clínica de RIB en pacientes con FH argentina demostró que la droga posee efecto antiviral pero no mostró eficacia en la disminución de la mortalidad (Enría & Maiztegui, 1994). La transfusión de plasma inmune de convaleciente con dosis definidas de anticuerpos neutralizantes contra JUNV es la intervención terapéutica actual contra esta FH, eficaz para atenuar la enfermedad y reducir la mortalidad a menos del 1% (Enría *et al.*, 2008). Sin embargo, muchas consideraciones argumentan la necesidad de tratamientos alternativos: i) la terapia de plasma no es tan eficiente cuando se inicia después de 8 días de la enfermedad, ii) se desarrolla un síndrome neurológico tardío en un 10% de los pacientes tratados con plasma, iii) problemas en el mantenimiento de existencias suficientes de plasma; iv) el riesgo de enfermedades transmitidas por transfusión. Por el contrario, el plasma inmune no mejoró la recuperación de la fiebre de Lassa (McCormick *et al.*, 1986). Los bajos títulos de anticuerpos neutralizantes en el plasma de convaleciente humano en la

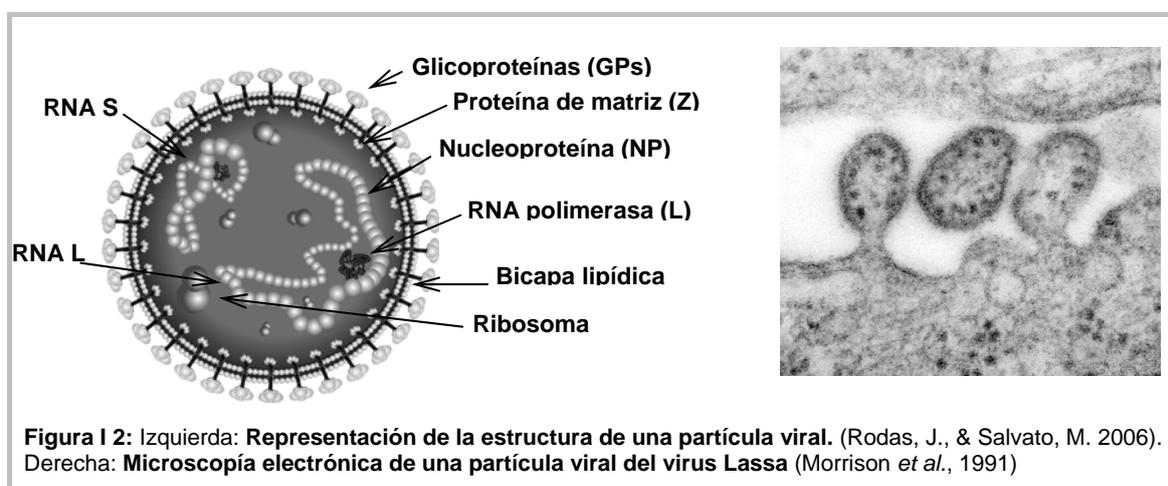
fiebre de Lassa pueden ser responsables del fracaso de la terapia con plasma inmune contra este virus.

Ante este cuadro de situación, resulta evidente que el hallazgo de drogas antivirales efectivas para el tratamiento de la infección por arenavirus continúa siendo una demanda en la actualidad.

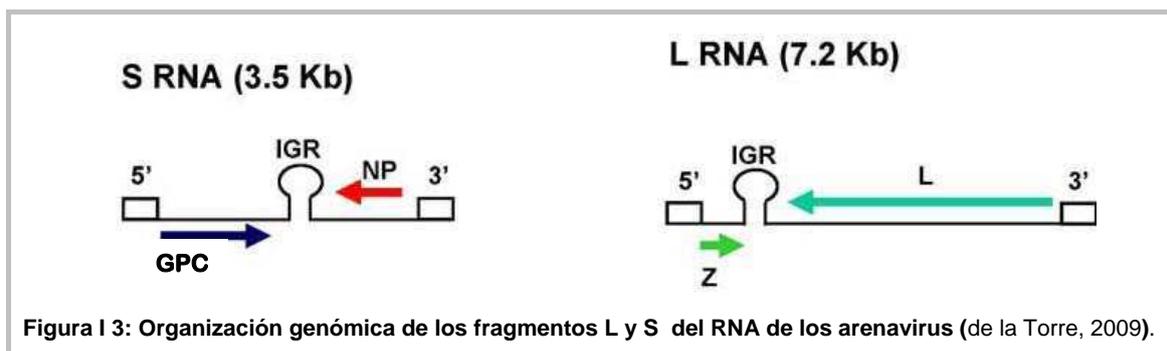
I 5. El virión y el ciclo de multiplicación viral

El conocimiento de la estructura del virión y del ciclo de multiplicación viral es esencial para elucidar blancos potenciales para la terapia antiviral.

Los viriones son partículas pleomórficas con un diámetro promedio de 90-110 nm, compuestos por dos nucleocápsides helicoidales dentro de una envoltura lipídica. Un número variable de ribosomas celulares, que no se requieren para la multiplicación del virus, también se encuentran en el interior de la partícula y a partir de esta peculiar estructura granular se originó el nombre de la familia (*arenosus*, del latín arena) (Figura I 2).



El genoma se compone de dos moléculas de cadena simple de RNA denominadas L, del inglés *large* (grande, promedio de 7,1 kb) y S, del inglés *small* (pequeño, promedio de 3,4 kb), ambas con una estrategia de codificación ambisentido que consiste en dos genes de polaridad opuesta, separados por una región intergénica (IGR) no codificante en forma de horquilla (Figura I 3).



La relación entre los segmentos S y L encontrada en las partículas virales no es equimolecular, ya que el segmento S se encuentra en mayor proporción que L (Romanowski & Bishop, 1983, Southern *et al.*, 1987). El segmento S codifica para la proteína de la nucleocápside (NP) en el extremo 3' en sentido complementario al genoma y el precursor de las glicoproteínas (GPC) en el extremo 5' en el sentido del genoma. GPC sufre un clivaje después de la traducción para generar los componentes del complejo de glicoproteínas (GP) en la envoltura: un péptido señal estable (SSP), la glicoproteína externa GP1 y la GP2 de membrana. Del mismo modo, el segmento L codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA (L) en el sentido del genoma complementario, y una pequeña proteína de matriz con un motivo *zinc-finger* (Z) en sentido contrario.

En la *Figura I 4* se muestra un esquema general del ciclo de multiplicación de los arenavirus. GP1 es la proteína de unión del virus que media la interacción con los receptores de la célula hospedadora para la adsorción inicial. Dentro de *Arenaviridae* el α -dístroglicano (α -DG) es el receptor celular para los virus del VM LCMV, LASV, MOPV y MOBV, así como para los del clado C del NM LATV y OLVV (Cao *et al.*, 1998; Spiropoulou *et al.*, 2002; Kunz *et al.*, 2005). Otra molécula, el receptor 1 de transferrina (TfR1), fue identificada recientemente como el receptor para los virus causantes de FH del clado B del NM JUNV, MACV, GTOV y SABV (Radoshitzky *et al.*, 2007; Abraham *et al.*, 2010). Por el contrario, los virus no patogénicos del clado B AMPV y TCRV pueden entrar en las células de una manera independiente de TfR1 y su receptor aún no ha sido identificado (Flanagan *et al.*, 2008). El arenavirus de América del Norte WWAV infecta células también de forma independiente a α -DG y TfR1 (Reignier *et al.*, 2008), revelando un complejo patrón de uso del receptor dentro del complejo NM con una posible relación entre el uso de los receptores y la capacidad patogénica (Rojek & Kunz, 2008).

Luego de la unión a las células, los arenavirus son internalizados por endocitosis en las vesículas de bajo pH, donde se desencadena la fusión entre la envoltura viral y la membrana del endosoma después de una alteración conformacional que expone un péptido fusogénico presente en la GP2 (Castilla *et al.*, 1994; Di Simone *et al.*, 1994; York & Nunberg, 2006). Como ocurrió con el uso de los receptores, los arenavirus del VM y NM también difieren en la vía endocítica de penetración: JUNV entraría por una endocitosis clásica mediada por clatrina y dependiente de una red de actina intacta, mientras que LCMV y LASV entrarían en las células predominantemente a través de una ruta inusual independiente de clatrina, caveolina, dinamina o actina (Martínez *et al.*, 2007, 2008; Rojek *et al.*, 2008a, 2008b, Rojek & Kunz, 2008; Quirin *et al.*, 2008).

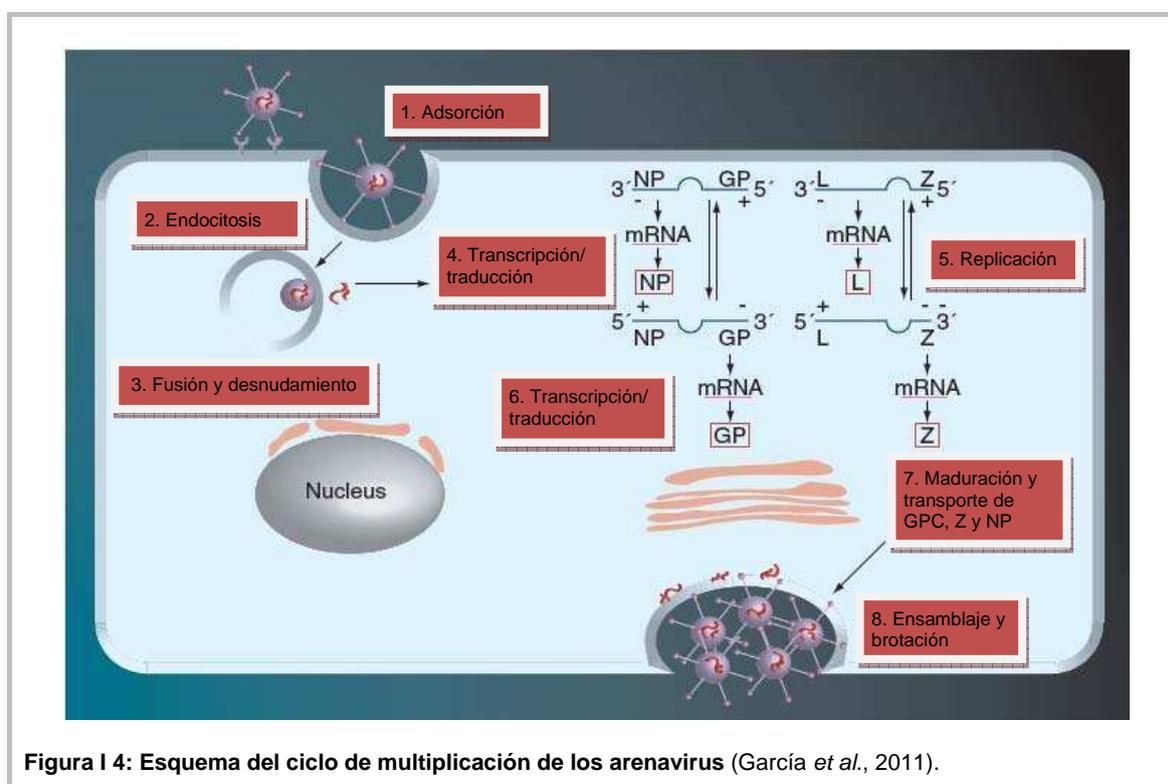


Figura I 4: Esquema del ciclo de multiplicación de los arenavirus (García *et al.*, 2011).

Luego de la fusión, las ribonucleoproteínas (RNP) son liberadas en el citoplasma y la polimerasa L asociada a RNA comienza la biosíntesis de macromoléculas. La transcripción de los mRNA para NP y L a partir de los segmentos S y L, respectivamente, ocurre en el citoplasma celular y es el primer evento de síntesis (Figura I 4). Estos RNA mensajeros contienen cap pero no son poliadenilados (Singh *et al.*, 1987; Southern *et al.*, 1987). La región intergénica no codificante posee la capacidad de formar un plegamiento estable en forma de horquilla debido a la presencia de secuencias complementarias conservadas a través de la evolución de esta familia, sirviendo las mismas como señal de terminación de la transcripción o,

como se sugirió por algunos autores, en la encapsidación del genoma viral (Auperin *et al.*, 1984, Tortorici *et al.*, 2001a; López & Franze-Fernández, 2007, Pinschewer *et al.*, 2003a, 2005). Luego de que se ha producido la síntesis de NP, podría producirse la replicación con la síntesis de la cadena completa del RNA antigénico. Este antigenoma sirve tanto como intermediario de replicación en la síntesis del genoma de RNA completo y como molde para la transcripción de los mRNAs subgenómicos de S y L, correspondientes a GPC y Z, respectivamente. Aunque los dos fragmentos del genoma contienen secuencias en sentido positivo en sus regiones 5', aún no existen evidencias de que puedan ser directamente traducidas a GPC y Z respectivamente (de la Torre, 2005) y, por tanto, los arenavirus se comportan en este punto como un verdadero virus de cadena negativa con la transcripción como el primer evento de biosíntesis luego del desnudamiento.

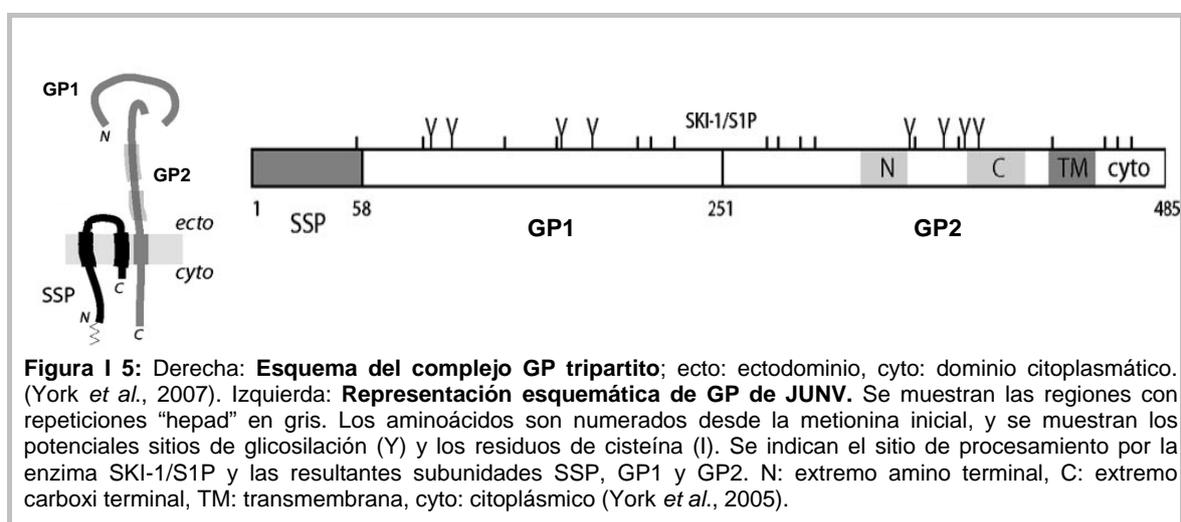
Los arenavirus poseen una secuencia nucleotídica conservada en los extremos 3' de los segmentos genómicos L y S y sus secuencias inversas complementarias se encuentran en los extremos 5' de ambos segmentos genómicos produciendo estructuras secundarias de dúplex intra o inter segmentos con circularización del genoma, observadas por microscopía electrónica (Young & Howard, 1983; Meyer *et al.*, 2002).

Finalmente, la formación y liberación de los viriones de la progenie involucra el transporte intracelular y el ensamblaje de las RNP con el complejo glicoproteico (GP) inserto en la superficie celular. Este proceso morfogénico requiere del correcto procesamiento de GPC para generar viriones infectivos (Beyer *et al.*, 2003; Kunz *et al.*, 2003; York *et al.*, 2004) y la participación de Z como proteína de matriz que interactúa con proteínas virales y proteínas celulares específicas para promover la brotación del virus a través de la membrana plasmática (Strecker *et al.*, 2003; Urata *et al.*, 2006; Capul *et al.*, 2007).

I 6. Las proteínas virales

Las glicoproteínas de los arenavirus son sintetizadas como un precursor GPC (75 kDa) que es procesado postraduccionalmente para generar los tres componentes que, asociados de manera no covalente, forman el complejo GP maduro: un péptido señal (SSP, 58 aminoácidos), GP1 (40-46 kDa) y GP2 (35 kDa) (Buchmeier *et al.*, 2002, 2007) (Figura 1 5). El SSP de los arenavirus es el único que permanece establemente asociado con el complejo GP luego del clivaje por la peptidasa y juega

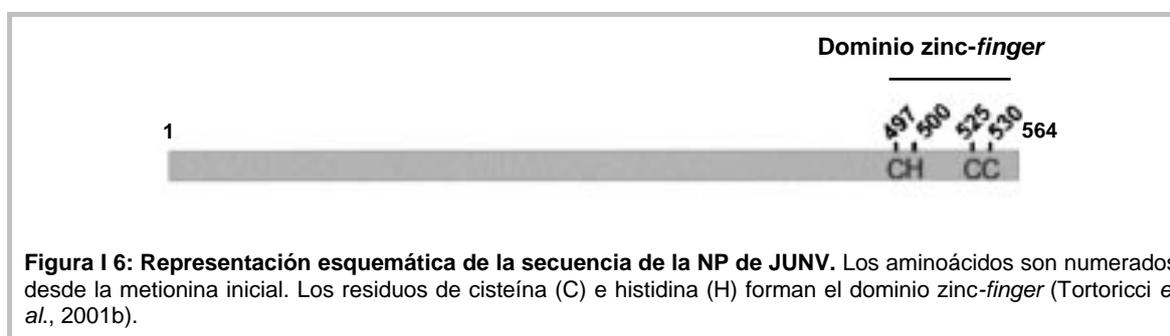
un rol crucial para el tráfico de complejo GP a través de la vía secretoria (Eichler *et al.*, 2003, 2004a; York *et al.*, 2004, Agnihothram *et al.*, 2006). GP2 comparte características comunes con otras proteínas de fusión de transmembrana de varias familias de virus. Sus dominios ricos en residuos hidrofóbicos y polares (conocidos como repeticiones “hepad” cuando se configuran en α -hélices) en los extremos amino y carboxi-terminal serían los responsables de mediar el evento de fusión dependiente de pH (Gallaher *et al.*, 2001, York *et al.*, 2005) (Figura 1 5). Además, esta proteína presenta un dominio zinc-*finger* conformado por una serie de siete residuos de cisteínas y una histidina (CCCHCCC) en su dominio citoplasmático, que es esencial para la incorporación del SSP en el complejo GP formando una “inter-subunidad” zinc-*finger* al incorporar una cisteína presente en el SSP (York *et al.*, 2007; Briknarová *et al.*, 2011).



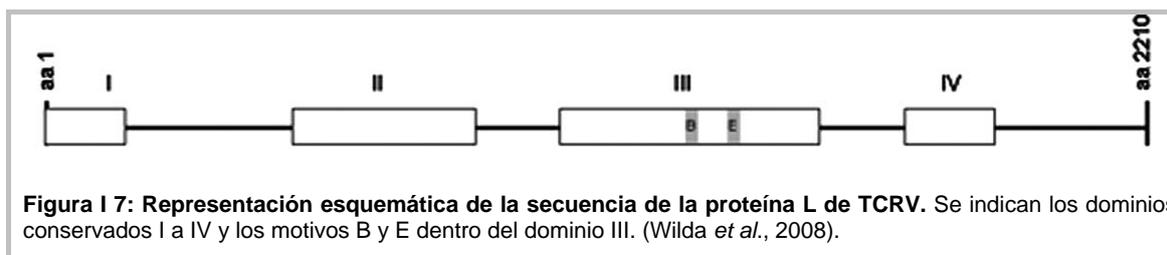
El procesamiento de GPC ocurre tardíamente en la vía secretora y requiere de previa glicosilación y de la integridad del dominio citoplasmático de GP2 (Kunz *et al.*, 2003, Burns & Buchmeier, 1993). La proteasa responsable del primer evento de procesamiento aún no ha sido identificada. El segundo evento ocurre mediante el reconocimiento de la secuencia consenso R-(R/K/H)-L-(A/L/S/T/F)₂₆₅ por una proteasa subtilasa celular SKI-1/S1P. Esta observación se determinó primeramente para los arnavirus del VM LCMV y LASV (Beyer *et al.*, 2003; Kunz *et al.*, 2003; Pinschewer *et al.*, 2003b) y luego se extendió a los arnavirus del NM causantes de FH GTOV, MACV y JUNV (Rojek *et al.*, 2008c). Se demostró que el procesamiento no es requerido para la expresión de las glicoproteínas en la membrana celular pero es esencial para la incorporación de las mismas a los viriones y la producción de partículas virales infectivas (Kunz *et al.*, 2003). Tanto la presencia del SSP como el

procesamiento, son necesarios para la fusión de la envoltura viral y membrana endosomal mediada por GP2 (York *et al.*, 2004).

La nucleoproteína NP (60-68 kDa) es la proteína estructural más abundante de los arenavirus en las partículas virales y en las células infectadas. Se encuentra asociada al RNA del virión y junto con L forman la nucleocápside o ribonucleoproteína viral. Posee alto grado de conservación tanto de secuencias como de motivos estructurales y su función principal sería la protección del RNA dentro de la célula infectada además de participar de manera esencial en la transcripción y replicación del genoma junto con la polimerasa viral (Lee *et al.*, 2000; Buchmeier *et al.*, 2007). Mediante el análisis bioinformático de las secuencias aminoacídicas de NP de diferentes arenavirus y mediante ensayos de unión a metales, se ha determinado la presencia de un dominio de unión a zinc, ubicado en su extremo carboxi-terminal del tipo CHCC, el cual estaría involucrado en su unión al RNA viral (Parisi *et al.*, 1996, Tortorici *et al.*, 2001b) (Figura 1 6). En las células infectadas, NP se localiza exclusivamente en el citoplasma, pero se han evidenciado acumulaciones de un fragmento de degradación de 28 kDa en el núcleo de células infectadas con PICV (Young *et al.*, 1987).



La proteína L (180-250 kDa) es una RNA polimerasa dependiente de RNA (Salvato *et al.*, 1989; Lukashevich *et al.*, 1997). Posee motivos conservados en todas las polimerasas de otros virus con genoma de RNA de polaridad negativa (dominio III, motivos B y E), así como regiones conservadas (dominios I y II) que han sido encontradas sólo en las polimerasas de los arenavirus y los bunyavirus (Poch *et al.*, 1989; Tordo *et al.*, 1992). Se ha identificado una región adicional conservada solamente entre las proteínas L de los arenavirus (dominio IV) (Vieth *et al.*, 2004). A excepción del dominio III, la probable RNA polimerasa, el análisis de las secuencias no sugiere ninguna función biológica para los otros dominios conservados (Figura 1 7).



La proteína Z es una pequeña proteína estructural del virión (11 kDa) (Salvato *et al.*, 1992) (Figura I 8), que contiene un importante motivo *RING-finger* del tipo CCCHCCCC, altamente conservado en los arenavirus. La coordinación de zinc entre los residuos de cisteína e histidina es necesaria para mediar la asociación de Z con otras proteínas (Djavani *et al.*, 1997). Z ha sido intensamente estudiada en el último tiempo debido a sus múltiples roles en el ciclo de multiplicación del virus, es actualmente considerada la contraparte funcional de las proteínas de matriz encontradas en otros virus envueltos con genoma de RNA de polaridad negativa (Perez *et al.*, 2003). Las evidencias de esta función estructural fueron provistas en estudios que muestran que la proteína Z de LCMV y LASV está fuertemente asociada a la membrana y es suficiente, en ausencia de otras proteínas virales, para liberar partículas envueltas tipo virales o similares a virus (VLPs) (Perez *et al.*, 2003; Strecker *et al.*, 2003; Urata *et al.*, 2006; Casabona *et al.*, 2009; Schlie *et al.*, 2010; Loureiro *et al.*, 2011). Así, se asume que Z es responsable de dirigir la brotación de los arenavirus a través del reclutamiento de la NP a los parches en las membranas celulares enriquecidos en GPs donde se lleva a cabo el ensamblaje del virus (Eichler *et al.*, 2004b; Shtanko *et al.*, 2010). Z posee un sitio de miristilación conservado (G2) el cual sería necesario para su localización en la superficie interna de la membrana celular y la posterior brotación viral (Perez *et al.*, 2004, Strecker *et al.*, 2006) (Figura I 8). Además, la proteína Z de los diferentes arenavirus posee en su extremo C-terminal motivos conservados de prolinas (PPxY y P(T/S)AP, donde x es cualquier aminoácido) denominados dominios tardíos (LD). Los LD encontrados en otras proteínas de matriz de virus con genoma de RNA de polaridad negativa y en la proteína Gag de los retrovirus son esenciales en el proceso de brotación del virus (Freed, 2002). Estos LD son altamente conservados y median la interacción con proteínas de la célula hospedadora, en particular, con miembros del sistema de transporte vacuolar secretor como *Tumor susceptibility gene 101* (Tsg101) (Bieniasz *et al.*, 2006; Urata *et al.*, 2006).



Por otra parte, estudios realizados con sistemas de genética reversa han mostrado que Z ejerce un efecto inhibitorio en manera dosis dependiente tanto sobre la transcripción como en la replicación del RNA viral (Cornu & de la Torre, 2001, 2002; López *et al.*, 2001; Jácomo *et al.*, 2003). A través de esta actividad inhibitoria, Z podría contribuir a la conocida capacidad limitada de replicación y las propiedades no citopáticas de muchos arenavirus. Otra característica sobresaliente de Z es su capacidad para interactuar con varias proteínas celulares, como la proteína oncogénica de leucemia promielocítica (PML), la proteína ribosomal P0, el factor de iniciación de la traducción en eucariotas 4E (eIF4E), la proteína de homeodominios ricos en prolina (PRH) (Borden *et al.*, 1998a, 1998b; Campbell Dwyer *et al.*, 2000; Djavani *et al.*, 2005) y la proteína del gen inducible por ácido retinoico (RIG-I) (Fan *et al.*, 2010). Debido a la interacción con eIF4E, se propuso que Z inhibiría la traducción dependiente de cap (Campbell Dwyer *et al.*, 2000, Kentsis *et al.*, 2001).

I 7. Estrategias antivirales

Como se ilustró anteriormente, la incidencia, la amenaza para la salud humana, el aumento de emergencia y la falta de control efectivo de la enfermedad por arenavirus revela la necesidad de agentes antivirales eficaces. Esta búsqueda se centra en enfoques basados en el ataque de blancos virales o celulares.

I 7.1. Inhibidores dirigidos a blancos virales

Glicoproteínas de la envoltura

En los últimos años, varios proyectos han sido desarrollados para el hallazgo de nuevos agentes anti-arenavirus que tienen como blanco potencial a las GPs virales (Tabla I 2). GP1 y GP2 están involucradas en la entrada viral, que es el primer paso de

la infección y un determinante crucial para el tropismo celular, rango de hospedadores y la patogénesis del virus. La entrada se ha convertido en un blanco antiviral muy atractivo para diferentes virus humanos, ya que representa una barrera para suprimir el principio de la infección.

A través de ensayos de alto rendimiento (*high-throughput screening*, HTS), donde se probaron cientos de miles de moléculas, utilizando viriones infecciosos o pseudotipos lentivirales que expresaban GPs de arenavirus, se identificaron dos compuestos inhibidores denominados ST-193 y ST-294. ST-193, un derivado de benzimidazol, mostró potente actividad antiviral contra LASV *in vitro* y en modelos animales (Larson *et al.*, 2008; Cashman *et al.*, 2011) en tanto que ST-294 resultó un potente inhibidor *in vitro* de TCRV y los arenavirus del NM causantes de FH JUNV, MACV y GTOV y mostró también eficacia protectora contra TCRV en un modelo de infección en ratón lactante (Bolken *et al.*, 2006). Estudios mecanísticos determinaron que tanto ST-294 como ST-193 interfirieron específicamente con la fusión de membranas mediante el bloqueo de la interacción de GP2 con SSP y por estabilización del complejo GP de prefusión en el ambiente ácido del endosoma (York *et al.*, 2008). En otro HTS realizado con una colección de diversos compuestos heterocíclicos y péptido-miméticos combinados con ácido iminodiacético y pirrolidina frente a pseudotipos retrovirales que expresan las GPs de LASV, JUNV, GTOV y MACV se identificaron las moléculas designadas 8C1, 16G8 y 17C8 con potente actividad inhibitoria (Lee *et al.*, 2008a; Whitby *et al.*, 2009). La caracterización del mecanismo de acción reveló que 16G8 bloqueó eficazmente la fusión de membranas dependiente de pH mediada por GP2 sin afectar significativamente la expresión de los receptores en la superficie celular.

Otro enfoque para bloquear la entrada viral consistió en la utilización de oligonucleótidos que obstruyan la unión de GP1 al receptor, debido a su carácter de molécula polianiónica. En este contexto, los polímeros anfipáticos de DNA (PAs) fueron evaluados *in vitro* con una serie de aislamientos de LCMV, demostrando ser potentes inhibidores en forma dependiente del tamaño e hidrofobicidad (Lee *et al.*, 2008a; Whitby *et al.*, 2009). Los PAs perturbaron la interacción entre la GP1 de LCMV y su receptor celular, el α -dístroglicano, bloqueando la entrada y la propagación célula-célula del virus. Sin embargo, por su gran peso molecular sólo podrían utilizarse como agentes profilácticos para prevenir la infección.

Finalmente, un estudio reciente demostró la actividad de un anticuerpo monoclonal contra JUNV denominado F100G5 que se une al péptido de fusión

presente en GP2 cuando el complejo glicoproteico se encuentra alterado conformacionalmente por efecto del pH ácido y, a través de esta unión anticuerpo-GP2, se impide la fusión de membranas viral y endosomal interfiriendo con la penetración (York *et al.*, 2010). Aunque F100G5 no es un candidato inmediato para su uso terapéutico, las estructuras identificadas por el anticuerpo en el péptido de fusión de GP2 podrían servir también como blancos estratégicos para el desarrollo de pequeñas moléculas inhibitoras de la entrada del virus.

La proteína Z

Otro blanco antiviral estudiado en arenavirus es la proteína Z. Dado que la integridad de motivos conservados en Z mencionados anteriormente, como el sitio de miristilación, el dominio *RING-finger* y los LD, es necesaria para las funciones reguladoras y estructurales mediadas por Z (Strecker *et al.*, 2003; Perez *et al.*, 2003; Casabona *et al.*, 2009; Volpon *et al.*, 2010), esta proteína resulta un blanco muy promisorio para la quimioterapia contra los arenavirus.

En la búsqueda de agentes dirigidos a la proteína Z, se evaluaron *in vitro* contra varios arenavirus una serie de compuestos con diversa estructura química, tales como compuestos azoicos, derivados de hidrazidas y disulfuros aromáticos y alifáticos. Estos compuestos habían sido reportados previamente como agentes antiretrovirales por su reactividad con los motivos *zinc-finger* de la proteína de la nucleocápside NCp7 del virus de inmunodeficiencia humana (HIV), causando la expulsión de zinc a partir de la proteína y la consecuente inhibición viral por la carencia de funcionalidad biológica de la proteína (Rice *et al.*, 1996, 1997; Tummino *et al.*, 1997). Dentro de esta clase de compuestos analizados, el disulfuro aromático NSC20625 fue uno de los más activos inhibidores de los arenavirus, presentando una potente acción virucida que bloqueó la infectividad viral (García *et al.*, 2000, 2002). Estudios posteriores mostraron que las partículas de LCMV y JUNV inactivadas por NSC20625 retenían las funciones biológicas de las GPs en cuanto a la unión y entrada del virus a la célula pero estaba impedido el desnudamiento viral, permaneciendo los viriones dentro de las vesículas endosomales (García *et al.*, 2009). El perfil electroforético de Z en estas partículas inactivadas se vio alterado bajo condiciones no reductoras y el compuesto fue capaz de inducir la eyección del ión metálico a partir de una preparación purificada de la proteína Z recombinante de LCMV, con la consecuente pérdida de su estructura nativa y estabilidad, produciendo su oligomerización y dando como resultado agregados de alto peso molecular (García *et*

al., 2006). Además de NSC20625 y otros disulfuros, ciertos compuestos azoicos como la azodicarbonamida también mostraron acción inhibitoria contra JUNV aunque con menor efectividad (García *et al.*, 2003a).

Tabla I 1. Inhibidores dirigidos a componentes virales de arenavirus

Blanco	Agente	Virus	Referencia
Glicoproteínas de la envoltura	ST-193, ST-194	TCRV, JUNV, MACV, GTOV, LASV	Bolken <i>et al.</i> , 2006; Larson <i>et al.</i> , 2008; Cashman <i>et al.</i> , 2011; York <i>et al.</i> , 2008
	Péptido-miméticos basados en pirrolidina y ácido iminodiacético	LASV, JUNV, GTOV, MACV	Lee <i>et al.</i> , 2008a; Whitby <i>et al.</i> , 2009
	Compuestos heterocíclicos	LASV, JUNV, GTOV, MACV	Lee <i>et al.</i> , 2008a; Whitby <i>et al.</i> , 2009
	Polímeros anfipáticos de DNA (PAs)	LCMV	Lee <i>et al.</i> , 2008b
Proteína Z	mAb	JUNV	York <i>et al.</i> , 2010
	Compuestos azoicos, derivados de hidrazida, disulfuros	JUNV, TCRV, LCMV	García <i>et al.</i> , 2000, 2002, 2003a, 2006, 2009
	siRNAs	JUNV	Artuso <i>et al.</i> , 2009
	ODN antisentido	JUNV, PICV, TCRV, LCMV	Neuman <i>et al.</i> , 2011
Otros blancos	Dehidroepiandrosterona, epiandrosterona	JUNV	Acosta <i>et al.</i> , 2008
	Brasinoesteroides	JUNV	Wachman <i>et al.</i> , 2000; Castilla <i>et al.</i> , 2005
	Azoles	JUNV, TCRV	Barradas <i>et al.</i> , 2008
	Favipiravir	JUNV, PICV, TCRV	Gowen <i>et al.</i> , 2007, 2008; Mendenhall <i>et al.</i> , 2010, 2011
	Tiosemicarbazonas	JUNV, TCRV	García <i>et al.</i> , 2003b
	siRNAs	LASV	Müller & Günther, 2007

Otro abordaje experimental dirigido a la proteína Z consistió en el uso de pequeños RNA interferentes (siRNAs) para bloquear la expresión génica, lográndose una inhibición efectiva de la infección viral con un siRNA cuyo blanco fue la región abarcada por los nucleótidos 179-197 del gen *z* de JUNV (Artuso *et al.*, 2009). Se ha ensayado también esta metodología probando secuencias conservadas de otros dominios del genoma de LASV, LCMV y MOPV (Müller & Günther, 2007), pero se requieren más estudios para determinar las perspectivas terapéuticas de la interferencia por RNA. Dentro de esta misma línea de inhibición de la expresión génica, recientemente se han desarrollado oligonucleótidos antisentido dirigidos contra distintas regiones del RNA viral, que incluyeron los extremos terminales y secuencias de los cuatro genes virales, con resultados promisorios aunque aún preliminares en cuanto a su actividad contra JUNV y LCMV (Neuman *et al.*, 2011).

Otras drogas y estrategias

Para la mayoría de los virus con genoma de RNA, la RNA polimerasa ha representado uno de los blancos preponderantes para la acción antiviral. En *Arenaviridae* la atención ha sido también enfocada en el bloqueo de la síntesis de RNA desde hace ya varios años, pero preferentemente se han ensayado agentes que actúan a través de la inhibición de enzimas o factores celulares requeridos para la síntesis de RNA en vez de atacar en forma específica a la enzima viral (ver más adelante) (Andrei & De Clercq, 1990, 1993). En la búsqueda de compuestos con un efecto más directo sobre la RNA polimerasa viral se han obtenido resultados muy interesantes con ciertos derivados de pirazina (Gowen *et al.*, 2007). Entre estos agentes, el derivado llamado T-705, (6-fluoro-3-hidroxi-2-pirazincarboxamida), conocido inicialmente por su acción inhibitoria *in vitro* e *in vivo* contra el virus influenza (Furuta *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2003; Sidwell *et al.*, 2007), mostró actividad antiviral muy potente *in vitro* frente a JUNV, PICV y TCRV en ensayos de reducción del rendimiento viral (Gowen *et al.*, 2007), así como efectividad *in vivo* contra la infección de hámsters con PICV (Gowen *et al.*, 2008). Estudios sobre el mecanismo de acción de T-705, también conocido como favipiravir, mostraron que este compuesto es convertido a ribofuranosil-trifosfato por enzimas celulares, y este metabolito inhibe selectivamente a la RNA polimerasa dependiente de RNA de influenza sin provocar toxicidad a las células de mamífero ni inhibir la síntesis de DNA o RNA celular (Furuta *et al.*, 2009). En forma similar, se demostró la inhibición específica de la replicación/transcripción viral por T-705 usando un sistema replicon de LCMV, sugiriendo que T-705 actuaría directamente sobre la RNA polimerasa dependiente de RNA (Mendenhall *et al.*, 2010, 2011).

Además de las estrategias que se centraron en GP, Z y el RNA viral, en los últimos años diferentes clases de agentes fueron evaluados por sus efectos inhibitorios sobre la replicación *in vitro* de arenavirus, mostrando efectos moderados y sin, al presente, una completa identificación del blanco antiviral (Tabla 1). Las drogas estudiadas comprenden: brasinoesteroides sintéticos que afectaron la replicación del RNA viral y también mostraron actividad antiviral sobre eventos tardíos del ciclo replicativo de JUNV (Wachman *et al.*, 2000; Castilla *et al.*, 2005); dehidroepiandrosterona y epiandrosterona, con acción inhibitoria parcial sobre la expresión de GP1 en la superficie de las células infectadas, efecto probablemente relacionado a la capacidad de las hormonas esteroideas de alterar la fluidez y la inserción de las glicoproteínas virales en la membrana celular (Acosta *et al.*, 2008);

azoles obtenidos a partir de carbohidratos (Barradas *et al.*, 2008), tiosemicarbazonas sintetizadas a partir de cetonas y terpenonas que afectan etapas tardías del ciclo viral (García *et al.*, 2003b).

I 7.2. Inhibidores dirigidos a blancos celulares

Como una alternativa al enfoque tradicional para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos, en los últimos años ha comenzado a surgir con fuerza la idea de utilizar factores celulares que participan en la infección viral como potenciales blancos antivirales. Las ventajas de este abordaje se basan fundamentalmente en la factibilidad de obtener drogas de amplio espectro activas contra distintos virus patógenos así como la posibilidad de evitar la aparición de la resistencia antiviral, uno de los problemas clave de la quimioterapia en la actualidad. En contraposición, esta estrategia antiviral puede resultar en mayor citotoxicidad respecto del uso de blancos específicos virales, pero a su vez permite el uso de drogas ya utilizadas con otros fines terapéuticos y de las que se conoce su perfil de seguridad.

En distintos procesos de la infección con arenavirus, desde la adsorción y entrada hasta el ensamblaje y liberación de nuevas partículas virales, participan numerosos componentes celulares que representan nuevos puntos posibles de ataque para bloquear la infección viral, algunos de los cuales se detallan a continuación (Tabla I 2).

Metabolismo de nucleósidos

En el contexto de blancos celulares, uno de los aspectos más explorados hasta el presente está representado por las enzimas celulares que intervienen en los distintos caminos metabólicos relacionados a la síntesis del RNA celular. Precisamente la RIB (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida), el único antiviral en uso clínico para las FH arenavirales, es un ejemplo prototípico de esta clase de agentes. A pesar de que han sido propuestos múltiples mecanismos de acción para la acción antiviral de RIB contra distintos virus con genoma de RNA (Graci & Cameron, 2006; Leyssen *et al.*, 2008), el blanco principal que se propone sería la inhibición competitiva de inosina monofosfato deshidrogenada (IMPDH), enzima celular que convierte IMP a xantosina monofosfato, precursor en el camino biosintético de nucleótidos de guanósina (Streeter *et al.*, 1973; Leyssen *et al.*, 2005). El bloqueo de IMPDH por RIB-5'-monofosfato disminuiría el nivel de reserva intracelular de guanósina trifosfato (GTP) con la consiguiente reducción de la síntesis del RNA viral y

el rendimiento del virus, un efecto revertido por la adición exógena de guanosina. En el caso particular de los arenavirus está actualmente en discusión cuál es el real modo de acción de RIB, proponiéndose que además de inhibir la IMPDH podría actuar también sobre la polimerasa viral o por mutagénesis letal (Ruiz-Jarabo *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2011; Ölschläger *et al.*, 2011). Otros conocidos inhibidores de la IMPDH como el 5-etinil-1- β -D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida (EICAR) y el ácido micofenólico (MPA) fueron ensayados como antivirales en infecciones con arenavirus. EICAR mostró una potencia antiviral *in vitro* 10 a 100 veces mayor que RIB contra JUNV y TCRV (De Clercq *et al.*, 1991) y fue capaz de inhibir la replicación de LASV *in vitro* al igual que el MPA (Ölschläger *et al.*, 2011).

Para superar los inconvenientes registrados por el tratamiento de humanos con RIB, se evaluaron contra diferentes arenavirus otros análogos relacionados inhibidores de la IMPDH como la ribamidina, tiazofurina y selenazofurina (Andrei & De Clercq, 1990, 1993; Smee *et al.*, 1993). También se han evaluado análogos de citidina, dirigidos a la citosina trifofato sintetasa (CTP sintetasa); análogos de carbanucleósidos inhibidores de la orotidilico-monofosfato (OMP) descarboxilasa, que convierte OMP a UMP (uridina monofosfato), y análogos de adenosina, la mayoría de ellos actuando como inhibidores de S-adenosilhomocisteína (SAH) hidrolasa, enzima clave en la transmetilación para obtener el 5' cap del mRNA (Andrei & De Clercq, 1990; Smee *et al.*, 1992; Guillerm *et al.*, 2003; Gowen *et al.*, 2010). Estos inhibidores se han ensayado *in vitro* o *in vivo*, algunos de ellos, pero sin mostrar mayor efectividad que RIB.

Maduración de proteínas

Entre los eventos de maduración post-traducciona l de proteínas virales llevados a cabo por componentes celulares y considerados como blancos antivirales, se destacan los estudios sobre potenciales inhibidores del clivaje proteolítico del precursor GPC efectuado por la proteasa celular S1P/SK1-1, ya sea a través de variantes de antitripsina recombinantes que portan los motivos reactivos con S1P/SK1-1 (Maise *et al.*, 2009) o con péptido-miméticos del mismo motivo de reconocimiento (Rojek *et al.*, 2010) que fueron efectivos frente a LASV y LCMV, respectivamente. Otro punto de ataque analizado ha sido la inhibición de la enzima celular N-miristiltransferasa mediante inhibidores competitivos y no competitivos. Tanto el complejo GP como Z requieren miristilación para su funcionalidad biológica, por lo que los inhibidores enzimáticos afectaron la multiplicación de JUNV en condiciones no citotóxicas (Cordo *et al.*, 1999).

Alteraciones en lípidos de membrana

La composición lipídica de las membranas celulares, determinante de la fluidez y permeabilidad de las mismas, es otro factor celular influyente en la infección viral. Entre los agentes que alteran la bicapa lipídica y han sido probados como inhibidores virales cabe mencionar: ácidos grasos de cierta longitud de cadena carbonada (C10-C18) que afectan las etapas tardías del ciclo de JUNV, resultando el ácido láurico (C12) el inhibidor más activo (Bartolotta *et al.*, 2001); el anticuerpo monoclonal quimérico bavituximab reactivo con fosfolípidos aniónicos expuestos en células infectadas y viriones (Soares *et al.*, 2008); y finalmente, un derivado de rodamina denominado LJ001 que se inserta en la membrana lipídica viral impidiendo la entrada y propagación infecciosa de una amplia variedad de virus con envoltura, incluido JUNV (Wolf *et al.*, 2010).

Tabla I 2. Inhibidores dirigidos a blancos celulares

Blanco	Agente	Virus	Referencia
Metabolismo de nucleótidos	RIB	JUNV, LASV, LCMV, TCRV	Andrei & De Clercq, 1990; Ruiz-Jarabo <i>et al.</i> , 2003; Moreno <i>et al.</i> , 2011; Ölschläger <i>et al.</i> , 2011
	EICAR, MPA	JUNV, LASV, TCRV	De Clercq <i>et al.</i> , 1991; Ölschläger <i>et al.</i> , 2011
	Ribamidina, tiazofurina y selenazofurina	JUNV, PICV, TCRV	Andrei & De Clercq, 1990, 1993; Smee <i>et al.</i> , 1993
	Inhibidores de OMP descarboxilasa y SAH hidrolasa	JUNV, LCMV, PICV, TCRV	Andrei & De Clercq, 1990; Smee <i>et al.</i> , 1992; Guillerm <i>et al.</i> , 2003; Gowen <i>et al.</i> , 2010
Maduración de proteínas	Variantes de α -1-antitripsina adaptadas a S1P/SK1-1	LASV	Maisa <i>et al.</i> , 2009
	dec-RRL-CKM	LCMV	Rojek <i>et al.</i> , 2010
	Ácido DL-2-hidroximirístico y ácido 13-oxamirístico	JUNV	Cordo <i>et al.</i> , 1999
Alteraciones en lípidos de membrana	Ácido láurico	JUNV	Bartolotta <i>et al.</i> , 2001
	Bavituximab	PICV	Soares <i>et al.</i> , 2008
	LJ001	JUNV	Wolf <i>et al.</i> , 2010
Sistemas de transporte y señalización celular	siRNAs contra Tsg101	LASV, LCMV	Perez <i>et al.</i> , 2003; Urata <i>et al.</i> , 2006
	Teterina	LASV	Sakuma <i>et al.</i> , 2009; Radoshitzky <i>et al.</i> , 2010
	Agentes que producen fosforilación / desfosforilación de proteínas celulares	JUNV, PICV	Bowick <i>et al.</i> , 2007; Vela <i>et al.</i> , 2008; Linero <i>et al.</i> , 2009

Sistemas de transporte y señalización celular

El proceso de brotación viral utiliza numerosas proteínas celulares implicadas en el sistema de translocación vacuolar (Welsch *et al.*, 2007). La proteína Tsg101 es un componente de la maquinaria celular de transporte vacuolar clase E de proteínas involucrado en la ruta de reciclaje y degradación de proteínas celulares. Se ha identificado a Tsg101 como necesaria para la brotación de los arenavirus mediante su silenciamiento empleando siRNAs (Perez *et al.*, 2003, Urata *et al.*, 2006). También se han identificado otros factores celulares que inhiben la replicación viral a través de interacciones con componentes virales, tal es el caso de la teterina (también conocida como BST2, CD317 o HM1.24), una proteína asociada a la membrana celular que se expresa constitutivamente o se induce por interferon, dependiendo del tipo celular. La sobreexpresión o el silenciamiento de teterina influyó en la liberación de VLPs inducidas por Z y de partículas infectivas de LASV (Sakuma *et al.*, 2009; Radoshitzky *et al.*, 2010). Varios virus tienen la propiedad de controlar distintas vías de señalización celular para afectar procesos celulares en beneficio de su propia multiplicación. En ensayos con PICV y JUNV se han podido determinar varios procesos de activación y estabilización de diferentes proteínas celulares mediante fosforilación (Bowick *et al.*, 2007; Vela *et al.*, 2008; Linero *et al.*, 2009).

I 8. Las acridonas como antivirales

Las acridonas son compuestos heterocíclicos que han concitado atención en los últimos años por sus propiedades biológicas antiproliferativas/anticancerígenas, antiparasitarias, antivirales y antimicóticas (Hedge *et al.*, 2004; Belmont *et al.*, 2007; Vispé *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2007, 2009; Singh *et al.*, 2009), en particular, las acridonas sintéticas no relacionadas a las naturales extraídas de plantas emergieron recientemente como compuestos bioactivos promisorios.

En cuanto a las propiedades antivirales de esta clase de compuestos, varios estudios, algunos recientes, han mostrado la acción inhibitoria de derivados de acridonas tanto contra virus con genoma de DNA tales como virus herpes simplex y citomegalovirus (Lowden *et al.*, 2003; Goodell *et al.*, 2006), virus Epstein-Barr (Itoigawa *et al.*, 2003) y adenovirus (Zarubaev *et al.*, 2003), así como con virus con genoma de RNA, que incluyen HIV (Turpin *et al.*, 1998; Fujiwara *et al.*, 1999), virus de diarrea viral bovina (Tabarrini *et al.*, 2006) y hepatitis C (HCV) (Manfroni *et al.*, 2009; Stankiewicz-Drogon, 2010).

El blanco preciso y modo de acción antiviral de las acridonas no está claramente determinado al presente, aunque su acción predominante parece estar centrada alrededor de la síntesis de ácidos nucleicos. Se ha identificado en diversos derivados una actividad inhibitoria específica contra enzimas celulares, como la DNA topoisomerasa II (Goodell *et al.*, 2006; Vispé *et al.*, 2007) y la IMPDH (Watterson *et al.*, 2007), y enzimas virales, como la RNA helicasa y la RNA polimerasa (Stankiewicz-Drogon, 2010), así como la capacidad de intercalarse en las moléculas de ácido nucleico, bloqueando el reconocimiento o asociación de enzimas con la molécula modificada (Adams, 2002). Por lo tanto, cabe la posibilidad de un efecto múltiple sobre varios blancos que posibilitarían una potente eficiencia en la inhibición viral, con menor factibilidad de generación de resistencia.

| Objetivos

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 blanco de ataque común para todos los miembros de la familia.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este trabajo se centran en el estudio de dos clases de inhibidores en la infección de arenavirus: I) tiosulfonas, disulfuros aromáticos y de tiuramo y II) acridonas *N*-alil sustituidas.

- I) En base a nuestra experiencia sobre la actividad antiviral de ciertos disulfuros como inhibidores de los arenavirus JUNV y LCMV debido a su reactividad con la proteína Z, nos propusimos extender el estudio a una nueva serie de disulfuros aromáticos y disulfuros de tiuramo con el fin de encontrar compuestos anti-arenavirus con mayor efectividad antiviral y/o virucida y analizar su modo de acción inhibitoria.
- II) En base a los estudios antivirales reportados para otros virus, nos propusimos caracterizar la acción antiviral contra arenavirus de nuevos derivados de acridonas *N*-alil sustituidas como potenciales inhibidores de la síntesis de RNA viral y su reactividad con blancos celulares y/o virales.

| Materiales y Métodos

MM 1. Líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: Vero, proveniente de riñón de mono verde africano adulto *Cercopithecus aethiops* (ATCC CCL 81); BHK-21, proveniente de riñón de hámster neonato (ATCC CRL8544); A549, proveniente de carcinoma pulmonar humano (ATCC CCL-185); C6/36, derivada de larvas del mosquito *Aedes albopictus*, adaptada a crecer a 33 °C (Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio Maiztegui, Pergamino, Argentina).

Las células fueron subcultivadas semanalmente. En el caso de Vero, las células fueron crecidas y mantenidas en botellas cerradas a 37 °C en estufa, utilizando medio mínimo esencial Eagle (MEM) (Gibco BRL – Life Technologies, EE.UU.) suplementado con 5 % de suero de ternera (ST) (Gibco BRL – Life Technologies, EE.UU.) inactivado (56 °C durante 30 min) y 50 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Para el medio de mantenimiento (MM) la concentración de suero fue reducida a 1,5 %. Las células BHK-21 y A549 fueron crecidas en MEM, suplementado con 10% de ST, 50 µg/ml de gentamicina y 1,5 g/l de bicarbonato de sodio. Para el MM la concentración de suero fue reducida al 5 %. Las células C6/36 se crecieron en medio L-15 (Leibovitz) (Gibco BRL – Life Technologies, EE.UU.) suplementado con 0,3 % de caldo triptosa fosfato, 0,02 % de glutamina, 1 % de solución de aminoácidos no esenciales MEM (Gibco BRL – Life Technologies, EE.UU.), 5 % de suero fetal bovino (SFB) inactivado y 50 µg/ml de gentamicina, reduciendo la concentración de suero a 2% en el MM.

Cuando los cultivos se realizaron en microplaca se crecieron y mantuvieron a 37° C en estufa con 4% de CO₂ y se suplementaron con 20 µM de buffer HEPES (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

El medio de plaqueo (MP) consistió en MEM en doble concentración suplementado con 4% de ST y 100 µg/ml de gentamicina, mezclado con volúmenes iguales de metilcelulosa 1,4 % (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

Para los experimentos con el minigenoma pS-CAT se utilizaron células CV1, de riñón de mono verde africano adulto (ATCC CCL 70), y BSR, un clon de BHK-21, las cuales fueron crecidas en medio mínimo esencial Dulbecco (D-MEM, Invitrogen – Life Technologies, EE.UU.) y medio mínimo esencial Glasgow (G-MEM, Invitrogen – Life Technologies, EE.UU.), respectivamente, suplementado con glutamina 2 mM, 10% SFB y penicilina 100 U/ml-estreptomicina 100 µg/ml (Invitrogen – Life Technologies, EE.UU.).

MM 2. Virus

Se utilizaron las cepas de JUNV IV4454, naturalmente atenuada, (Contigiani *et al.*, 1977) y XJCI3, derivada de la cepa patógena prototipo XJ (de Guerrero *et al.*, 1969; Ruggiero *et al.*, 1969).

Otros arenavirus ensayados fueron TCRV, cepa TRLV 11573 (Downs *et al.*, 1963) y LCMV, cepas WE y Armstrong (ARM).

También se emplearon como controles no relacionados los virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) cepa KOS, Polio tipo 3 (PV) cepa Sabin, dengue serotipo 2 (DENV-2) cepa NGC, Sarampión (MV) cepa vacunal y el virus de la estomatitis vesicular (VSV) cepa Indiana.

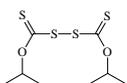
Los stocks de trabajo de los arenavirus se prepararon en células Vero con una multiplicidad de infección (m.i) de 0,1 UFP/cél., a excepción de LCMV, que se propagó en células BHK-21. Se dejó adsorber el inóculo durante 1 h a 37 °C, luego se lo retiró y se cubrieron las células con MM. El sobrenadante de células infectadas con LCMV se cosechó al segundo y tercer día post infección (p.i.); para el resto de los arenavirus, el sobrenadante se cosechó al cuarto y quinto día p.i. Todos los stocks fueron almacenados a -70 °C hasta su uso. El título de los stocks se determinó por formación de placas en células Vero y en todos los casos estuvo en el orden 10^6 - 10^7 UFP/ml.

Para HSV-1, PV, MV y VSV, los stocks se prepararon en células Vero, en tanto que DENV-2 se propagó en células C6/36, con una m.i que varió entre 0,1 y 0,01 UFP/cél., y el tiempo elegido para recoger los sobrenadantes y/o el medio intracelular fue variable de acuerdo a las características de crecimiento de cada virus. Todos los virus se titularon por UFP en células Vero.

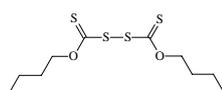
MM 3. Compuestos

Se utilizaron dos grupos de compuestos: 1) disulfuros y tiosulfonas conocidos por su reactividad contra motivos zinc-*finger* de la proteína de nucleocápside de HIV p7 (Figura MM 1); 2) derivados de acridonas *N*-sustituídas (Figura MM 2).

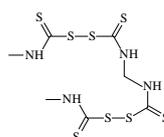
Disulfuros de tiuramo



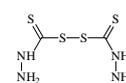
NSC1339



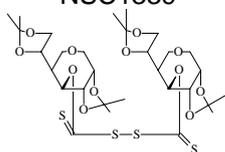
NSC5239



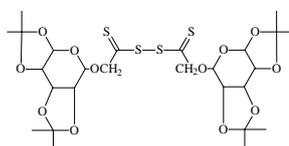
NSC14560



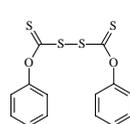
NSC27320



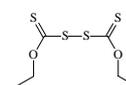
NSC93057



NSC93058

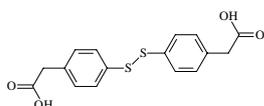


NSC317926

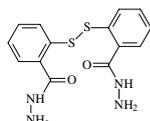


NSC402561

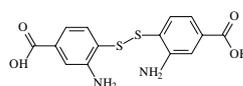
Disulfuros aromáticos carboxil/carboxamida-derivados



NSC211

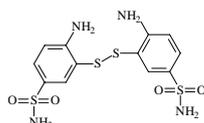


NSC4492

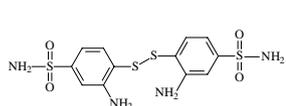


NSC38069

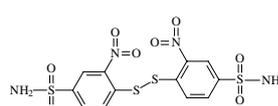
Disulfuros aromáticos sulfonio-derivados



NSC58950

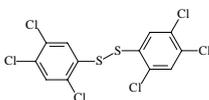


NSC83217

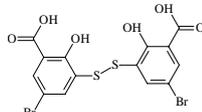


NSC255289

Disulfuros aromáticos sustituidos con grupos halógenos

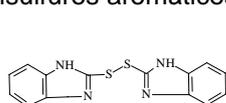


NSC238936

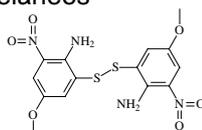


NSC314354

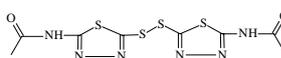
Disulfuros aromáticos misceláneos



NSC35825

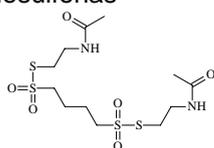


NSC71033

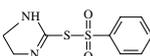


NSC327174

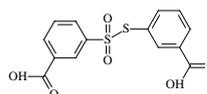
Tiosulfonas



NSC76302



NSC112801



NSC342015

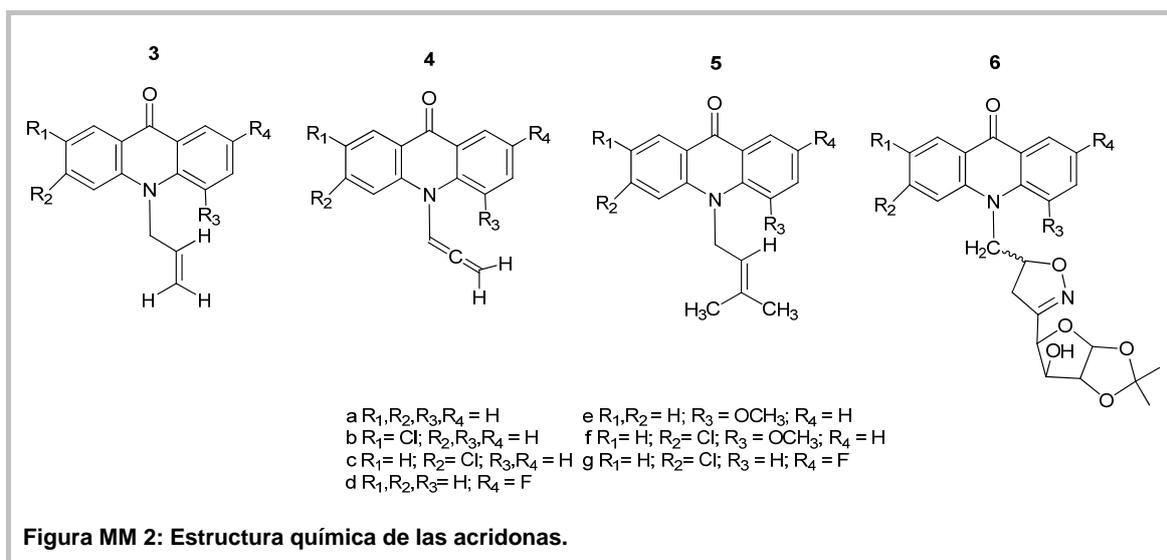
Figura MM 1: Estructura química de los disulfuros y tiosulfonas, reactivos con motivos Zn- fingers.

MM 3.1. Disulfuros y tiosulfonas

Los compuestos fueron provistos por el National Cancer Institute (NCI), Frederick, MD, Estados Unidos, a través de un Acuerdo de Transferencia Tecnológica y se nombran de acuerdo al número de identificación del NCI. Comprenden tres estructuras básicas generales, disulfuros aromáticos, disulfuros de tiamina y tiosulfonas, con diversos grupos sustituyentes (*Figura MM 1*).

MM 3.2. Derivados de acridonas *N*-sustituídas

Se ensayaron 4 series de derivados de acridonas *N*-sustituídas con diferentes grupos químicos, provistos por la Dra. Norma D'Accorso (CIHIDECAR-CONICET, Dpto. Química Orgánica, FCEN, UBA). Los compuestos se designaron con un número (correspondiente a cada serie) y una letra de acuerdo al tipo de sustituyente (*Figura MM 2*).



Se prepararon soluciones madres 100 mM de todos los compuestos de los grupos en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y luego se guardaron a $-70^{\circ}C$ hasta su uso.

Se ensayaron también la ribavirina (RIB) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) como compuesto de referencia anti-arenavirus y el ácido micofenólico (MPA) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) como control de inhibidor de IMPDH.

MM 4. Ensayo de citotoxicidad

MM 4.1. Método del MTT

Se utilizó el ensayo colorimétrico o técnica del MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) (Mosmann, 1983). Este compuesto es procesado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa formando cristales de formazán (producto coloreado), en cantidad proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Para estudiar el efecto de los compuestos sobre células confluentes, las monocapas de células crecidas en microplacas de 96 cavidades (90% de confluencia) fueron tratadas con diluciones seriadas al medio de los compuestos, por triplicado durante 48 h a 37 °C. Para evaluar el efecto de los compuestos sobre células en crecimiento, se sembraron las células en microplacas de 96 pocillos y se las incubó durante 2,5 h a 37 °C para permitir la adhesión de las mismas a la superficie y posteriormente se agregaron diluciones seriadas al medio de los compuestos, por triplicado y se incubaron durante 48 h 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 96°. 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 4.2. Síntesis de proteínas celulares

Monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 24 cavidades, fueron incubadas en ausencia o presencia de compuesto durante 24 h a 37 °C. Luego, se descartó el medio, se lavaron las células tres veces con PBS y se agregó medio sin metionina ni cisteína (Gibco BRL – Life Technologies, EE.UU.) en ausencia o presencia de compuesto. Luego de 1,5 h de ayuno a 37° C se incorporó la marca radiactiva (Expre³⁵S³⁵S, 50 µCi/ml, NEN Dupont), y se incubaron las células durante 3 h a 37 °C. Concluido el período de marcación, las células se lavaron tres veces con PBS y se lisaron con 75 µl de buffer RIPA (NaCl 0,15 M, SDS 0,1%, Tritón X-100 1%, deoxicolato de sodio 1%, Tris-HCl 0,01 M pH 7,4) en presencia de inhibidores de

proteasas fenilmetanosulfonil fluoruro (PMSF) 0,4 mM (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y aprotinina 10 µg/ml (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

Los lisados celulares se centrifugaron a baja velocidad 4000 x g 10 min a 4 °C, los sobrenadantes se diluyeron al medio con buffer de muestra SDS-PAGE reductor (Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, SDS 5%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,005%, β-mercaptoetanol 2%) y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE) (Tris-ClH 0,2M pH 8,8 con SDS 0,1%) a 150 V en buffer de corrida (Tris-ClH 0,025M pH 8,3, glicina 0,192M y SDS 0,1%). El gel se sometió a fluorografía, realizando tres lavados de 1 h cada uno con concentraciones crecientes de DMSO, luego se incubó en una solución de PPO (2,5-difeniloxazol, Sigma-Aldrich, EE.UU.) al 15% en DMSO durante 3 h, se secó y se expuso con una película radiográfica (AGFA Curix RPI) a -70°C durante el tiempo adecuado para revelar las bandas.

MM 5. Determinación de la actividad antiviral

La actividad antiviral de los compuestos se determinó mediante un ensayo de inhibición del rendimiento viral. Monocapas de células crecidas en microplacas de 24 cavidades, fueron infectadas con 0,1 ml de suspensiones virales 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 CO₂ hasta la cosecha de los sobrenadantes; éstos fueron titulados por el método de UFP en células Vero. Se inoculó con distintas diluciones del virus, se dejó adsorber durante 1 h a 37 °C y luego se cubrió la monocapa con 1 ml de MP. Las células fueron fijadas con formol y teñidas con cristal violeta para el recuento de placas de lisis a los 7 días p.i.

Para los restantes virus se siguió el mismo procedimiento experimental, variando el tiempo de cosecha de los sobrenadantes y revelado de las placas de lisis de acuerdo a las características de cada virus.

En todos los casos el porcentaje de inhibición se calculó con respecto a los controles infectados y sin tratar (control viral) como:

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

A partir de los datos anteriores se calcularon la CE_{50} y la CE_{90} como la concentración efectiva del compuesto que reduce la infectividad viral en un 50% y 90%, respectivamente.

A fin de caracterizar la actividad antiviral de los compuestos contra JUNV, se realizaron ensayos de actividad antiviral por inhibición del rendimiento variando distintas condiciones experimentales, como: m.i., tiempo de tratamiento con el compuesto, frecuencia de cambio del MM y tipo de célula.

MM 6. Efecto del pretratamiento de las células con los compuestos sobre la actividad antiviral

Monocapas de células Vero en microplacas de 24 cavidades fueron preincubadas durante 2 h a 37 °C con MM conteniendo diluciones seriadas al medio de los compuestos, luego éstos fueron removidos y las células lavadas dos veces con PBS e infectadas a una m.i. de 0,1 UFP/cél en ausencia de compuesto. A las 48 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se tituló la producción viral mediante UFP.

MM 7. Reversibilidad de la acción antiviral

Se evaluó la reversibilidad de la actividad antiviral mediante la remoción del compuesto a las 24 h p.i. Las células fueron infectadas (m.i. 0,1), luego de 1 h de adsorción se removió el inóculo y se agregó MM con o sin compuesto. A las 24 h p.i. se siguieron distintos tratamientos:

T1: Agregado de medio fresco con compuesto.

T2: Agregado de medio fresco sin compuesto.

Los controles virales no fueron tratados con compuesto, a las 24 h a uno de ellos se le realizó el cambio de medio y el otro permaneció con el mismo medio. A las 48 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se tituló el rendimiento viral por plaqueo.

MM 8. Efecto de la adición del compuesto a distintos tiempos

Para el ensayo de adición, monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades fueron infectadas 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 a los cultivos una concentración del compuesto que inhibiera el rendimiento en un 90% de acuerdo al ensayo de actividad antiviral (MM 5.), excepto a los controles no tratados con compuestos. 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 9. Determinación de la actividad virucida

MM 9.1. En función de la concentración de compuesto

Volúmenes iguales de suspensión viral conteniendo aproximadamente 1×10^6 UFP de virus y varias concentraciones de compuestos en MM fueron mezclados e incubados 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 titularon por UFP en células Vero, teniendo 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 concentración inactivante 50% (CI_{50}), como la concentración de compuesto que inactiva el 50% de la infectividad de la suspensión viral respecto del control.

MM 9.2. En función del tiempo de incubación

Las incubaciones de las muestras conteniendo 1×10^6 UFP de virus con la dilución de compuesto 10 μ M, 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.

MM 9.3. En función de la temperatura de incubación

Las incubaciones de las muestras conteniendo 1×10^6 UFP de virus con la dilución de compuesto 10 μ M, se realizaron a 4, 20 y 37 °C, respectivamente. Luego de 90 min de incubación, las muestras se titularon por el método de UFP.

MM 10. RT-PCR en tiempo real

El RNA total se extrajo a partir de células sin infectar e infectadas con JUNV (m.i. 0,1 UFP/cél) utilizando el reactivo comercial TRIzol (Gibco BRL – Life Technologies, EE.UU.) siguiendo las indicaciones del proveedor. La muestra final se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada estéril libre de enzimas degradadoras de RNA y se almacenó a –20 °C. La cuantificación del RNA obtenido se realizó con el fluorómetro Nanodrop (Thermo Scientific Inc., EE.UU.).

El RNA extraído se utilizó como molde para la síntesis de cDNA. Para ello, se tomaron 5 µg del RNA y se llevó a 9,5 µl de volumen final con agua bidestilada libre de nucleasas. Se agregaron 0,5 µl de oligonucleótidos específicos o aleatorios (Biodynamics, Argentina) (Tabla MM 1), según el caso, en una concentración 10 µM y se dejó incubar durante 5 min a 65 °C, luego a cada muestra se le agregó la mezcla de reacción conteniendo: 1 µl de transcriptasa reversa murina M-MLV (100 U/µl, Promega, EE.UU.), 4 µl de buffer 5X, 4 µl de una mezcla conteniendo los cuatro deoxinucleótidos (dNTPs) 10 mM y 4 µl de agua bidestilada libre de nucleasas. El volumen final fue de 20 µl y la reacción se llevó a cabo a 42 °C durante 2 h.

Tabla MM 1: Oligonucleótidos utilizados para la síntesis de cDNA

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
186 Complementario a las secuencias ubicadas en los extremos 5' del mRNA de NP.	5'-GGCATCCTTCAGAACATC-3'
GPC1 (87) Complementario a la secuencia ubicada en el extremo 3' del RNA S genómico complementario de JUNV.	5'-ATGGGGCAGTTCATCAG-3'
Oligonucleótidos aleatorios Oligonucleótidos aleatorios (Biodynamics, Argentina)	Aleatoria
Actina1 Complementario a la secuencia de <i>actina</i>	5'-GAGACCTTCAACACCCCAGCC-3'

El cDNA sintetizado se empleó como molde en la reacción de una PCR en tiempo real. El volumen final de reacción fue de 25 µl. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo con 2 µl de cDNA en presencia de buffer completo de reacción “Mezcla real” (Biodynamics, Argentina) y 0,4 µl de cada oligonucleótido 50 µM (Tabla MM 2) siguiendo las siguientes condiciones: una incubación a 95 °C durante 5 min, 45 ciclos de 30 seg a 95 °C, 45 seg a 60 °C y 30 seg a 72 °C, finalmente 1 ciclo de 5 min a 72 °C. Al término de la reacción, todas las muestras fueron sometidas a distintas temperaturas (55-95 °C) para calcular las curvas de disociación.

Tabla MM 2: Oligonucleótidos utilizados para PCR en tiempo real

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
Arena 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 arnavirus.	5'-CGCACAGTGGATCCTAGGC-3'
NP Complementario a las secuencias ubicadas en los extremos 5' del mRNA de NP.	5'-GGCATCCTTCAGAACATC-3'
GPC1 (87) Complementario a la secuencia ubicada en el extremo 3' del RNA S genómico complementario de JUNV.	5'-ATGGGGCAGTTCATCAG-3'
GPC2 Complementario a la secuencia ubicada en el extremo 5' de la secuencia de GPC en el RNA S genómico de JUNV.	5'-CCCCTTAATGTAAAGATGGC-3'
ZF Complementario a la secuencia ubicada en el extremo 3' del RNA L genómico complementario de JUNV.	5'-ATGGGCAACTGCAACGGGGCATC-3'
ZR Complementario a la secuencia ubicada en el extremo 5' del RNA L genómico de JUNV.	5'-CTATGGTTGGTGGTGCTGTTGGCT -3'
GAPDH-F151 (Invitrogen – Life Technologies, EE.UU.)	5'-GTTGCCATCAATGACCCCTTCA-3'
GAPDH-R339 (Invitrogen – Life Technologies, EE.UU.)	5'-CAGCCTTCTCCATGGTGGTG-3'
Actina1	5'-GAGACCTTCAACACCCCAGCC-3'
Actina2	5'-GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'

Los gráficos de las amplificaciones obtenidas fueron expresados como cantidades relativas (QR), calculadas con los valores de C_T analizados con el software iQ5 2.1.97.1001 (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.), donde C_T es una medida del software para cada muestra y corresponde al ciclo en el cual la fluorescencia alcanza un umbral arbitrario en la parte lineal de la curva de la reacción, las muestras más diluidas se cruzan en valores más altos de C_T . Los valores de C_T fueron normalizados usando la amplificación de genes celulares *gapdh* o *actina* (Tabla MM 2) como control interno. A partir de los datos numéricos obtenidos con el software se llevó a cabo una cuantificación de los mismos con el fin de traducirlos a porcentajes de inhibición. Los cálculos fueron:

C_T : número de ciclos para el umbral de fluorescencia seleccionado.

ΔC_T : diferencia entre el promedio de los valores de C_T de las muestras utilizando oligonucleótidos virales y los valores de C_T de las muestras utilizando oligonucleótidos celulares.

$$\Delta C_T = C_T \text{ viral} - C_T \text{ celular}$$

$\Delta\Delta C_T$: diferencia entre el ΔC_T en la condición control y el ΔC_T en la condición tratada (células infectadas y tratadas).

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{células no tratadas}) - \Delta C_T (\text{células tratadas})$$

QR (cantidad relativa): $2^{\Delta\Delta C_T}$. Si QR=1, no hay diferencia entre el control y las células tratadas; QR > 1 indica el número de veces que aumenta la expresión del gen; y QR < 1 representa el número de veces que dicha expresión se encuentra inhibida respecto de la condición control.

MM 11. Acción de los compuestos sobre la adsorción de los viriones

MM 11.1. Ensayo de adsorción de JUNV por infectividad

Para determinar el efecto de los compuestos sobre la adsorción viral, cultivos de células Vero se infectaron con JUNV (m.i. 1 UFP/cél) en cuatro condiciones de tratamiento. Compuesto durante la adsorción: las células se infectaron en MM conteniendo compuesto y luego de 1 h de adsorción a 4 °C se descartó el inóculo, se lavaron las células con PBS y se agregó MM libre de compuesto; compuesto después de la adsorción: el virus se adsorbió 1 h a 4 °C en ausencia de compuesto y luego de remover el virus no adsorbido por lavado se agregó MM con compuesto; control de compuesto: la droga estuvo siempre presente durante y después de la adsorción; control viral: las células se infectaron y se mantuvieron siempre en MM sin compuesto. Para todos los tratamientos, los títulos virales extracelulares se determinaron a las 48 h p.i.

También se midió el efecto sobre la cinética de adsorción. Para ello, células Vero se infectaron con JUNV a una m.i. de 1 UFP/cél. Se dejó adsorber el inóculo por distintos tiempos a 4 °C en presencia o en ausencia de compuesto, al cabo de los cuales se descartó el medio y se lavaron las células con PBS frío para remover el virus no adsorbido. Se agregó 100 µl de PBS frío por cavidad y las células se rompieron por 3 ciclos de congelado/descongelado. Los restos celulares se separaron por centrifugación (10 min a 3000 x g) y se cuantificó el virus infeccioso en el sobrenadante mediante UFP.

MM 11.2. Ensayo de adsorción de JUNV por RT-PCR en tiempo real

Monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 6 cavidades se infectaron con viriones de JUNV previamente inactivados con el compuesto durante 1,5 h a 37 °C y se procesaron como en *MM 11.1*, excepto que luego de los lavados con PBS frío se lisaron las células con 500 µl de TRizoTM procediéndose de acuerdo a lo detallado en *MM 10*.

MM 12. Acción de los compuestos sobre la internalización de los viriones

Monocapas de células Vero en microplacas de 6 cavidades fueron infectadas con JUNV a una m.i. de 1 o 0,0001 UFP/cél. En ambos casos, luego de 1 h de adsorción a 4 °C en ausencia de compuesto, las células fueron lavadas tres veces con PBS frío y cubiertas con MM con o sin compuesto e incubadas a 37 °C durante 1 h. Luego se retiró el medio, se lavó con PBS y se colocó 100 µl de buffer citrato (ácido cítrico 40 mM, KCl 10 mM, NaCl 135 mM, pH 3) por cavidad durante 1 min para inactivar el virus no internalizado. Se realizaron tres lavados con PBS. Luego se determinó la cantidad de virus internalizado midiendo la infectividad viral por: a) plaqueo directo (infección a m.i. 0,0001): las células se cubrieron directamente con MP y luego de 7 días de incubación a 37 °C se reveló el número de placas de lisis; b) centros infecciosos (infección a m.i. 1): las células se trataron con tripsina, se realizaron tres lavados con MM centrifugando durante 1 min a 2000 x g, y finalmente se resuspendieron en 400 µl de MM. Se realizaron diluciones seriadas al décimo de las suspensiones celulares y se inocularon sobre monocapas confluentes de células Vero. Después de 1,5 h de incubación a 37 °C se cubrieron las monocapas con MP y luego de 7 días de incubación a 37 °C se reveló el número de placas de lisis, expresando los resultados como centros infecciosos (CI)/ml.

MM 13. Efecto de los inhibidores sobre el desnudamiento de JUNV

Monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades fueron infectadas con JUNV a una m.i. de 1. Luego de 1 h de adsorción a 4 °C en ausencia de compuesto, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y cubiertas con MM con o sin compuesto o concanamicina A (50 nM) e incubadas a 37 °C. A diferentes tiempos p.i., el virus no internalizado fue eliminado con proteinasa K (Invitrogen – Life Technologies, EE.UU.) durante 45 min a 4 °C, luego se agregó PMSF 2 mM en PBS para bloquear la actividad enzimática. Se lavaron las células tres veces por

centrifugación durante 10 min a 3000 x g, se resuspendieron en PBS y se realizaron tres ciclos de congelamiento y descongelamiento para lisar las células. Los restos celulares se separaron por centrifugación (10 min a 3000 x g) y se cuantificó el virus infeccioso en el sobrenadante por UFP, cuyo valor está directamente relacionado con el grado de desnudamiento viral en función del tiempo.

MM 14. Efecto de los inhibidores sobre la expresión de antígenos virales. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta

Monocapas de células Vero crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades fueron infectadas con JUNV e incubadas con MM conteniendo o no compuesto. A las 16 ó 48 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 total se fijaron las células con metanol por 10 min a -20 °C. Luego de tres lavados con PBS se realizó la tinción indirecta usando el anticuerpo monoclonal (mAc) SA02-BG12 1/300 reactivo contra NP, en PBS y el mAc QC03-BF11 1/300 reactivo contra GP1 y su precursor GPC, en PBS (Sánchez *et al.*, 1989) durante 1 h a 37 °C. Seguidamente, se incubó con suero anti-IgG de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) por 30 min a 37 °C. Antes del lavado final con agua, las células fueron teñidas con azul de Evans y luego fueron montadas en una solución tamponada de glicerol conteniendo 2,5 % de 1,4-diazabicyclo octano (DABCO).

Para la inmunofluorescencia de membrana las células fueron fijadas con formaldehído 4% y luego incubadas con mAc QC03-BF11 seguido por FITC-anti-IgG de ratón.

El porcentaje de células fluorescentes en cada preparación fue calculado a partir de 20 campos ópticos seleccionados al azar, tomando como control las monocapas infectadas y sin tratar.

MM 15. Efecto de los inhibidores sobre las proteínas recombinantes de JUNV expresadas en células Vero

Monocapas de células Vero fueron crecidas en microplacas de 24 cavidades hasta 80% de confluencia. Para cada muestra se prepararon mezclas separadas de

1 µg de DNA, 25 µl de OptiMEM (Invitrogen – Life Technologies, EE.UU.) sin suero y 3 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen – Life Technologies, EE.UU.) en 25 µl del mismo medio. Se utilizaron los plásmidos pcDNA-3.1/JUNV Z-FLAG, pcDNA-3.1/JUNV NP y pcDNA-3.1/JUNV GPC (gentileza Dra. Ellenberg, Dr. Scolaro). Luego de 5 min, se combinaron las soluciones de Lipofectamina 2000 y DNA, y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos. Posteriormente, se agregaron los 50 µl de la mezcla a cada una de las cavidades de la microplaca más 200 µl de OptiMEM, se centrifugaron las microplacas durante 30 min a 3000 rpm incubándose luego en estufa de CO₂ durante 5 h. Transcurrido dicho tiempo, se reemplazó el medio con la mezcla de transfección por OptiMEM 2% SFB con o sin compuesto y se incubaron las células.

A las 48 h post-transfección se procedió a revelar la expresión de las proteínas recombinantes mediante inmunofluorescencia indirecta. Para las proteínas NP y GPC/GP1 se siguió el mismo procedimiento que se detalla en *MM 14* para inmunofluorescencia total. Para el caso de la proteína Z, se fijaron las células a temperatura ambiente con paraformaldehído 4% por 15 min, luego se colocó cloruro de amonio 20 mM 15 min y por último PBS-0,2% Triton X-100 15 min. Se hicieron lavados con PBS y se realizó la tinción indirecta utilizando el anticuerpo monoclonal anti-FLAG (DYKDDDDK Tag Antibody) (Cell Signaling Technology, EE.UU.) 1/400 en PBS-0,2% Tritón X-100 durante 1 h a 37 °C. Pasado ese tiempo se lavó con PBS y se incubó con suero anti-IgG de conejo conjugado a FITC durante 30 min a 37 °C.

El porcentaje de células fluorescentes en cada preparación fue calculado a partir de 20 campos ópticos seleccionados al azar, tomando como control las monocapas transfectadas con el plásmido pcDNA-3.1 vacío, tratadas y sin tratar.

MM 16. Ensayos de formación de VLPs y medición de la actividad del minigenoma pS-CAT

MM 16.1. Plásmidos

Los plásmidos fueron gentilmente cedidos por la Dra. Nora López del Centro de Virología Animal (CEVAN), Instituto de Ciencia y Tecnología "Dr. Cesar Milstein", (CONICET). El plásmido pS-CAT expresa el minigenoma de TCRV con el gen reportero *cat* (Figura *MM 3*). Los plásmidos pJUNV Z-HA y pTCRV FLAG-NP expresan, respectivamente, la proteína Z de JUNV unida en su extremo carboxi-terminal a la secuencia correspondiente al epítipo de la hemaglutinina de influenza

(HA) (GSYPYDVPDYA) y la proteína NP de TCRV marcada en su extremo amino-terminal con el epítipo FLAG. Los plásmidos pTCRV L, y pJUNV GPC expresan la polimerasa viral L de TCRV y el precursor glicoproteico GPC de JUNV, respectivamente. El plásmido pCMV-T7pol expresa la RNA polimerasa del bacteriofago T7 bajo el control del promotor de citomegalovirus (Radecke *et al.*, 1995). Para desarrollar un sistema que reproduzca el ciclo de replicación completo del virus, los genes que codifican para las proteínas de TCRV y JUNV se clonaron bajo el promotor de la RNA polimerasa de T7 y del *IRES* (sitio interno de entrada al ribosoma) del virus de encefalomiocarditis (EMCV), en el vector de expresión cap-independiente pTM1 (Moss *et al.*, 1990).

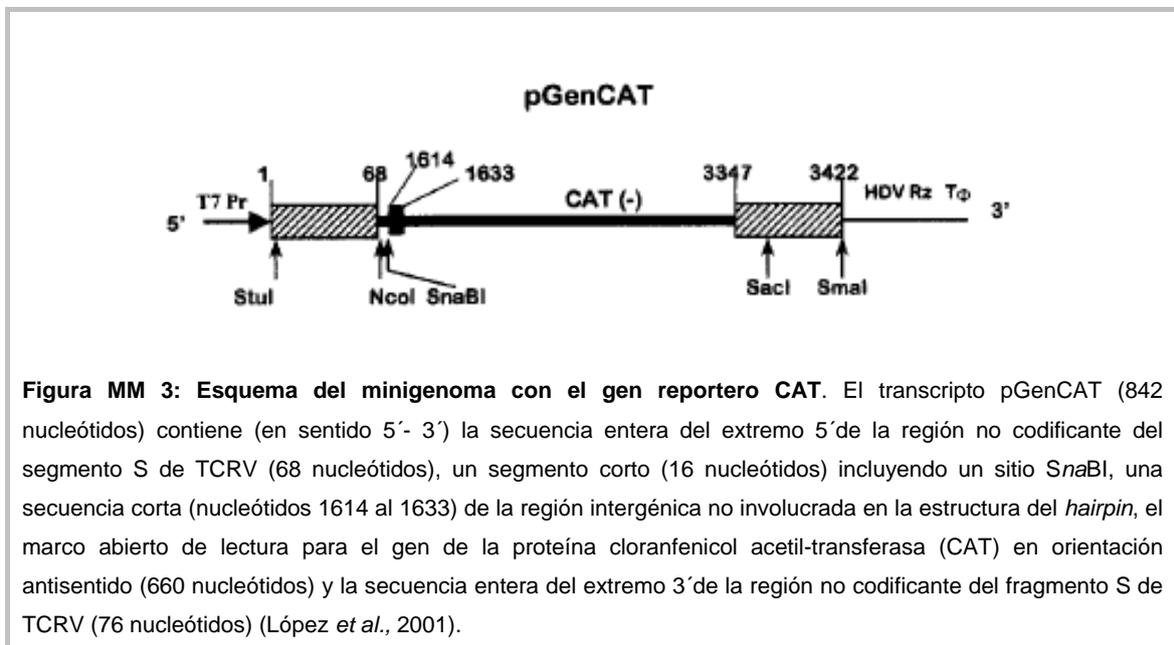


Figura MM 3: Esquema del minigenoma con el gen reportero CAT. El transcripto pGenCAT (842 nucleótidos) contiene (en sentido 5'- 3') la secuencia entera del extremo 5' de la región no codificante del segmento S de TCRV (68 nucleótidos), un segmento corto (16 nucleótidos) incluyendo un sitio *SnaBI*, una secuencia corta (nucleótidos 1614 al 1633) de la región intergénica no involucrada en la estructura del *hairpin*, el marco abierto de lectura para el gen de la proteína cloranfenicol acetil-transferasa (CAT) en orientación antisentido (660 nucleótidos) y la secuencia entera del extremo 3' de la región no codificante del fragmento S de TCRV (76 nucleótidos) (López *et al.*, 2001).

MM 16.2 Efecto de NSC4492 sobre la generación de VLPs producidas por la expresión de únicamente la proteína Z (Z-VLPs)

Células BSR crecidas en microplacas de 12 cavidades fueron transfectadas en G-MEM conteniendo Lipofectamina 2000, con los siguientes plásmidos: 2 µg de pCMV-T7pol y 2 µg de pJUNV Z-HA, por cavidad. El medio de transfección fue removido luego de 4 h de incubación a 37 °C, se lavaron las células dos veces con PBS, se agregó G-MEM suplementado con 2% SFB conteniendo o no 25 µM de NSC4492 y se continuó la incubación a 37 °C. Después de 48 h, se cosecharon los sobrenadantes de las células transfectadas para purificar las VLPs y las células se lisaron con buffer de muestra SDS-PAGE no reductor (Invitrogen – Life Technologies,

EE.UU.). Para purificar las VLPs, los sobrenadantes se clarificaron por centrifugación a $400 \times g$ 10 min, y se concentraron sobre un colchón de sacarosa 20% en buffer TEN (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) por centrifugación a 34000 rpm, 2h en rotor Beckman SW 50.1. El sedimento de VLPs fue resuspendido en buffer de muestra SDS-PAGE en condiciones no reductoras (Invitrogen – Life Technologies, EE.UU.).

Ambas muestras, lisados celulares y VLPs se analizaron por *Western-blot*. Para ello, alícuotas de extractos celulares y VLPs purificadas fueron calentadas en buffer muestra SDS-PAGE no reductor luego de la adición o no de 0,1 % DTT. Luego, las proteínas fueron resueltas por SDS-PAGE 14% y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Pharmacia, EE.UU.). Luego de bloquear toda la noche a 4 °C en PBS con 0,1% de Tween-20 y 5% de leche descremada, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-HA (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) por 2 h a 37 °C. Seguidamente se realizó la incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Jackson Inmuno Research, EE.UU.) y se realizó la detección con el sustrato quimioluminiscente (SuperSignal West Pico, Thermo Scientific), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Finalmente, las membranas fueron expuestas a placas radiográficas y las bandas correspondientes a las proteínas fueron cuantificadas por densitometría. A partir de dichos valores se calculó la liberación (%) como la relación entre la proteína Z detectada en las VLPs y el total de proteína Z (VLPs + lisados celulares) considerando 100% a la liberación en ausencia de compuesto.

MM 16.3 Efecto de NSC4492 sobre la expresión del minigenoma pS-CAT y la infectividad de VLPs completas

Para obtener VLPs completas con capacidad infecciosa se transfectaron células BSR crecidas en microplacas de 12 cavidades en G-MEM con 3 µg del plásmido que expresa el minigenoma pS-CAT, 1 µg de pCMV-T7pol y los plásmidos que expresan las proteínas virales: 3 µg de pTCRV FLAG-NP, 1 µg de pTCRV L, 0,15µg de pJUNV Z-HA y 2 µg de pJUNV GPC por cavidad, utilizando Lipofectamina 2000. A las 4 h post-transfección se removieron los sobrenadantes, se lavaron las células dos veces con PBS, se agregó G-MEM suplementado con 2% SFB conteniendo o no 25 µM de NSC4492 y se continuó la incubación a 37 °C. A las 72 h

post-transfección se cosecharon los sobrenadantes para purificar las VLPs por centrifugación como se describe en *MM 16.2* y las células se procesaron para medir la expresión del gen reportero *cat*. El ensayo de infectividad de las VLPs se realizó inoculando células CV1 crecidas en microplacas de 12 cavidades con la suspensión de VLPs. Luego de 2 h de adsorción a 37 °C se removió el inóculo, se lavaron las células y se las transfeció con 0,5 µg de cada uno de los plásmidos pCMV-T7pol, pTCRV FLAG-NP y pTCRV L, por cavidad, en D-MEM utilizando Lipofectamina 2000. El medio de transfección fue reemplazado por D-MEM 2% SFB a las 4 h post-transfección y luego de 48 h se analizaron las células por su actividad CAT.

La actividad CAT fue ensayada en los extractos de las células BSR transfectadas o de las células CV1 infectadas con las VLPs. Las células fueron lavadas con PBS en hielo, luego con buffer TEN y cosechadas por raspado en TEN seguido de centrifugación. Las células fueron lisadas por tres ciclos de congelado y descongelado en 250 mM Tris-HCl (pH 7,4). El lisado celular fue clarificado por centrifugación (13000 x *g*, 5 min a 4 °C) y se inactivó la actividad CAT endógena por calentamiento 10 min a 65 °C. Luego, 5µl de los extractos celulares se mezclaron con 0,2 µCi de [¹⁴C]-cloranfenicol (57 mCi/mmol; New England Nuclear, EE.UU.), 15 µl de 4mM acetil-coenzima A (Amersham Pharmacia, Inglaterra) ajustado a 250 mM de Tris-HCl (pH 7,4) en un volumen total de 130 µl, e incubado durante 1 h a 37 °C. Los productos del ensayo CAT se analizaron por cromatografía ascendente en capa delgada (TLC) realizada con una mezcla 19:1 cloroformo:metanol, seguida por autorradiografía. La cantidad de extracto celular ensayado se determinó de modo que el ensayo fuera en el rango lineal de la actividad de la enzima (conversión de cloranfenicol no acetilado a monoacetilado menor al 30%). La actividad CAT fue determinada calculando el porcentaje de radiactividad correspondiente a cloranfenicol monoacetilado relativo a la radiactividad total (López *et al.*, 2001).

| Resultados

Capítulo I. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS: CITOTOXICIDAD, ACTIVIDAD ANTIVIRAL Y ACTIVIDAD VIRUCIDA

Inicialmente se realizó la evaluación de las actividades biológicas de las dos series de compuestos mencionados en MM 3: 1) veintidós compuestos provistos por el National Cancer Institute, Frederick, MD, USA, a través de un Acuerdo de Transferencia de Materiales, que de acuerdo a sus estructuras químicas (Figura MM.1) fueron agrupados en tres categorías principales: disulfuros aromáticos, disulfuros de tiuramo y tiosulfonas; 2) trece derivados de acridonas *N*-sustituídas con diferentes grupos químicos, provistos por la Dra. Norma D'Accorso (CIHIDECAR-CONICET, Dpto. Química Orgánica, FCEN, UBA) (Figura MM 2). Simultáneamente se determinó la actividad de RIB como compuesto de referencia anti-arenavirus.

R I 1. Evaluación de la citotoxicidad y actividad inhibitoria contra JUNV

Cada categoría de compuestos fue primero evaluada por su citotoxicidad en células Vero por el método de MTT, determinándose la CC_{50} . A continuación, se ensayó la actividad antiviral por el ensayo de inhibición del rendimiento viral a las 48 h p.i. en rangos de concentraciones menores a las correspondientes CC_{50} , usando como modelo el virus JUNV cepa IV4454. Finalmente, cada compuesto fue también evaluado como agente virucida contra esta cepa de virus, mediante un ensayo de inactivación de viriones. En las Tablas R I 1 y R I 2 se presentan los resultados obtenidos para disulfuros de tiuramo y tiosulfonas y para disulfuros aromáticos, respectivamente, en tanto que la Tabla R I 3 muestra la evaluación de los derivados de acridona.

Los disulfuros de tiuramo, tiosulfonas y disulfuros aromáticos mostraron bajos niveles de citotoxicidad, con valores de CC_{50} superiores a 100 μ M para la mayoría de ellos, con la excepción de dos disulfuros sulfonil-derivados, NSC58950 y NSC83217, cuyas CC_{50} fueron <50 y 51,2 μ M, respectivamente (Tablas R I 1 y R I 2).

Tabla R I 1: Citotoxicidad, actividad antiviral y actividad virucida de disulfuros de tiuramo y tiosulfonas

Compuesto	CC₅₀ [μM]^a	CE₅₀ [μM]^b	CI₅₀ [μM]^c
Disulfuros de tiuramo			
NSC1339	>1000	>200	70,1 ± 1,4
NSC5239	400,0 ± 0,2	18,5 ± 1,0	12,2 ± 0,4
NSC14560	475,2 ± 0,2	8,5 ± 0,2	27,6 ± 0,8
NSC27320	407,2 ± 0,3	>200	38,0 ± 0,9
NSC93057	761,0 ± 0,4	>200	127,7 ± 2,4
NSC93058	>1000	>200	121,1 ± 2,0
NSC317926	528,4 ± 0,1	>200	101,9 ± 2,4
NSC402561	989,2 ± 0,7	>200	17,9 ± 0,4
Tiosulfonas			
NSC76302	>1000	181,5 ± 4,6	>100
NSC112801	297,0 ± 0,1	>200	>100
NSC342015	>1000	>200	15,3 ± 0,5
RIB	>400	18,5 ± 1,7	>100

CC₅₀: concentración citotóxica 50%, determinada en células Vero, luego de 48 h de incubación con cada compuesto, mediante el método del MTT. **CE₅₀**: concentración efectiva 50%, determinada mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral de JUNV, en células Vero a las 48 h de infección. **CI₅₀**: concentración inactivante 50%, determinada mediante inactivación de una suspensión de JUNV a 37 °C durante 1,5 h. Los valores corresponden a la media de dos determinaciones independientes ± DE.

La mayoría de los disulfuros derivados de tiuramo, seis compuestos de un total de ocho, fueron inactivos en el ensayo de actividad antiviral hasta 200 μM y exhibieron un reducido o moderado efecto inactivante (CI₅₀ en el rango de 17,9-127,7 μM) (Tabla R I 1). Solamente dos compuestos de tiuramo mostraron actividad antiviral significativa, NSC14560 y NSC5239 con valores de CE₅₀ de 8,5 y 18,5 μM, respectivamente. Estos dos compuestos también mostraron propiedades inactivantes, pero con diferente eficacia. Para NSC5239, los valores de CE₅₀ y CI₅₀ fueron del mismo orden, 18,5 y 12,2 μM, respectivamente, sugiriendo que la acción antiviral observada en células Vero podría ser debido a la inactivación directa del virus liberado. Por el contrario, el valor de CI₅₀ de NSC14560 excedió más de tres veces el de CE₅₀ (27,6 μM vs. 8,5 μM, respectivamente), permitiendo concluir que este disulfuro puede ser considerado un auténtico agente antiviral con habilidad para interferir con algún evento intracelular en el ciclo de multiplicación de JUNV en células

Vero. Por otra parte, es notable que la eficacia antiviral y la selectividad de NSC14560 contra JUNV en células Vero fuera mayor que RIB, compuesto de referencia por ser el único en uso clínico para arenavirus (Tabla *R / 1*). El índice de selectividad (IS), calculado como la relación entre la citotoxicidad (CC_{50}) y actividad antiviral (CE_{50}), fue 55,9 para NSC14560 mientras que el IS de RIB fue 21,6. Incluso la concentración efectiva 90% (CE_{90} , concentración requerida para reducir el rendimiento de JUNV en un 90%) fue 23,02 μM , un valor veinte veces menor que la CC_{50} de NSC14560 y cuatro veces menor que la CE_{90} correspondiente a RIB (96,7 μM).

En cuanto a las tiosulfonas, los derivados NSC76302 y NSC112801 fueron inactivos o mostraron actividad inhibitoria muy reducida en ambos ensayos antiviral y virucida (Tabla *R / 1*). La tiosulfona aromática NSC342015 también careció de actividad antiviral pero exhibió un moderado efecto inactivante contra los viriones de JUNV, con una CI_{50} de 15,3 μM .

Por otro lado, el grupo de disulfuros aromáticos estudiados incluyó derivados con sustituyentes diversos y presentó los inhibidores más eficaces de la infectividad de JUNV. De un total de once disulfuros aromáticos, solamente tres compuestos (NSC38069, NSC238936 y NSC35825) fueron totalmente inactivos careciendo de propiedades antivirales o inactivantes (Tabla *R / 2*). Seis compuestos exhibieron simultáneamente una moderada actividad antiviral y virucida. Finalmente, dos compuestos, el disulfuro carboxamida-derivado NSC4492 y el animo-nitro-derivado NSC71033 mostraron una moderada actividad antiviral, con valores de CE_{50} en el rango de 27,7-32,4 μM , pero un muy potente efecto virucida, con valores de CI_{50} de 0,2 y 0,5 μM para NSC4492 y NSC71033, respectivamente.

A partir de los datos presentados en la Tabla *R / 2*, puede verse que la relación entre CE_{50}/CI_{50} , es decir, la relación entre la actividad antiviral y la virucida, para ambos compuestos NSC71033 y NSC4492 es de 55,4 y 162,0, respectivamente, valores excepcionalmente altos que son indicativos de la eficacia de ambas sustancias para inactivar la infectividad de los viriones de JUNV en comparación con sus efectos en la multiplicación intracelular del virus. Las propiedades inactivantes de ambas drogas contra JUNV no se debieron a efectos citotóxicos, ya que la relación CC_{50}/CI_{50} fue 320 y 740 para NSC71033 y NSC4492, respectivamente.

Tabla R I 2: Citotoxicidad, actividad antiviral y actividad virucida de disulfuros aromáticos

Compuesto	CC ₅₀ [μM]	CE ₅₀ [μM]	CI ₅₀ [μM]
Disulfuros aromáticos carboxil/carboxamida-derivados			
NSC211	>1000	103,4 ± 3,8	22,7 ± 0,5
NSC4492	148,0 ± 0,1	32,4 ± 0,9	0,2 ± 0,006
NSC38069	>1000	>250	>100
Disulfuros aromáticos sulfonio-derivados			
NSC58950	<50	10,9 ± 0,3	21,0 ± 0,4
NSC83217	51,2 ± 0,0	20,2 ± 0,5	16,2 ± 0,4
NSC255089	>1000	133,4 ± 3,7	17,7 ± 0,3
Disulfuros aromáticos sustituidos con grupos halogenados			
NSC238936	387,6 ± 0,3	>200	>100
NSC314654	400,0 ± 0,4	41,3 ± 1,2	9,4 ± 0,3
Disulfuros aromáticos misceláneos			
NSC35825	172,0 ± 0,2	>100	>100
NSC71033	160,2 ± 0,2	27,7 ± 1,0	0,5 ± 0,02
NSC327174	966,0 ± 0,1	89,7 ± 2,3	24,6 ± 0,6

CC₅₀: concentración citotóxica 50%, determinada en células Vero, luego de 48 h de incubación con cada compuesto, mediante el método del MTT. **CE₅₀**: concentración efectiva 50%, determinada mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral de JUNV, en células Vero a las 48 h de infección. **CI₅₀**: concentración inactivante 50%, determinada mediante inactivación de una suspensión de JUNV a 37 °C durante 1,5 h. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes ± DE.

Por su parte, las acridonas *N*-sustituidas presentaron un espectro muy amplio de capacidad citotóxica, con valores de CC₅₀ entre 74,0 y > 1000 μM (Tabla R I 3). Ninguno de estos compuestos mostró actividad inactivante contra JUNV hasta la máxima concentración ensayada, de acuerdo a los valores de CC₅₀, en tanto que su actividad antiviral determinada por inhibición del rendimiento fue variable como se observa en la Tabla R I 3.

El grupo de 10-alil-9(10*H*)-acridonas (**3a-3g**) incluyó a los compuestos con acción antiviral más efectivos y selectivos contra JUNV. Cinco de estos derivados no ejercieron ningún efecto citotóxico sobre las células Vero hasta la máxima concentración ensayada (1000 μM). Por otro lado, los compuestos **3f** y **3c** exhibieron el mayor efecto inhibitorio contra JUNV con valores de CE₅₀ de 4,7 y 5,5 μM, respectivamente, y, como ambas acridonas carecieron de toxicidad en células no

infectadas, el IS fue >212,8 y >181,8, respectivamente. Más aún, tanto **3f** como **3c** mostraron mayor actividad y selectividad que el compuesto de referencia RIB (Tabla R I 3). El compuesto **3e** también mostró un interesante nivel de actividad contra JUNV, exhibiendo una CE₅₀ de 7,3 µM, sin embargo, debido a su mayor toxicidad, el IS fue solamente 14,9. El resto de las 10-alil-9(10*H*)-acridonas, **3a**, **3b** y **3d**, fueron inactivas o mostraron muy poco efecto inhibitorio contra JUNV. Las acridonas con otras N-sustituciones (compuestos **4**, **5** y **6**) mostraron un gran nivel de toxicidad para las células Vero junto con una débil o nula actividad anti-JUNV.

Tabla R I 3: Citotoxicidad y actividad antiviral de derivados de acridona

Compuesto	CC ₅₀ [µM]	CE ₅₀ [µM]	IS
3a	112,4 ± 2,2	34,2 ± 1,9	3,3
3b	> 1000	> 100	I
3c	> 1000	5,5 ± 0,5	> 181,8
3d	> 1000	44,2 ± 0,9	> 22,7
3e	109,0 ± 5,3	7,3 ± 0,2	14,9
3f	> 1000	4,7 ± 0,2	> 212,8
3g	> 1000	> 100	I
4a	87,6 ± 0,8	33,4 ± 2,9	2,6
5c	541,6 ± 7,0	> 100	I
6a	165,5 ± 2,7	43,1 ± 3,5	3,8
6c	70,2 ± 4,8	> 50	I
6e	276,2 ± 6,8	53,3 ± 0,6	5,2
6f	74,0 ± 0,9	> 50	I
RIB	>400	18,5 ± 1,7	>21,6

CC₅₀: concentración citotóxica 50%, determinada en células Vero, luego de 48 h de incubación con cada compuesto, mediante el método del MTT. CE₅₀: concentración efectiva 50%, determinada mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral de JUNV, en células Vero a las 48 h de infección. IS: índice de selectividad, relación entre CC₅₀/CE₅₀. I: inactivo. Los valores corresponden a la media de dos determinaciones independientes ± DE.

A partir de esta evaluación inicial de las actividades citotóxicas e inhibitorias de las dos series de compuestos, se seleccionaron los más efectivos de cada una de ellas para su mejor caracterización: 1) el disulfuro de tiuramo NSC14560 como agente antiviral y el disulfuro aromático NSC4492 como agente virucida dentro de la primera

clase de compuestos; 2) la 10-alil-9(10*H*)-acridonas **3f** como agente antiviral entre los derivados de acridonas.

R I 2. Actividad inhibitoria contra arenavirus del Viejo y Nuevo Mundo

Habida cuenta de la muy selectiva acción inhibitoria contra JUNV cepa IV4454 mostrada por los compuestos seleccionados, se decidió evaluar su espectro de actividad contra otros virus de la familia *Arenaviridae*. Los virus ensayados fueron otra cepa de JUNV, la cepa atenuada XJCI3 obtenida por pasajes seriados de la cepa prototipo XJ (de Guerrero *et al.*, 1969); otro arenavirus del Nuevo Mundo, el virus TCRV; y el virus LCMV, arenavirus del Viejo Mundo y prototipo de la familia *Arenaviridae*. Se incluyó la cepa IV4454 previamente probada como referencia.

Como se observa en la Figura R I 1, el comportamiento del disulfuro de tiuramo fue un poco variable entre los diferentes arenavirus, con curvas que presentaron perfiles similares de dependencia con la dosis pero leves variaciones en los porcentajes de inhibición producidos. Sin embargo, la extrapolación de las CE_{50} s a partir de los datos de la Figura R I 1 muestra la sensibilidad de todos los virus probados con valores de $18,3 \pm 0,7$, $11,9 \pm 0,2$ y $15,8 \pm 0,4$ μ M para JUNV XJCI3, TCRV y LCMV, respectivamente.

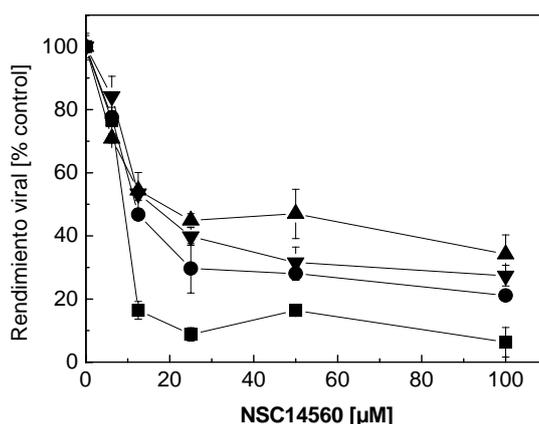
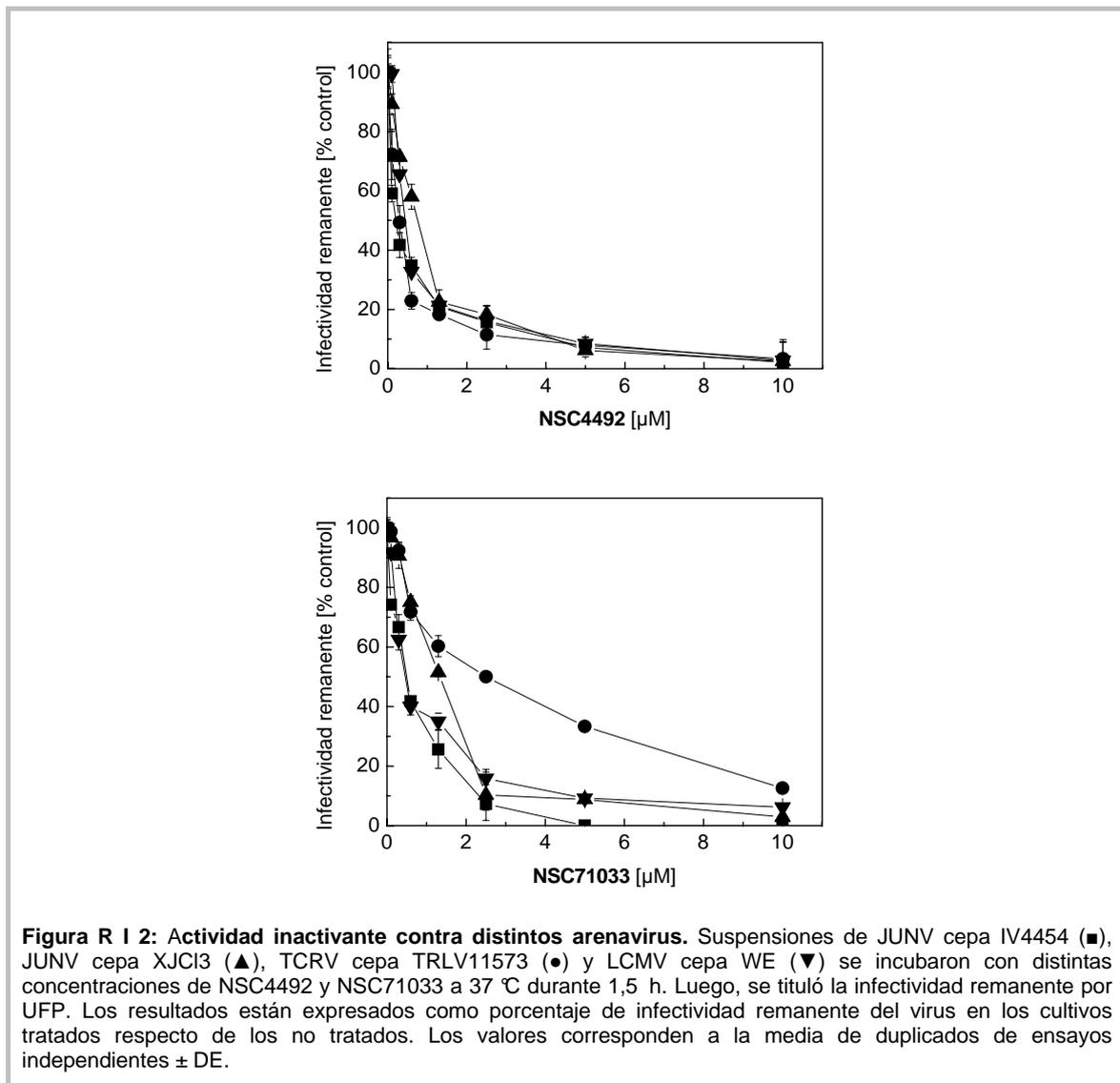


Figura R I 1: Actividad inhibitoria contra distintos arenavirus. Células Vero fueron infectadas (m.i. 0,1) con JUNV cepa IV4454 (■), JUNV cepa XJCI3 (▲), TCRV cepa TRLV11573 (●) y LCMV cepa WE (▼) y luego de 1 h de adsorción a 37 °C el inóculo fue removido y las células cubiertas con MM conteniendo distintas concentraciones de NSC14560. El rendimiento viral fue medido a las 48 h p.i. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes \pm DE.

Igualmente que para el disulfuro de tiuramo con actividad antiviral, se evaluó la capacidad inactivante de los compuestos con actividad virucida frente a miembros del Nuevo y del Viejo Mundo de la familia *Arenaviridae*. Ambos compuestos NSC4492 y NSC71033 tuvieron un fuerte efecto inactivante contra todos los virus ensayados (Figura R I 2).



El disulfuro NSC4492 fue el más efectivo con valores de CI_{50} , extrapolados a partir de la Figura R I 2, en el rango 0,2-0,7 μM , en tanto que para NSC71033 la eficiencia inactivante fue similar excepto para TCRV, cuya CI_{50} fue cinco veces mayor que para los restantes arenavirus (Tabla R I 4).

Tabla R I 4: Eficiencia virucida contra arnavirus del Nuevo y Viejo Mundo

Virus	CI ₅₀ [μM]	
	NSC4492	NSC71033
JUNV IV4454	0,2 ± 0,006	0,5 ± 0,02
JUNV XJCI3	0,7 ± 0,01	0,9 ± 0,03
TCRV	0,2 ± 0,04	2,5 ± 0,3
LCMV	0,4 ± 0,01	0,6 ± 0,01

CI₅₀: concentración inactivante 50%, determinada mediante inactivación a 37 °C durante 1,5 h. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes ± DE.

En cuanto a las acridonas **3c** y **3f**, como muestra la Tabla R I 5 todos los arnavirus ensayados fueron también susceptibles a ambos compuestos pero con ciertas variaciones respecto de la cepa IV4454. La CE₅₀ de **3c** contra cada virus varió entre 5,5 y 29,4 μM, mientras la CE₅₀ de **3f** fue menor a 10 μM, excepto contra TCRV que resultó ser de 13,4 μM.

Tabla R I 5: Actividad inhibitoria de derivados de acridona contra arnavirus del Nuevo y Viejo Mundo

Virus	CE ₅₀ [μM]	
	3c	3f
JUNV IV4454	5,5 ± 0,5	4,7 ± 0,5
JUNV XJCI3	20,5 ± 0,8	4,5 ± 0,2
TCRV	27,2 ± 0,9	13,4 ± 0,9
LCMV	29,4 ± 1,7	7,3 ± 1,2

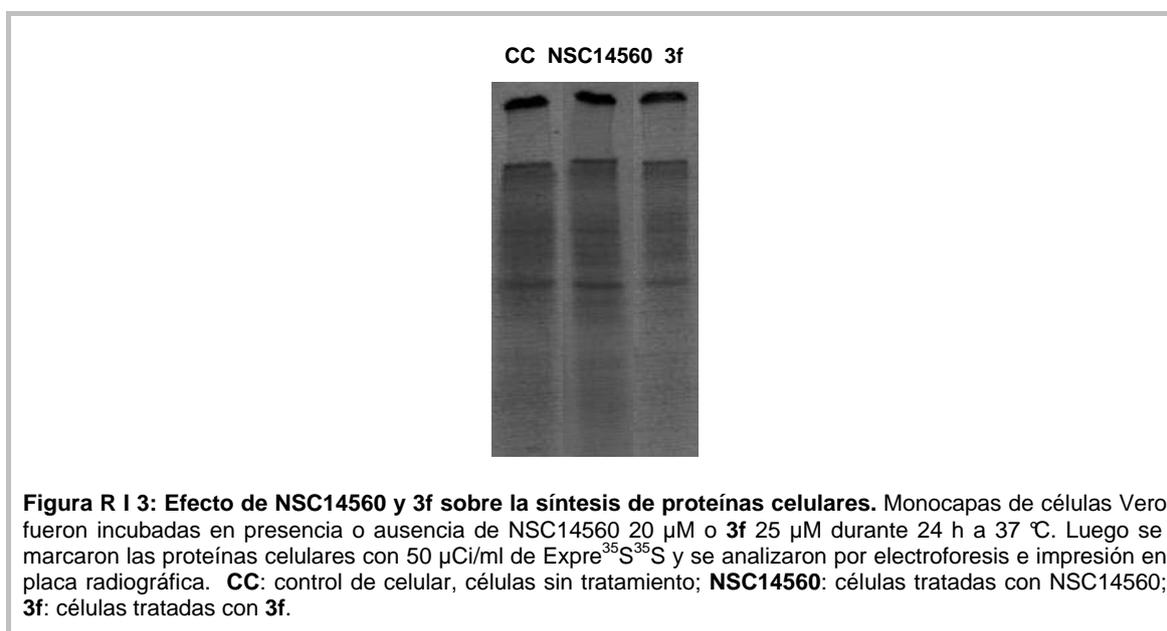
CE₅₀: concentración efectiva 50%, determinada mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral de JUNV, en células Vero a las 48 h de infección. IS: índice de selectividad, relación entre CC₅₀/CE₅₀. Los valores corresponden a la media de dos determinaciones independientes ± DE.

R I 3. Evaluación de la citotoxicidad de los compuestos con actividad antiviral por otras metodologías

R I 3.1. Efecto de los compuestos sobre la síntesis de proteínas celulares

Para evaluar el efecto de los compuestos antivirales seleccionados sobre el metabolismo de las células Vero, se midió el nivel de síntesis de proteínas celulares

en monocapas confluentes luego de 24 h de incubación en presencia de NSC14560 y **3f**, utilizando las concentraciones de los compuestos elegidas para la realización de los posteriores experimentos de caracterización de la actividad antiviral. Para ello, se marcaron las proteínas celulares con ^{35}S -metionina y ^{35}S -cisteína (Expre $^{35}\text{S}^{35}\text{S}$) durante 3 h a 37 °C en presencia y ausencia de compuesto y se analizaron por electroforesis. Como se muestra en la Figura R I 3, no se encontraron variaciones en la síntesis de proteínas celulares en las muestras tratadas con NSC14560 y sólo se observó una muy leve disminución en la intensidad de las bandas correspondientes a las proteínas celulares en los cultivos tratados con **3f**.



R I 3.2. Efecto de los compuestos sobre la proliferación de células Vero

La capacidad antiproliferativa de los compuestos antivirales seleccionados se determinó utilizando el método del MTT; para ello luego de 2,5 h de la siembra celular se agregaron distintas concentraciones de compuesto en un rango que incluye la concentración elegida para los ensayos antivirales y se realizó la medición de la viabilidad celular mediante el método colorimétrico a las 48 h de incubación.

Como puede observarse en la Figura R I 4, los compuestos produjeron una disminución en la viabilidad celular de las células en crecimiento en forma dependiente de la dosis. En todas las concentraciones ensayadas NSC14560 mostró un mayor efecto antiproliferativo, obteniéndose una CC_{50} de 87,4 μM , mientras que la

actividad de **3f** fue mucho menor ya que produjo 35,5% de inhibición de la viabilidad celular a la máxima concentración evaluada de 100 μM , por lo que la CC_{50} resultó $>100 \mu\text{M}$. Se observó una disminución mayor en la viabilidad celular en células en crecimiento en comparación con células estacionarias (Tablas *R I 1* y *R I 3*), en las que se determinó la actividad antiviral y el IS, pero aún los valores de CC_{50} en células en crecimiento excedieron a las respectivas CE_{50} .

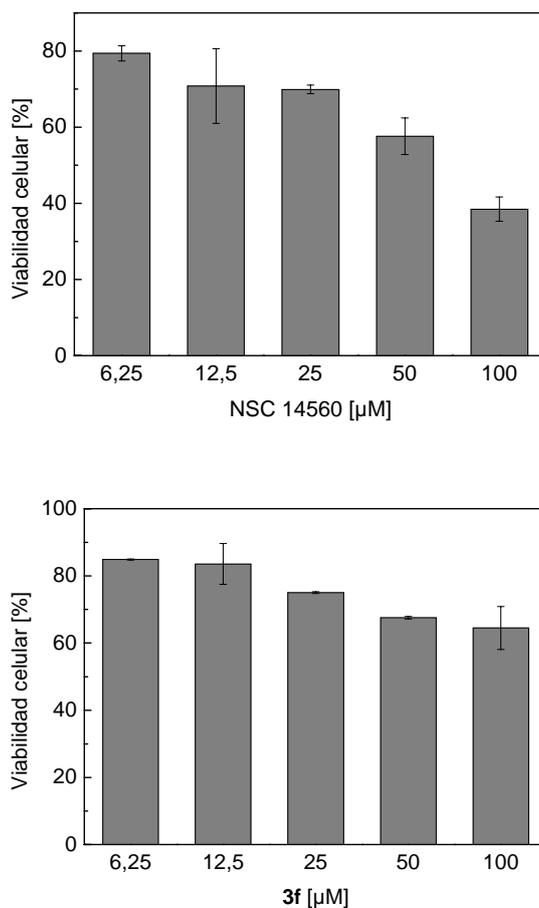


Figura R I 4: Efecto de los compuestos sobre la proliferación de células Vero. Las células fueron sembradas en microplacas de 96 pocillos y luego de 2,5 h de incubación a 37 °C se agregaron distintas concentraciones de los compuestos NSC14560 y **3f**. Luego de 48 h de incubación a 37 °C, se determinó la viabilidad celular utilizando el método del MTT. Los resultados están expresados como porcentaje de viabilidad celular en los cultivos tratados con compuesto respecto a los cultivos no tratados. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes \pm DE.

R I 4. Conclusiones

En esta sección se presentó la evaluación inicial de la actividad biológica de los disulfuros aromáticos, disulfuros de tioramo, tiosulfonas y acridonas,

encontrándose compuestos con una muy selectiva actividad antiviral y potente efecto virucida contra JUNV IV4454 y otros arenavirus. En base a los resultados obtenidos se seleccionaron los compuestos más activos para realizar la caracterización de sus propiedades antiarenavirus: el inactivante NSC4492 (disulfuro aromático) y los antivirales NSC14560 (disulfuro de tiuramo) y **3f** (acridona).

Capítulo II. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD VIRUCIDA DEL DISULFURO AROMÁTICO NSC4492

El disulfuro aromático NSC4492 fue el compuesto elegido por su potencia inhibitoria para caracterizar la acción virucida de esta clase de compuestos.

R II 1. Efecto de las condiciones de incubación sobre la actividad inactivante

Además de la concentración del compuesto (Figura R I 2), se analizó el efecto del tiempo y la temperatura de incubación sobre la acción inactivante de NSC4492 contra JUNV.

Después de 15 min de estar el virus en contacto con el compuesto ya se observa una pérdida significativa de infectividad (Figura R II 1). NSC4492 se mostró nuevamente como un agente virucida muy efectivo, capaz de producir la inactivación del 95% de las partículas virales en 30 min y la inactivación completa a los 45 min.

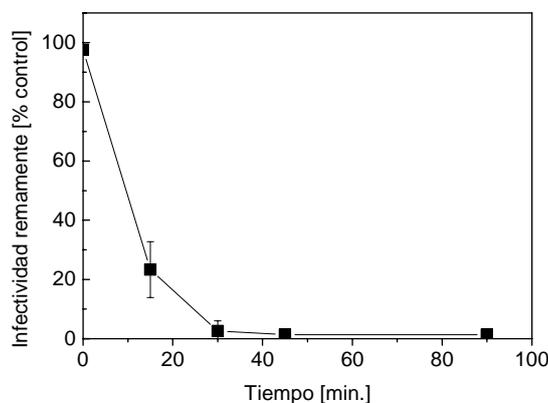


Figura R II 1: Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad inactivante. Suspensiones virales conteniendo 1×10^6 UFP de JUNV cepa IV4454 fueron incubadas con NSC4492 $10 \mu\text{M}$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. A diferentes tiempos se determinó el virus infeccioso remanente mediante plaqueo en células Vero. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes \pm DE.

El efecto de la temperatura de incubación también fue determinado mediante ensayos de inactivación viral a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y $25 \text{ }^\circ\text{C}$, en comparación con $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Se comprobó que la interacción entre NSC4492 y los viriones es dependiente de la temperatura, dado que a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ el compuesto ejerció un efecto inactivante muy débil, que se incrementó a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y fue máximo a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura R II 2), resultado que

indica el requerimiento de energía para lograr la mayor estabilidad de la unión virus-compuesto.

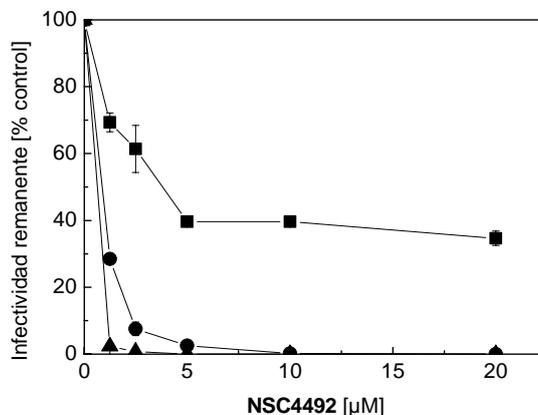


Figura R II 2: Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad inactivante. Suspensiones virales conteniendo 1×10^6 UFP de JUNV cepa IV4454 fueron incubadas con distintas concentraciones de NSC4492 a 4 °C (■), 25 °C (●) y a 37 °C (▲) durante 1,5 h. Luego el virus infeccioso se determinó por plaqueo. Los resultados están expresados como porcentaje de infectividad remanente del virus en los cultivos tratados respecto de los no tratados (CV). Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes \pm DE.

R II 2. Estudio del blanco de acción

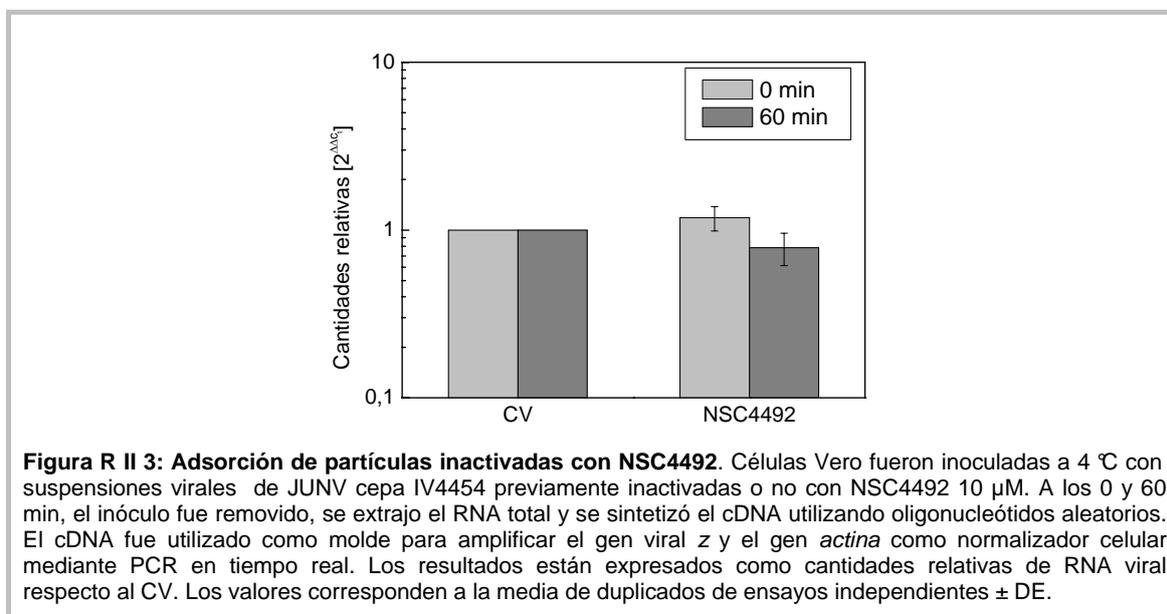
Dada la reportada reactividad de esta clase de compuestos con los motivos *zinc-finger* de proteínas retrovirales y nuestros estudios previos en el tema, la hipótesis de partida fue que el blanco de ataque del compuesto NSC4492 que produciría la inactivación de JUNV podrían ser las proteínas virales portadoras de motivos *zinc-finger*: complejo GP, Z y NP. Para tratar de comprobarlo se decidió analizar la posible interacción de este compuesto con las distintas proteínas mediante distintos abordajes experimentales, encarándose estudios que permitan evidenciar efectos de NSC4492 sobre los procesos en los que interviene cada proteína.

R II 2.1. Efecto de NSC4492 sobre el complejo GP

A fin de analizar la posibilidad de un efecto de la inactivación viral producida por NSC4492 sobre las proteínas del complejo GP, se decidió estudiar si los viriones inactivados con NSC4492 tienen afectada la capacidad de unión a la célula hospedadora mediante la medición de la adsorción de partículas inactivadas.

Para ello, las células Vero fueron infectadas a 4 °C con viriones previamente inactivados o no, y a distintos tiempos (0 y 60 min) se quitó el inóculo y se lisaron las células para la extracción del RNA total. Se determinó la cantidad de RNA de JUNV unido a la célula mediante un ensayo de RT-PCR en tiempo real.

Como puede observarse en la Figura R II 3, no se encontraron variaciones que excedan los DE de las mediciones en las cantidades de RNA viral en los cultivos control y en los cultivos infectados con partículas inactivadas, con lo cual, la capacidad de unión de dichas partículas a las células no se vio modificada por el tratamiento con el compuesto inactivante. Este resultado sugiere que la funcionalidad biológica del complejo GP, no estaría afectada en las partículas inactivadas por NSC4492.



R II 2.2. Efecto de NSC4492 sobre la proteína Z

Para estudiar el posible efecto de NSC4492 sobre la proteína Z utilizamos la técnica de co-transfección de los plásmidos que codifican para la proteína Z de JUNV ligada a la HA de virus Influenza (pJUNV-Z-HA), y la RNA polimerasa del bacteriófago T7 bajo el promotor de CMV (pCMV-T7pol), en colaboración con la Dra. Nora López (Instituto Milstein, CONICET). La proteína Z se comporta como una proteína de matriz viral, siendo la que dirige el proceso de autoensamblado para la formación de VLPs, así como la brotación al medio extracelular. Por lo tanto, en condiciones normales el resultado de la transfección de Z en las células es la formación de VLPs conformadas

por Z (Z-VLPs) cuya presencia se detecta en el sobrenadante luego de haberse ensamblado en el interior de la célula. Aquí estudiamos si la presencia de NSC4492 ejercía algún efecto sobre Z evaluando el ensamblaje y/o la formación de estas VLPs en presencia de compuesto.

Como se observa en la Figura R II 4, en presencia de NSC4492 no se afectó la formación de Z-VLPs detectadas en el extracelular mediante *Western-blot* contra la proteína Z. El porcentaje de liberación de esta proteína, medido como la cantidad de Z formando las Z-VLPs respecto de la cantidad total de Z total (Z-VLP + Z intracelular), fue similar en presencia o ausencia del compuesto. Sin embargo, se observa que hay una alteración en el patrón electroforético de la proteína Z por el tratamiento con NSC4492, con una importante formación de multímeros que se detectan en condiciones no reductoras. Principalmente estos agregados se observan en las Z-VLPs (comparar líneas 3 con 4 y 7 con 8), en donde la banda correspondiente al monómero de Z disminuye y se incrementa la banda correspondiente a los multímeros de mayor peso molecular.

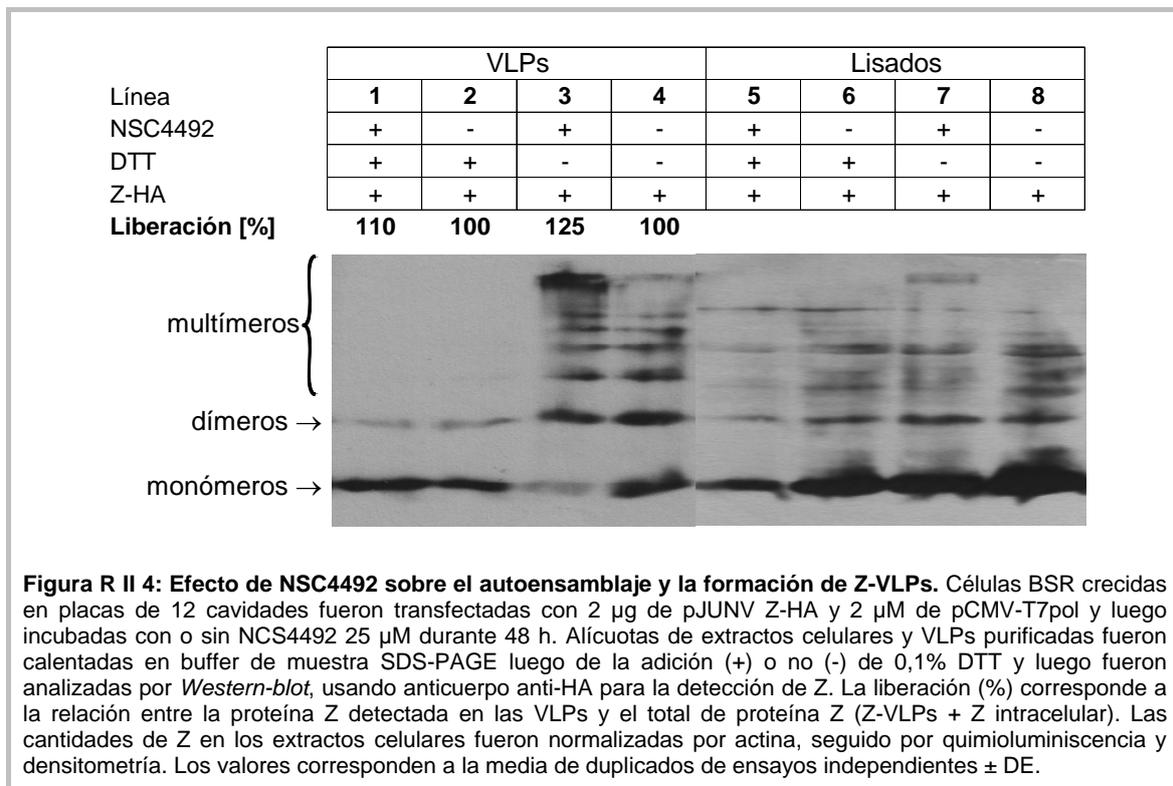


Figura R II 4: Efecto de NSC4492 sobre el autoensamblaje y la formación de Z-VLPs. Células BSR crecidas en placas de 12 cavidades fueron transfectadas con 2 µg de pJUNV Z-HA y 2 µM de pCMV-T7pol y luego incubadas con o sin NSC4492 25 µM durante 48 h. Alícuotas de extractos celulares y VLPs purificadas fueron calentadas en buffer de muestra SDS-PAGE luego de la adición (+) o no (-) de 0,1% DTT y luego fueron analizadas por *Western-blot*, usando anticuerpo anti-HA para la detección de Z. La liberación (%) corresponde a la relación entre la proteína Z detectada en las VLPs y el total de proteína Z (Z-VLPs + Z intracelular). Las cantidades de Z en los extractos celulares fueron normalizadas por actina, seguido por quimioluminiscencia y densitometría. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes ± DE.

Este cambio conformacional en la proteína apoya una posible interacción del disulfuro con Z, que no afecta el proceso de liberación (Z-VLPs), y nos indicaría que Z es un posible blanco de este compuesto en el virión.

R II 2.3. Efecto de NSC4492 sobre la RNP

También en colaboración con la Dra. Nora López, se utilizó un sistema de minigenoma para estudiar el efecto del compuesto sobre la RNP viral, complejo proteico que involucra a NP y a L y que es además regulado por la proteína Z. Se evaluó la expresión del minigenoma pS-CAT como gen reportero en conjunto con los plásmidos que expresan las distintas proteínas virales en presencia y ausencia del compuesto. La co-transfección del minigenoma con los plásmidos que expresan las proteínas virales NP y L permite la transcripción del reportero por la actividad de la enzima viral, y el agregado de los plásmidos que expresan Z y GPC a la mezcla de transfección anterior, permite evaluar además la formación de VLPs completas e infectivas. Se ensayaron dos condiciones experimentales: 1) transfección con pS-CAT y los plásmidos que expresan NP (pTCRV-FLAG-NP) y L (pTCRV-L), ó 2) transfección con pS-CAT y los plásmidos que expresan todas las proteínas virales NP, L, Z (pJUNV-Z-HA) y GPC (pJUNV-GPC), en presencia y ausencia de NSC4492. Estos dos protocolos se ensayaron con el fin de evaluar comparativamente el efecto sobre la transcripción en las condiciones mínimas que permiten la expresión del minigenoma (sistema 1) y en presencia de la expresión de todas las proteínas virales (sistema 2) que permite la formación de VLPs completas e infectivas. A las 72 h post-transfección se cosecharon los sobrenadantes, para purificar las VLPs completas, y se lisaron las células para medir la actividad del gen reportero CAT.

La medición de enzima CAT en los extractos celulares se muestra en la Figura *R II 5* (Transfecciones, líneas 1 a 4). La cuantificación, expresada como % de actividad CAT, se presenta en la parte superior calculada como % de actividad en cada muestra tratada respecto de la correspondiente no tratada, tomada como 100%. Se puede observar una disminución de la señal del gen reportero de CAT en presencia de NSC4492, lo que indicaría una inhibición en la transcripción viral. La inhibición de la expresión del minigenoma se observa en las células transfectadas con el minigenoma y las proteínas virales NP y L, es decir, sin agregar las proteínas virales Z y GPC al sistema (comparar línea 1 con 3, 39,9% en presencia de droga respecto del 100% en ausencia), lo cual indica que la maquinaria de síntesis de RNA viral estaría afectada. Esta inhibición se incrementa cuando además se transfectan Z

y GPC (comparar líneas 2 y 4, 18,6% respecto del 100%). Los resultados observados en la condición control muestran un aumento en la expresión del gen reportero cuando están presentes en el sistema las cuatro proteínas virales (comparar línea 3 con 4), este aumento es esperado para este tipo de sistemas, de acuerdo a los resultados previos de otros autores (Cornu & de la Torre, 2001; Lee *et al.*, 2002; Perez *et al.*, 2004; Casabona *et al.*, 2009).

Con los sobrenadantes obtenidos a las 72 h a partir de cada transfección, se concentraron las VLPs completas por ultracentrifugación y se realizaron infecciones de nuevos cultivos celulares con esas VLPs completas en ausencia y presencia de compuesto. A las 48 h p.i., se midió nuevamente la actividad de CAT en los extractos celulares.

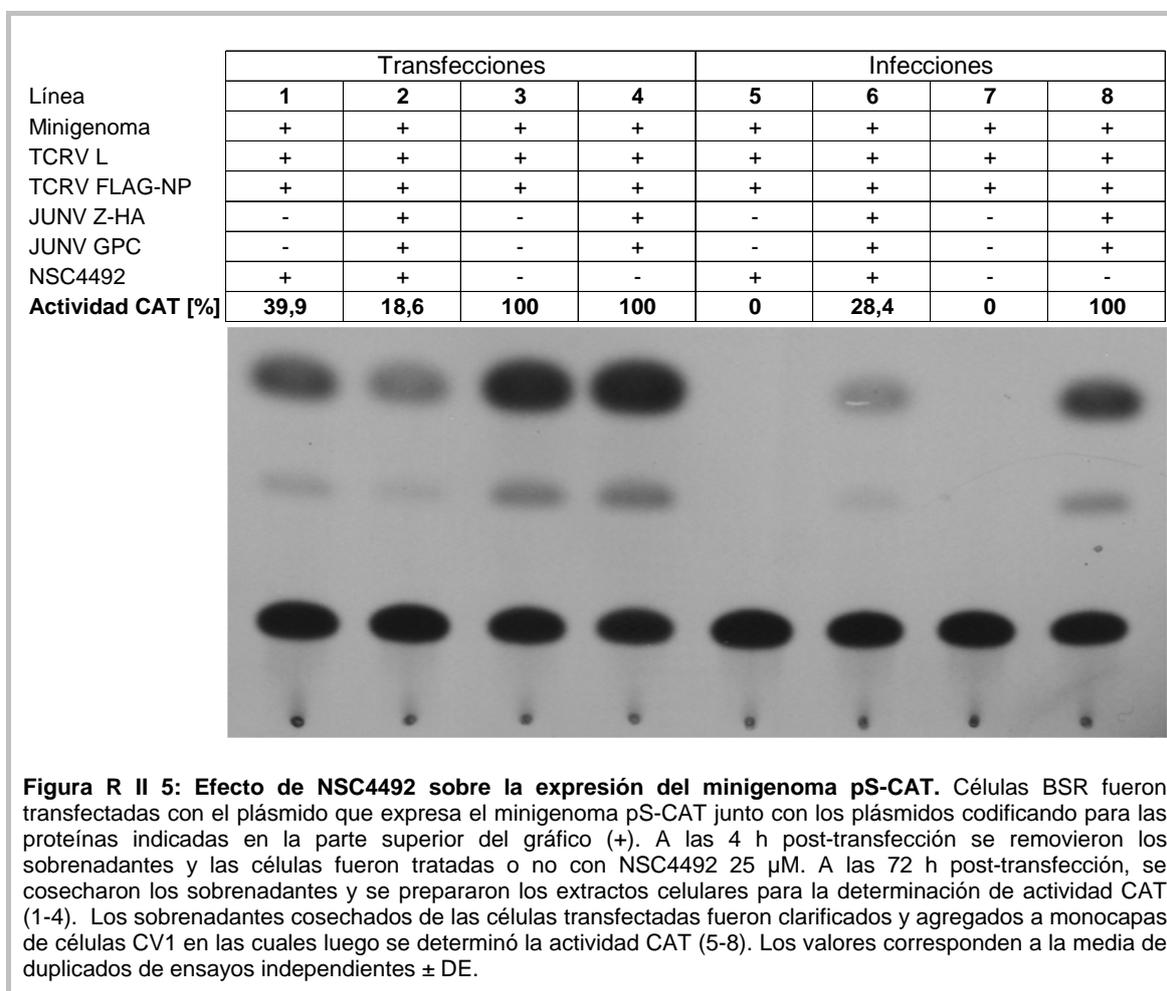


Figura R II 5: Efecto de NSC4492 sobre la expresión del minigenoma pS-CAT. Células BSR fueron transfectadas con el plásmido que expresa el minigenoma pS-CAT junto con los plásmidos codificando para las proteínas indicadas en la parte superior del gráfico (+). A las 4 h post-transfección se removieron los sobrenadantes y las células fueron tratadas o no con NSC4492 25 μ M. A las 72 h post-transfección, se cosecharon los sobrenadantes y se prepararon los extractos celulares para la determinación de actividad CAT (1-4). Los sobrenadantes cosechados de las células transfectadas fueron clarificados y agregados a monocapas de células CV1 en las cuales luego se determinó la actividad CAT (5-8). Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes \pm DE.

Los resultados de las infecciones con VLPs se presentan en la Figura R II 5, líneas 5 a 8. Las líneas 5 y 7 corresponden a controles negativos de la infección, dado que cabe esperar que no se hayan formado VLPs completas infectivas en los sobrenadantes de 1 y 3 de la transfección original sin Z ni GPC y que por lo tanto no

se produzca señal de actividad CAT, tal como se observa. Las líneas 6 y 8 reflejan para las infecciones con VLPs completas infectivas los mismos resultados observados en las transfecciones (líneas 2 y 4). La menor actividad CAT en las células transfectadas y tratadas con NSC4492 (línea 2 respecto de 4) se traduce en una menor actividad en las células infectadas con los sobrenadantes de las correspondientes transfecciones (línea 6 respecto de 8). Esto se debería a la menor cantidad de partículas infectivas producidas en los cultivos tratados respecto de los no tratados, de acuerdo a los valores de actividad CAT.

Estos resultados permiten concluir que NSC4492 produce inhibición de la transcripción del minigenoma pS-CAT. Esta inhibición podría deberse al efecto del compuesto sobre NP ya que se ha descrito en esta proteína la presencia en su extremo C-terminal de un dominio de unión a zinc del tipo CHCC, (Parisi *et al.*, 1996, Tortorici *et al.*, 2001b) (Figura I 6) que sería también blanco de acción del compuesto.

R II 3. Capacidad replicativa de los viriones inactivados con NSC4492

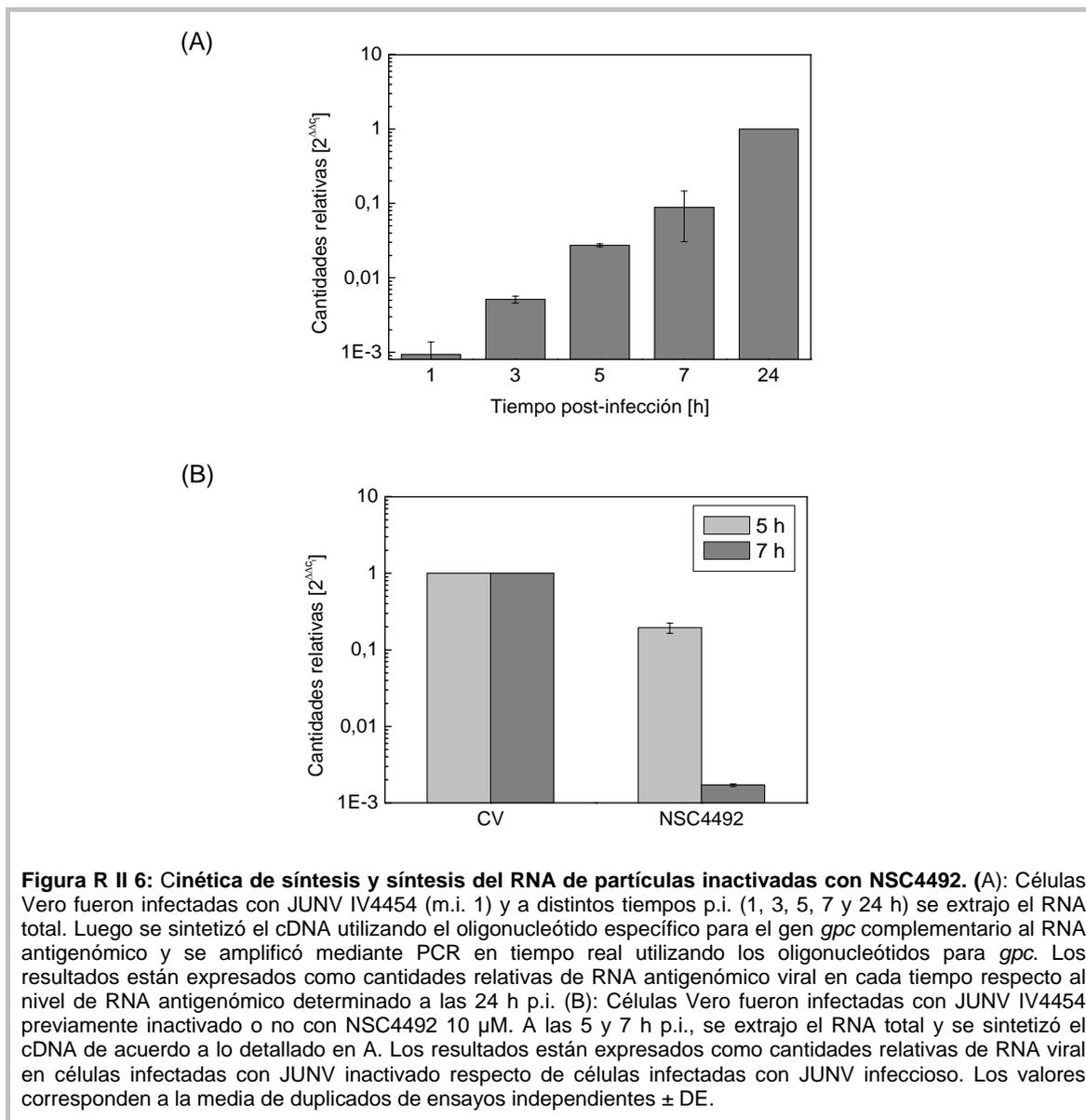
R II 3.1. Síntesis de RNA viral de viriones inactivados con NSC4492

Con el fin de determinar si las partículas inactivadas con NSC4492 son capaces de replicar dentro de la célula hospedadora, se decidió estudiar a continuación la síntesis de RNA viral luego de la infección de células Vero con los viriones inactivados. Para ello primero se determinó la cinética de síntesis de RNA viral en el sistema células Vero-JUNV utilizado para los ensayos antivirales y virucidas a fin de establecer los tiempos iniciales de síntesis y así medir en forma adecuada el efecto de la droga sobre este evento biosintético.

En la Figura R II 6 A se muestra el ensayo de cinética de síntesis de RNA viral, medida por RT-PCR en tiempo real, mostrando el inicio de síntesis detectable a partir de las 3 h y un crecimiento continuado de los niveles de RNA en función del tiempo. Estos resultados concuerdan con estudios que han reportado que el ciclo de multiplicación de JUNV se completa alrededor de las 12 h (Mersich *et al.*, 1981) y el RNA viral se detecta alrededor de las 3-4 h p.i. (Ellenberg *et al.*, 2007).

A partir del estudio cinético, se decidió determinar la capacidad de síntesis de RNA viral de los viriones inactivados a las 5 y 7 h después de la infección de células Vero, en forma comparativa con viriones infectivos. Para ello, se realizó una reacción de RT-PCR utilizando el RNA extraído de células Vero infectadas con JUNV

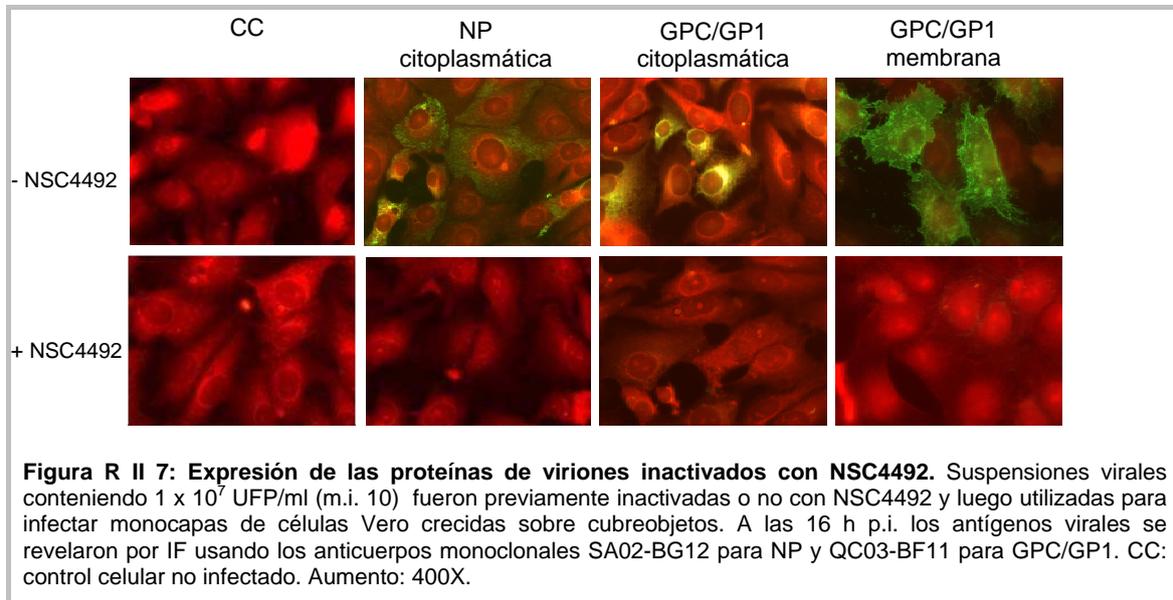
previamente inactivado o no con NSC4492. Se observó una reducción significativa en los niveles de RNA viral tanto a las 5 como a las 7 h p.i. (Figura R II 6 B). El nivel de inhibición a las 7 h p.i., tiempo en donde puede detectarse una mayor cantidad de RNA en las células infectadas, fue de casi 3 log.



R II 3.2. Expresión de antígenos virales de viriones inactivados con NSC4492

La capacidad de las partículas virales inactivadas de expresar sus proteínas fue estudiada por inmunofluorescencia indirecta luego de 16 h de infección (Figura R II 7) empleando una alta m.i.

La inhibición en los niveles de RNA viral observados previamente fue corroborada por la detección nula de los antígenos virales en las células infectadas con los viriones inactivados, lo cual permitiría concluir que las partículas inactivadas son completamente incapaces de replicar dentro de la célula hospedadora.



R II 4. Efecto de NSC4492 sobre otros virus no relacionados

El difuluro NSC4492 ha mostrado efectiva actividad virucida contra JUNV y otros arenavirus, como aquí se muestra, y contra HIV-1 (Rice *et al.*, 1996). Para tratar de establecer si el efecto inactivante de NSC4492 estaba relacionado exclusivamente a la presencia de motivos *zinc-finger* en alguna proteína viral, se ensayó la susceptibilidad a este compuesto de virus de otras familias. Se realizaron ensayos de actividad virucida con HSV-1 cepa KOS, VSV cepa Indiana, virus Polio cepa 3 (PV-3), DENV-2 cepa NCG y virus Sarampión cepa vacunal (MV).

Todos los virus ensayados presentan alguna proteína con motivo *zinc-finger*, a excepción de VSV que carece de estos motivos en sus proteínas. Sin embargo, cabe destacar que sólo la proteína ICP0 de HSV-1 comparte con la proteína Z de JUNV la característica de presentar un motivo de tipo *RING finger* (Moriuchi *et al.*, 1994), ambas con secuencias del tipo CCCHCCCC (Figura R II 8) (Salvato & Shimomaye 1989; Djavani *et al.*, 1997; O'Rourke *et al.*, 1998). Para los restantes virus, las secuencias de unión a zinc corresponden a otros tipos de motivos dentro de los grupos estructurales en que han sido clasificados los motivos *zinc-finger*.

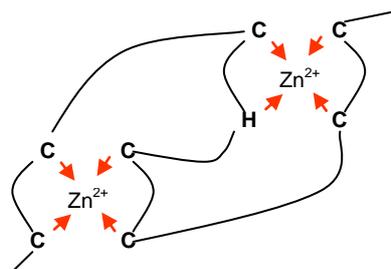


Figura R II 8: Estructura del motivo *RING-finger*. Los 8 residuos con la secuencia CCCHCCCC unen dos átomos de zinc. Las secuencias que contienen este motivo se encuentran superpuestas, siendo el primer, segundo, quinto y sexto residuo el que coordina un átomo de zinc, mientras que el tercer, cuarto, séptimo y octavo residuo, unen el segundo átomo de zinc.

De acuerdo a los valores de CI_{50} presentados en la Tabla R // 1, HSV-1 resultó junto con JUNV el virus más susceptible a la acción de NSC4492. Para los restantes virus, las CI_{50} fueron significativamente más elevadas, con valores 6-8 veces mayores para VSV y MV y más de 150 veces superiores para PV-3 y DENV-2, que mostraron la menor susceptibilidad.

Tabla R II 1: Actividad virucida de los disulfuros frente a otros virus

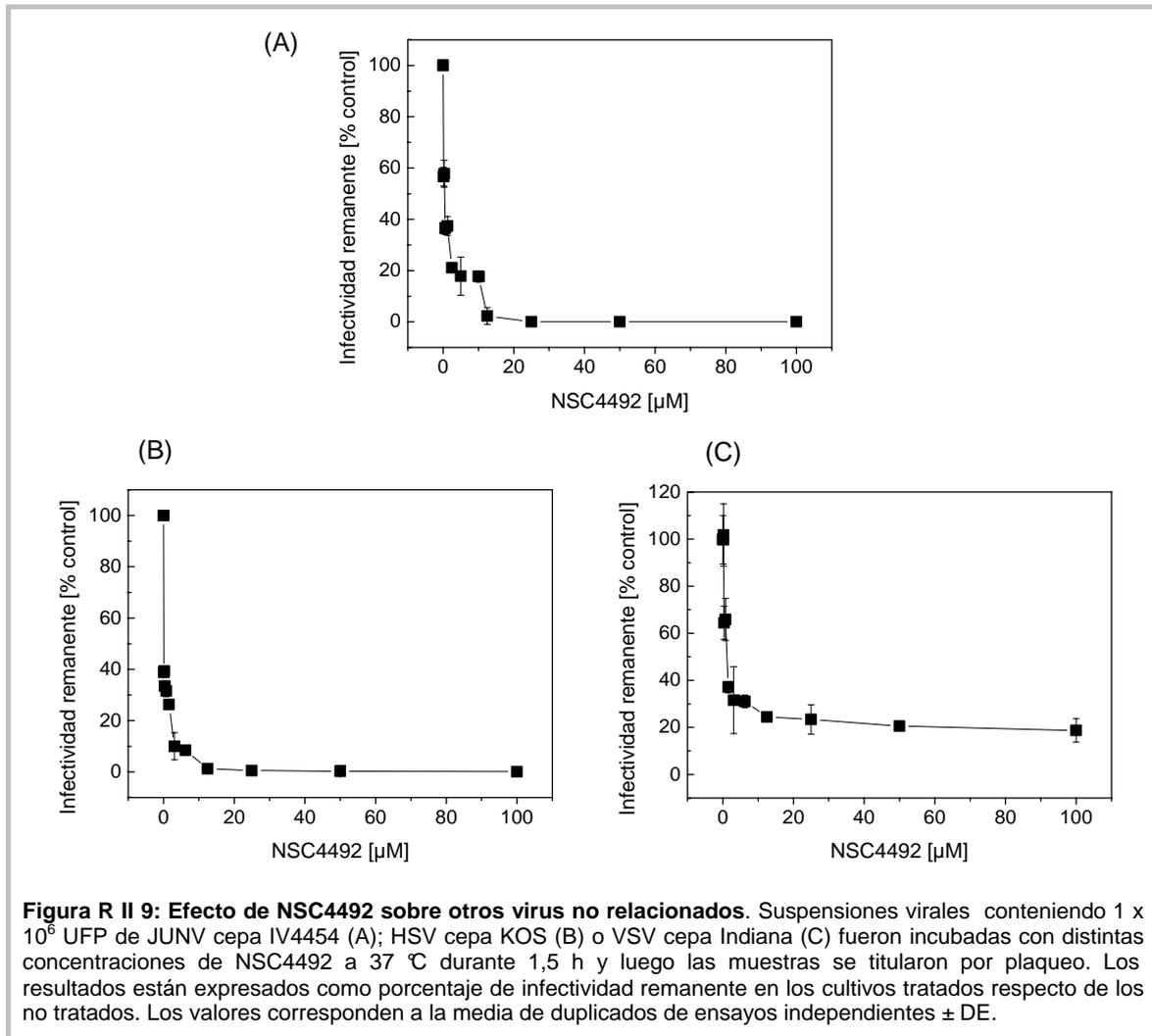
Virus	NSC4492 CI_{50} [μ M]
JUNV IV4454	0,2 \pm 0,006
HSV-1	0,08 \pm 0,001
VSV	1,21 \pm 0,08
DENV-2	94,2 \pm 3,5
PV-3	36,1 \pm 1,5
MV	1,6 \pm 0,1

CI_{50} : concentración inactivante 50%, determinada mediante inactivación a 37 °C durante 1,5 h. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes \pm DE.

Además del valor de CI_{50} extrapolado a partir de los valores de % inactivación en función de la concentración, si se analiza el perfil de los gráficos de respuesta a la dosis, se observa que para JUNV y HSV-1 hay una muy potente inactivación viral en concentraciones por encima de 1,5 μ M, con valores de 90-100% inhibición para JUNV y 90-99,9% inhibición para HSV-1 (Figura R // 9 A y B). Por el contrario, para los restantes virus, como puede observarse para VSV en la Figura R // 9 C, no se supera el 80% de inhibición aún luego de tratar la suspensión viral con 100 μ M y, más aún, en

el rango de concentraciones desde 3 a 100 μM se mantiene un % de infectividad remanente de aproximadamente 20-30%.

Por lo tanto, se puede afirmar que aunque se observa un cierto efecto frente a los distintos virus, la potencia de la actividad virucida de este tipo de agente es fuertemente variable en función del virus.



R II 4. Conclusiones

El compuesto inactivante NSC4492 mostró efectividad contra miembros de la familia, con una cinética de inactivación rápida y dependiente de la temperatura.

Los viriones inactivados con NSC4492 no mostraron alterada su capacidad de unión a las células, lo que indicaría que no hay efectos del compuesto sobre el complejo GP.

El tratamiento con el compuesto virucida no afectó el autoensamblaje y la brotación de Z-VLPs pero sí produjo una alteración en el patrón electroforético de la proteína Z, con una importante formación de multímeros. Asimismo, mediante el empleo de un sistema de genética reversa, se observó una disminución de la señal del gen reportero de CAT en presencia de NSC4492, lo que indicaría también un posible efecto del compuesto sobre la NP.

Se observó una incapacidad de los viriones inactivados de sintetizar el RNA viral con la consecuente pérdida de detección de antígenos virales en células infectadas con estos viriones.

Por último, NSC4492 fue capaz de inactivar viriones de variadas familias con diferente grado de efectividad. HSV-1 fue el más susceptible, con niveles de inhibición y curvas dosis-respuesta similares a los observados con JUNV.

Capítulo III. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL DISULFURO DE TIURAMO NSC14560

R III 1. Parámetros que afectan la actividad antiviral

R III 1.1. Influencia del inóculo viral sobre la actividad antiviral de NSC14560

Para algunos antivirales se registra una fuerte dependencia de su efectividad *in vitro* con la multiplicidad de infección empleada en el ensayo antiviral. Para determinar si este parámetro afecta la actividad de NSC14560, se evaluó la actividad antiviral en células Vero infectadas con JUNV a distintas m.i. Como se observa en la Figura R III 1, hubo mínimas variaciones en la inhibición del rendimiento para diferentes concentraciones del compuesto cuando la m.i. varió entre 0,001 y 1, y sólo para la m.i. de 10 se observa una importante disminución en la capacidad inhibitoria.

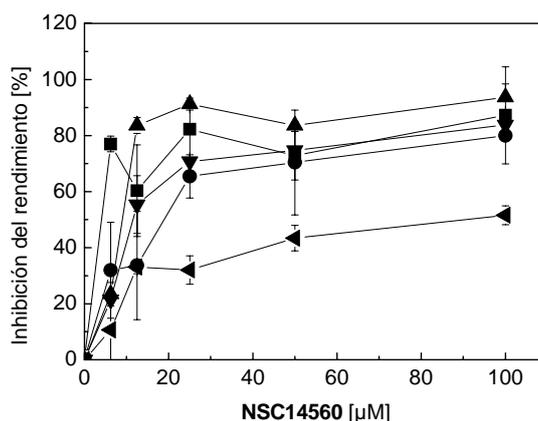


Figura R III 1: Influencia del inóculo viral sobre la actividad antiviral de NSC14560. Células Vero fueron infectadas con JUNV cepa IV4454 a distinta m.i. (■: 0,001; ●: 0,01; ▲: 0,1; ▼: 1; ◄: 10), luego de 1 h de adsorción a 37 °C, el inóculo fue removido y las células cubiertas con MM conteniendo distintas concentraciones de NSC14560. El rendimiento viral fue medido a las 48 h p.i. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes ± DE.

Los valores de CE_{50} calculados a partir de los datos presentados en la Figura R III 1 se muestran en la Tabla R III 1. Se observa que con una variación de 1000 veces en el inóculo del virus (0,001-1) no hay variaciones superiores a 5 veces en los valores de CE_{50} y sin observarse una relación directa entre CE_{50} y m.i., en tanto que solamente para una m.i. muy elevada de 10 se registra un incremento mayor de la CE_{50} a 91,1 µM. Teniendo en cuenta el valor de toxicidad en células Vero durante 48 h ($CC_{50} = 475,2$ µM, Tabla R I 1) los IS se encontraron en el rango 27,5-117,6 para m.i. de JUNV entre 0,001 y 1, y se redujo a 5,2 frente a una m.i. de 10.

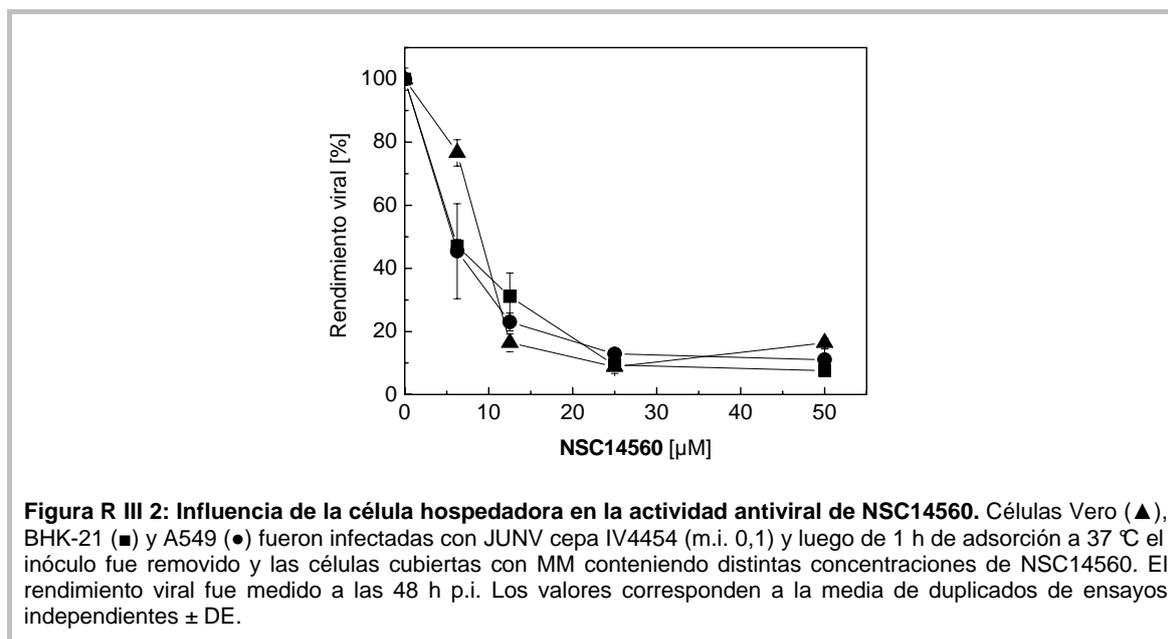
Tabla R III 1: Valores de CE₅₀ de NSC14560 en función del inóculo viral

m.i. [UFP/cél]	0,001	0,01	0,1	1	10
CE ₅₀ [μM]	4,04 ± 0,1	17,3 ± 5,3	8,5 ± 0,2	11,6 ± 2,1	91,1 ± 17,4

CE₅₀: concentración efectiva 50%, determinada mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral de JUNV cepa IV4454, en células Vero a las 48 h de infección. Los valores corresponden a la media de dos determinaciones independientes ± DE.

R III 1.2. Efecto inhibitorio de NSC14560 en distintos tipos celulares

También se analizó la influencia del tipo de célula hospedadora sobre la acción inhibitoria de NSC14560 en la infección con JUNV, determinando su eficacia antiviral mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral en la línea celular de carcinoma pulmonar humano A549 y la línea celular BHK-21 proveniente de riñón de hámster neonato. Ambas líneas mostraron un nivel similar de sensibilidad a la acción anti-arenavirus de este compuesto en comparación con las células Vero (Figura R III 2).



En los tres sistemas celulares ensayados, los valores de CE₅₀ de NSC14560 contra JUNV extrapolados de la Figura R III 2 fueron mucho menores que las respectivas CC₅₀, determinadas por el método de MTT (Tabla R III 2).

Tabla R III 2: Citotoxicidad y actividad antiviral de NSC14560 en distintos tipos celulares

Célula hospedadora	CC₅₀ [μM]	CE₅₀ [μM]	IS
Vero	475,2 ± 0,2	8,5 ± 0,2	55,9
A549	>500	6,8 ± 0,6	>72,9
BHK-21	485,3 ± 7,2	5,7 ± 0,7	85,7

CC₅₀: concentración citotóxica 50%, determinada en cada línea celular, luego de 48 h de incubación con el compuesto, mediante el método del MTT. **CE₅₀**: concentración efectiva 50%, determinada en cada línea celular mediante el ensayo de inhibición del rendimiento de JUNV a las 48 h de infección. **IS**: índice de selectividad, relación CC₅₀/CE₅₀. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes ± DE.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que el disulfuro estudiado posee un adecuado espectro de actividad inhibitoria contra arenavirus (Figura *R I 1*) y tipos de célula hospedadora diferentes.

R III 1.3. Estabilidad del efecto inhibitorio de NSC14560 en función del tiempo de infección

Con el fin de evaluar la estabilidad de la acción inhibitoria sobre la multiplicación viral en función del tiempo de infección en presencia de NSC14560, se realizaron ensayos de inhibición del rendimiento viral a distintos tiempos p.i. realizando o no la reposición de MM con compuesto fresco.

Como se observa en la Figura *R III 3*, la inhibición del rendimiento viral se mantiene en niveles similares durante 72 h p.i. si se agrega cada 24 h MM conteniendo compuesto fresco (barras grises) mientras que el porcentaje de inhibición decae con el transcurso de los días si el compuesto no es renovado (barras negras). Esto sugeriría que la concentración real de compuesto disminuye en el medio de cultivo y/o en el ambiente intracelular con el transcurso del tiempo, permitiendo que aquellos viriones que escaparon a la acción antiviral puedan replicar normalmente y recuperarse, de esa forma, parcialmente la producción viral.

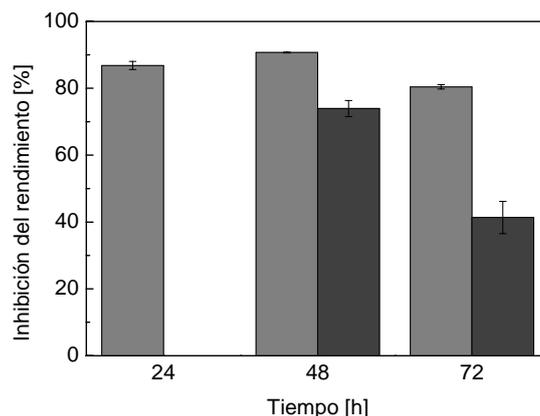


Figura R III 3: Estabilidad del efecto inhibitorio de NSC14560 en función del tiempo de infección. Se infectaron cuatro series de cultivos de células Vero con JUNV (m.i. = 0,1), luego de 1 h de adsorción a 37 °C, el inóculo fue removido y se agregó MM a dos series (controles virales) y MM conteniendo 20 µM de NSC14560 a las otras (cultivos tratados). En dos series de cultivos, una tratada y otra control, se cambió el medio a las 24 y 48 h por MM con o sin compuesto, según corresponda (barras grises), en tanto que las otras dos series se mantuvieron sin renovación de medio durante el tiempo de incubación (barras oscuras). Se determinaron los rendimientos virales por UFP a las 24, 48 y 72 h p.i. Los resultados están expresados como porcentaje de inhibición del rendimiento del virus en los cultivos tratados respecto de los no tratados para las dos condiciones de incubación, con o sin cambio de medio. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes ± DE.

R III 2. Mecanismo de acción del compuesto NSC14560

Para comenzar la investigación acerca del mecanismo de acción antiviral se llevaron a cabo una serie de ensayos a fin de tratar de localizar la etapa en la cual ejerce su efecto inhibitorio contra JUNV en células Vero. Se utilizó una concentración del inhibidor de 20 µM que asegure un 90% de inhibición.

R III 2.1. Efecto del pre-tratamiento de células con el compuesto NSC14560

Para descartar la posibilidad de que la unión a un factor celular fuese el blanco para la acción antiviral de NSC14560, se realizó un experimento en el cual las células fueron primero incubadas con distintas concentraciones de compuesto, lavadas exhaustivamente para eliminar el mismo y luego infectadas con JUNV. Paralelamente, otra serie de cultivos se infectó con JUNV y se agregó MM conteniendo las mismas concentraciones de NSC14560 luego de la infección. En ambos casos se midió la producción viral a las 48 h p.i.

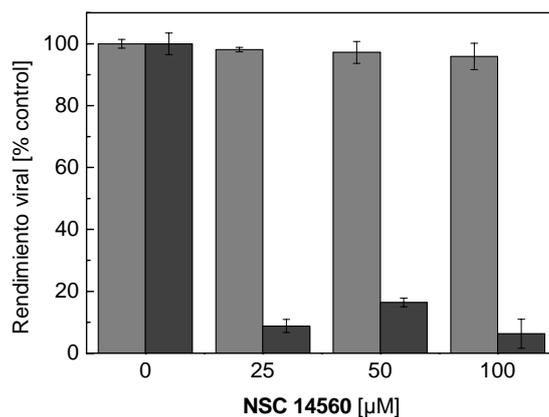


Figura R III 4: Pretratamiento de células con NSC14560. Pretratamiento de células (barras claras): células Vero fueron pre-incubadas con MM conteniendo diferentes concentraciones de compuesto durante 2 h a 37 °C, luego se removieron los sobrenadantes, se lavaron las células con PBS y se infectaron con JUNV IV4454 (m.i. 0,1) en ausencia de compuesto. A las 48 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se tituló el rendimiento viral por plaqueo. Tratamiento durante la infección (barras oscuras): el compuesto fue agregado a las células Vero simultáneamente con el virus JUNV (m.i. 0,1) y mantenido durante 48 h a 37 °C, luego se determinó el rendimiento viral por plaqueo. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes \pm DE.

Como se muestra en la Figura R III 4, el pretratamiento de las células no produjo inhibición viral a ninguna de las concentraciones ensayadas, mientras que el tratamiento durante la infección inhibió la replicación de JUNV. Estos resultados indicarían que el disulfuro no estaría interactuando durante ese período de pretratamiento con moléculas de la célula hospedadora para desencadenar una respuesta antiviral.

R III 2.2. Influencia del tiempo de adición de NSC14560 sobre la acción antiviral

Para tratar de localizar temporalmente cuándo se ejerce la acción inhibitoria de NSC14560 sobre la multiplicación intracelular de los arnavirus, se analizó el efecto del tiempo de adición del compuesto sobre el rendimiento de JUNV durante la infección. El ciclo replicativo de JUNV dura aproximadamente 12 h hasta que la progenie infecciosa se desprende de la célula (Mersich *et al.* 1981). Sin embargo, la producción de virus suficiente para ser determinada mediante un ensayo de inhibición del rendimiento viral y poder evaluar con certeza un efecto inhibitorio sólo se detecta cerca de 24 h p.i. Consecuentemente, las células fueron infectadas con JUNV realizando la adsorción durante 1 h a 4 °C, luego se incubaron a 37 °C para sincronizar el comienzo del ciclo viral dentro de la célula y el compuesto se agregó a diferentes tiempos post-adsorción. El rendimiento de virus extracelular de todos los cultivos infectados se tituló a las 24 h p.i.

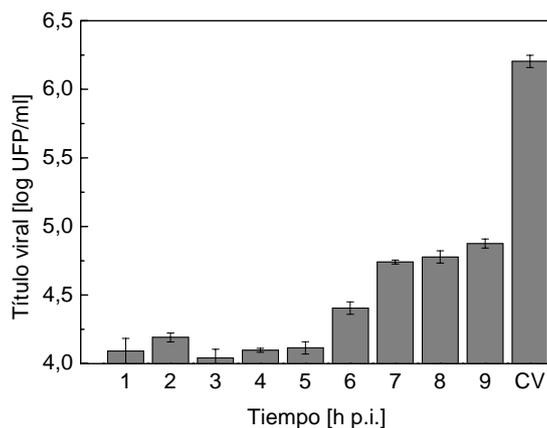


Figura R III 5: Efecto del tiempo de adición de NSC14560 sobre la acción antiviral. Células Vero fueron infectadas con JUNV (m.i. 0,1) y luego de 1 h de adsorción a 4 °C, las células fueron lavadas y cubiertas con MM y a distintos tiempos p.i. se agregó NSC14560 20 µM. El rendimiento viral fue determinado a las 24 h por plaqueo. Los valores correspondientes a la media de duplicados de ensayos independientes ± DE.

Como muestra la Figura *R III 5* se logró un nivel similar de inhibición, durante todo el período de tiempo analizado (1 a 9 h p.i.). Cuando el compuesto fue agregado inmediatamente después de la adsorción viral (tiempo 1) o hasta las 5 h p.i. se determinó una inhibición en el rendimiento viral del 99%. Cabe destacar que aún cuando el compuesto fue agregado a las 9 h p.i la reducción en el rendimiento del virus resultó alrededor del 95%. De acuerdo a estos resultados, el blanco de acción del compuesto NSC14560 estaría involucrado en todo el ciclo de vida de JUNV.

R III 2.3. Efecto de NSC14560 sobre la adsorción e internalización viral

Para determinar si la entrada del virus en la célula hospedadora se ve afectada por NSC14560, se evaluó el efecto de la droga durante los procesos de adsorción e internalización viral.

En primer lugar, se estudió la influencia del compuesto sobre la cinética de adsorción viral. Células Vero fueron expuestas a JUNV en ausencia o presencia de NSC14560 y se determinó la infectividad asociada a células después de diferentes tiempos de incubación a 4 °C. Como se observa en la Figura *R III 6*, la adsorción del virus a las células Vero no fue inhibida por el tratamiento con el compuesto con respecto a las células no tratadas.

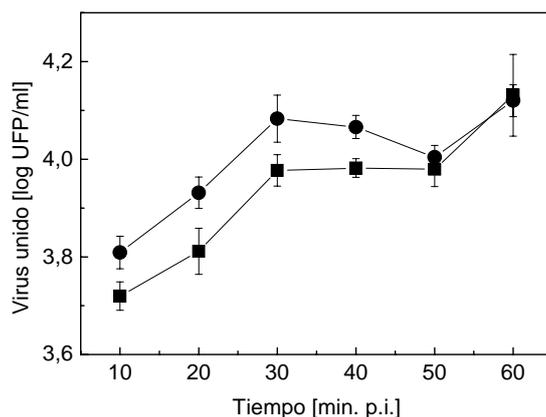


Figura R III 6: Efecto de NSC14560 sobre la adsorción viral. JUNV fue adsorbido a células Vero (m.i. 1) a 4 °C en MM conteniendo (■) o no (●) NSC14560 20 µM. A diferentes tiempos p.i. se determinó el virus infeccioso unido a células por un ensayo de plaqueo. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes ± DE.

A continuación, para estudiar la internalización viral se infectaron células Vero con JUNV y luego de 1 h de adsorción a 4 °C, se agregó MM conteniendo o no NSC14560 20 µM y se incubaron los cultivos durante tiempos variables a 37 °C. En cada tiempo se eliminó el virus adsorbido remanente por tratamiento con buffer citrato para cuantificar las UFP internalizadas. Los resultados obtenidos mostraron que los viriones fueron internalizados por las células con la misma eficacia y cinética independientemente de la presencia o ausencia del compuesto (Figura R III 7).

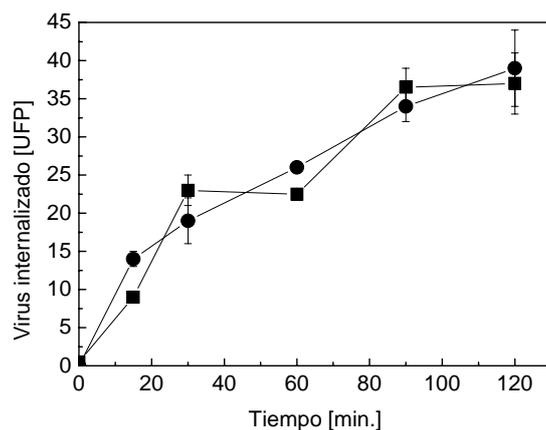


Figura R III 7: Efecto de NSC14560 sobre la internalización viral. Células Vero fueron infectadas con aproximadamente 200 UFP de JUNV. Luego de 1 h de adsorción a 4 °C las células fueron incubadas a 37 °C en presencia (■) o ausencia (●) de NSC14560 20 µM. A diferentes tiempos post-adsorción, las células fueron tratadas con buffer citrato, lavadas con PBS y cubiertas con MP para cuantificar el virus internalizado. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes ± DE.

Por lo tanto, el conjunto de ambos experimentos permite concluir que NSC14560 no impediría la entrada del virus a la célula.

R III 2.4. Efecto de NSC14560 sobre el desnudamiento viral

Luego de la unión a las células, los arenavirus son internalizados por endocitosis en las vesículas de bajo pH, donde se desencadena la fusión entre la envoltura viral y la membrana del endosoma después de una alteración conformacional que expone un péptido fusogénico presente en la GP2 (Castilla *et al.*, 1994; Di Simone *et al.*, 1994; York & Nunberg, 2006). Para evaluar si los viriones son o no capaces de desnudarse y liberarse de los endosomas en presencia del compuesto, se llevó a cabo un estudio de la cinética de desnudamiento viral en presencia de compuesto. Para ello, se realizó la adsorción de JUNV en células Vero a 4 °C en ausencia de compuesto y luego los cultivos infectados se incubaron a 37 °C en presencia de NSC14560. A diferentes tiempos post-adsorción, se eliminó el virus no internalizado, se lisaron las células y se determinó la cantidad de partículas infectivas dentro de las células. Como control positivo se ensayó en paralelo el tratamiento con concanamicina A. Este compuesto es un inhibidor de la ATPasa vacuolar protónica, y se ha informado para otros virus envueltos que permite la endocitosis viral pero impide la fusión de membranas entre la envoltura viral y la membrana endosomal quedando las partículas retenidas en el endosoma (Guinea & Carrasco, 1994).

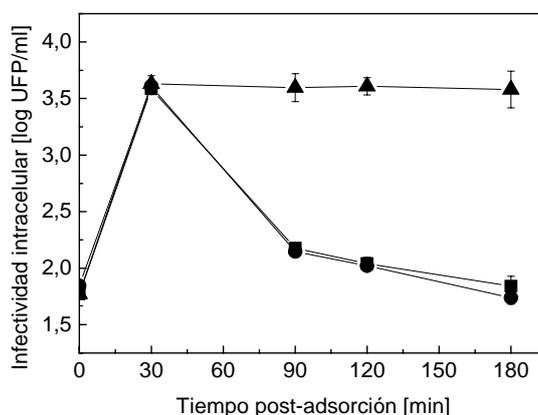


Figura R III 8: Efecto de NSC14560 sobre el desnudamiento viral. Células Vero se infectaron con JUNV cepa IV4454 (m.i. 1) a 4 °C en ausencia de compuesto. Luego se incubaron a 37 °C en MM conteniendo o no (■) NSC14560 20 µM (●) o concanamicina A (50 nM) (▲). A diferentes tiempos post-adsorción, se removió el virus no internalizado por tratamiento con proteinasa K, se lisaron las células por congelamiento-descongelamiento y se determinó la infectividad intracelular por un ensayo de plaqueo. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes ± DE.

Como puede observarse en la Figura R III 8, no se detectó una acumulación de infectividad intracelular en los cultivos tratados con NSC14560 sino que se observó una disminución similar a la observada para los cultivos no tratados. Por el contrario, los cultivos tratados con concanamicina A mostraron una acumulación de infectividad intracelular, que se mantuvo hasta los 180 min.

Estos resultados permitirían descartar un efecto de NSC14560 sobre el desnudamiento de JUNV en células Vero.

R III 2.5. Efecto de NSC14560 sobre la síntesis de RNA viral

Para analizar si la síntesis de RNA viral se encuentra afectada por NSC14560 en el ciclo de replicación de JUNV, se analizó el efecto de este compuesto sobre dicho evento biosintético a tiempos tempranos de la infección. Se decidió evaluar los niveles de RNA a las 7 h p.i., ya que es a ese tiempo donde se determinan cantidades adecuadas de RNA como para evidenciar los efectos del compuesto (Figura R II 5 A).

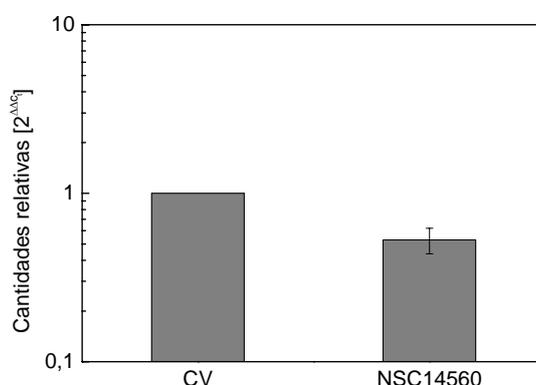


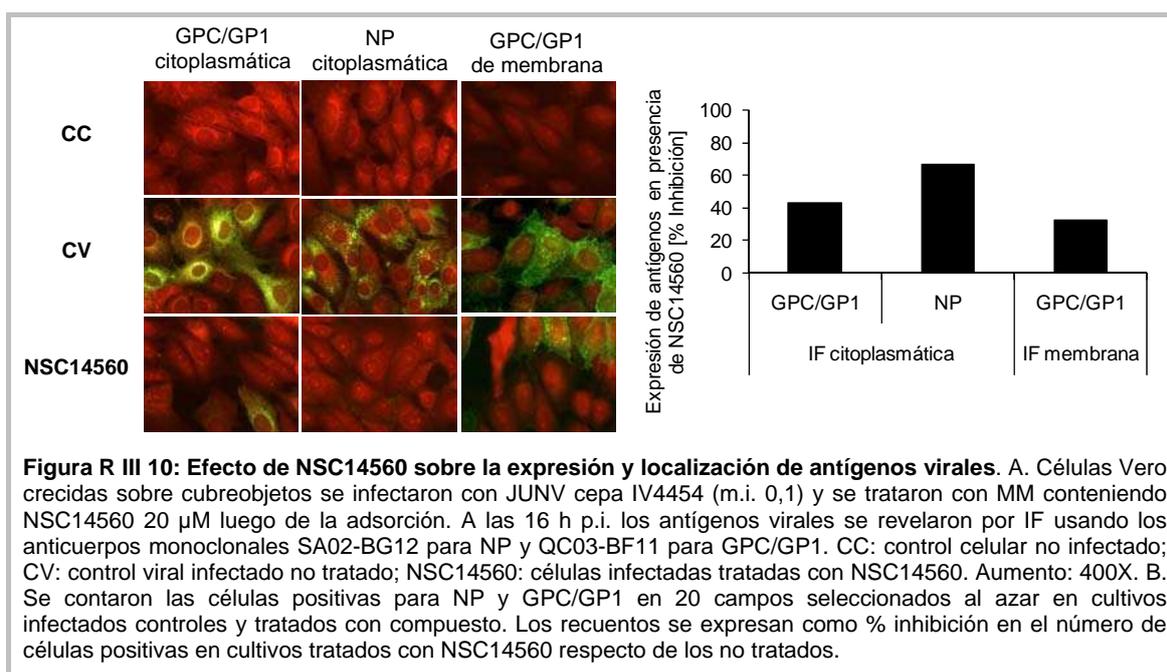
Figura R III 9: Efecto de NSC14560 sobre la síntesis de RNA viral. Células Vero fueron infectadas con JUNV y luego tratadas con NSC14560 20 μ M. A las 7 h p.i., se extrajo el RNA total y se sintetizó el cDNA utilizando el oligonucleótido específico para el gen *gpc* complementario al RNA antigenómico y se amplificó mediante PCR en tiempo real utilizando los oligonucleótidos para *gpc*. Los resultados están expresados como cantidades relativas de RNA viral en células infectadas con JUNV y tratadas respecto de células infectadas no tratadas. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes \pm DE.

Se pudo determinar una reducción en la cantidad de RNA viral en los cultivos tratados observándose una reducción en las cantidades relativas de RNA de alrededor del 50% (Figura R III 9).

R III 2.6. Efecto de NSC14560 sobre la expresión y localización de antígenos virales

Los efectos de NSC14560 sobre la expresión y localización celular de las proteínas de JUNV fueron estudiados por inmunofluorescencia indirecta de células infectadas en presencia y ausencia de la droga después de 16 h de infección.

En las células infectadas (control viral) la presencia de la proteína de la nucleocápside NP, la proteína viral de aparición más temprana y más abundante, fue revelada a las 16 h p.i. con un anticuerpo monoclonal específico, exhibiendo una distribución regular finamente punteada (Figura R III 10). La cantidad de células que exhibieron fluorescencia citoplasmática para NP fue reducida en presencia de NSC14560 20 μ M. La inhibición de la expresión de NP fue del 60%, cuantificada por recuento del número de células fluorescentes en 20 campos microscópicos seleccionados al azar.

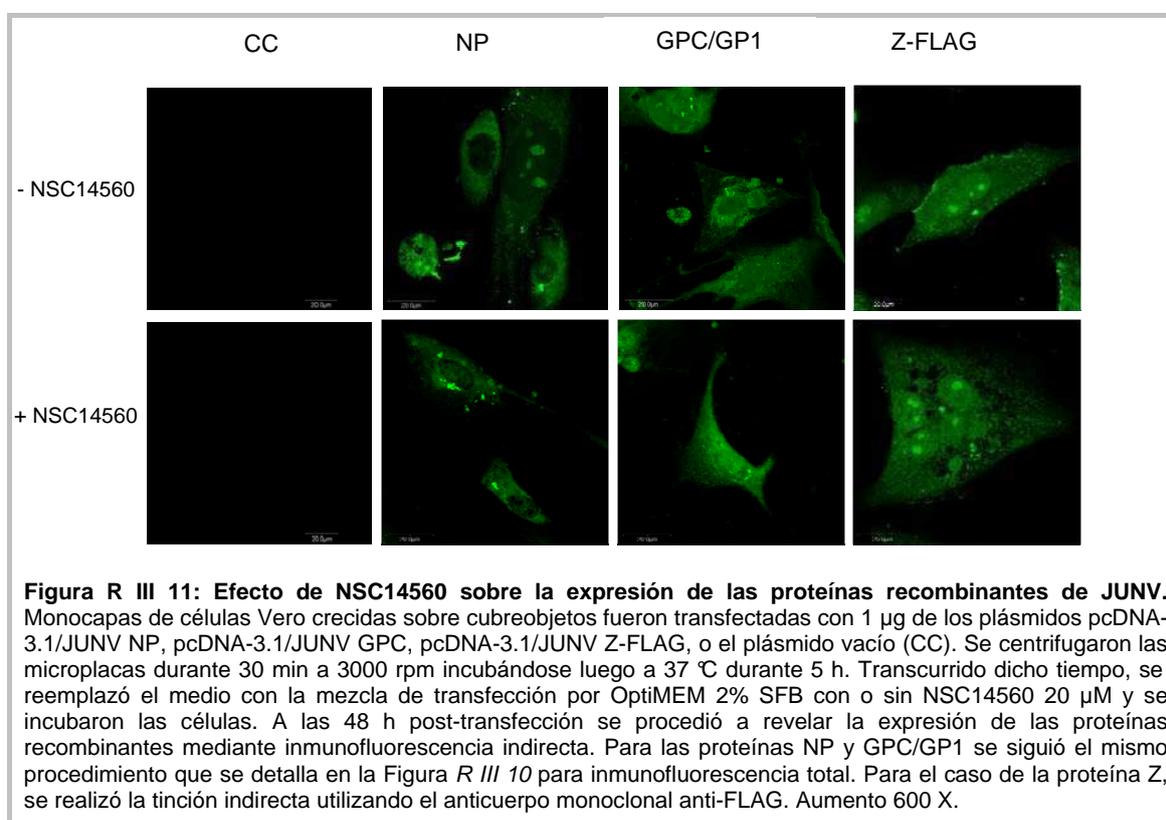


En cuanto a las glicoproteínas de JUNV, se analizaron tanto la expresión citoplasmática como de membrana utilizando un anticuerpo monoclonal reactivo contra el precursor GPC y la proteína de la envoltura madura GP1 (Sanchez *et al.*, 1989). Como se muestra en la Figura R III 10, se observó una disminución similar en el patrón de distribución de las glicoproteínas de JUNV en el citoplasma y en la superficie celular luego del tratamiento con NSC14560 (40%).

R III 2.7. Efecto de NSC14560 sobre la expresión y localización de las proteínas recombinantes NP, GPC/G1 y Z de JUNV

Mediante la transfección de los plásmidos pcDNA-3.1/JUNV Z-FLAG, pcDNA-3.1/JUNV NP o pcDNA-3.1/JUNV GPC en células Vero, se decidió estudiar el efecto del tratamiento con NSC14560 sobre la expresión y el patrón de distribución de las proteínas Z, NP y GPC de JUNV expresadas en forma individual.

Como muestra la Figura R III 11, en los cultivos tratados no se ven cambios en el nivel de síntesis de ninguna de las tres proteínas. Tampoco se evidencian modificaciones en la localización de las mismas dentro de las células.



Con este resultado, se confirma que la inhibición de la expresión de los antígenos virales en las células infectadas y tratadas con NSC14560 observada en la Figura R III 10 se debe a un efecto de la droga en un paso anterior al de la síntesis proteica, involucrando principalmente la síntesis del RNA viral.

R III 2.8. Efecto de NSC14560 sobre la liberación de partículas virales

Con el fin de determinar si la disminución en la producción viral detectada en el sobrenadante de las células tratadas se corresponde con una inhibición de la brotación de los viriones, se realizó la comparación del rendimiento viral en el sobrenadante y el virus infectivo asociado a células luego de 24 ó 48 h de tratamiento con NSC14560.

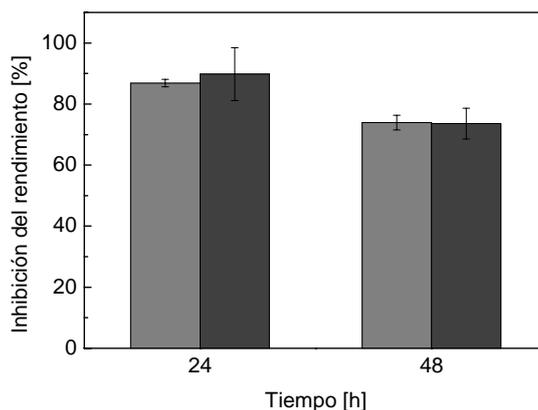


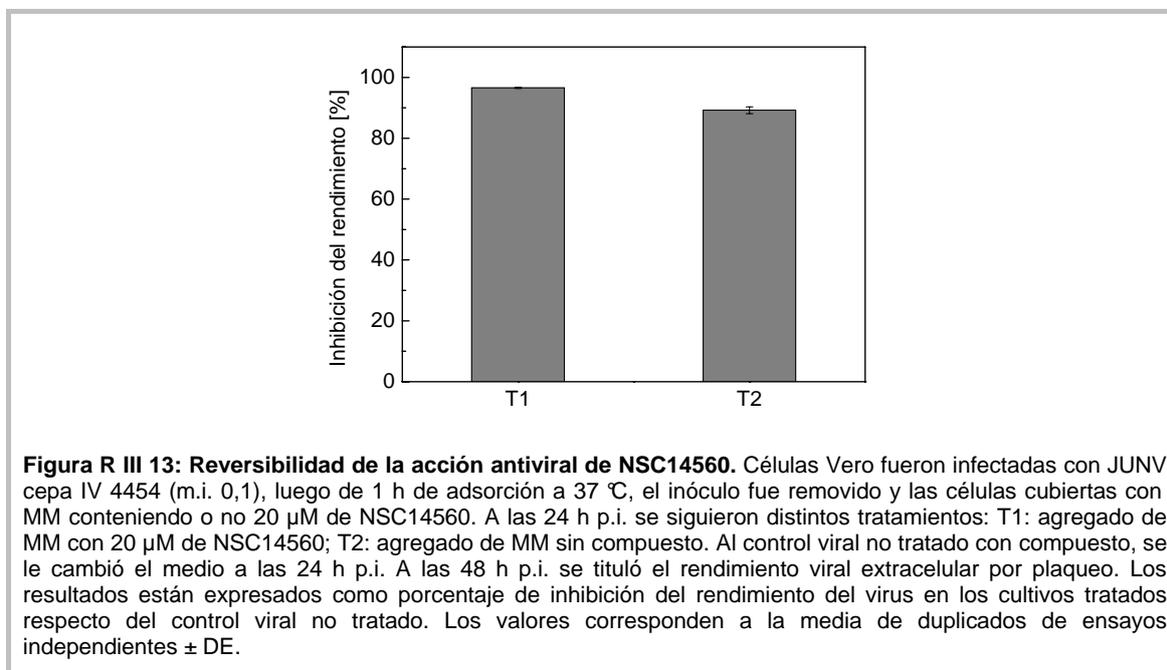
Figura R III 12: Efecto de NSC14560 sobre la liberación de partículas. Células Vero fueron infectadas con JUNV cepa IV 4454 (m.i. 0,1), luego de 1 h de adsorción a 37 °C, el inóculo fue removido y las células cubiertas con MM conteniendo o no 20 µM de NSC14560. A las 24 y 48 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se tituló el rendimiento viral extracelular por plaqueo (barras grises). Las monocapas celulares se lavaron con PBS y se rompieron por 3 ciclos de congelado/descongelado, los restos celulares se separaron por centrifugación (10 min a 3000 x g) y se cuantificó el virus infeccioso en el sobrenadante mediante UFP (barras negras). Los resultados están expresados como porcentaje de inhibición del rendimiento del virus en los cultivos tratados respecto del control viral no tratado. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes ± DE.

Como se observa en la Figura *R III 12*, los porcentajes de inhibición en el rendimiento del virus liberado al sobrenadante como en el virus asociado a células fueron similares indicando que la totalidad del virus producido fue liberado al sobrenadante, con lo cual, no habría una acción directa de NSC14560 sobre la salida de JUNV.

R III 2.9. Reversibilidad de la acción antiviral de NSC14560

También se caracterizó el modo de acción de NSC14560 sobre la infección con JUNV en cuanto a la reversibilidad de la inhibición producida. Para ello, cultivos de células Vero infectados y tratados con el compuesto durante 24 h fueron luego incubados por otras 24 h con MM con o sin agregado de droga. La remoción del compuesto no modificó significativamente el rendimiento viral a las 48 h p.i. respecto de los cultivos infectados mantenidos durante todo el tiempo en presencia de la droga

(Figura R III 13). Los niveles de inhibición en ambos casos fueron similares, lo cual indicaría que la acción del compuesto afecta irreversiblemente la multiplicación de JUNV.



R III 2.10. Efecto de NSC14560 sobre la replicación de otros virus

En forma similar a los estudios con el compuesto virucida NSC4492, se trató de establecer si la actividad inhibitoria de NSC14560 estaba relacionada exclusivamente a la presencia de motivos *zinc-finger* en alguna proteína viral, evaluando la susceptibilidad a este compuesto de los virus HSV-1 cepa KOS, VSV cepa Indiana, PV-3, DENV-2 cepa NCG y MV mediante ensayos de reducción en el rendimiento viral en células Vero.

Nuevamente, sólo en el caso de HSV-1 se observó un efecto antiviral de orden similar al encontrado para JUNV, ya que los valores de CE_{50} para ambos virus portadores de proteínas con motivos *RING finger* resultaron ser, en promedio, 7 veces menores a los determinados para VSV, DENV-2, PV-3 y MV (Tabla R III 3). Estas diferencias entre JUNV y HSV respecto de los restantes virus también se reflejan en los correspondientes valores de IS.

Tabla R III 3: Actividad antiviral de NSC14560 frente a otros virus

Virus	CE₅₀ [μM]	IS
JUNV IV4454	8,5 ± 0,2	55,9
HSV-1	5,92 ± 0,07	80,3
VSV	43,8 ± 1,7	10,8
DENV-2	30,4 ± 1,3	15,6
PV-3	60,6 ± 1,5	7,8
MV	63,2 ± 5,6	7,5

CE₅₀: concentración efectiva 50%, determinada mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral en células Vero a las 48 h de infección. **IS**: índice de selectividad. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes ± desvío estándar.

R III 3. Conclusiones

De acuerdo a los resultados presentados en este capítulo, se puede concluir que la actividad antiviral de NSC14560 contra JUNV no fue dependiente de la dosis viral inoculada en el rango de m.i. de 0,001-1, en cambio a una m.i. de 10 se observó un aumento en la CE₅₀.

Al estudiar la eficacia en la acción antiviral en diferentes cultivos de células de mamífero, se encontró que el compuesto fue inhibidor efectivo de JUNV en células humanas y de hámster, mostrando un efecto comparable al observado en células Vero de mono, con índices de selectividad en el rango de 55,9-85,7.

Estudios mecanísticos demostraron que NSC14560 no induce un estado refractario a la infección por el pretratamiento celular. Asimismo se determinó que la inhibición de la replicación de JUNV es irreversible y que se mantiene en niveles similares durante 72 h p.i. si el compuesto y MM es renovado cada 24 h pero decae con el transcurso del tiempo si no se renueva.

Los ensayos de tiempo de adición indicaron que la acción inhibitoria de NSC14560 parecería afectar predominantemente etapas tempranas o intermedias que transcurren durante las 5 h p.i. La entrada y desnudamiento virales no están inhibidos, pero se observa una reducción en la síntesis de RNA viral. Consecuentemente, la expresión citoplasmática y de membrana de la mayoría de las proteínas virales en células infectadas también fue inhibida por NSC14560.

Capítulo IV. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS DERIVADOS DE ACRIDONAS *N*-SUSTITUÍDAS

La actividad antiviral contra JUNV de acridonas se estudió empleando la 10-alil-6-cloro-4-metoxi-9(10*H*)-acridona, designada **3f**, el derivado con mayor acción inhibitoria y selectividad (Tabla *R I 3*).

R IV 1. Influencia del inóculo viral sobre la actividad antiviral

Se evaluó la actividad antiviral de **3f** infectando monocapas de células Vero a distintas m.i. para determinar si este parámetro ejerce algún efecto sobre la misma.

La Figura *R IV 1* muestra que la efectividad de **3f** para inhibir la infección de JUNV no se vio afectada en forma importante por el inóculo viral inicial. Al realizar ensayos de inhibición del rendimiento viral en células Vero infectadas a distintas m.i., el perfil de las curvas de dosis-respuesta fue similar en el rango de 0,2-40 UFP/cél.

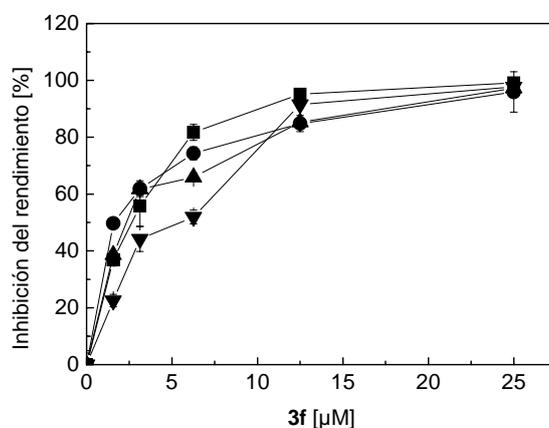


Figura R IV 1: Influencia del inóculo viral sobre la actividad antiviral de 3f. Monocapas de células Vero fueron infectadas con JUNV cepa IV4454 a distintas m.i. (■: 0,2; ●: 2; ▲: 20; ▼: 40), luego de 1 h de adsorción a 37 °C, el inóculo fue removido y las células cubiertas con MM conteniendo distintas concentraciones de **3f**. El rendimiento viral fue medido a las 48 h p.i. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes ± DE.

Los valores de CE_{50} calculados a partir de los datos presentados en la Figura *R IV 1* se muestran en la Tabla *R IV 1*. Se observa que con una variación de 200 veces en el inóculo de virus, no hay variaciones superiores a 2 veces en los valores de CE_{50} y en forma totalmente al azar respecto del valor de la m.i. Por otra parte, dado que la viabilidad de las células Vero no se vio afectada después de 48 h de incubación

con el compuesto hasta 1 mM (Tabla R I 1), en las mismas condiciones del ensayo antiviral, los índices de selectividad fueron superiores a 350 para todas las m.i. de JUNV IV4454 evaluadas.

Tabla R IV 1: Valores de CE₅₀ de 3f en función del inóculo viral

m.i. [UFP/cél]	0,2	2,0	20,0	40,0
CE ₅₀ [µM]	2,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	2,3 ± 0,3	2,2 ± 0,3

CE₅₀: concentración efectiva 50%, determinada mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral de JUNV cepa IV4454, en células Vero a las 48 h de infección. Los valores corresponden a la media de dos determinaciones independientes ± DE.

R IV 2. Reversibilidad de la acción antiviral

También se decidió caracterizar la acción de **3f** sobre la infección con JUNV en cuanto a la reversibilidad de la inhibición producida por eliminación de la droga luego de un cierto tiempo de tratamiento. Para ello, cultivos de células Vero infectados y tratados con el compuesto durante 24 h fueron luego incubados por otras 24 h con MM con o sin agregado de droga. La remoción del compuesto no produjo una modificación de importancia en el rendimiento viral a las 48 h p.i. respecto de los cultivos infectados mantenidos durante todo el tiempo en presencia de la droga (Figura R IV 2). Los niveles de inhibición en ambos casos fueron similares lo cual indicaría que la acción del compuesto afecta irreversiblemente la multiplicación de JUNV.

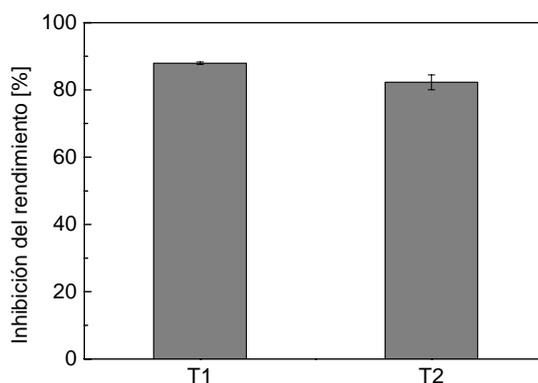


Figura R IV 2: Reversibilidad de la acción antiviral de 3f. Células Vero fueron infectadas con JUNV cepa IV 4454 (m.i. 0,1), luego de 1 h de adsorción a 37 °C, el inóculo fue removido y las células cubiertas con MM conteniendo o no 25 µM de **3f**. A las 24 h p.i. se siguieron distintos tratamientos: T1: agregado de MM con 25 µM de **3f**; T2: agregado de MM sin compuesto. Al control viral no tratado con compuesto, se le cambió el medio a las 24 h p.i. A las 48 h p.i. se tituló el rendimiento viral extracelular por plaqueo. Los resultados están expresados como porcentaje de inhibición del rendimiento del virus en los cultivos tratados respecto del control viral no tratado. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes ± DE.

R IV 3. Mecanismo de acción antiviral

R IV 3.1. Efecto sobre la infección por pretratamiento de células y viriones

Como una primera aproximación para caracterizar la acción de las acridonas sobre la infección de células Vero con JUNV, se investigó si actuarían por una interacción directa con las células a ser infectadas. Para ello, monocapas de células Vero fueron pre-incubadas con distintas concentraciones de **3f** durante 2 h a 37 °C y luego se removió la droga antes de la infección con JUNV por lavados exhaustivos.

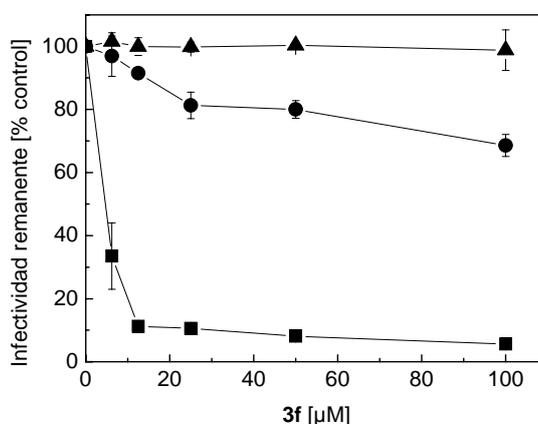


Figura R IV 3: Tratamiento de células o virus con 3f antes y durante la infección. Pretratamiento de células (▲): células Vero fueron pre-incubadas con MM conteniendo diferentes concentraciones de compuesto durante 2 h a 37 °C, luego se removieron los sobrenadantes y las células fueron infectadas con JUNV IV4454 (m.i. 0,1) en ausencia de compuesto. A las 48 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se tituló el rendimiento viral por plaqueo. Pretratamiento de virus (●): suspensiones virales conteniendo 1×10^6 UFP de JUNV IV4454 fueron incubadas con igual volumen de MM con o sin diferentes concentraciones de compuesto por 1,5 h a 37 °C. Luego las muestras fueron diluidas y la infectividad remanente determinada por UFP. Tratamiento durante la infección (■): el compuesto fue agregado a las células Vero simultáneamente con el virus JUNV IV4454 (m.i. 0,1) y mantenido durante 48 h a 37 °C, luego se determinó el rendimiento viral por UFP. Los resultados están expresados como porcentaje de infectividad remanente del virus en los cultivos tratados respecto de los no tratados. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes \pm DE.

Los resultados mostraron que la acridona no fue efectiva en reducir el rendimiento viral luego de 48 h de incubación p.i. por pretratamiento celular 2 h antes de la infección (Figura R IV 3). En simultáneo, se evaluó el efecto directo del compuesto sobre los viriones y por tratamiento de las células durante la infección. Cuando las partículas virales se incubaron con **3f** durante 1,5 h a 37 °C antes de la infección celular para determinar la posible actividad inactivante del compuesto, la reducción en la infectividad remanente de JUNV fue solamente de alrededor del 30% a la mayor concentración ensayada (100 μM). En contraste, cuando las células se incubaron con el compuesto simultáneamente con el inóculo viral, los títulos en los

sobrenadantes a las 48 h p.i. fueron significativamente reducidos a concentraciones 15-20 veces menores y en una forma dosis dependiente (Figura R IV 3).

En conclusión, los efectos inhibitorios de la acridona contra JUNV fueron ejercidos enteramente a través de un bloqueo en el ciclo de replicación durante el proceso infeccioso.

R IV 3.2. Influencia del tiempo de adición de 3f sobre la acción antiviral

Se realizaron experimentos de tiempo de adición para estimar el período del ciclo de multiplicación de JUNV en que el compuesto **3f** ejerce su efecto inhibitorio. El compuesto fue agregado a cultivos celulares infectados a varios tiempos post-adsorción a 4 °C y luego se determinaron los títulos virales a las 24 h p.i., simultáneamente con cultivos infectados no tratados. Se observó una fuerte inhibición en la producción viral mayor a 3 log cuando la droga fue agregada hasta las 5 h p.i., y un efecto menor a tiempos mayores, con una reducción de 1-1.5 log en el título viral, (Figura R IV 4).

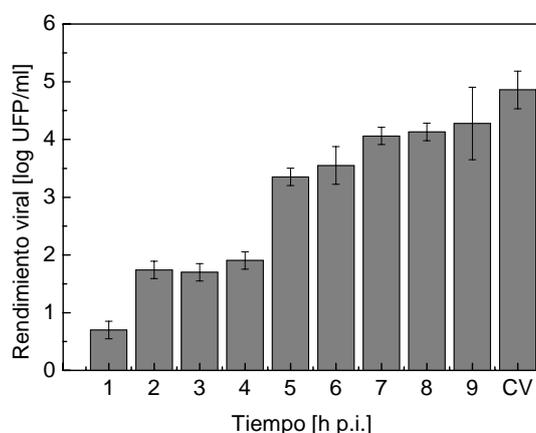
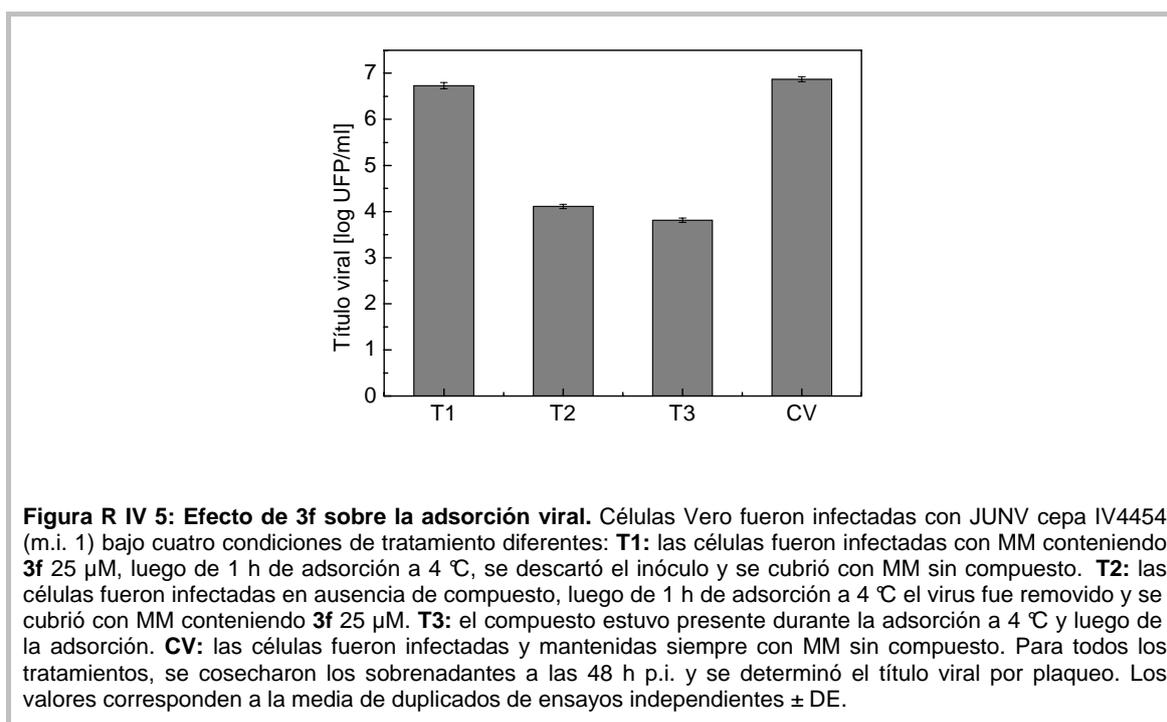


Figura R IV 4: Efecto del tiempo de adición de 3f sobre la acción antiviral. Células Vero fueron infectadas con JUNV (m.i. 0,1) y luego de 1 h de adsorción a 4 °C, las células fueron lavadas y cubiertas con MM y a distintos tiempos p.i. se agregó **3f** 25 µM. El rendimiento viral fue determinado a las 24 h por plaqueo. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes ± DE.

Estos datos sugieren que la acción inhibitoria de **3f** es ejercida principalmente en las fases tempranas o intermedias del ciclo de multiplicación del virus.

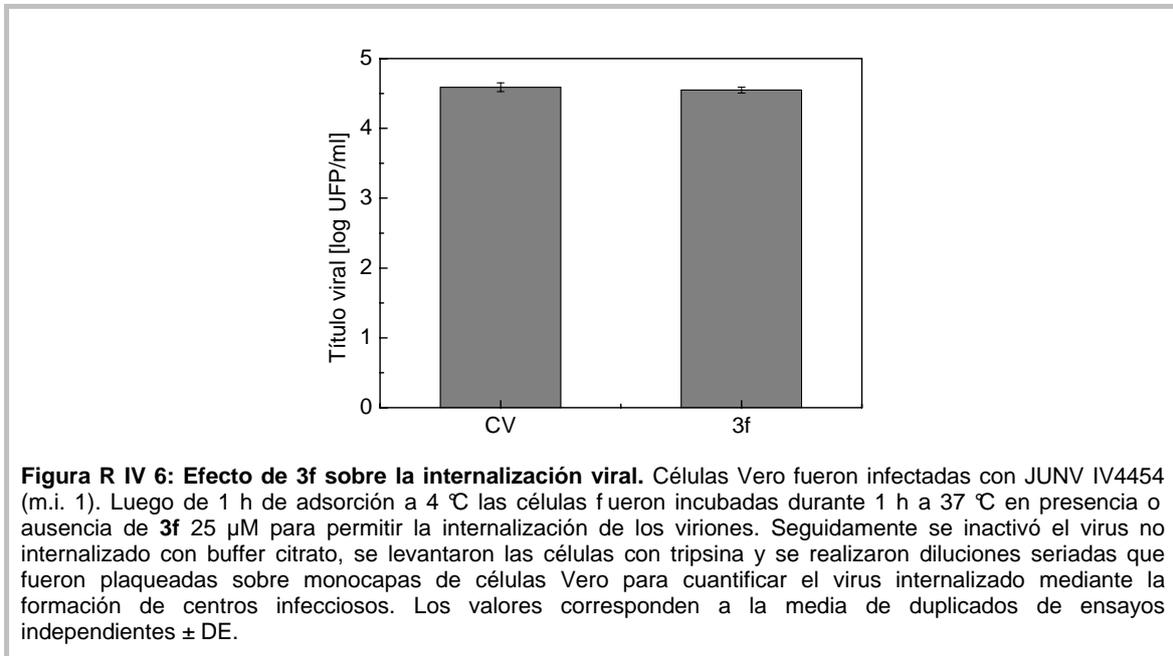
R IV 3.3. Efecto de 3f sobre la adsorción e internalización viral

La importante reducción en la multiplicación de JUNV observada en el experimento de tiempo de adición mostrada en la Figura R IV 4 se obtuvo en ausencia del compuesto durante la adsorción viral, ya que se agregó la droga luego de la unión a 4 °C. La falta de efecto de 3f sobre la adsorción viral fue confirmada determinando la inhibición producida en el rendimiento viral luego de 48 h de infección cuando el compuesto estuvo presente solamente en el período de adsorción de JUNV en células Vero durante 1 h a 4 °C (Figura R IV 5, T1). Bajo estas condiciones, no se observó reducción en la producción viral respecto a los cultivos infectados no tratados (CV), mientras que la adición de la acridona luego de la adsorción viral (T2) fue tan efectiva como su presencia continuada durante la adsorción y todo el período de incubación post-adsorción (T3) (Figura R IV 5).



A continuación, se estudió la acción de 3f sobre la internalización de JUNV. Para ello, se infectaron células Vero con JUNV (m.i. 1) y luego de 1 h de adsorción a 4 °C se retiró el inóculo viral y las células se incubaron inmediatamente a 37 °C para permitir la internalización viral en presencia o ausencia de 3f. Luego de 1 h de incubación, se cuantificó el virus internalizado mediante un ensayo de centros infecciosos.

Como se muestra en la Figura R IV 6, no se observaron diferencias entre la cantidad de virus internalizado en presencia o en ausencia de **3f**. Por lo tanto, la acridona no afectaría la entrada del virus a la célula.



R IV 3.4. Efecto de 3f sobre la síntesis de RNA viral

Luego de la penetración en la célula hospedadora, el siguiente paso en el ciclo de vida de los arenavirus es la síntesis del RNA viral. Para analizar el efecto de **3f** sobre la síntesis del RNA de JUNV, las células fueron infectadas (m.i. 0,1) y fueron incubadas con MM conteniendo o no compuesto; a las 48 h p.i. el RNA total fue extraído y utilizado como molde para la síntesis de cDNA utilizando oligonucleótidos aleatorios. Las muestras de cDNA fueron amplificadas con los oligonucleótidos correspondientes a los genes virales *gpc*, *z* y *n* (Tabla MM 1) mediante PCR en tiempo real usando *actina* como gen normalizador celular. La cuantificación del RNA viral total bajo estas condiciones mostró casi 3 log de inhibición en la síntesis de RNA viral en células infectadas con JUNV y tratadas con **3f** 25 µM en comparación con las células infectadas no tratadas (Figura R IV 7). El grado de inhibición fue similar para los tres genes virales analizados.

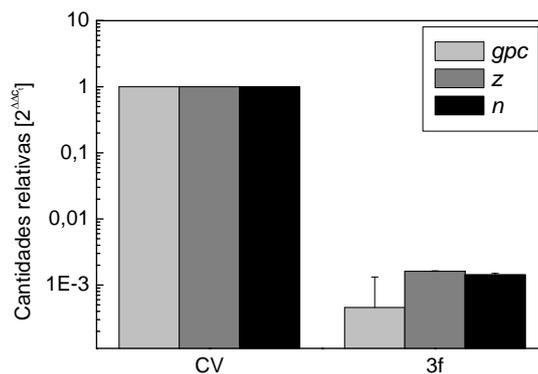


Figura R IV 7: Efecto de 3f sobre la síntesis de RNA viral. Células Vero fueron infectadas con JUNV IV4454 (m.i. 0,1) e incubadas en ausencia (CV: control viral) o en presencia de 3f 25 μ M. A las 48 h p.i., se extrajo el RNA total y se sintetizó el cDNA utilizando oligonucleótidos aleatorios. El cDNA fue utilizado como molde para amplificar los genes virales *gpc*, *z* y *n* y el gen *actina* como normalizador celular mediante PCR en tiempo real. Los resultados están expresados como cantidades relativas de RNA viral respecto al control viral de cada gen. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes \pm DE.

Para asegurar que la síntesis de RNA es el blanco de 3f en el ciclo de replicación de JUNV, se analizó el efecto de este compuesto sobre dicho evento biosintético a tiempos tempranos de la infección. En base a la cinética de síntesis de RNA viral en células infectadas con JUNV (ver Figura R II 5 A) se hicieron las mediciones de RNA a las 5 y 7 h p.i. Se observó una reducción significativa en los niveles de RNA viral a ambos tiempos p.i. (Figura R IV 8). El nivel de inhibición se fue incrementando con el tiempo ya que se evidenció una mayor inhibición a las 7 h p.i. pasando del 54% a las 5 h p.i. al 90% a las 7 h p.i., momento que coincide con la detección de una mayor cantidad de RNA viral en las células infectadas (Figura R II 5 A).

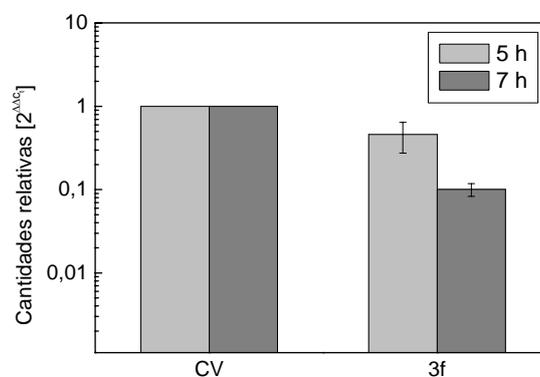
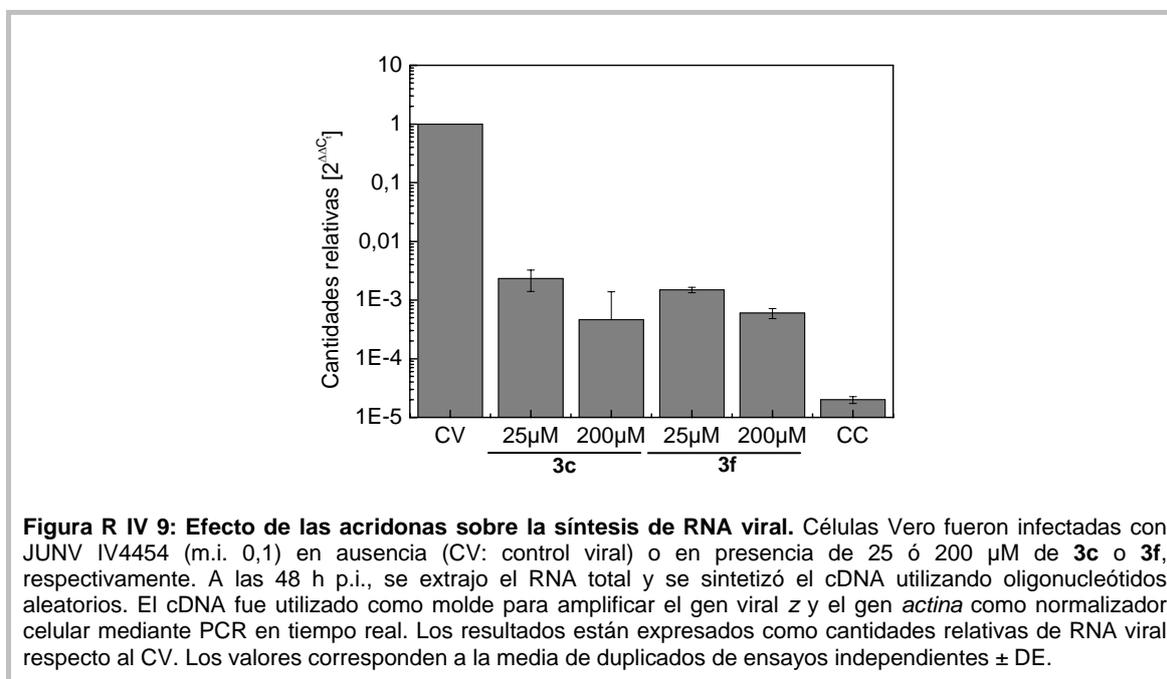


Figura R IV 8: Efecto de 3f sobre la síntesis de RNA viral. Células Vero fueron infectadas con JUNV IV4454 (m.i. 1) e incubadas durante 5 ó 7 h en ausencia (CV) o presencia de 3f 25 μ M. Luego, se extrajo el RNA total y se sintetizó el cDNA utilizando el oligonucleótido específico para el gen *gpc* complementario al RNA antigenómico y se amplificó mediante PCR en tiempo real utilizando los oligonucleótidos para *gpc*. Los resultados están expresados como cantidades relativas de RNA viral respecto al control viral. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes \pm DE.

Este resultado permite concluir que hay un efecto directo de la acridona sobre la síntesis de RNA viral, etapa que sería el blanco principal de este tipo de compuestos en el ciclo de JUNV, y que la inhibición observada a las 48 h p.i. se debe efectivamente a la acción inhibitoria acumulada de **3f** sobre este paso del ciclo viral. A fin de corroborar esta conclusión más fehacientemente, se analizó también el efecto de la acridona **3c** (Tablas R I 3 y R I 5) sobre la síntesis de RNA viral. Como se observa en la Figura R IV 9, este compuesto también produjo una drástica reducción de los niveles de RNA viral detectables en células infectadas. Asimismo, los niveles de inhibición producidos por ambas acridonas fueron dependientes de la dosis de compuesto.



R IV 3.5. Efecto de **3f** sobre la expresión de los antígenos virales en células infectadas

La inhibición en la síntesis de RNA fue indirectamente corroborada mediante el análisis del efecto de **3f** sobre la expresión de las proteínas de JUNV, estudiada por inmunofluorescencia indirecta. En las células infectadas, la presencia de la proteína de la nucleocápside NP, la proteína viral más abundante, fue revelada con un anticuerpo monoclonal específico exhibiendo una distribución regular, finamente punteada (Figura R IV 10). La cantidad de células mostrando fluorescencia citoplasmática para NP fue drásticamente reducida en presencia de **3f**.

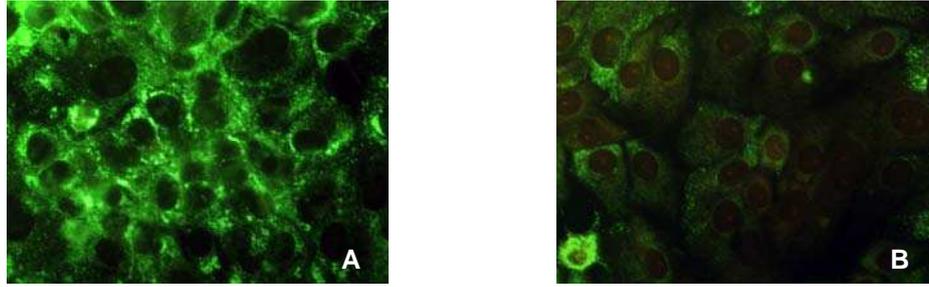


Figura R IV 10: Efecto de 3f sobre la expresión de antígenos virales. Células Vero crecidas sobre cubreobjetos se infectaron con JUNV cepa IV4454 (m.i. 0,1) y se incubaron con MM (A) o MM + 3f 25 μ M (B) luego de la adsorción. A las 48 h p.i. la expresión de la proteína viral NP se reveló por IFI usando el anticuerpo monoclonal SA02-BG12. Aumento: 400X

Por lo tanto, la falta de RNA mensajero viral en las células inoculadas con JUNV y tratadas con 3f fue confirmada por la ausencia de la expresión de la proteína.

R IV 3.6. Reversión de la actividad antiviral de 3f por el agregado de guanósina exógena

Ciertos compuestos derivados de acridonas han sido reportados como inhibidores potentes y no competitivos de la enzima IMPDH (Waterson *et al.*, 2007). IMPDH es una enzima clave responsable de la conversión de inosina 5'-monofosfato a xantósina 5'-monofosfato, un paso limitante para la síntesis intracelular *de novo* de nucleótidos de guanósina.

Para explorar si la actividad antiviral de 3f podría estar afectando esta vía enzimática y así producir el efecto inhibitorio sobre la síntesis de RNA viral, se probó la actividad antiviral de 3f en presencia o ausencia de guanósina exógena para determinar si ocurría reversión de la inhibición. Como controles, RIB y ácido micofenólico (MPA), dos conocidos inhibidores de la IMPDH (Sintchak & Nimmesgern, 2000), fueron ensayados en simultáneo contra JUNV, en las mismas condiciones. La actividad antiviral de RIB contra JUNV había sido ya determinada con un valor de CE_{50} de $18,5 \pm 1,7 \mu$ M (Tabla R I 3), pero el efecto de MPA sobre la multiplicación de JUNV no ha sido estudiado hasta el presente. Por lo tanto, primero se hizo la evaluación de la actividad citotóxica en células Vero y la actividad antiviral de MPA contra JUNV mediante un ensayo de inhibición del rendimiento viral en células Vero, resultando una $CC_{50} > 500 \mu$ M y una CE_{50} de $0,37 \pm 0,04 \mu$ M.

A partir de estos datos, se hizo un ensayo de reversión por guanosina infectando células Vero con JUNV en presencia de una concentración fija de cada inhibidor y concentraciones crecientes de guanosina y midiendo los rendimientos virales a las 48 h p.i. La concentración fija de cada inhibidor se eligió en exceso de la CE_{50} correspondiente de manera de producir una importante reducción del rendimiento viral (Figura *R IV 11*). Por su parte, la máxima concentración de guanosina ensayada fue determinada de acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad en células Vero por la técnica de MTT, resultando la $CC_{50} = 625,1 \pm 3,9 \mu\text{M}$.

La adición de guanosina exógena rescató la infectividad de JUNV en células tratadas con **3f** en una manera dosis-dependiente, aunque esta reversión fue parcial, tal como se ve reflejado en los niveles de UFP: el rendimiento viral fue reducido de $3,55 \times 10^6$ UFP/ml en las células infectadas, a $6,0 \times 10^4$ UFP/ml en las células infectadas y tratadas con **3f** y el tratamiento simultáneo con **3f** y $200 \mu\text{M}$ de guanosina incrementó el título a $6,05 \times 10^5$ UFP/ml. Por lo tanto, se recuperó 1 log de infectividad pero se mantuvo aún una pérdida de aproximadamente el 80% de la producción correspondiente a las células infectadas no tratadas (Figura *R IV 11*).

En el caso de RIB (Figura *R IV 11*), la reversión observada fue aún más incompleta y no se observaron grandes variaciones al incrementar la concentración de guanosina, sugiriendo que el mecanismo de acción de RIB con JUNV no sería predominantemente a través de un efecto inhibitorio sobre la IMPDH.

Por el contrario, la inhibición producida sobre JUNV por MPA fue fuertemente revertida con el agregado de guanosina externa (Figura *R IV 11*): con una dosis de $12,5 \mu\text{M}$ de guanosina el rendimiento viral aumentó más de 1,5 log y el incremento en el título fue proporcional a la concentración de guanosina agregada. Sin embargo, cabe hacer notar que aún en presencia de la máxima concentración de guanosina de $200 \mu\text{M}$ no se produjo la reversión total.

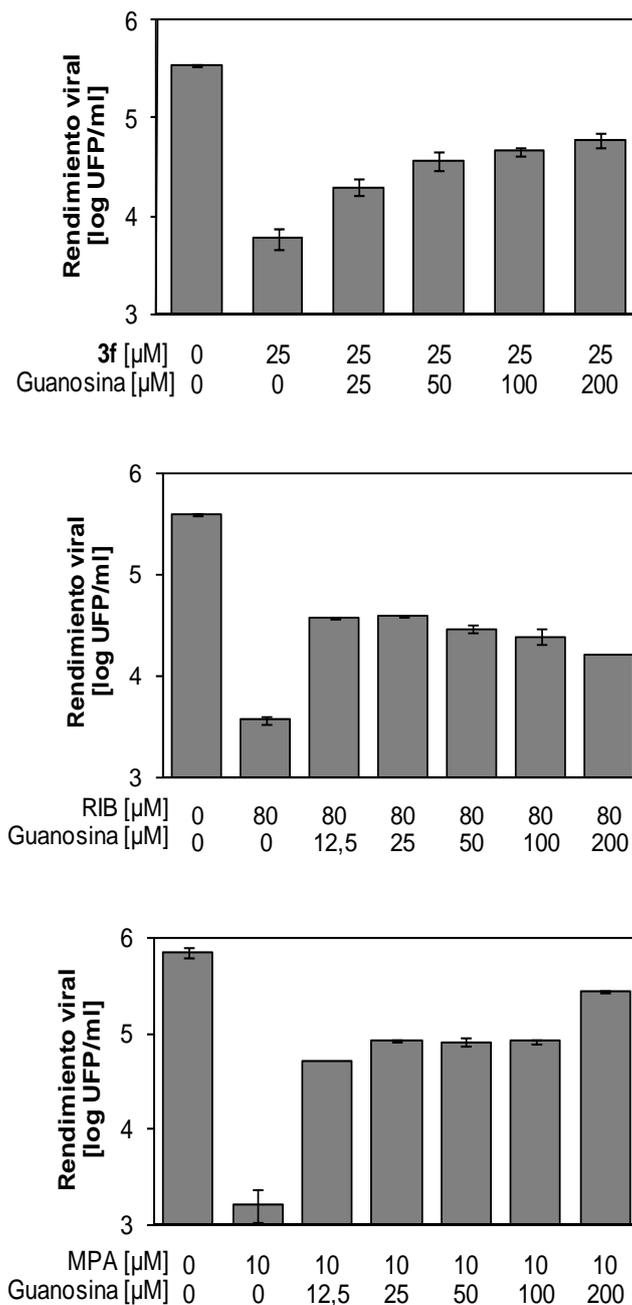


Figura R IV 11: Reversión de la actividad antiviral por el agregado de guanosina exógena. Monocapas de células Vero fueron infectadas con JUNV IV4454 (m.i. 0,1), luego se removió el inóculo y se cubrieron con MM conteniendo **3f** 25 μM, **RIB** 80 μM o **MPA** 10 μM y distintas concentraciones de guanosina. El control viral se cubrió solamente con MM. A las 48 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se tituló el rendimiento viral por el método de plaqueo. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes ± DE.

El efecto de la adición de guanosina exógena sobre la actividad inhibitoria de los tres compuestos también se corroboró mediante la determinación de la síntesis del RNA viral por RT-PCR. Para ello, células Vero fueron infectadas con JUNV y tratadas con cada inhibidor en presencia o ausencia de 200 μM guanosina, como en el punto anterior. A las 48 h p.i. se extrajo el RNA total, se sintetizó el cDNA utilizando

oligonucleótidos aleatorios y se lo amplificó por PCR en tiempo real usando los oligonucleótidos para el gen z (Tabla MM 1). Se observó un perfil similar de recuperación parcial de los niveles de RNA viral para 3f y RIB y una alta recuperación para MPA (Figura R IV 12).

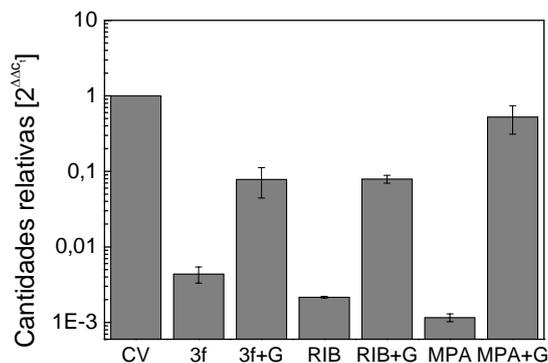


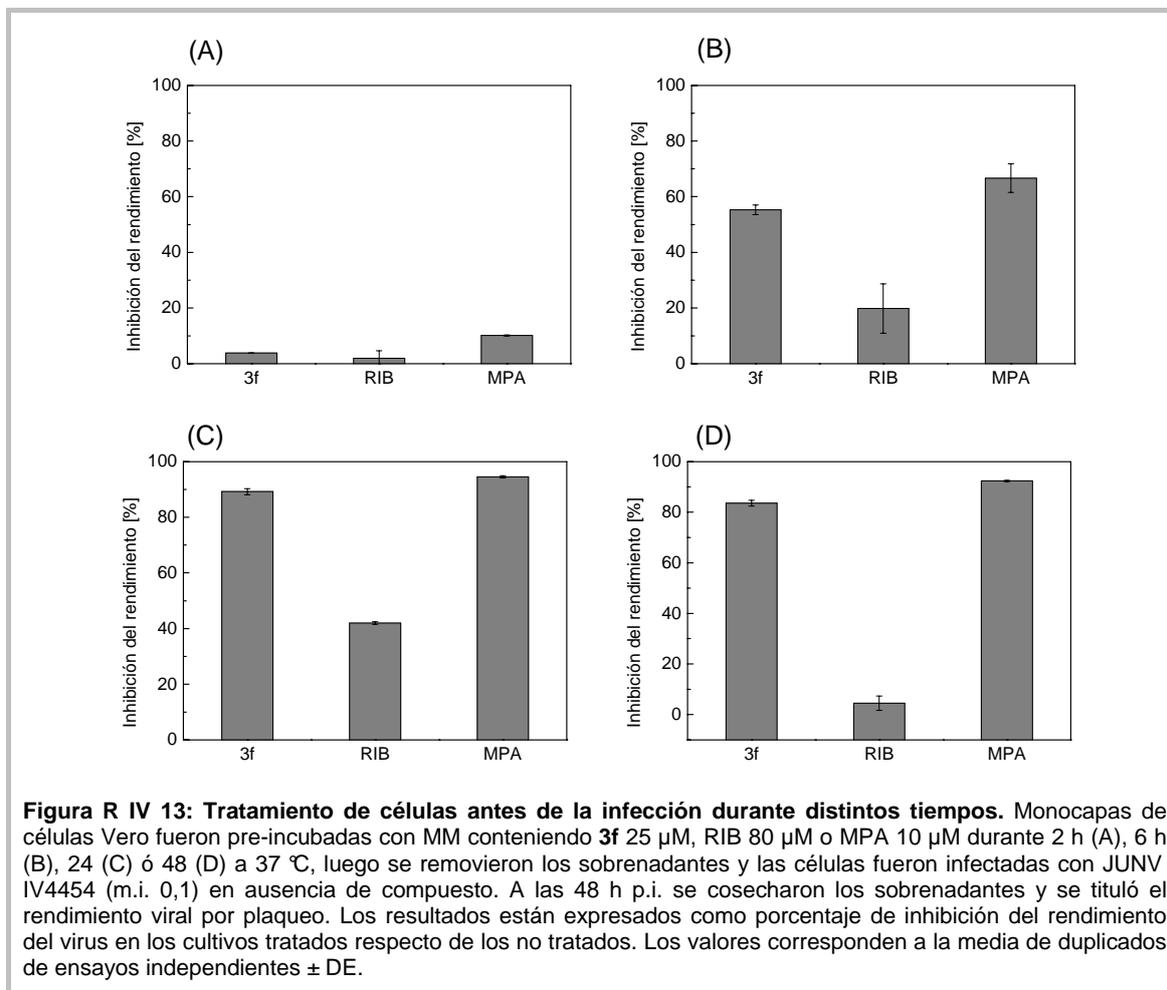
Figura R IV 12: Reversión de la síntesis del RNA viral por el agregado de guanosina exógena. Células Vero fueron infectadas con JUNV y tratadas con 3f 25 μM, MPA 10 μM o RIB 80 μM en presencia o en ausencia de guanosina 200 μM. Luego de 48 h, se extrajo el RNA total y se sintetizó el cDNA con oligonucleótidos aleatorios. El cDNA fue utilizado como molde para amplificar el gen viral z y el gen *actina* como normalizador celular mediante PCR en tiempo real. Los resultados están expresados como cantidades relativas de RNA viral respecto al CV. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes ± DE.

Por lo tanto, la reversión incompleta de la infectividad y de la síntesis de RNA viral de JUNV producida por la guanosina sugiere que la IMPDH sería un blanco de acción de 3f y que la reducción de los niveles de GTP producidos por la inhibición de esta enzima contribuirían a su actividad antiviral, pero éste no sería el único mecanismo operante para la inhibición de la síntesis de RNA viral.

R IV 3.7. Efecto del tratamiento de células con 3f antes de la infección por tiempos prolongados

En base a los resultados del ítem anterior sobre la participación de la enzima IMPDH en el mecanismo inhibitorio ejercido por la acridona 3f, se planteó la posibilidad de la inducción de un estado refractario a la infección en los cultivos mediante un tratamiento de las células previo a la infección por un tiempo prolongado que permitiera la depleción de GTP. Como se mostró en la Figura R IV 3, el pretratamiento por 2 h no produjo inhibición en la infección. Como ese tiempo puede no ser suficiente para producir una adecuada disminución en los niveles intracelulares de GTP (Meredith *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998), se decidió ensayar tiempos de

tratamiento previos a la infección más prolongados y probar en esas condiciones si se produce inhibición en la producción viral. Los tiempos ensayados fueron 2, 6, 24 y 48 h de pretratamiento con **3f**, y simultáneamente también se analizó el efecto sobre la infección con JUNV de RIB y MPA.



Como se observa en la Figura R IV 13, el pretratamiento de células Vero durante 2 h con las tres drogas no produjo inhibición en la multiplicación de JUNV, tal como se había observado previamente para **3f** (Figura R IV 3). Sin embargo, al incrementar el tiempo de pretratamiento se observa un creciente efecto inhibitorio tanto para **3f** como para MPA, siendo mínimas las variaciones con RIB. La similitud del comportamiento de **3f** y MPA ante la infección por JUNV por pretratamientos prolongados de las células y por adición de guanosina exógena sugiere que en ambos casos las drogas estarían actuando sobre la IMPDH celular, en tanto que por el contrario, dicha enzima no sería un blanco preponderante para RIB en las infecciones con JUNV.

R IV 3.8. Efecto de **3f** sobre la liberación de partículas virales

Para evaluar si existe algún efecto de **3f** sobre la etapa tardía de liberación de partículas virales, se realizó la comparación del rendimiento viral en el sobrenadante y el virus infeccioso asociado a células luego de 24 ó 48 h de tratamiento con el compuesto. El nivel de inhibición fue similar tanto en el título intracelular como extracelular (Figura R IV 14) indicando que la totalidad del virus producido fue liberado al sobrenadante, por lo que podría descartarse una acción de **3f** sobre la salida de JUNV.

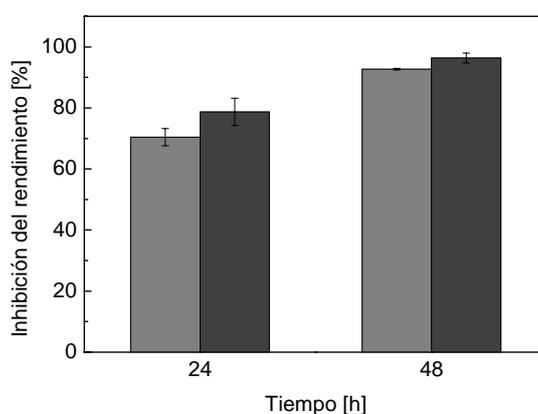


Figura R IV 14: Efecto de **3f sobre la liberación de partículas.** Células Vero fueron infectadas con JUNV cepa IV 4454 (m.i. 0,1), luego de 1 h de adsorción a 37 °C, el inóculo fue removido y las células cubiertas con MM conteniendo o no 25 µM de **3f**. A las 24 y 48 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se tituló el rendimiento viral extracelular por plaqueo (barras grises). Las monocapas celulares se lavaron con PBS y se rompieron por 3 ciclos de congelado/descongelado, los restos celulares se separaron por centrifugación (10 min a 3000 x g) y se cuantificó el virus infeccioso en el sobrenadante mediante UFP (barras negras). Los resultados están expresados como porcentaje de inhibición del rendimiento del virus en los cultivos tratados respecto del control viral no tratado. Los valores corresponden a la media de duplicados de ensayos independientes ± DE.

R IV 4. Conclusiones

La actividad antiviral de **3f** fue independiente del inóculo viral inicial. El compuesto mostró la inducción de un estado refractario a la infección con JUNV en pre-tratamientos prolongados (6, 24 y 48 h de pre-tratamiento), observándose una disminución en el rendimiento viral a las 48 h. Por el contrario, el pretratamiento de virus con el compuesto, no produjo cambios sobre la infectividad remanente.

La acción inhibitoria de este compuesto parecería afectar pasos tempranos de la infección viral sin bloquear la entrada del virus a la célula.

Se observó que **3f** afecta la síntesis del RNA viral, determinándose casi 3 log de inhibición en células infectadas con JUNV y tratadas con **3f** en comparación con

las células infectadas no tratadas. Como consecuencia de esta inhibición, se observó una marcada disminución en la expresión de antígenos virales en las células infectadas y tratadas.

El agregado de guanosina exógena rescató parcialmente la infectividad de JUNV y los niveles de RNA viral en las células tratadas con **3f** en una manera dosis-dependiente, por lo que la enzima celular IMPDH estaría involucrada en la acción antiviral de la acridona, aunque no en forma exclusiva.

No se observaron efectos del compuesto sobre la liberación de partículas virales, descartándose un efecto de **3f** sobre la salida de JUNV.

| Discusión

En el presente trabajo se realizó la evaluación de la actividad biológica de diversos agentes químicos que incluyeron disulfuros aromáticos, disulfuros de tiuramo, tiosulfonas y acridonas, encontrándose compuestos con una muy selectiva actividad antiviral y potente efecto virucida contra varios miembros de la familia *Arenaviridae*. De un total de treinta y cinco compuestos ensayados, el disulfuro de tiuramo NSC14560 y la acridona **3f** resultaron los más efectivos agentes antivirales, con altos índices de selectividad. En particular la acridona **3f** mostró un nivel de selectividad para JUNV muy superior a RIB, la única droga actualmente en uso clínico para el tratamiento de FH causadas por arenavirus. Por su parte, el disulfuro aromático NSC4492 mostró el efecto virucida más potente, en tanto que las tiosulfonas fueron totalmente inactivas.

Los compuestos disulfuros fueron elegidos para ser evaluados por sus actividades anti-arenavirus en base a los estudios previos realizados en el laboratorio utilizando diversos quimiotipos, tales como disulfuros, ditianos, derivados azoicos y derivados de hidrazida, con conocida reactividad contra motivos zinc-*finger* en retrovirus. Entre estos compuestos, algunos disulfuros aromáticos y ditianos fueron capaces de inactivar viriones de JUNV y LCMV a través de modificaciones irreversibles en la proteína de matriz Z (García *et al.*, 2006, 2009). En el presente trabajo, estos estudios fueron extendidos confirmándose la capacidad virucida de los disulfuros aromáticos contra los arenavirus. Dos nuevos compuestos, el derivado aromático de carboxamida NSC4492 y el amino-derivado NSC71033 mostraron una mejora en la eficacia para inactivar JUNV en comparación a los otros derivados de disulfuros, en el rango de concentraciones submicromolar a micromolar, convirtiendo a estos agentes en herramientas muy promisorias para aplicaciones profilácticas.

Una característica interesante que presentaron estos hallazgos es el espectro de actividad frente a arenavirus del Nuevo y Viejo Mundo exhibida tanto por compuestos inactivantes como por los antivirales. El efecto inactivante del agente virucida NSC4492 contra los tres arenavirus ensayados fue dosis-dependiente hasta una concentración de 5 μM , y en la concentración máxima probada de 10 μM el nivel de inactivación viral aumentó aún más, llegando a un rango de inhibición del 96-100%, según la especie de virus. Por otro lado, el compuesto antiviral NSC14560 fue más efectivo contra JUNV cepa IV4454 en comparación con su actividad contra otros arenavirus.

La cinética de inactivación de NSC4492 demostró la capacidad de este compuesto de inactivar JUNV a los pocos minutos de estar en contacto con el virus y

en forma dependiente de la temperatura, ya que se observó un efecto virucida mucho menor a bajas temperaturas, siendo la inactivación máxima a 20 y 37 °C. NSC4492 también fue capaz de actuar dentro de la célula infectada, reduciendo moderadamente el rendimiento viral en el sobrenadante extracelular luego de 48 h de tratamiento. La CE_{50} resultó de 27,7 μ M, muy superior a su CI_{50} , determinando que la relación entre CE_{50}/CI_{50} , es decir, la relación entre la actividad antiviral y la virucida, para este compuesto sea de 162,0, valor suficientemente alto como para destacar su eficacia para inactivar la infectividad de los viriones de JUNV por sobre sus efectos en la multiplicación intracelular del virus.

En cuanto a los posibles blancos virales de NSC4492, se encararon distintos abordajes experimentales para determinar si alguna o varias proteínas virales portadoras de motivos *zinc-finger* se ven afectadas por el tratamiento con el compuesto.

Mediante la medición de la adsorción a la célula hospedadora de las partículas inactivadas con NSC4492 fue posible analizar la posibilidad de un efecto del compuesto sobre las proteínas que conforman el complejo GP. Cabe recordar que la proteína GP2 presenta en su dominio citoplasmático, un motivo con capacidad de unir zinc formado por dos arreglos que coordinan dos átomos de zinc. El primero de los arreglos posee la secuencia HHCH y el segundo la secuencia HCC que al incorporar una C presente en el SSP forma una “inter-subunidad” *zinc-finger* que es esencial para que el SSP sea retenido en el complejo GP maduro (York *et al.*, 2007; Briknarová *et al.*, 2011).

Niveles similares de RNA viral adsorbido fueron determinados en los cultivos infectados con viriones control como en los infectados con viriones previamente inactivados con el compuesto, sugiriendo que la funcionalidad biológica del complejo GP, no estaría afectada en las partículas inactivadas por NSC4492. Quedan pendientes de estudio aquellos procesos en los cuales GP2 participa activamente y determinar si se muestran alterados en presencia del compuesto.

La proteína Z de los arenavirus contiene un dominio central *RING-finger* conformado por un patrón altamente conservado de residuos de cisteínas e histidinas, requeridas para un adecuado plegamiento de la proteína (Borden, 2000). La funcionalidad de esta proteína de matriz, conectando la envoltura lipídica viral con la nucleocápside interna (Neuman *et al.*, 2005) es motivo de continuos estudios. Sin embargo, no hay dudas de que la proteína Z es crítica para el ensamblaje y la

brotación del virus (Perez *et al.*, 2003; Strecker *et al.*, 2003; Casabona *et al.*, 2009; Loureiro *et al.*, 2011) como así también para regular la transcripción y la replicación del RNA (Garcin *et al.*, 1993; López *et al.*, 2001; Cornu & de la Torre, 2002). También sería requerida para el desnudamiento del virión (García *et al.*, 2009). Asimismo, se vio que la disrupción o mutación de la estructura del *RING* de Z impide algunas de esas funciones biológicas (Cornu & de la Torre, 2002; Jácamo *et al.*, 2003; Casabona *et al.*, 2009). Siendo que dos tercios de los residuos que conforman esta proteína se encuentran formando el dominio *RING*, sería lógico pensar a Z como otro posible blanco viral responsable de la inactivación de JUNV producida por el compuesto. Evaluamos entonces los efectos del compuesto sobre la proteína Z mediante el empleo de sistemas de genética reversa.

Cuando los cultivos transfectados con el plásmido que codifica para la proteína Z de JUNV fueron tratados con NSC4492, no se observaron efectos sobre el autoensamblaje ni la brotación de Z-VLPs ya que los porcentajes de liberación analizados por *Western-blot* en condiciones reductoras y no reductoras no mostraron diferencias entre los cultivos tratados y los controles. Sin embargo, la interacción de NSC4492 con Z puede deducirse a partir de la alteración observada en el patrón electroforético de esta proteína, con una importante formación de multímeros que se detectan, principalmente, en las Z-VLPs. El mismo fenómeno de aparición de multímeros de alto peso molecular se observó en el tratamiento de la proteína Z recombinante de LCMV con el disulfuro NSC20625 (García *et al.*, 2006). La alteración conformacional detectada en la proteína Z por efecto de NSC4492 no impide la formación de partículas tipo virales, lo que sugeriría que el motivo *RING-finger* de Z no sería necesario para la funcionalidad de Z en la brotación viral. Existen claras evidencias que demuestran que la sola expresión de Z es suficiente para la formación y liberación de Z-VLPs, (Pérez *et al.*, 2003; Strecker *et al.*, 2003; Urata *et al.*, 2006; Casabona *et al.*, 2009, Schlie *et al.*, 2010), en esos trabajos se destacan la importancia de la presencia del residuo G2 correspondiente al sitio de miristilación en el extremo N-terminal de Z y la integridad de los motivos tardíos presentes en el extremo C-terminal de la proteína de cada uno de los distintos arenavirus para que pueda llevarse a cabo la liberación de Z-VLPs. Además, utilizando mutantes de Z del virus JUNV, se determinó que la integridad del motivo *RING-finger* no sería necesaria para que ocurra el ensamblaje y la brotación viral, (Casabona *et al.*, 2009) ya que fue posible determinar la formación de Z-VLPs con la mutante que no posee el motivo *RING-finger* funcional. Nuestras observaciones serían coincidentes con estos resultados.

Asimismo, para evaluar el efecto del compuesto sobre la RNP viral, se ensayó el efecto de NSC4492 sobre la expresión del minigenoma pS-CAT como gen reportero en conjunto con los plásmidos que expresan las distintas proteínas virales. Se observó una disminución de la señal de CAT en presencia de NSC4492, lo que indicaría una inhibición en la transcripción viral. De los dos componentes proteicos que integran la RNP, cabe esperar que sea NP la proteína afectada y no L ya que NP posee un sitio de unión a zinc del tipo CHCC, (Parisi *et al.*, 1996, Tortorici *et al.*, 2001b) que potencialmente podría ser blanco para la acción del compuesto.

El efecto inhibitorio sobre el sistema completo en el que se incluyen el total de las proteínas virales y el minigenoma se visualiza con mayor intensidad.

Una posible explicación de esta observación es que el compuesto pudiera estar actuando sobre varias proteínas virales, con lo cual, el efecto inhibitorio se iría adicionando de acuerdo a la presencia de las proteínas blanco del compuesto dentro del sistema. Por lo tanto, la afectación de los motivos presentes en estas proteínas debido a la presencia del compuesto, podría generar la interacción entre ellas formándose asociaciones no funcionales que podrían generar un impedimento estérico entre las proteínas no afectadas por el compuesto e impedir que las mismas lleven a cabo su función biológica.

Cabe aclarar que la concentración de compuesto utilizada en estos ensayos fue menor a la CE_{50} determinada por el ensayo antiviral en infecciones con JUNV en células Vero, con lo cual, podría esperarse que algunas de las proteínas expresadas mediante transfección, pudieran escapar a la acción del compuesto y cumplir su rol dentro del ciclo viral. Con lo cual, otra opción sería considerar el efecto inhibitorio de la proteína Z sobre la síntesis del RNA viral (Cornu & de la Torre, 2001; López *et al.*, 2001), el cual se sumaría al efecto inhibitorio del compuesto sobre la maquinaria transcripcional produciendo una mayor inhibición de la expresión del gen reportero en el sistema completo. Este efecto regulatorio lo ejercerían las proteínas que no se hubiesen visto afectadas por el compuesto, ya que para esa función de Z, se requiere un motivo *RING-finger* intacto (Cornu & de la Torre, 2002; Jácomo *et al.*, 2003; Casabona *et al.*, 2009; Loureiro *et al.*, 2011).

El potente efecto virucida exhibido por NSC4492 sobre los arenavirus, hace considerar al compuesto como una promisorio herramienta no solamente por su probable uso profiláctico sino también como una posible aplicación para la generación de virus inactivados vacunales. Es por ello que se decidió estudiar la capacidad

replicativa de los viriones inactivados con NSC4492 para determinar si esas partículas son incapaces de llevar a cabo su ciclo replicativo dentro del hospedador.

A tal fin, pudo determinarse mediante RT-PCR cuantitativa en los tiempos iniciales de la transcripción y replicación viral, que las partículas virales previamente inactivadas con NSC4492 tienen impedida la capacidad de síntesis de RNA y que esa inhibición en los niveles de RNA viral conlleva a la no detección de los antígenos virales en las células infectadas con los viriones inactivados.

Estas dos observaciones permitirían concluir que las partículas inactivadas son completamente incapaces de replicar dentro de la célula hospedadora, convirtiendo al compuesto NSC4492 en un buen candidato para su uso como sustancia inactivante para generar vacunas a virus inactivado. Resta analizar la respuesta inmunológica generada por estos viriones no infecciosos dentro del hospedador y la reactividad de los anticuerpos producidos frente a un desafío con virus infeccioso.

Respecto de los disulfuros de tiuramo, el análisis de una variedad de esta clase de compuestos permitió detectar sustancias con una acción inhibitoria muy eficaz, ejercida primordialmente durante la multiplicación intracelular de los arenavirus. Los disulfuros de tiuramo representan una clase interesante de compuestos a ser examinados, dado que un miembro de este grupo, el disulfuro de tetraetiltiuramo (disulfiram o Antabuse), es una droga farmacológicamente activa aprobada por más de 50 años por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos para el tratamiento en la dependencia por el alcohol (Suh *et al.*, 2006). El disulfiram presentó actividad antiviral contra arenavirus, aunque con poca selectividad (García *et al.*, 2000). Los disulfuros de tiuramo poseen la estructura general R1-C(S)-S-S-(S)C-R2 y difieren entre sí por la naturaleza de los grupos R. En este trabajo se ensayaron disulfuros de tiuramo con diversos sustituyentes en R1 y R2 en búsqueda de compuestos más selectivos, permitiendo identificar al compuesto alifático asimétrico NSC14560 como un muy efectivo inhibidor de la multiplicación de los arenavirus, sin afectar la viabilidad celular.

En general, los disulfuros mostraron bajos niveles de citotoxicidad mediante el ensayo de MTT en células estacionarias, con valores de CC_{50} superiores a 100 μ M para la mayoría de ellos, con algunas excepciones. En particular, el análisis de la síntesis de proteínas celulares no reveló diferencias entre los cultivos tratados con NSC1560 y los controles. Cuando el efecto se evaluó sobre cultivos de células en crecimiento, pudo determinarse que NSC14560 posee efectos antiproliferativos con

una CC_{50} de 87,4 μ M. Además, también se observó una eficacia comparable en la acción antiviral de NSC14560 contra JUNV usando células de mono, hámster o humanas, sugiriendo que la actividad no es única para una clase particular de célula de mamífero. Los valores de CE_{50} en una variedad de líneas celulares fueron menores que 10 μ M, con índices de selectividad en el rango de 55,9-85,7, confirmando la eficacia de la inhibición ejercida por NSC14560.

En cuanto a la reversibilidad y estabilidad de la acción antiviral de NSC14560, se observó que la inhibición del rendimiento viral no es reversible y que decae con el transcurso de los días si el compuesto no es renovado. Esto sugiere que la concentración de compuesto disminuye en el medio de cultivo con el transcurso del tiempo permitiendo que aquellas partículas que escaparon a la acción antiviral puedan replicar normalmente y recuperar, paulatinamente, el título viral. Posibles causas de esta pérdida de acción antiviral por parte del compuesto podrían ser que sea metabolizado por las células o que se vuelva inestable en solución acuosa y ya no pueda ejercer su efecto; además, como los disulfuros son agentes oxidantes fuertes, el ambiente reductor del interior celular podría producir la reducción de los grupos activos de los compuestos y así perder su capacidad oxidativa; hasta el momento no hay datos certeros sobre la estabilidad de estos compuestos en tiempos prolongados.

Si bien la actividad antiviral de NSC14560 es independiente del tipo celular, se observó un incremento de la CE_{50} a una m.i. muy elevada de 10. El mecanismo molecular de este tipo de compuesto aún no está claramente dilucidado pero el blanco de acción antiviral podría tratarse de una proteína viral debido a esta relación con la dosis inicial viral inoculada. El experimento de tiempo de adición mostró evidencias de que este compuesto parecería ejercer su efecto durante todo el ciclo de replicación de JUNV ya que durante todo el intervalo de tiempo analizado (1-9 h p.i.), el nivel de inhibición observado nunca fue menor al 95%. El estudio de las distintas etapas del ciclo de multiplicación viral señalaría a la síntesis de RNA viral como probable blanco antiviral, habiéndose determinado un 50% de inhibición en las cantidades relativas de RNA viral respecto al control a tiempos tan tempranos como las 7 h p.i. Es factible considerar que ese nivel de inhibición podría amplificarse con la sucesiva acumulación de ciclos replicativos del virus y llegar a los valores de inhibición observados en el rendimiento viral a las 48 h (90%).

Como consecuencia de la reducción en la síntesis del RNA, la expresión de las proteínas virales NP y GPC/GP1 también estuvo inhibida en presencia del compuesto en células infectadas. En particular para la glicoproteína de la envoltura, el porcentaje

de inhibición en la fluorescencia citoplasmática fue similar a la obtenida con la tinción de membrana, indicando que la reducción en la inserción de la glicoproteína en la membrana es una consecuencia de la reducción en la expresión de la proteína en las células tratadas. Por otro lado, no hubo alteraciones en la expresión proteica después de la transfección de plásmidos que expresaron en forma individual NP, Z y GPC/GP1, corroborando así que la síntesis del RNA viral sería el evento mayoritariamente afectado por NSC14560.

Está demostrada la reactividad de los disulfuros de tiuramo con los dominios zinc-*finger* de la proteína retroviral NCp7 (Rice *et al.*, 1996), entonces, puede hipotetizarse que, como se vio para otros compuestos basados en disulfuros activos contra los arenavirus (García *et al.*, 2006), el disulfuro de tiuramo podría interactuar con los motivos de unión a zinc presentes en las proteínas virales, en particular con los de las proteínas NP y Z de los arenavirus. Como se ha mencionado anteriormente ambas proteínas participan activamente en la síntesis del RNA de los arenavirus, que sería la etapa mayoritariamente afectada por NSC14560. Sin embargo, la probable reactividad de NSC14560 con estas proteínas virales aún no está probada y se requieren futuras investigaciones para dilucidar plenamente el blanco de este compuesto inhibidor selectivo de arenavirus.

Como otra forma de relacionar la capacidad inhibitoria de los disulfuros estudiados con la presencia de proteínas portadoras de motivos zinc-*finger*, se estudió su efecto sobre otros virus no relacionados a *Arenaviridae*. Todos los virus ensayados en este trabajo, además de los arenavirus, presentan proteínas con motivos zinc-*finger* o estructuras similares ricas en cisteínas, a excepción de VSV que carece de este tipo de motivos en todas sus proteínas. HSV-1, posee una proteína regulatoria no estructural, ICP0, con un motivo *RING-finger* similar al de JUNV, con la secuencia CCCHCCCC (Moriuchi *et al.*, 1994). La proteína NS5 (proteína no estructural 5) de DENV, posee dos motivos de unión a zinc (*zinc binding pocket*) HHCC y HCC (Yap *et al.*, 2007). Esta proteína con actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA es esencial para la replicación viral. PV posee una proteína no estructural con actividad ATPasa, 2C, con un motivo rico en cisteínas cerca de su extremo carboxi-terminal que se asemeja a un zinc-*finger*, con la secuencia CCHCC, implicado en la unión al RNA; se sabe que esta proteína está involucrada en una variedad de funciones durante la replicación viral como el reordenamiento de la célula hospedadora para la replicación del RNA y la encapsidación (Pfister *et al.*, 2000). La proteína V de MV posee un dominio zinc-*finger* en su extremo carboxi-terminal muy conservado dentro de los

miembros de la familia *Paramyxoviridae*, cuya secuencia es HCCCCCCC (Liston & Brindis, 1994). Esta proteína no estructural tiene la capacidad de interactuar con otras proteínas virales como la polimerasa L o la proteína P y con factores de transcripción celulares (Schuhmann *et al.*, 2011).

A pesar de la presencia de estas proteínas, se observó susceptibilidad variable frente a los compuestos NSC14560 y NSC4492 por los distintos virus. En general, hubo mayor reactividad con los virus que portan motivos del tipo *RING-finger* como JUNV y HSV, pero también hubo actividad, aún cuando más débil, con virus con otra clase de estructura *zinc-finger* o carentes de esta clase de secuencias como es el caso de VSV. Estas diferencias podrían estar relacionadas al tipo de arreglo de los aminoácidos que participan en la coordinación de las moléculas de zinc en los distintos motivos, haciéndolos más o menos vulnerables al ataque nucleofílico del compuesto. La selectividad del compuesto por los diferentes motivos de unión a zinc podría deberse a la interacción de múltiples factores, incluyendo la afinidad por la unión al ligando, la proximidad al ligando reactivo y a propiedades redox suficientes como para realizar la reacción. Al respecto, se demostró experimental y computacionalmente que agentes antivirales efectivos contra HIV cuyo blanco de acción es la proteína NCp7 reaccionaron selectivamente con el motivo *zinc-finger* de la misma causando muy poca o ninguna alteración de las funciones de proteínas celulares con otros tipos de motivos de unión a zinc (Huang *et al.*, 1998).

El hecho de que la replicación de VSV así como la infectividad del virión se vieran moderadamente afectadas por tratamiento con NSC4492 careciendo las proteínas de este virus de motivos de unión a zinc, hace también considerar la posibilidad de otro blanco diferente para esta clase de compuestos debido a su capacidad oxidante. Se ha visto que la oxidación de los tioles correspondientes a los residuos de cisteína provocan el bloqueo de la infectividad de virus como herpesvirus (Mirazimi *et al.*, 1999), retrovirus (Ryser *et al.*, 1994), alphavirus (Abell & Brown, 1993), paramixovirus (Jain *et al.*, 2007), hepatitis B (Abou-Jaoudé & Sureau, 2007) y coronavirus (Gallagher, 1996). En trabajos con hantavirus y compuestos como *N*-etilmeleimida (NEM) y ácido 5,5'-ditio-*bis*-2-nitrobenzoico (DTNB), que son también compuestos reactivos con motivos *zinc-finger* (Strandin *et al.*, 2011), se ha descrito distinto grado de susceptibilidad a los mismos entre virus pertenecientes al mismo género. Los autores atribuyen estas diferencias a variaciones en la eficiencia de alquilación de los compuestos, que podrían explicarse por diferencias en su velocidad de reacción y en la dependencia del pH, así como por la accesibilidad a dichos

agentes de las cisteínas reactivas. El amplio espectro de acción inhibitoria de los disulfuros ensayados en este trabajo de tesis también podría deberse a su capacidad oxidativa sobre los grupos tioles de las cisteínas de algunas proteínas virales, probablemente sumado a una reactividad más específica sobre los motivos *RING-finger* en JUNV y HSV. Asimismo, aunque se trabajó con concentraciones no citotóxicas para las células Vero de acuerdo al ensayo de MTT, no puede descartarse en el caso del compuesto antiviral NSC14560 que alguna proteína celular necesaria para el ciclo de vida viral, en alguna de las especies virales ensayadas, se vea afectada por el compuesto, siendo así parcialmente responsable de los niveles de inhibición observados.

La experiencia de los estudios realizados hasta el presente por distintos grupos con agentes reactivos con proteínas portadoras de motivos *zinc-finger* como agentes antivirales ha tratado siempre de encontrar aquellos compuestos que mostraran mayor selectividad en su capacidad de reacción con las proteínas virales que con las proteínas celulares (Huang *et al.*, 1998; García *et al.*, 2006). Sin embargo, siempre está latente la posibilidad de una reactividad, aunque sea mínima, con algún factor celular. Es por ello que parecen más promisorias las perspectivas de los agentes inactivantes respecto de los antivirales para esta clase de compuestos. Vale la pena considerar no solamente su probable uso profiláctico sino también una posible aplicación para la generación de virus inactivados vacunales.

Los compuestos 2-2'-ditiopiridina (AT-2) y NEM, mostraron ser potentes inactivantes de retrovirus mediante la modificación covalente de los motivos *zinc-finger* de la nucleocápside, y son usualmente utilizados para inactivar partículas de diferentes virus para ser empleadas como potenciales vacunas. En trabajos con HIV, SIV, DENV y hantavirus (Rossio *et al.*, 1998; Arthur *et al.*, 1998; Morcock *et al.*, 2005) se comprobó que la inactivación de viriones con estos compuestos oxidantes preserva la funcionalidad y la inmunoreactividad de las glicoproteínas virales, como así también la integridad del virión y fueron patentados como mecanismo de generación de partículas vacunales. Dado que los viriones inactivados con NSC4492 se unen a las células de manera similar a los viriones no tratados, parecería que la funcionalidad de las glicoproteínas virales y la integridad del virión permanecen intactas. Una perspectiva interesante es la realización de estudios de reconocimiento por el sistema inmune de las partículas de JUNV inactivadas con NSC4492 a fin de establecer sus propiedades inmunogénicas y el potencial de esta clase de compuestos como agentes inactivantes de aplicación para vacunas.

El otro hallazgo importante de este estudio es la primera demostración de la potente actividad antiviral de derivados de acridonas, capaces de bloquear la multiplicación *in vitro* de virus causantes de FH pertenecientes a la familia *Arenaviridae*, como lo es JUNV. Aquí se llevó a cabo la selección y caracterización de compuestos activos contra los arenavirus dentro de una serie de *N*-alil acridonas sintéticas.

A pesar de que la diversidad estructural de los derivados ensayados impide una comparación más sustantiva de la relación estructura-actividad en este momento, el análisis de este grupo de acridonas evidencia algunas tendencias iniciales de sustituyentes funcionales con su impacto en la actividad antiviral. La *N*-sustitución con grupos carbohidratos por ciclo-adición generó derivados muy citotóxicos, mientras que los *N*-alil derivados fueron el grupo más selectivo de inhibidores virales. La presencia de sustituyentes halogenados en las *N*-alil acridonas, en general, redujo la toxicidad e incrementó el efecto antiviral. En particular, la sustitución 6-cloro parece ser un elemento importante, mientras la sustitución con halógeno en otra posición del anillo A o B condujo a una mejora menor de la actividad antiviral. En efecto, los índices de selectividad de los compuestos más activos **3c** y **3f** fueron significativamente mayores que los valores reportados en la literatura para otras clases de derivados de acridonas ensayados frente a otros virus (Fujiwara *et al.*, 1999; Bastow, 2004; Goodell *et al.*, 2006; Tabarrini *et al.*, 2006; Stankiewicz-Drogón *et al.*, 2010). Adicionalmente, estos dos compuestos exhibieron actividad antiviral contra arenavirus del Nuevo y Viejo Mundo sin producir efectos sobre la viabilidad celular. También es de destacar que la actividad antiviral contra JUNV de **3f**, el inhibidor más potente de esta serie de compuestos, fue similar independientemente de la multiplicidad de infección del inóculo inicial en el rango 0,2-40,0 UFP/cel. Los reportes sobre la dependencia con la dosis viral inicial de varios agentes antivirales son muy variables. La falta de dependencia de la potencia antiviral con el inóculo de virus infeccioso se ha observado con varios tipos de agentes antivirales (Rice *et al.*, 1997; Stránská *et al.*, 2002; Whitby *et al.*, 2005; Talarico & Damonte, 2007; Artuso *et al.*, 2009), y representa una ventaja clara para los compuestos tales como **3f** contra JUNV que presentan esta propiedad, ya que permite bloquear la infección incluso en presencia de altas dosis iniciales de virus.

Los experimentos sobre la influencia del tiempo de adición de la droga realizados para estimar el período del ciclo replicativo de JUNV inhibido por **3f** permitieron determinar una fuerte inhibición, mayor a 3 log, cuando la droga se agregó

hasta las 5 h p.i., y un efecto menor a tiempos más tardíos con reducciones en el título de 1 a 1,5 log. Estos datos sugieren que la mayor acción antiviral de **3f** se ejerce dentro de los estadios tempranos y/o intermedios de la replicación de JUNV, quedando presumiblemente descartado un efecto sobre la salida del virus.

Hilando más finamente sobre los eventos tempranos, se determinó que **3f** no afecta la adsorción ni la internalización de las partículas virales ya que la adición de la acridona sólo después de la adsorción fue tan efectiva como cuando estuvo presente en los períodos de adsorción y post-adsorción.

El proceso de síntesis del RNA viral parece ser el blanco mayor de la acción antiviral de **3f**. Se observó una importante inhibición sobre la síntesis del RNA tanto en los comienzos del proceso de síntesis en un ciclo de multiplicación viral como luego de la acumulación de varios ciclos de vida, afectando por igual a todos los genes virales estudiados. El mecanismo de acción de los inhibidores cuyo blanco es el RNA viral podría involucrar tanto factores virales y/o factores de la célula hospedadora participantes en la síntesis del RNA viral. Algunas sustancias derivadas de acridonas han sido reportadas como potentes inhibidores de la IMPDH (Watterson *et al.*, 2007), una enzima que se ha probado que es el blanco principal de RIB, MPA, tiazofurina, selenazofurina y otros compuestos estudiados como potenciales agentes contra algunos virus con genoma de RNA altamente patogénicos (Nair *et al.*, 2007). Esta enzima es clave en la biosíntesis de nucleótidos de guanosina y su inhibición produce el descenso de la biodisponibilidad de los niveles intracelulares de GTP y con ello la inhibición de la replicación viral; esta última inhibición pudo ser revertida con la administración exógena de guanosina (Leyssen *et al.*, 2005; Nair *et al.*, 2009). Cuando se evaluó la posible interferencia de **3f** con esta enzima, se pudo determinar una reversión parcial del efecto inhibitorio en presencia simultánea en el cultivo de **3f** y guanosina, sugiriendo que posiblemente la inhibición de la IMPDH esté involucrada en la actividad antiviral de la acridona. La reversión con el agregado de guanosina fue parcial tanto para la recuperación de partículas infectivas como para la síntesis del RNA viral lo cual indicaría que habría también otro modo de acción operando en la acción inhibitoria de la síntesis de RNA ejercida por **3f**.

Es interesante comparar los efectos de **3f** contra JUNV con otros inhibidores conocidos de la IMPDH con actividad antiviral frente a varios virus, como lo son RIB y MPA. RIB es un análogo de nucleósido que una vez dentro de la célula primeramente se transforma en RIB-5'-monofosfato y de esta forma se convierte en un inhibidor competitivo de la IMPDH (Streeter *et al.*, 1973). Luego, por sucesivas fosforilaciones

se forma la especie RIB-5'-trifosfato, a la cual se le han propuesto otros mecanismos antivirales como la inhibición directa de la RNA polimerasa viral (Eriksson *et al.*, 1977; Toltzis *et al.*, 1988; Rankin *et al.*, 1989), la inhibición de la adición del cap en el extremo 5' de los mRNAs virales (Goswami *et al.*, 1979) y la inducción de un estado designado "catástrofe por errores" como resultado de la acumulación de mutaciones (Graci & Cameron, 2002). Existen evidencias que respaldan cada uno de los mecanismos de acción propuestos para RIB y distintas combinaciones virus/hospedador pueden alentar uno o más de estos mecanismos durante la terapia antiviral. En el caso particular de los arenavirus existen claras evidencias de que el mecanismo de acción de RIB para LCMV y LASV no está mayormente enfocado en la inhibición de la IMPDH, como sí se describe para otros virus como flavivirus y paramixovirus (Leyssen *et al.*, 2005), sino que estaría mayormente involucrada la polimerasa viral (Ruiz-Jarabo *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2011; Ölschläger *et al.*, 2011). Nuestros experimentos con RIB y guanosina también indican que la depleción del GTP intracelular no es dominante para RIB en la inhibición de JUNV.

MPA es un inhibidor no competitivo de la IMPDH y que no deriva de nucleósido, con muy conocidos efectos inmunosupresivos, y efectivo contra la multiplicación de varios virus (Kitchin *et al.*, 1997; Hermann & Coombs, 2004; Takhampunya *et al.*, 2006; Marroquí *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2011; Sebastián *et al.*, 2011). En este trabajo se muestra por primera vez la muy potente acción antiviral de esta droga contra la multiplicación de JUNV; esta inhibición fue fuertemente revertida cuando el medio se suplementó con guanosina, incluso a bajas concentraciones. De acuerdo a esto, la actividad anti-JUNV del MPA estuvo sin dudas asociada con la depleción del nivel intracelular de GTP a través del bloqueo de la IMPDH, además de demostrar la alta susceptibilidad de la replicación de JUNV a esta vía de inhibición celular. Recientemente se demostró un mecanismo similar de inhibición del MPA contra LASV (Ölschläger *et al.*, 2011).

En los últimos tiempos, diversas sustancias de origen natural y sintéticas basadas en acridona han sido propuestas como agentes con múltiples blancos, con propiedades anticancerígenas y antimicrobianas contra parásitos, virus y hongos (Hedge *et al.*, 2004; Belmont *et al.*, 2007; Vispé *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009) renovando el interés sobre el potencial terapéutico de estos compuestos bioactivos. Específicamente sobre la actividad antiviral, los derivados de acridona mostraron ser inhibidores de diferentes virus, incluyendo virus con genoma de DNA como adenovirus (Zarubaev *et al.*, 2003) y herpesvirus (Bastow, 2004), tanto como

virus con genoma de RNA tales como el HIV (Fujiwara *et al.*, 1999), el virus de la diarrea viral bovina (Tabarrini *et al.*, 2006) y HCV (Manfroni *et al.*, 2009; Stankiewicz-Drogon *et al.*, 2010). Para este último flavivirus, la acción antiviral también fue debida a la inhibición de la síntesis del RNA viral y por la inhibición de la actividad de enzimas virales como la RNA helicasa y, probablemente, la RNA polimerasa.

Adicionalmente, los derivados de acridona tienen la habilidad de intercalarse en los ácidos nucleicos, alterando el sitio de reconocimiento de las enzimas y/o la asociación de las mismas al ácido nucleico modificado (Adams, 2002). Stankiewicz-Drogon *et al.* (2010) encontraron una fuerte preferencia por la doble cadena de RNA en las propiedades intercalantes de algunos inhibidores de HCV basados en acridonas, pero los autores no pudieron dilucidar si estos compuestos afectan la síntesis del RNA sólo a través de esta intercalación, o si también hay una interacción directa del compuesto con las enzimas virales o la combinación de ambos efectos.

La reversibilidad del efecto inhibitorio sobre JUNV de **3f** por el agregado de guanosina fue intermedio entre lo observado para RIB y MPA y estos resultados son consistentes con que el compuesto posea más de un blanco de acción, tal como se ha reportado para otras acridonas. Un posible blanco celular estaría representado por la enzima IMPDH mientras el/los otros blancos potenciales aún no están identificados, presumiblemente un blanco viral dada la alta selectividad del compuesto, podría estar contribuyendo a la actividad antiviral de **3f** contra la síntesis de RNA de los arenavirus. La identificación de todos los blancos de acción de las acridonas *N*-sustituidas en el ciclo de multiplicación viral así como la evaluación de una mayor cantidad de compuestos derivados a partir de las estructuras más activas aquí analizadas permitirá nuevas investigaciones respecto a la relación estructura-actividad en este sistema.

En cuanto al efecto celular ejercido por **3f**, se determinó que el mismo se ve influido por el tiempo de tratamiento con el compuesto, ya que con seis horas de pre-tratamiento previas a la infección con JUNV se observó una reducción del 55% en el rendimiento viral y ese efecto se intensificó a más del 80% con pre-tratamientos más prolongados (24-48 h); niveles similares de inhibición se observaron en el pre-tratamiento con MPA. Esta observación coincide con trabajos anteriores en donde se mide el nivel de GTP en función del tiempo en cultivos tratados con MPA a concentraciones del mismo orden a la utilizada en este trabajo (Meredith *et al.*, 1997). Allí, los máximos descensos en el contenido de GTP (83%) y en la relación GTP/GDP (86%) en líneas celulares pancreáticas se produjeron a las seis horas de cultivo en

presencia de MPA 3,125 μ M. De acuerdo a nuestros resultados, podría considerarse que serían necesarias al menos seis horas para disminuir el nivel de GTP de las células y poder así visualizar los efectos inhibitorios de **3f** sobre la IMPDH.

En conclusión, este estudio presenta nuevas alternativas para el tratamiento y prevención de las FH causadas por arenavirus, tanto en lo que respecta a drogas con propiedades inactivantes como antivirales de muy buena potencia y selectividad como el disulfuro NSC4492 y la acridona **3f**. El hallazgo y la caracterización de nuevas moléculas con amplio espectro de acción inhibitoria como las aquí estudiadas representan un punto de partida promisorio para futuros desarrollos, ante la carencia actual de agentes específicos y selectivos para enfrentar a estos virus, en continua y creciente emergencia en América y África.

| Bibliografía

Bibliografía

- Abell BA & Brown DT (1993) Sindbis virus membrane fusion is mediated by reduction of glycoprotein disulfide bridges at the cell surface. *J Virol* 67:5496-5501.
- Abou-Jaoudé G & Sureau C (2007). Entry of hepatitis delta virus requires the conserved cysteine residues of the hepatitis B virus enveloped protein antigenic loop and is blocked by inhibition of thiol-disulfide exchange. *J Virol* 81:13057-13066.
- Abraham J, Corbett KD, Farzan M, Choe H, Harrison SC (2010). Structural basis for receptor recognition by New World hemorrhagic fever arenaviruses. *Nat Struct Mol Biol* 17:438-444.
- Acosta EG, Bruttomesso AC, Bisceglia JA, Wachsman MB, Galagovsky LR, Castilla V (2008): Dehydroepiandrosterone, epiandrosterone and synthetic derivatives inhibit Junín virus replication *in vitro*. *Virus Res* 135:203-212.
- Adams A (2002). Crystal structures of acridines complexed with nucleic acids. *Curr Med Chem* 9(18):1667-75.
- Agnihothram SS, York J, Nunberg JH (2006). Role of the stable signal peptide and cytoplasmic domain of G2 in regulating intracellular transport of the Junín virus envelope glycoprotein complex. *J Virol* 80:5189-5198.
- Andrei G, De Clercq E (1990). Inhibitory effect of selected antiviral compounds on arenavirus replication *in vitro*. *Antiviral Res* 14:287-300.
- Andrei G, De Clercq E (1993). Molecular approaches for the treatment of hemorrhagic fever virus infections. *Antiviral Res* 22:45-75.
- Archer AA & Rico-Hesse R (2002). High genetic divergence and recombination in arenaviruses from the Americas. *Virology* 304:274-281.
- Arthur LO, Bess JW, Chertova EN, Rossio JL, Esser MT, Benveniste RE, Henderson LE, Lifson JD (1998). Chemical inactivation of retroviral infectivity by targeting nucleocapsid protein zinc fingers: a candidate SIV vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14(3):S311-S319.
- Artuso MC, Ellenberg PC, Scolaro LA, Damonte EB, García CC (2009). Inhibition of Junín virus replication by small interfering RNAs. *Antiviral Res* 84:31-37.
- Atkin S, Anaraki S, Gothard P, Walsh A, Brown D, Gopal R, Hand J, Morgan D (2009). The first case of Lassa fever imported from Mali to the United Kingdom, February 2009. *Euro Surveill* 14(10), pii 19145.
- Auperin DD, Galinski M, Bishop DH (1984). The sequences of the N protein gene and intergenic region of the S RNA of Pichinde arenavirus. *Virology* 134(1):208-19.
- Barradas JS, Errea MI, D'Accorso NB, Sepúlveda CS, Damonte EB (2011). Imidazo[2,1-b]thiazole carbohydrate derivatives: Synthesis and antiviral activity against Junin virus, agent of Argentine hemorrhagic fever. *Eur J Med Chem*. 46(1):259-64.

- Bartolotta S, García CC, Candurra NA, Damonte EB (2001). Effect of fatty acids on arenavirus replication: inhibition of virus production by lauric acid. *Arch Virol* 146(4):777-90.
- Barton LL & Mets MB (2001): Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: decade of rediscovery. *Clin Infect Dis* 33:370-374.
- Bastow KF (2004). New acridone inhibitors of human herpes virus replication. *Curr Drug Targets Infect Disord* 4:323–330.
- Belmont P, Bosson J, Godet T, Tiano M (2007). Acridine and acridone derivatives, anticancer properties and synthetic methods: where are we now? *Anticancer Agents Med Chem* 7(2):139-69.
- Beyer WR, 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.
- Bieniasz PD (2006). Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 344(1)55–63.
- Bolken TC, Laquerre S, Zhang Y, Bailey TR, Pevear DC, Kickner SS, Sperzel LE, Jones KF, Warren TK, Amanda Lund S, Kirkwood-Watts DL, King DS, Shurtleff AC, Guttieri MC, Deng Y, Bleam M, Hruby DE (2006). Identification and characterization of potent small molecule inhibitor of hemorrhagic fever New World arenavirus. *Antiviral Res* 69:86-97.
- Borden KLB, Campbell Dwyer EJ, Carlile GW, Djavani M, Salvato MS (1998a). Two RING finger proteins, the oncoprotein PML and the arenavirus Z protein, colocalize with the nuclear fraction of the ribosomal P proteins. *J Virol* 72:3819–3826.
- Borden KLB, Campbell Dwyer EJ, Salvato MS (1998b). An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm. *J Virol* 72, 758–766.
- Borden KL (2000). RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol* 295:1103–1112.
- Bossi P, Van Loock F, Tegnell A, Gouvras G; Task Force on Biological and Chemical Agent Threats, Public Health Directorate, European Commission, Luxembourg (2004). Bichat guidelines for the clinical management of haemorrhagic fever viruses and bioterrorism-related haemorrhagic fever viruses. *Eur Surveill* 9(12):E11-E12.
- Bowen MD, Peters CJ, Nichol ST (1996). The phylogeny of New World (Tacaribe Complex) arenaviruses. *Virology* 219:285-290.
- Bowick GC, Fennewald SM, Scott EP, Zhang L, Elsom BL, Aronson JF, Spratt HM, Luxon BA, Gorenstein DG, Herzog NK (2007). Identification of differentially activated cell-signaling networks associated with Pichinde virus pathogenesis by using systems kinomics. *J Virol* 81(4):1923-33.
- Bredenbeek PJ, Molenkamp R, Spaan WJ, Deubel V, Marianneau P, Salvato MS, Moshkoff D, Zapata J, Tikhonov I, Patterson J, Carrion R, Ticer A, Brasky K,

- Lukashevich IS (2006). A recombinant yellow fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *Virology* 345(2):299-304.
- Briese T, Paweska JT, McMullan LK, Hutchison SK, Street C, Palacios G, Khristova ML, Weyer J, Swanepoel R, Egholm M, Nichol ST, Lipkin WI (2009). Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever-associated arenavirus from southern Africa. *PLoS Pathog.* 5(5):e1000455.
- Briknarová K, Thomas CJ, York J, Nunberg JH (2011). Structure of a zinc-binding domain in the Junin virus envelope glycoprotein. *J Biol Chem* 14;286(2):1528-36.
- Buchmeier MJ (2002). Arenaviruses: protein structure and function. *Curr Top Microbiol Immunol* 262:159-73.
- Buchmeier MJ, Peters CJ, de la Torre JC (2007). *Arenaviridae*: the viruses and their replication. In: *Knipe, D.M., Holey, P.M. (Eds.), Fields Virology*, 2(5):1792–1827.
- Burns J & Buchmeier M (1993). Glycoproteins of the Arenaviruses. In: *The Viruses*. Wagner, R. & Frankel Conrat, H. Eds. Plenum Press, New York. 17-31
- Cajimat MNB, Milazzo ML, Bradley RD, Fulhorst CF (2007). Catarina virus, an arenaviral species principally associated with *Neotoma micropus* (Southern plains woodrat) in Texas. *Am J Trop Med Hyg* 77:732-736.
- Cajimat MNB, Milazzo ML, Borchert JN, Abbott KD, Bradley RD, Fulhorst CF (2008). Diversity among Tacaribe serocomplex viruses (family *Arenaviridae*) naturally associated with the Mexican woodrat (*Neotoma mexicana*). *Virus Res.* 133(2):211-217.
- Campbell Dwyer EJ, Lai H, MacDonald RC, Salvato MS, Borden KLB (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):3293–3300.
- Cao W, Henry MD, Borrow P, Yamada H, Elder JH, Ravkov EV, Nichol ST, Compans RW, Campbell KP, Oldstone MB (1998). Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* 282:2079-2081.
- Capul AA, Perez M, Burke E, Kunz Z, Buchmeier MJ, de la Torre JC (2007). Arenavirus Z-glycoprotein association requires Z myristoylation but not functional RING or late domains. *J Virol* 81:9451-9460.
- Casabona JC, Levingston MacLeod JM, Loureiro ME, Gomez GA, Lopez N, (2009). The RING domain and the L79 residue of Z protein are involved in both the rescue of nucleocapsids and the incorporation of glycoproteins into infectious chimeric arenavirus-like particles. *J Virol* 83:7029-39.
- Cashman KA, Smith MA, Twenhafel NA, Larson RA, Jones KF, Allen RD 3rd, Dai D, Chinsangaram J, Bolken TC, Hrubby DE, Amberg SM, Hensley LE, Guttieri MC (2011). Evaluation of Lassa antiviral compound ST-193 in a guinea pig model. *Antiviral Res* 90(1):70-9.

- Castilla V, Mersich SE, Candurra NA, Damonte EB (1994). The entry of Junin virus into Vero cells. *Arch Virol* 136:363-374.
- Castilla V, Larzábal M, Aguirre Sgalippa N, Wachsmann MB, Coto CE (2005). Antiviral mode of action of a synthetic brassinosteroid against Junín virus replication. *Antiviral Res* 68:88-95.
- Charrel RN, Feldmann H, Fulhorst CF, Khelifa R, de Chese R, de Lamballerie X (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* 296:1118-1124.
- Charrel RN, de Lamballerie X, Emonet S (2008). Phylogeny of the genus Arenavirus. *Curr Opin Microbiol* 11:362-368.
- Charrel RN & de Lamballerie X (2010). Zoonotic aspects of arenavirus infections *Vet Microbiol* 140:213-220.
- Contigiani MS, Sabattini MS (1977). Virulencia diferencial de cepas de virus Junín por marcadores biológicos en ratones y cobayos. *Medicina (Bs. Aires)* 37(3):244-251.
- Cordo SM, Candurra NA, Damonte EB (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* 75:9415–9426.
- Cornu TI, de la Torre JC (2002). Characterization of the arenavirus RING finger protein regions required for Z-mediated inhibition of viral RNA synthesis. *J Virol* 76:6678–6688.
- Crowcroft NS (2002). Management of Lassa fever in European countries. *Eur Surveill* 7(1):50-52.
- Cummins D, McCormick JB, Bennett D, Samba JA, Farrar B, Machin SJ, Fisher-Hoch SP (1990). Acute sensorineural deafness in Lassa fever. *JAMA* 264:2093-2096.
- Damonte EB, Pujol CA, Coto CE (2004). Prospects for the therapy and prevention of dengue virus infections. *Adv. Virus Res.* 63:239-285.
- De Clercq E, Cools M, Balzarini J, Snoeck R, Andrei G, Hosoya M, Shigeta S, Ueda T, Minakawa N, Matsuda A (1991). Antiviral activities of 5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4- carboxamide and related compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 35(4):679-84.
- de Guerrero LB, Weissenbacher MC, Parodi AS, (1969). Inmunización contra la fiebre hemorrágica argentina con una cepa atenuada de virus Junín. *Medicina (Buenos Aires)* 29:1–5.
- de la Torre JC (2005). Arenavirus extinction through lethal mutagenesis. *Virus Res* 107,207-14.

- de la Torre JC (2009). Molecular and cell biology of the prototypic arenavirus LCMV: implications for understanding and combating hemorrhagic fever arenaviruses. *Ann N Y Acad Sci* 1171 Suppl 1:e57-64
- Delgado S, Erickson BR, Agudo R, Blair PJ, Vallejo E, Albariño CG, Vargas J, Comer JA, Rollin PE, Ksiazek TG, Olson JG, Nichol ST (2008). Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia. *PLoS Pathog.* 18;4(4):e1000047.
- Di Simone C, Zandonatti MA, Buchmeier MJ (1994). Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike. *Virology* 198:455-465.
- Djavani, M, Lukashevich IS, Sanchez A, Nichol ST, Salvato MS (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, Topisirovic I, Zapata JC, Sadowska M, Yang Y, Rodas J, Lukashevich IS, Bogue CW, Pauza CD, Borden KL, Salvato MS (2005). The proline-rich homeodomain (PRH/HEX) protein is downregulated in liver during infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 79:2461–2473.
- 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.
- Drosten C, Kümerer BM, Schmitz H, Günther S (2003). Molecular diagnostics of viral hemorrhagic fevers. *Antiviral Res* 57:61-87.
- Eichler R, Lenz O, Strecker T, Eickmann M, Klenk HD, Garten W (2003). Identification of Lassa virus glycoprotein signal peptide as a trans-acting maturation factor. *EMBO Rep.* 4:1084–1088.
- Eichler R, Lenz O, Strecker T, Eickmann M, Klenk HD, Garten W (2004a). Lassa virus glycoprotein signal peptide displays a novel topology with an extended endoplasmic reticulum luminal region. *J Biol Chem* 279:12293–12299.
- Eichler R, Strecker T, Kolesnikova L, ter Meulen J, Weissenhorn W, Becker S, Klenk HD, Garten W, Lenz O (2004b). Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP). *Virus Res* 100:249-55.
- Ellenberg P, Linero MF, Scolaro LA (2007). Superinfection exclusion in BHK-21 cells persistently infected with Junín virus. *J Gen Virol* 88(Pt 10):2730-2739.
- Enría DA & Maiztegui JI (1994). Antiviral treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 23:23-31.
- Enría DA & Barerra Oro JG (2002). Junin virus vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* 263:239-264.
- Enría DA, Briggiler AM, Sánchez Z (2008). Treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 78:132-139.

- Eriksson B, Helgstrand E, Johansson NG, Larsson A, Misiorny A, Norén JO, Philipson L, Stenberg K, Stening G, Stridh S, Öberg B (1977). Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate. *Antimicrob Agents Chemother* 11:946–951.
- Fan L, Briese T, Lipkin WI (2010). Z proteins of New World arenaviruses bind RIG-I and interfere with type I interferon induction. *J Virol* 84(4):1785-91.
- Fisher SA, Graham MB, Kuehnert MJ, Kotton CN, Srinivasan A, Marty FM, Comer JA, Guarner J, Paddock CD, DeMeo DL, Shieh WJ, Erickson BR, Bandy U, DeMaria A Jr, Davis JP, Delmonico FL, Pavlin B, Likos A, Vincent MJ, Sealy TK, Goldsmith CS, Jernigan DB, Rollin PE, Packard MM, Patel M, Rowland C, Helfand RF, Nichol ST, Fishman JA, Ksiazek T, Zaki SR; LCMV in Transplant Recipients Investigation Team. (2006). Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *N Engl J Med* 354(21):2235-2249.
- Fisher-Hoch SP, Gborie S, Parker L, Huggins J (1992). Unexpected adverse reactions during a clinical trial in rural West Africa. *Antiviral Res* 19:139-147.
- Flanagan ML, Oldenburg J, Reignier T, Holt N, Hamilton GA, Martin VK, Cannon PM (2008). New World Clade B arenaviruses can use transferrin receptor 1 (TfR1)-dependent and independent entry pathways, and glycoproteins from human pathogenic strains are associated with the use of TfR1. *J Virol* 82:938-948.
- Freed EO (2002). Viral late domains. *J Virol* 76(10):4679–4687.
- Fujiwara M, Okamoto M, Okamoto M, Watanabe M, Machida H, Shigeta S, Konno K, Yokota T, Baba M. (1999). Acridone derivatives are selective inhibitors of HIV-1 replication in chronically infected cells. *Antiviral Res* 43:179–189.
- Furuta Y, Takahashi K, Fukuda Y, Kuno M, Kamiyama T, Kozaki K, Nomura N, Egawa H, Minami S, Watanabe Y, Narita H, Shiraki K. (2002). In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob Agents Chemother* 46:977-981.
- Furuta Y, Takahashi K, Shiraki K, Sakamoto K, Smee DF, Barnard DL, Gowen BB, Julander JG, Morrey JD (2009). T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res* 82:95-102.
- Gallagher TM (1996). Murine coronavirus membrane fusion is blocked by modification of thiols buried within the spike protein. *J Virol* 70:4683-4690.
- Gallaher WR, DiSimone C, Buchmeier MJ (2001). The viral transmembrane superfamily: possible divergence of Arenavirus and Filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor. *BMC Microbiol* 1:1.
- García CC, Candurra NA, Damonte EB (2000). Antiviral and virucidal activities against arenaviruses of zinc-finger active compounds. *Antiviral Chem Chemother* 11:231–238.
- García CC, Candurra NA, Damonte EB (2002). Mode of inactivation of arenaviruses by disulfide-based compounds. *Antiviral Res* 55:437–446.

- García CC, Candurra, NA, Damonte EB (2003a). Differential inhibitory action of two azoic compounds against arenaviruses. *Int J Antimicrob Agents* 21:319–324.
- García CC, Brousse BN, Carlucci MJ, Moglioni AG, Martins Alho M, Moltrasio GY, D'Accorso NB, Damonte EB (2003b). Inhibitory effect of thiosemicarbazone derivatives on Junin virus replication *in vitro*. *Antivir Chem Chemother* 14(2):99-105.
- García CC, Djavani M, Topisirovic I, Borden KLB, Salvato MS, Damonte EB (2006). Arenavirus Z protein as an antiviral target: virus inactivation and protein oligomerization by zinc finger-reactive compounds. *J Gen Virol* 87:1217–1228.
- García CC, Ellenberg PC, Artuso MC, Scolaro LA, Damonte EB (2009). Characterization of Junín virus particles inactivated by a zinc finger-reactive compound. *Virus Res* 143, 106–113.
- García CC, Sepúlveda CS, Damonte EB (2011). Novel therapeutic targets for arenavirus hemorrhagic fevers. *Future Virology* 6(1) 27-44.
- 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(2):807–812.
- Goodell JR, Madhok AA, Hiasa H, Ferguson DM (2006). Synthesis and evaluation of acridine- and acridone-based anti-herpes agents with topoisomerase activity. *Bioorg Med Chem* 14:5467-5480.
- Goswami BB, Borek E, Sharma OK, Fujitaki J, Smith RA (1979). The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits capping of mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 89:830–836.
- Geisbert TW, Jones S, Fritz EA, Shurtleff AC, Geisbert JB, Liebscher R, Grolla A, Ströher U, Fernando L, Daddario KM, Guttieri MC, Mothé BR, Larsen T, Hensley LE, Jahrling PB, Feldmann H (2005). Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever. *PLoS Med* 2(6)e183.
- Gowen BB, Wong MH, Jung KH, Sanders AB, Mendenhall M, Bailey KW, Furuta Y, Sidwell RW (2007). *In vitro* and *in vivo* activities of T-705 against arenavirus and bunyavirus infections. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3168-3176.
- Gowen BB, Smee DF, Wong MH, Hall JO, Jung KH, Bailey KW, Stevens JR, Furuta Y, Morrey JD (2008). Treatment of late stage disease in a model of arenaviral hemorrhagic fever: T-705 efficacy and reduced toxicity suggests an alternative to ribavirin. *PLoS One* 3:e3725.
- Gowen BB, Wong MH, Larson D, Ye W, Jung KH, Sefing EJ, Skirpstunas R, Smee DF, Morrey JD, Schneller SW (2010). Development of a new Tacaribe arenavirus infection model and its use to explore antiviral activity of a novel aristeromycin analog. *PLoS One* 16;5(9) pii: e12760.
- Graci JD & Cameron CE (2006). Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev Med Virol* 16:37-48.
- Guillerm G, Guillerm D, Vandenplas-Vitkowski C, Glapski C, De Clercq E (2003). Inactivation of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase with novel 5'

- thioadenosine derivatives. Antiviral effects. *Bioorg Med Chem Lett* 13(10):1649-52.
- Guinea R & Carrasco L (1994). Concanamycin A: a powerful inhibitor of enveloped animal-virus entry into cells. *Biochem Biophys Res Commun* 201:1270-1278.
- Günther S, Hoofd G, Charrel R, Röser C, Becker-Ziaja B, Lloyd G, Sabuni C, Verhagen R, van der Groen G, Kennis J, Katakweba A, Machang'u R, Makundi R, Leirs H (2009). Mopeia virus-related arenavirus in Natal multimammate mice, Morogoro, Tanzania. *Emerg Infect Dis*. 15:2008-2012.
- Haas WH, Breuer T, Pfaff G, Schmitz H, Köhler P, Asper M, Emmerich P, Drosten C, Gölnitz U, Fleischer K, Günther S (2003). Imported Lassa fever in Germany: surveillance and management of contact persons. *Clin Infect Dis* 36(10):1254-1258.
- Hedge R, Thimmaiah P, Yerigeri MC, Krishnegowda G, Thimmaiah KN, Houghton PJ (2004). Anti-calmodulin acridone derivatives modulate vinblastine resistance in multidrug resistant (MDR) cancer cells. *Eur J Med Chem* 39(2):161-77.
- Hermann LL & Coombs KM (2004). Inhibition of Reovirus by Mycophenolic Acid Is Associated with the M1 Genome Segment. *J Viro* 78(12):6171–6179.
- Howard CR (1993). Antigenic diversity among the arenaviruses. In: *The Arenaviridae*. Salvato MS (Ed.), Plenum Press, New York, USA, 37-49.
- 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. *J Med Chem* 41(9):1371-81.
- Itoigawa M, Ito C, Wu TS, Enjo F, Tokuda H, Nishino H, Furukawa H (2003). Cancer chemopreventive activity of acridone alkaloids on Epstein-Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett* 193:133–138.
- Jácamo R, López N, Wilda M, Franze-Fernández MT (2003). Tacaribe virus Z protein interacts with the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis. *J Virol* 77:10383–10393.
- Jain S, McGinnes LW, Morrison TG (2007). Thiol/disulfide exchange is required for membrane fusion directed by the Newcastle disease virus fusion protein. *J Virol* 81:2328-2339.
- Jamieson DJ, Kourtis AP, Bell M, Rasmussen SA (2006). Lymphocytic choriomeningitis virus: and emerging obstetric pathogen? *Am J Obst Gynecol* 194:1532-1536.
- Kelly JX, Smilkstein MJ, Cooper RA, Lane KD, Johnson RA, Janowsky A, Dodean RA, Hinrichs DJ, Winter R, Riscoe M (2007). Design, synthesis, and evaluation of 10-*N*-substituted acridones as novel chemosensitizers in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 51(11):4133-40.
- Kelly JX, Smilkstein MJ, Brun R, Wittlin S, Cooper RA, Lane KD, Janowsky A, Johnson RA, Dodean RA, Winter R, Hinrichs DJ, Riscoe MK (2009). Discovery of dual function acridones as a new antimalarial chemotype. *Nature* 459(7244):270-3.

- Kentsis A, Dwyer EC, Perez JM, Sharma M, Chen A, Pan ZQ, Borden KLB (2001). The RING domains of the promyelocytic leukemia protein PML and the arenaviral protein Z repress translation by directly inhibiting translation initiation factor eIF4E. *J Mol Biol* 312(4):609–623.
- Kernéis S, Koivogui L, Magassouba N, Koulemou K, Lewis R, Aplogan A, Grais RF, Guerin PJ, Fichet-Calvet E (2009). Prevalence and risk factors of Lassa seropositivity in inhabitants of the forest region of Guinea: A cross-sectional study. *PLoS Negl Trop Dis* 3(11):e548.
- Khan M, Dhanwani R, Patro IK, Rao PV, Parida MM (2011). Cellular IMPDH enzyme activity is a potential target for the inhibition of Chikungunya virus replication and virus induced apoptosis in cultured mammalian cells. *Antiviral Res* 89(1):1-8.
- Kitchin JE, Pomeranz MK, Pak G, Washenik K, Shupack JL (1997). Rediscovering mycophenolic acid: a review of its mechanism, side effects, and potential uses. *J Am Acad Dermatol* 37:445–449.
- Kitching A, Addiman S, Cathcart S, Bishop L, Krahé D, Nicholas M, Coakley J, Lloyd G, Brooks T, Morgan D, Turbitt D (2009). A fatal case of Lassa fever in London, January 2009. *Euro Surveill* 14(6), pii 19117.
- Kunz S, Edelmann KH, de la Torre JC, Gorney R, Oldstone MBA (2003). Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions. *Virology* 314:168-178.
- Kunz S, Rojek JM, Perez M, Spiropoulou CF, Oldstone MB (2005). Characterization of the interaction of Lassa fever virus with its cellular receptor alpha-dystroglycan. *J Virol* 79:5979-5987.
- Larson RA, Dai D, Hosack VT, Tan Y, Bolken TC, Hruby DE, Amberg SM (2008). Identification of a broad-spectrum arenavirus entry inhibitor. *J Virol* 82:10768-10775.
- Lecompte E, Fichet-Calvet E, Daffis S, Koulémou K, Sylla O, Kourouma F, Doré A, Soropogui B, Aniskin V, Allali B, Kouassi Kan S, Lalis A, Koivogui L, Günther S, Denys C, ter Meulen J (2006). *Mastomys natalensis* and Lassa fever, West Africa. *Emerg Infect Dis* 12(12):1971-1974.
- Lecompte E, ter Meulen J, Emonet S, Daffis S, Charrel RN (2007). Genetic identification of Kodoko virus, a novel arenavirus of the African pigmy mouse (*Mus Nannomys minutoides*) in West Africa. *Virology* 364:178-183.
- Lee KJ, Novella IS, Teng MN, Oldstone MB, de la Torre JC (2000). NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *J Virol* 74:3470-7.
- Lee KJ, Perez M, Pinschewer DD, de la Torre JC (2002). Identification of the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) proteins required to rescue LCMV RNA analogs into LCMV-like particles. *J Virol* 76(12):6393-6397.
- Lee AM, Rojek JM, Spiropoulou CF, Gundersen AT, Jin W, Shaginian A, York J, Nunberg JH, Boger DL, Oldstone MB, Kunz S (2008a). Unique small molecule

- entry inhibitors of hemorrhagic fever arenaviruses. *J Biol Chem* 283:18734-18742.
- Lee AM, Rojek JM, Gundersen A, Ströher U, Juteau JM, Vaillant A, Kunz S (2008b). Inhibition of cellular entry of lymphocytic choriomeningitis virus by amphipathic DNA polymers. *Virology* 372:107-117.
- Leyssen P, Balzarini J, De Clercq E, Neyts J (2005). The predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral activity *in vitro* against flaviviruses and paramyxoviruses is mediated by inhibition of IMP dehydrogenase. *J Virol* 79(3):1943-1947.
- Leyssen P, De Clercq E, Neyts J (2008). Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. *Antiviral Res* 78:9-25.
- Li G, Segu VBG, Rebaglia ME, Luo R-H, Kowluru A, Metz SA (1998). Prolonged depletion of guanosine triphosphate induces death of insulin-secreting cells by apoptosis. *Endocrinology* 139(9) 3752-3762.
- Linero FN, Scolaro LA (2009). Participation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in Junin virus replication *in vitro*. *Virus Res* 145(1):166-70.
- Liston P and Briedis DJ (1994). Measles virus V protein binds zinc. *Virology* 198:399-404.
- López N, Jácamo R, Franze-Fernández MT (2001). Transcription and RNA replication of Tacaribe virus genome and antigenome analogs require N and L proteins: Z protein is an inhibitor of these processes. *J Virol*. 75(24):12241–12251.
- López NM & Franze-Fernández MT (2007). A single stem-loop structure in Tacaribe arenavirus intergenic region is essential for transcription termination but is not required for a correct initiation of transcription and replication. *Virus Res* 124:237-244.
- Loureiro ME, Wilda M, Levingston Macleod JM, D'Antuono A, Foscaldi S, Marino Buslje C, López N (2011). Molecular determinants of arenavirus Z protein homo-oligomerization and L polymerase binding. *J Virol* 85(23):12304-12314.
- Lowden CT, Bastow KF (2003). Cell culture replication of herpes simplex virus and, or human cytomegalovirus is inhibited by 3,7-dialkoxylated, 1-hydroxyacridone derivatives. *Antiviral. Res* 59:143-154.
- Lukashevich IS, Djavani M, Shapiro K, Sanchez A, Ravkov E, Nichol ST, Salvato MS (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(3):547-51.
- Lukashevich IS, Carrion R Jr, Salvato MS, Mansfield K, Brasky K, Zapata J, Cairo C, Goicochea M, Hoosien GE, Ticer A, Bryant J, Davis H, Hammamieh R, Mayda M, Jett M, Patterson J (2008). Safety, immunogenicity, and efficacy of the ML29 reassortant vaccine for Lassa fever in small non-human primates. *Vaccine* 26(41)5246-5254.
- Macher AM & Wolfe MS (2006). Historical Lassa fever reports and 30-year clinical update. *Emerg Infect Dis* 12:835-836.

- Maisa A, Ströher U, Klenk HD, Garten W, Strecker T. Source (2009). Inhibition of Lassa virus glycoprotein cleavage and multicycle replication by site 1 protease-adapted alpha(1)-antitrypsin variants. *PLoS Negl Trop Dis*. 3(6):e446.
- Maiztegui JI, McKee KT Jr, Barrera Oro JG, Harrison LH, Gibbs PH, Feuillade MR, Enria DA, Briggiler AM, Levis SC, Ambrosio AM, Halsey NA, Peters CJ (1998). Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentina hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 177(2):277-283.
- Manfroni G, Paeshuysse J, Massari S, Zanoli S, Gatto B, Maga G, Tabarrini O, Cecchetti V, Fravolini A, Neyts J (2009). Inhibition of subgenomic hepatitis C virus RNA replication by acridone derivatives: identification of an NS3 helicase inhibitor. *J Med Chem* 28;52(10):3354-65.
- Marroquí L, Estepa A, Perez L (2008). Inhibitory effect of mycophenolic acid on the replication of infectious pancreatic necrosis virus and viral hemorrhagic septicemia virus. *Antiviral Res* 80(3):332-8.
- Martínez MG, Cordo SM, Candurra NA (2007). Characterization of Junin arenavirus cell entry. *J Gen Virol* 88:1776-1784.
- Martínez MG, Cordo SM, Candurra NA (2008). Involvement of cytoskeleton on Junin virus entry. *Virus Res* 138:17-25.
- McCormick JB, King IJ, Webb PA, Scribner CL, Craven RB, Johnson KM, Elliott LH, Belmont-Williams R (1986). Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N. Engl. J. Med.* 314(1):20-26.
- McCormick JB, Fisher-Hoch SP (2002). Lassa fever. *Curr Top Microbiol Immunol* 262:75-109.
- Mendenhall M, Russell A, Juelich T, Messina EL, Smee DF, Freiberg AN, Holbrook MR, Furuta Y, de la Torre JC, Nunberg JH, Gowen BB (2010). T-705 (favipiravir) inhibition of arenavirus replication in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(2):782-787.
- Mendenhall M, Russell A, Smee DF, Hall JO, Skirpstunas R, Furuta Y, Gowen BB (2011). Effective oral favipiravir (T-705) therapy initiated after the onset of clinical disease in a model of arenavirus hemorrhagic fever. *PLoS Negl Trop Dis* 5(10):e1342.
- Meredith M, Li G, Metz SA (1997). Inhibition of calcium-induced insulin secretion from intact HIT-T15 or INS-1 β cells by GTP depletion. *Biochem Pharmacol* 53(12): 1873-1882
- Mersich SE, Damonte EB, Coto CE (1981). Induction of RNA polymerase II activity in Junin-virus infected cells. *Intervirology* 16:123-127.
- 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
- Milazzo ML, Cajimat MNB, Haynie ML, Abbott KD, Bradley RD, Fulhorst CF (2008). Diversity among Tacaribe serocomplex viruses (family *Arenaviridae*) naturally

- associated with the white-throated woodrat (*Neotoma albigula*) in the Southwestern United States. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8:523-540 (2008).
- Mirazimi A, Mousavi-Jazi M, Sundqvist VA, Svensson L (1999). Free thiol groups are essential for infectivity of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 80:2861-2865.
- Morcock DR, Thomas JA, Gagliardi TD, Gorelick RJ, Roser JD, Chertova EN, Bess JW, Ott DE, Sattentau OJ, Frank I, Pope M, Lifson JD, Henderson LE, Crise BJ (2005). Elimination of retroviral infectivity by N-ethylmaleimide with preservation of functional envelope glycoproteins. *J Virol* 79(3):1533-42.
- Moreno H, Gallego I, Sevilla N, de la Torre JC, Domingo E, Martín V (2011). Ribavirin can be mutagenic for arenaviruses. *J Virol* 85(14):7246-55.
- 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.
- Morrison HG, Goldsmith CS, Regnery HL, Auperin DD (1991). Simultaneous expression of the Lassa virus N and GPC genes from a single recombinant vaccinia virus. *Virus Res* 18(2-3):231-41.
- Moss B, Elroy-Stein O, Mizukami T, Alexander WA, Fuerst TR (1990). Product review. New mammalian expression vectors. *Nature* 348:91-92.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Meth.* 65:55-63.
- Müller S & Günther S (2007). Broad-spectrum antiviral activity of small interfering RNA targeting the conserved RNA termini of Lassa virus. *Antimicrob Agents Chemother* 51:2215-2218.
- Nair V, Shu Q (2007) Inosine monophosphate dehydrogenase as a probe in antiviral drug discovery. *Antivir Chem Chemother* 18:245-258.
- Nair V, Chi G, Shu Q, Julander J, Smee DF (2009) A heterocyclic molecule with significant activity against dengue virus. *Bioorg Med Chem Lett* 19(5):1425-1427.
- Neuman BW, Adair BD, Burns JW, Milligan RA, Buchmeier MJ, Yeager M, (2005). Complementarity in the supramolecular design of arenaviruses and retroviruses revealed by electron cryomicroscopy and image analysis. *J Virol* 79:3822–3830.
- Neuman BW, Bederka LH, Stein DA, Ting JP, Moulton HM, Buchmeier MJ (2011). Development of peptide-conjugated morpholino oligomers as pan-arenavirus inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 55(10):4631-8.
- O'Rourke D, Elliott G, Papworth M, Everett R, O'Hare P (1998). Examination of determinants for intranuclear localization and transactivation within the RING finger of herpes simplex virus type 1 IE110k protein. *J Gen Virol* 79(Pt 3):537-48.

- Ölschläger S, Neyts J, Günther S (2011). Depletion of GTP pool is not the predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral effect on Lassa virus. *Antiviral Res* 91(2):89-93.
- Palacios G, Druce J, Du L, Tran T, Birch C, Briese T, Conlan S, Quan PL, Hui J, Marshall J, Simons JF, Egholm M, Paddock CD, Shieh WJ, Goldsmith CS, Zaki SR, Catton M, Lipkin WI (2008). A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. *N Engl J Med* 358(19):991-998.
- Palacios G, Savji N, Hui J, Travassos da Rosa A, Popov V, Briese T, Tesh R, Lipkin WI (2010). Genomic and phylogenetic characterization of Merino Walk virus, a novel arenavirus isolated in South Africa. *J Gen Virol*. 91(5):1315-24.
- Parisi G, Echave J, Ghiringhelli D, Romanowski V (1996). Computational characterisation of potential RNA-binding sites in arenavirus nucleocapsid proteins. *Virus Genes* 13:247-54.
- 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):12978–12983.
- Perez M, Greenwald DL, de la Torre JC (2004). Myristoylation of the RING finger Z protein is essential for arenavirus budding. *J Virol* 78(20):11443-8.
- Pfister T, Jones EW, Wimmer E (2000). A cysteine-rich motif in Poliovirus protein 2C^{ATPase} is involved in RNA replication and binds zinc *in vitro*. *J Virol* 74(1):334–343.
- Pinschewer DD, Perez M, de la Torre JC (2003a). Role of the virus nucleoprotein in the regulation of lymphocytic choriomeningitis virus transcription and RNA replication. *J Virol* 77:3882–3887.
- Pinschewer DD, Perez M, Sanchez AB, de la Torre JC (2003b). Recombinant lymphocytic choriomeningitis virus expressing vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7895–7900.
- Pinschewer DD, Perez M, de la Torre, JC (2005). Dual role of the lymphocytic choriomeningitis virus intergenic region in transcription termination and virus propagation. *J Virol* 79:4519-26.
- Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* 8:3867–3874.
- Quirin K, Eschli B, Scheu I, Poort L, Kartenbeck J, Helenius A (2008). Lymphocytic choriomeningitis virus uses a novel endocytic pathway for infectious entry via late endosomes. *Virology* 378:21-33.
- Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, Kaelin K, Huber M, Dotsch C, Christiansen G, Billeter MA (1995). Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J* 14:5773–5784.
- Radoshitzky SR, Abraham J, Spiropoulou CF, Kuhn JH, Nguyen D, Li W, Nagel J, Schmidt PJ, Nunberg JH, Andrews NC, Farzan M, Choe H (2007). Transferrin

- receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature* 446: 92-96.
- Radoshitzky SR, Dong L, Chi X, Clester JC, Retterer C, Spurgers K, Kuhn JH, Sandwick S, Ruthel G, Kota K, Boltz D, Warren T, Kranzusch PJ, Whelan SP, Bavari S (2010). Infectious Lassa virus, but not filoviruses, is restricted by BST-2/tetherin. *J Virol* 84(20):10569-80.
- Rankin JT, Eppes SB, Antczak JB, Joklik WK (1989). Studies on the mechanism of the antiviral activity of ribavirin against reovirus. *Virology* 168:147–158.
- Reignier T, Oldenburg J, Flanagan ML, Hamilton GA, Martin VK, Cannon PM (2008). Receptor use by the Whitewater Arroyo virus glycoprotein. *Virology* 371:439-446.
- Rice WG, Turpin JA, Schaeffer CA, Graham L, Clanton D, Buckheit Jr RW, Zaharevitz D, Summers MF, Wallquist A, Covell DG (1996). Evaluation of selected chemotypes in coupled cellular and molecular target-based screens identifies novel HIV-1 zinc finger inhibitors. *J Med Chem* 39, 3603–3616.
- Rice WG, Turpin JA, Huang M, Clanton D, Buckheit Jr. RW, Covell DG, Wallquist A, McDonnell NB, De Guzman RN, Summers MF, Zalkow L, Bader JP, Haugwitz R, Sausville EA (1997). Azodicarbonamide inhibits HIV-1 replication by targeting the nucleocapsid protein. *Nat Med* 3, 341–345.
- Richmond JK & Baglole DJ (2003). Lassa fever: epidemiology, clinical features, and social consequences. *BMJ* 327:1271-1275.
- Rodas J & Salvato M (2006). Tales of mice and men: Natural History of Arenaviruses. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* Vol. 19:4.
- Rojek JM, Perez M, Kunz S (2008a). Cellular entry of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 82:1505-1517.
- Rojek JM, Sanchez AB, Nguyen NT, de la Torre JC, Kunz S (2008b). Different mechanism of cell entry by human-pathogenic Old World and New World arenaviruses. *J Virol* 82:7677-7687.
- Rojek JM, Lee AM, Nguyen N, Spiropoulou CF, Kunz S (2008c). Site 1 protease is required for proteolytic processing of the glycoproteins of the South American hemorrhagic fever viruses Junin, Machupo, and Guanarito. *J Virol* 82:6045–6051.
- Rojek JM, Pasqual G, Sanchez AB, Nguyen NT, de la Torre JC, Kunz S (2010). Targeting the proteolytic processing of the viral glycoprotein precursor is a promising novel antiviral strategy against arenaviruses. *J Virol* 84(1):573-84.
- Rojek JM & Kunz S (2008). Cell entry by human pathogenic arenaviruses. *Cell Microbiol* 10, 828-835.
- Romanowski V, & Bishop DH (1983). The formation of arenaviruses that are genetically diploid. *Virology* 126:87-95.
- Rossio JL, Esser MT, Suryanarayana K, Schneider DK, Bess JW, Vazquez GM, Wiltrout TA, Chertova E, Grimes MK, Sattentau Q, Arthur LO, Henderson LE,

- Lifson JD (1998). Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. *J Virol* 72(10):7992-8001.
- Rugiero HR, Astarloa L, Gonzalez Cambaceres C, Maglio F, Squassi G (1969). Immunization against Argentina hemorrhagic fever using a strain attenuated Junin virus. II. Immunization of volunteers, clinical and laboratory analysis. *Medicina (Buenos Aires)* 29:81-7.
- Ruiz-Jarabo CM, Ly C, Domingo E, de la Torre JC (2003) Lethal mutagenesis of the prototype arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *Virology* 308: 37-47.
- Ryser HJ, Levy EM, Mandel R Di Sciuolo GJ (1994). Inhibition of human immunodeficiency virus infection type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. *J Virol* 72:7992-8001.
- Sakuma T, Sakurai A, Yasuda J (2009). Dimerization of tetherin is not essential for its antiviral activity against Lassa and Marburg viruses. *PLoS One* 9;4(9):e6934.
- Salazar-Bravo J, Ruedas LA, Yates TL (2002). Mammalian reservoirs of arenaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 262:25-63.
- Salvato MS & Shimomaye EM (1989). The completed sequence of lymphocytic choriomeningitis virus reveals a unique RNA structure and a gene for a zinc finger protein. *Virology* 173(1):1-10.
- Salvato M, Shimomaye E, Oldstone MB (1989). The primary structure of the lymphocytic choriomeningitis virus L gene encodes a putative RNA polymerase. *Virology* 169(2):377-84.
- Salvato MS, Schweighofer KJ, Burns J, Shimomaye EM (1992). Biochemical and immunological evidence that the 11 kDa zinc-binding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus. *Virus Research* 22(3):185–198.
- Salvato MS, Buchmeier MJ, Charrel RN, Clegg JCS, Gonzalez JP, Lukashevich IS, Peters CJ, Romanowski V (2010). Family *Arenaviridae*. In: *Virus Taxonomy Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus*. Van Regenmolter MHV, King A, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Eds). Elsevier Academic Press, London, UK (en prensa).
- Sanchez A, Pifat DY, Kenyon RH, Peters CJ, McCormick JB, Kiley MP (1989). Junin virus monoclonal antibodies: characterization and cross-reactivity with other arenaviruses. *J Gen Virol* 70(5):1125-32.
- Schlie K, Maisa A, Freiberg F, Groseth A, Strecker T, Garten W (2010). Viral protein determinants of Lassa virus entry and release from polarized epithelial cells. *J Virol* 84:3178-3188.
- Schuhmann KM, Pfaller CK, Conzelmann KK (2011). The measles virus V protein binds to p65 (RelA) to suppress NF-kappaB activity. *J Virol* 85(7):3162-71.

- Sebastian L, Madhusudana SN, Ravi V, Desai A (2011). Mycophenolic acid inhibits replication of Japanese encephalitis virus. *Chemotherapy* 57(1):56-61.
- Shtanko O, Imai M, Goto H, Lukashevich IS, Neumann G, Watanabe T, Kawaoka Y (2010). A role for the C terminus of Mopeia virus nucleoprotein in its incorporation into Z protein-induced virus-like particles. *J Virol* 84, 5415-5422.
- Sidwell RW, Smee DF (2003). Viruses of the *Bunya-* and *Togaviridae* families: potential as bioterrorism agents and means of control. *Antiviral Res* 57:101-111.
- Sidwell RW, Barnard DL, Day CW, Smee DF, Bailey KW, Wong MH, Morrey JD, Furuta Y. (2007). Efficacy of orally administered T-705 on lethal avian Influenza A (H5N1) virus infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 51:845-851
- Singh MK, Fuller-Pace FV, Buchmeier MJ, Southern PJ (1987). Analysis of the genomic L RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 161(2): 448-56.
- Singh P, Kaur J, Yadav B, Komath SS (2009). Design, synthesis and evaluations of acridone derivatives using *Candida albicans*--search for MDR modulators led to the identification of an anti-candidiasis agent. *Bioorg Med Chem* 1;17(11):3973-9.
- Sintchak MD, Nimmesgern E (2000). The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. *Immunopharmacol* 47:163-184.
- Smee DF, Morris JL, Barnard DL, Van Aerschot A (1992). Selective inhibition of arthropod-borne and arenaviruses in vitro by 3'-fluoro-3'-deoxyadenosine. *Antiviral Res* 18(2):151-62.
- Smee DF, Gilbert J, Leonhardt JA, Barnett BB, Huggins JH, Sidwell RW (1993). Treatment of lethal Pichinde virus infections in weanling LVG/Lak hamsters with ribavirin, ribamidine, selenazofurin and amplitgen. *Antiviral Res* 20(1):57-70.
- Spiropoulou CF, Kunz S, Rollin PE, Campbell KP, Oldstone MB (2002). New World arenavirus clade C, but not clade A and B viruses, utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor. *J Virol* 76:5140-5146.
- Soares MM, King SW, Thorpe PE (2008). Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases. *Nat Med* 14(12):1357-62.
- Southern PJ, Singh MK, Riviere Y, Jacoby DR, Buchmeier MJ, Oldstone MB (1987). Molecular characterization of the genomic S RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 157:145-55.
- Stankiewicz-Drogoń A, Dörner B, Erker T, Boguszewska-Chachulska AM (2010). Synthesis of new acridone derivatives, inhibitors of NS3 helicase, which efficiently and specifically inhibit subgenomic HCV replication. *J Med Chem* 22;53(8):3117-26.
- Strandin T, Hepojoki J, Wang H, Vaheri A, Lankinen H (2011). Inactivation of hantaviruses by *N*-ethylmaleimide preserves virion integrity. *J Gen Virol* 92:1189-1198.

- Stránská R, van Loon AM, Polman M, Schuurman R (2002). Application of realtime PCR for determination of antiviral drug susceptibility of herpes simplex virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:2943–2947.
- Streeter DG, Witkowski JT, Khare GP, Sidwell RW, Bauer RJ, Robins RK, Simon LN (1973). Mechanism of action of 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:1174-1178.
- 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):10700-10705.
- Strecker T, Maisa A, Daffis S, Eichler R, Lenz O, Garten W (2006). The role of myristoylation in the membrane association of the Lassa virus matrix protein Z. *Virol J* 3:93.
- Suh JJ, Pettinati HM, Kampman KM, O'Brien CP (2006). The status of disulfiram: a half of century later. *J Clin Psychopharmacol* 26:290–302.
- Tabarrini O, Manfroni G, Fravolini A, Cecchetti V, Sabatini S, De Clercq E, Rozenski J, Canard B, Dutartre H, Paeshuyse J, Neyts J (2006). Synthesis and anti-BVDV activity of acridones as new potential antiviral agents. *J Med Chem* 49(8):2621–2627.
- Takahashi K, Furuta Y, Fukuda Y, Kuno M, Kamiyama T, Kozaki K, Nomura N, Egawa H, Minami S, Shiraki K (2003). *In vitro* and *in vivo* activities of T-705 and oseltamivir against influenza virus. *Antivir Chem Chemother* 14:235-241.
- Takhampunya R, Ubol S, Houng HS, Cameron CE, Padmanabhan R (2006). Inhibition of dengue virus replication by mycophenolic acid and ribavirin. *J Gen Virol* 87(Pt 7):1947-52.
- Talarico LB & Damonte EB (2007). Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans. *Virology* 363:473–485.
- Toltzis P, O'Connell K, Patterson JL (1988). Effect of phosphorylated ribavirin on vesicular stomatitis virus transcription. *Antimicrob Agents Chemother* 32:492–497.
- Tordo N, De Haan P, Goldbach R, Poch O (1992). Evolution of negative-stranded RNA genomes. *Semin Virol* 3:341–357.
- Tortorici MA, Albariño CG, Posik DM, Ghiringhelli PD, Lozano ME, Rivera Pomar R, Romanowski V (2001a). Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity *in vivo*. *Virus Res* 73:41-55.
- Tortorici MA, Ghiringhelli PD, Lozano ME, Albarino CG, Romanowski V (2001b). Zinc-binding properties of Junin virus nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 82:121-128.
- Tseng CK (2005). Overview of antiviral drug discovery and development. In: *Antiviral drug discovery for emerging diseases and bioterrorism threats*. Torrence PF (Ed.), J. Wiley & Sons, New Jersey, USA, 31-82.

- Tummino PJ, Harvey PJ, 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. *Antimicrob Agents Chemother* 41:394–400.
- Turpin JA, Buckheit RW Jr, Derse D, Hollingshead M, Williamson K, Palamone C, Osterling MC, Hill SA, Graham L, Schaeffer CA, Bu M, Huang M, Cholody WM, Michejda CJ, Rice WG. (1998). Inhibition of acute-, latent-, and chronic-phase human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by a bistriazoloacridone analog that selectively inhibits HIV-1 transcription. *Antimicrob Agents Chemother* 42:487-494.
- Urata S, Noda T, Kawaoka Y, Yokosawa H, Yasuda J (2006). Cellular factors required for Lassa virus budding. *J Virol* 80(8):4191-4195.
- Vela EM, Bowick GC, Herzog NK, Aronson JF (2008). Genistein treatment of cells inhibits arenavirus infection. *Antiviral Res* 77(2):153-6.
- Vieth, S, Torda AE, Asper M, Schmitz H, Gunther S (2004). Sequence analysis of L RNA of Lassa virus. *Virology* 318:153–158.
- Vieth S, Drosten C, Lenz O, Vincent M, Omilabu S, Hass M, Becker-Ziaja B, ter Meulen J, Nichol ST, Schmitz H, Günther S (2007). RT-PCR assay for detection of Lassa virus and related Old World arenaviruses targeting the L gene. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101(12):1253-64.
- Vispé S, Vandenberghe I, Robin M, Annereau JP, Créancier L, Pique V, Galy JP, Kruczynski A, Barret JM, Bailly C (2007). Novel tetra-acridine derivatives as dual inhibitors of topoisomerase II and the human proteasome. *Biochem Pharmacol* 15;73(12):1863-72.
- Volpon L, Osborne MJ, Capul AA, de la Torre JC, Borden KLB (2010). Structural characterization of the Z RING-eIF4E complex reveals a distinct mode of control for eIF4E. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 5441-5446.
- Wachsman MB, López EMF, Ramírez JA, Galagovsky LR, Coto CE (2000). Antiviral effect of brassinosteroids against herpes virus and arenavirus. *Antivir Chem Chemother* 11:71-77.
- Watterson SH, Chen P, Zhao Y, Gu HH, Dhar TG, Xiao Z, Ballentine SK, Shen Z, Fleener CA, Rouleau KA, Obermeier M, Yang Z, McIntyre KW, Shuster DJ, Witmer M, Dambach D, Chao S, Mathur A, Chen BC, Barrish JC, Robl JA, Townsend R, Iwanowicz EJ (2007). Acridone-based inhibitors of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase: discovery and SAR leading to the identification of *N*-(2-(6-(4-ethylpiperazin-1-yl)pyridin-3-yl)propan-2-yl)-2-fluoro-9-oxo-9,10-dihydroxyacridine-3-carboxamide (BMS-566419). *J Med Chem* 50(15):3730-3742.
- Welsch, S., Kepler, O. T., Habermann, A., Allespach, I., Krijnse-Locker, J. & Kräusslich, HG. (2007). HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. *PLoS Pathog* 3, e36.

- Whitby K, Pierson TC, Geiss B, Lane K, Engle M, Zhou Y, Doms RW, Diamond MS (2005). Castanospermine, a potent inhibitor of dengue virus infection *in vitro* and *in vivo*. *J Virol* 79:8698–8706.
- Whitby LR, Lee AM, Kunz S, Oldstone MBA, Boger DL (2009). Characterization of Lassa virus cell entry inhibitors: Determination of the active enantiomer by asymmetric synthesis. *Bioorg Med Chem Lett* 19:3771-3774.
- Wilda M, Lopez N, Casabona JC, Franze-Fernandez MT (2008). Mapping of the Tacaribe arenavirus Z-protein binding sites on the L protein identified both amino acids within the putative polymerase domain and a region at the N terminus of L that are critically involved in binding. *J Virol* 82(22):1454–11460.
- Wolf MC, Freiberg AN, Zhang T, Akyol-Ataman Z, Grock A, Hong PW, Li J, Watson NF, Fang AQ, Aguilar HC, Porotto M, Honko AN, Damoiseaux R, Miller JP, Woodson SE, Chantasirivisal S, Fontanes V, Negrete OA, Krogstad P, Dasgupta A, Moscona A, Hensley LE, Whelan SP, Faull KF, Holbrook MR, Jung ME, Lee B (2010). A broad-spectrum antiviral targeting entry of enveloped viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:3157-3162.
- Yap TL, Xu T, Chen YL, Malet H, Egloff MP, Canard B, Vasudevan SG, Lescar J (2007). Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. *J Virol* 81(9):4753-65.
- Young PR & Howard CR (1983). Fine structure analysis of Pichinde virus nucleocapsids. *J Gen Virol* 64(Pt 4):833-42.
- Young PR, Chanas AC, Lee SR, Gould EA, Howard CR (1987). Localization of an arenavirus protein in the nuclei of infected cells. *J Gen Virol* 68(9):2465-70.
- York J, Romanowski V, Lu M, Nunberg JH (2004). The signal peptide of the JUNV arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex. *J Virol* 78:10783-10792.
- York J, Agnihothram SS, Romanowski V, Nunberg JH (2005). Genetic analysis of heptad-repeat regions in the G2 fusion subunit of the Junin arenavirus envelope glycoprotein. *Virology* 343:267-74.
- York J & Nunberg JH (2006). Role of the stable signal peptide of Junin arenavirus envelope glycoprotein in pH-dependent membrane fusion. *J Virol* 80:7775-7780.
- York J, Dai D, Amberg S, Nunberg JH (2007). pH-induced activation of arenavirus membrane fusion is antagonized by small-molecule inhibitors. *J Virol* 82:10932-10939.
- York J, Berry JD, Ströher U, Li Q, Feldmann H, Lu M, Trahey M, Nunberg JH. (2010). An antibody directed against the fusion peptide of Junin virus envelope glycoprotein GPC inhibits pH-induced membrane fusion. *J Virol* 84:6119-6129.
- Zarubaev VV, Slita AV, Krivitskaya VZ, Sirotkin AK, Kovalenko AL, Chatterjee NK (2003). Direct antiviral effect of cycloferon (10-carboxymethyl-9-acridanone) against adenovirus type 6 *in vitro*. *Antiviral Res* 58:131-137.