



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Participación de las vías de señalización celular dependientes de proteínas quinasas activadas por mitógenos Raf/MEK/ERK y p38 en la multiplicación del virus Junín

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

Lic. Jesús Emanuel Brunetti

Directora de tesis: Dra. Viviana Castilla

Consejero de Estudios: Dr. Luis Alberto Scolaro

Lugar de trabajo: Laboratorio de Procesos Moleculares de la Interacción Virus-Célula, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, marzo 2019

Fecha de defensa: 12 de marzo de 2019

Resumen

Participación de las vías de señalización celular dependientes de proteínas quinasas activadas por mitógenos Raf/MEK/ERK y p38 en la multiplicación del virus Junín

El virus Junín (JUNV), miembro de la familia *Arenaviridae*, es el agente causal de la fiebre hemorrágica argentina, enfermedad endemo-epidémica que afecta una amplia zona central de la República Argentina y para la cual, si bien existe una vacuna atenuada eficaz, no hay disponible un tratamiento antiviral específico.

Numerosos virus modulan diferentes vías de señalización celular entre las que se encuentran aquellas mediadas por las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas), proteínas implicadas en la proliferación, supervivencia, diferenciación y apoptosis celular.

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivos analizar el estado de activación de las vías dependientes de MAP quinasas Raf/MEK/ERK y p38 en la infección de JUNV en cultivos celulares, establecer la importancia de estas vías para la infección y determinar el rol que cumple la vía Raf/MEK/ERK en diferentes etapas del ciclo de multiplicación viral.

Se demostró que la infección con JUNV induce la activación de Raf/MEK/ERK en diferentes líneas celulares, mientras que la activación de p38 es dependiente del sistema celular analizado. Se comprobó que en cultivos de células Vero la activación de Raf/MEK/ERK es de tipo bifásica, observándose una primera activación temprana y una segunda fase de activación a las 7 h pos-infección, mientras que la fosforilación de p38 se hace evidente fundamentalmente a tiempos tardíos de la infección. El bloqueo de las vías mediante inhibidores químicos o RNAs de interferencia demostró que ambas rutas de señalización promueven la multiplicación de JUNV. La producción de virus infeccioso y la expresión de proteínas virales se redujeron de manera notoria en presencia de inhibidores específicos de cada una de las cascadas de señalización, tanto en células de mono como en líneas celulares humanas.

El análisis detallado del papel de la vía Raf/MEK/ERK en diferentes etapas del ciclo de multiplicación de JUNV mostró que esta ruta de señalización no estaría

implicada en las etapas iniciales de la infección como la adsorción, la internalización o el desnudamiento viral sino en la síntesis de RNA viral. Esto último se puso en evidencia mediante la cuantificación de los niveles de RNA viral en cultivos celulares tratados con U0126, inhibidor específico de la vía. Estos hallazgos se corroboraron empleando un sistema de genética reversa basado en análogos del genoma del arnavirus Tacaribe, virus estrechamente emparentado con JUNV. Se determinó además que la inhibición de la vía no afectaría la traducción de proteínas virales, por lo cual la reducción de la expresión de proteínas virales detectada en los cultivos celulares tratados con U0126 sería consecuencia de la inhibición de la síntesis de RNA viral. El tratamiento con el inhibidor de la vía Raf/MEK/ERK tampoco afectó los niveles de fosforilación del factor eIF2 α , componente celular clave en el proceso de traducción.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran por primera vez la capacidad de JUNV de activar vías de señalización celular dependientes de MAP quinasa y ponen en evidencia que las mismas son relevantes en la multiplicación de este virus. Asimismo, cabe destacar que la comprensión del papel de las rutas de transducción de señales en la replicación y patogénesis viral tiene importantes implicancias en el desarrollo de nuevas terapias antivirales, dado que la modulación de estas vías podría constituir una estrategia terapéutica con bajo riesgo de aparición de resistencia viral y efectiva frente a diferentes virus que manipulen de manera similar estos mecanismos de señalización.

Palabras clave: virus Junín, Raf/MEK/ERK, p38, replicación, U0126, virus Tacaribe

Abstract

Involvement of mitogen-activated protein kinase - dependent signaling pathways Raf/MEK/ERK and p38 in Junín virus multiplication

Junín virus (JUNV), a member of the *Arenaviridae* family, is the causative agent of Argentine hemorrhagic fever (AHF), an endemo-epidemic disease that affects a large central area of Argentina. Although an effective attenuated vaccine against AHF has been developed, no specific antiviral treatment is available.

Numerous viruses can modulate cell signal transduction cascades, such as mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent signaling pathways, which are involved in cellular proliferation, survival, differentiation and apoptosis.

The aims of this thesis were the analysis of the activation state and the importance of Raf/MEK/ERK and p38 signaling cascades during JUNV infection in cell cultures as well as the study of the role that Raf/MEK/ERK pathway plays in different stages of JUNV multiplication cycle.

It was demonstrated that JUNV infection induces the activation of Raf/MEK/ERK pathway in different cell lines whereas the activation of p38 is dependent on the cell system assayed. The activation of Raf/MEK/ERK route in Vero cells was biphasic, with a first early activation and a second phase of activation at 7 h pos-infection, while the activation of p38 occurs mainly during late stages of infection. Pathway blockade by chemical inhibitors or RNA interference showed that both signaling cascades are necessary for JUNV multiplication. In the presence of specific inhibitors of each signaling cascade, infectious virus production and viral protein expression are markedly reduced in both monkey and human cell lines.

The detailed analysis of the role of Raf /MEK /ERK pathway in different stages of JUNV multiplication cycle showed that this signaling route would not be involved in the initial stages of the infection, such as adsorption, internalization or viral uncoating, but in the synthesis of viral RNA. The latter was proved by measuring viral RNA levels in cell cultures treated with U0126, a specific inhibitor of the pathway. These findings were corroborated using a reverse genetic system based on genome analogues of Tacaribe virus, an arenavirus closely related to JUNV. It was further determined that the inhibition

of Raf /MEK /ERK pathway would not affect viral translation indicating that the reduction in viral protein expression detected in cultures treated with U0126 would be a consequence of viral RNA synthesis inhibition. Furthermore, U0126 treatment did not affect the levels of phosphorylation of eIF2 α , a key cellular factor involved in the translation process.

The results obtained in this work show for the first time the ability of JUNV to activate MAPK-dependent cell signaling cascades and reveal that these transduction pathways are relevant for JUNV multiplication. Likewise, it is important to emphasize that the understanding of the role of signal transduction pathways in viral replication and pathogenesis has important implications in the development of new antiviral treatments, given that the modulation of these cascades could constitute a therapeutic strategy with low risk of viral resistance emergence and effective against different viruses that manipulate those cell signaling mechanisms in a similar fashion.

Key words: Junín virus, Raf/MEK/ERK, p38, replication, U0126, Tacaribe virus

Agradecimientos

Tengo la suerte de haber disfrutado mucho la realización de este doctorado. Pasé por muchas experiencias, desde la mesada y el cultivo hasta un viaje al exterior. He tratado de crecer y ser cada día mejor, a los porrazos, con caídas, con manchas de fibrones en la mano y cristal violeta en el guardapolvo, entre clases de biología en el colegio o química en la facu y RT-PCRs. Como dice un cantautor, tengo la suerte de saber que tengo lugar a dónde volver siempre, y una pasión en mi mente. Pero ha llegado el fin de esta parte: creo que pocas personas tienen la posibilidad de vivir y darle cierre a su doctorado en la manera que me tocó darle a mí. Por todo esto, quiero dar las gracias a tanta gente, pero principalmente...

A Dios y la *Mater Ter Admirabilis* de Schönstatt, por haberme regalado personas maravillosas a lo largo de este recorrido, con las que compartí experiencias, conocimientos, charlas, risas y llantos, de seguro ya tendrán su recompensa; por haberme sostenido la mano en todo momento y abrazarme fuerte el alma, un abrazo doloroso que no me dejó caer.

A mi mamá, por haberme aguantado todo y acompañarme siempre en este trayecto. Por su esfuerzo y lucha constante, para que yo estudie aun cuando quedamos los tres solitos. Por sus noches desveladas, esperando que yo llegue o acompañándome mientras escribía. Por sus mates y su oído, aunque no entendiera nada de lo que hablara. Por haberme forjado como la persona que soy, muchos de mis logros, entre los que se incluye este, se lo debo a ella. Me formó con reglas y libertades, pero siempre motivándome a alcanzar mis anhelos. Por ser una mujer de fierro. Tengo la suerte de saber que si me equivoco tengo alguien que puede entenderme.

A Vivi, mi directora. Agradeceré siempre su paciencia, sus consejos, su apoyo incondicional, su energía. Por abrirme las puertas del labo allá por 2011 cuando todavía era un estudiante, dejarme formar parte del grupo de investigación y transmitirme un montón de conocimientos. Por guiarme a lo largo de todos estos años para ser un mejor profesional y una mejor persona. Por sostenerme también cuando más lo necesité y mostrarme que podía dar más de mí. No me alcanzan las palabras para agradecerle TODO.

Al Enano y a Gaby, mi hermano, por brindarme su apoyo en todo momento y sus consejos. Al Enano especialmente por cuidarme siempre, por las idas y las venidas a la parada del colectivo.

A Daniel, mi novio, por aguantarse mis caprichos, mis locuras, mis gritos. Por estar a mi lado siempre. Por las charlas, los consejos y las discusiones. Por ser mi conejillo de Indias para mis explicaciones. Por sus postres (que todo Viro disfrutó) y sus comidas. Por todo el amor que me demuestra día a día desde hace más de 8 años.

A Luis, por sus charlas y consejos, sus perros, gatos, palomas, cobayos, tigres, monos y el zoológico entero. Por su paciencia y su ayuda incondicional.

A Vero y Nieves, compañeras de laboratorio, con las que compartí experiencias, detalles técnicos, inquietudes, pósters, papers, medios de cultivos, células y virus. Siempre dispuestas a colaborar con lo que se necesite.

Al resto del Viro Team, a los que están (Fede, Euge, Ceci, Lu, Lau, Maxi, Ale, Flor, Briyith, Nichi, Mariel) y a los que se fueron (Belu, July, José), el mejor grupo de trabajo que he conocido. Por todos las cosas compartidas, las experiencias, las risas, las cervezas, las salidas con Maxi. Por haberme enseñado a comer un kiwi con cucharita.

A Nico (alias Momo), mi estadístico muy querido, mi amigo de toda la carrera, por enseñarme todo sobre el bello arte de la Biometría y ayudarme con los análisis. Sin él, la estadística de esta tesis no sé qué sería. Mitad de la tesis es tuya.

A Isa, por enseñarme el amor por la biología y ser una Merlí en mi vida. Un ejemplo de dedicación a la docencia y a la ciencia. Sin ella, probablemente no habría elegido estas hermosas profesiones: científico y profesor.

Al equipo de Cs Naturales del Isma (Vero, Yami y Virgi), y especialmente al jefecito Néstor, con los que he pasado las mañanas contándoles sobre lo que estaba haciendo, y me han ayudado a crecer como profesional. Por todos los jueves mañaneros compartidos. Aprecio mucho la estima que me tienen, pero sólo soy un docente y un poco científico.

A Cybele, por el viaje compartido, el incentivo, los consejos y la ayuda brindada. Dios quiera vuelva a repetirse.

A Clau, por toda la experiencia compartida. Por los mails recordando los seminarios y las charlas anti-M.

Al resto de los integrantes de Virología, por todo los recuerdos y reuniones compartidos estos años. Por los seminarios, que me ayudaron a mejorar y crecer como científico.

A mis amigos quienes me apoyan incondicionalmente y a pesar de todo nunca me dejaron sólo: Barbie y Ale.

A mis ex Alumnos, del San José y del San Miguel, que durante estos años de doctorado también me ayudaron a crecer mucho como docente. ¡Cuánto daría por volver a tener una clase con ellos!

*A mi compañero de toda la vida.
Que aún no me has vencido.*

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en:

- Brunetti JE, Foscaldi S, Quintana VM, Scolaro LA, López N, Castilla V. Role of the ERK1/2 signaling pathway in the replication of Junín and Tacaribe viruses. *Viruses* 2018, 10(4): E199.
- Rodríguez ME, Brunetti JE, Wachsman MB, Scolaro LA, Castilla V. Raf-MEK-ERK pathway activation is required for Junín virus replication. *J Gen Virol* 2014, 95: 799-805.

Otras publicaciones relacionadas:

- Castilla V, Brunetti JE, Armiento MN, Scolaro LA. Recent Advances in the Development of Antiviral Approaches against Hemorrhagic-Fever-Causing Arenaviruses. *Front Clin Drug Res - Anti-Infectives* 2017, 4: 3-38.
- Brunetti JE, Scolaro LA, Castilla V. The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNPK) is a host factor required for dengue virus and Junín virus multiplication. *Virus Res* 2015, 203: 84-91.

Abreviaturas

Abreviatura	Definición en inglés	Definición en castellano
3' UTR	3' Untranslated Region	Región 3' no traducida
5' UTR	5' Untranslated Region	Región 5' no traducida
Ab	Antibody	Anticuerpo
Ad5	Adenovirus 5	Adenovirus 5
AG		Antigenoma
AgHBc	Antigen Hepatitis B Core	Antígeno del core de HBV
AgHBs M	Antigen Hepatitis B Middle envelope	Antígeno de la envoltura media de HBV
agS RNA	Antigenome S RNA	RNA S antigenómico
AHF/FHA	Argentine hemorrhagic fever	Fiebre hemorrágica argentina
AIC	Akaike Information Criterion	Criterio de Información de Akaike
AN		Anisomicina
ANOVA	Analysis of Variance	Análisis de la varianza
AP-1	Activator Protein 1	Proteína activadora 1
ARE	AU-Rich Element	Elemento rico en AU
ASK	Apoptosis Signal-regulating Kinase	Quinasa reguladora de la señal de apoptosis
ATP	Adenosine Triphosphate	Adenosín Trifosfato
BKV	BK Virus	Virus BK
BMK	BiMC related Kinase	Quinasa relacionada a BiMC
BSA	Bovine Serum Albumine	Albúmina de Suero Bovino
CA16	Coxsackievirus A16	Virus Coxsackie A16
CDK1	Cyclin-dependent Kinase 1	Quinasa dependiente de ciclina 1
cDNA		DNA copia
CHPV	Chaparé Virus	Virus Chaparé
CMV	Cytomegalovirus	Citomegalovirus
cRNA	Control interfering RNA	RNA control
CVB3	Coxsackievirus B3	Virus Coxsackie B3
CZ	Chlorpromazine	Clorpromazina
DABCO	1,4-diazabicyclo(2.2.2)octane	1,4-diazabicyclo(2.2.2)octano
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin	Molécula de adhesión intercelular 3 específica de células dendríticas que no atrapa integrinas
DE		Desvío Estándar
DENV	Dengue Virus	Virus dengue
DLK	Dual Leucine zipper bearing Kinase	Quinasa que contiene cierre doble de leucinas
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Ácido desoxirribonucleico
DNAcd		Ácido desoxirribonucleico de cadena doble
dNTP	Deoxynucleoside Triphosphate	Desoxinucleósido trifosfato
EboV	Ébola Virus	Virus Ébola
EBV	Epstein-Barr Virus	Virus de Epstein-Barr
EGR-1	Early Growth Response protein 1	Proteína de respuesta temprana al crecimiento 1
eIF2 α	Eukaryotic Initiation Factor 2 α	Factor de iniciación eucariota 2 α

eIF4 (A, E, F, G)	Eukaryotic Initiation Factor 4 (A, E, F o G)	Factor de iniciación eucariota 4 (A, E, F o G)
ERK	Extra-cellular Regulated Kinase	Quinasa regulada extracelularmente
ESCRT	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport	Complejos de clasificación endosomal requeridos para transporte
EV-A71	Enterovirus A71	Enterovirus A71
FITC	Fluorescein Isotiocyanate	Isotiocianato de fluoresceína
FLUC	Firefly Luciferase	Luciferasa de luciérnaga
GLM	Generalized Linear Model	Modelo lineal generalizado
GLMM	Generalized Linear Mixed Model	Modelo lineal generalizado y mixto
GPCR	G Protein-coupled Receptor	Receptor acoplado a proteína G
gS RNA	Genomic S RNA	RNA S genómico
GTOV	Guanarito Virus	Virus Guanarito
HA		Hemaglutinina
HBV	Hepatitis B Virus	Virus de la hepatitis B
HCMV	Human Cytomegalovirus	Citomegalovirus humano
HCoV-229E	Human Coronavirus 229E	Coronavirus humano 229E
HCV	Hepatitis C Virus	Virus de la hepatitis C
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Virus de la inmunodeficiencia humana
hnRNP (A/B, K)	heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein (A/B o K)	Ribonucleoproteína heterogéneo-nuclear (A/B o K)
hPIV (1,3)	Human Parainfluenzavirus (1 o 3)	Parainfluenzavirus humano (1 o 3)
HRP	Horseradish Peroxidase	Peroxidasa de rabanito
HSV-1	Herpes Simplex Virus 1	Virus herpes simplex 1
IAV	Influenza A Virus	Virus de la influenza A
IBV	Influenza B Virus	Virus de la influenza B
IFI		Inmunofluorescencia indirecta
IFN	Interferon	Interferón
IGR	Intergenic Region	Región intergénica
IL (5,2,6,8,10,12)	Interleukin (5,2,6,8,10 o 12)	Interleuquina (5,2,6,8,10 o 12)
JCPyV	John Cunningham Polyomavirus	Poliomavirus de John Cunningham
JEV	Japanese Encephalitis Virus	Virus de la encefalitis japonesa
JNK	Jun N-terminal Kinase	Quinasa N-terminal de Jun
JUNV	Junín Virus	Virus Junín
KSR	Kinase Suppressor of Ras	Quinasa supresora de Ras
LASV	Lassa Virus	Virus de Lassa
LCMV	Lymphocytic Choriomeningitis Virus	Virus de la coriomeningitis linfocítica
LPS		Lipopolisacárido
L-SIGN	Liver/lymph node-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin	Molécula de adhesión intercelular 3 específica de hígado/nódulo linfático que no atrapa integrinas
LUJV	Lujo Virus	Virus Lujo
mAb	Monoclonal Antibody	Anticuerpo monoclonal
MACV	Machupo Virus	Virus Machupo
MAP	Mitogen-Activated Protein	Proteína activada por mitógeno
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	Proteína Quinasa activada por mitógeno

MAPKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase	Proteína Quinasa de MAPK
MAPKKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase	Proteína Quinasa de MAPKK
MEK	MAPK/ERK Kinase	Quinasa de MAPK/ERK
MEKK	MEK Kinase	Quinasa de MEK
MEM		Medio de Eagle modificado
MG		Minigenoma
MKK	Mitogen-activated Kinase Kinase	Quinasa de quinasa activada por mitógeno
MLK	Mixed-Lineage protein Kinase	Proteína quinasa de linaje mixto
MM		Medio de Mantenimiento
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus	Virus de la leucemia murina de Moloney
MOPV	Mopeia Virus	Virus Mopeia
Mos	Moloney Oncogene Sarcoma	Oncogén del Sarcoma de Moloney
MP		Medio de Plaqueo
MP1	MEK Partner 1	Socia de MEK-1
mRNA	Messenger RNA	RNA mensajero
mTOR	mammalian Target of Rapamycin	Proteína de mamífero objetivo de la rapamicina
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MV	Measles Virus	Virus del sarampión
NBCS	Newborn Calf Serum	Suero de ternero recién nacido
NELP	Non-Enveloped Liked Particle	Partícula sin envoltura semejante a virus
NM		Nuevo Mundo
NRP-2	Neuropilin 2	Neuropilina 2
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Phosphate Buffer Saline	Buffer fosfato salino
PCR	Polymerase Chain Reaction	Reacción en cadena de la polimerasa
PHB		Prohibitina
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase	Fosfatidilinositol-3 Quinasa
PICV	Pichindé Virus	Virus Pichindé
PKC	Protein Kinase C	Proteína quinasa C
PMA	Phorbol 12-miristate-13-acetate	Forbol 12-miristato-13-acetato
PML	Promyelocytic Leukemia protein	Proteína de la leucemia promielocítica
PRR	Pattern Recognition Receptor	Receptor de reconocimiento de patrones
PRV	Pseudorabievirus	Virus pseudorabia
PVDF	Polyvinylidene Fluoride	Fluoruro de polivinildeno
Q-PCR		PCR cuantitativa
qRT-PCR		RT-PCR cuantitativa
Raf	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma	Fibrosarcoma acelerado rápidamente
RAPTOR	Regulatory-associated protein of mTOR	Proteína reguladora asociada a mTOR
RE		Retículo endoplásmico
RLUC	<i>Renilla</i> Luciferase	Luciferasa de <i>Renilla</i>
RMRV	<i>Rhesus</i> monkey rhadinovirus	Rhadinovirus de los monos Rhesus

RNA	Ribonucleic Acid	Ácido ribonucleico
RNAcd		Ácido ribonucleico de cadena doble
RNAcs		Ácido ribonucleico de cadena simple
RNasin	Rnase Inhibitor	Inhibidor de la Rnasa
RNP		Ribonucleoproteína
RRV	Ross River Virus	Virus Ross River
RSV	Respiratory Syncytial Virus	Virus sincicial respiratorio
RT-PCR		PCR con retrotranscripción
RV		Rotavirus
RVA		Rotavirus A
SKI-1/S1P	Subtilisin-Kexin Isozyme 1/Site-1 Protease/	Isozima de subtilisina-kexina 1/Proteasa del sitio 1
SABV	Sabiá Virus	Virus Sabiá
SAPK	Stress-Activated Protein Kinase	Proteína quinasa activada por estrés
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	Dodecilsulfato de sodio
SG	Stress Granule	Gránulo de estrés
siRNA	small interfering RNA	RNA pequeño interferente
SSP	Stable Signal Peptide	Péptido señal estable
TAK	Tranforming growth factor β -Activated Kinase	Quinasa activada por el factor transformante de crecimiento β
TAM	Tyro3, Axl and Mer	Proteínas Tyro3, Axl y Mer
TBS	Tris Buffer Saline	Buffer tris salino
TCRV	Tacaribe Virus	Virus Tacaribe
TfR-1	Transferrin Receptor 1	Receptor de transferrina 1
TIM	T-cell Immunoglobulin and Mucin- domain containing proteins	Proteínas que contienen dominios de mucina e inmunoglobulina de células T
TLR-4	Toll-like Receptor 4	Receptor tipo toll 4
TNF α	Tumor Necrosis Factor α	Factor de necrosis tumoral α
Tp12	Tumor Progression Locus 2	Locus 2 de progresión tumoral
TRITC	Tetramethylrhodamine	Tetrametilrodamina
UFP		Unidad Formadora de Placa
UV		Ultravioleta
VACV	Vaccinia Virus	Virus vaccinia
VLP	Viral-like Particle	Partícula semejante a virus
VM		Viejo mundo
vRNP	viral Ribonucleoprotein	Ribonucleoproteína viral
VZV	Varicella Zoster Virus	Virus de la Varicela Zoster
WB	Western Blot	
YFV	Yellow Fever Virus	Virus de la fiebre amarilla
ZIKV	Zika Virus	Virus zika
α DG		α -dístroglicano

Índice

Resumen.....	i
Abstract.....	iii
Agradecimientos.....	v
Abreviaturas.....	xi
Índice.....	1
1. Introducción.....	5
1.1. Los arenavirus.....	6
1.1.1. Generalidades.....	6
1.1.2. Ciclo de multiplicación.....	9
1.1.2.1. Adsorción, internalización y desnudamiento de la partícula viral.....	9
1.1.2.2. Síntesis de proteínas y RNAs virales.....	11
1.1.2.3. Ensamble y liberación de las partículas virales.....	14
1.2. Fiebre hemorrágica argentina.....	16
1.2.1. Características generales.....	16
1.2.2. Vacunas y tratamiento.....	17
1.3. Interacción de JUNV con componentes celulares.....	18
1.4. Las vías de señalización dependientes de MAP quinasas Raf/MEK/ERK y p38.....	20
1.4.1. Implicancia de la vía de señalización Raf/MEK/ERK en la replicación de virus patógenos para el hombre.....	23
1.4.2. Implicancia de la vía de señalización p38 en la replicación de virus patógenos para el hombre.....	29
2. Hipótesis y objetivos.....	33
2.1. Hipótesis.....	34
2.2. Objetivos.....	34
2.2.1. Objetivo general.....	34
2.2.2. Objetivos específicos.....	34
3. Materiales y métodos.....	35
3.1. Células.....	36
3.2. Virus.....	37
3.3. Compuestos.....	37
3.4. Anticuerpos.....	37
3.5. Pequeños RNAs de interferencia y plásmidos.....	38
3.6. Ensayos de viabilidad celular.....	39
3.6.1. Método de exclusión del azul tripán.....	40
3.6.2. Método de MTT.....	40
3.7. Titulación viral (método de UFP).....	41
3.8. Transfección de siRNAs.....	41

3.9.	Ensayo de Western Blot (WB).....	42
3.10.	Efecto de los compuestos moduladores de las MAP-quinasa sobre el rendimiento viral	43
3.11.	Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI)	44
3.12.	Ensayo de adsorción viral.....	45
3.13.	Ensayo de internalización viral.....	45
3.14.	Ensayo de desnudamiento viral	45
3.15.	Tinción con naranja de acridina	46
3.16.	Ensayo de formación de sincicios.....	46
3.17.	RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)	46
3.17.1.	Extracción de RNA.....	46
3.17.2.	Síntesis de DNA copia (cDNA).....	47
3.17.3.	PCR cuantitativa (Q-PCR).....	48
3.18.	Ensayo de replicones	48
3.19.	Ensayo de traducción <i>in vivo</i>	49
3.20.	Análisis estadístico	49
4.	Resultados	50
4.1.	Capítulo 1: Estudio de la importancia de las vías Raf/MEK/ERK y p38 en la multiplicación de JUNV	51
4.1.1.	Participación de la vía Raf/MEK/ERK en la multiplicación de JUNV	51
4.1.1.1.	Análisis de los niveles de fosforilación de ERK en cultivos de células humanas infectados con JUNV	51
4.1.1.2.	Cinética de activación de ERK frente a la infección con JUNV	53
4.1.1.3.	Efecto del inhibidor U0126 sobre la multiplicación de JUNV en líneas celulares humanas.....	55
4.1.1.4.	Reversibilidad del efecto inhibitorio de U0126 sobre la activación de ERK.....	57
4.1.1.5.	Efecto del silenciamiento de ERK1/2 sobre la infección viral.....	58
4.1.1.6.	Efecto de la activación de la vía Raf/MEK/ERK sobre la producción viral ..	59
4.1.2.	Participación de la vía p38 en la multiplicación de JUNV	61
4.1.2.1.	Análisis de los niveles de fosforilación de p38 en cultivos de células Vero infectados con JUNV	61
4.1.2.2.	Efecto de la inhibición de la vía p38 sobre la multiplicación de JUNV en células Vero.....	61
4.1.2.3.	Expresión de la proteína N de JUNV en células Vero tratadas con los inhibidores de p38.	63
4.1.2.4.	Efecto de la activación de la vía p38 sobre la multiplicación de JUNV en células Vero.....	65
4.1.2.5.	Efecto de la inhibición de la vía p38 sobre la multiplicación de JUNV en células humanas.....	66

4.2. Capítulo 2: Análisis del papel de la vía Raf/MEK/ERK en el ciclo de multiplicación de JUNV	70
4.2.1. Efecto de la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK sobre las etapas iniciales de la multiplicación de JUNV.....	70
4.2.2. Efecto de la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK sobre la expresión de las proteínas virales	74
4.2.3. Efecto de la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK sobre la síntesis de RNA viral ..	78
4.2.4. Efecto de la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK sobre la traducción viral.....	82
4.2.5. Efecto de la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK sobre la fosforilación de eIF2 α ..	83
5. Discusión	85
6. Conclusiones.....	102
7. Bibliografía	104

1. Introducción

1.1. Los arenavirus

1.1.1. Generalidades

Los arenavirus (familia *Arenaviridae*) se caracterizan por ser virus envueltos y poseer un genoma compuesto por dos segmentos de RNA de cadena simple (RNAs) y codificación ambisentido (Figura 1A) (1,2). El fragmento más largo de RNA, denominado L (Figura 1B), codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA (L, 200 kDa) y para una proteína Z, proteína de unión a zinc también conocida como proteína de matriz (11 kDa), la cual está involucrada en la regulación de la síntesis de RNA y en el ensamblaje de la partícula viral. El fragmento más corto, denominado S, codifica para la proteína de nucleocápside N (60-64 kDa), la cual junto con L participa en la transcripción y replicación del genoma viral, y para un precursor de las glicoproteínas virales, denominado GPC (72 kDa). Este precursor es procesado post-traduccionalmente dando origen por clivaje a un complejo glicoproteico tripartito maduro (GP) formado por un péptido señal estable (SSP), una glicoproteína periférica llamada G1 (35-38 kDa) y una glicoproteína G2 (44-52 kDa) transmembrana. Las espículas virales están conformadas por trímeros de GP. G1 es la proteína viral que interactúa con el receptor celular, mientras que G2 media la fusión dependiente de pH ácido de la envoltura viral con la membrana endosomal una vez que el virus es internalizado mediante un proceso de endocitosis, permitiendo la liberación del genoma en el citoplasma de la célula (1). La nucleocápside viral está formada por el RNA viral y las proteínas L y N (Figura 1A). Ambos segmentos del RNA viral poseen una región no codificante en el extremo 5' (5' UTR), una región 3' no codificante (3' UTR) y dos secuencias codificantes orientadas en sentido opuesto separadas entre sí por una región intergénica no codificante (IGR) que presenta 1 o 2 estructuras secundarias de tipo "stem and loop" (Figura 1B).

El nombre de esta familia de virus deriva del aspecto arenoso que presenta el interior de las partículas virales cuando éstas son observadas al microscopio electrónico. Esto se debe a que, al ensamblarse, los viriones incorporan ribosomas celulares, sin embargo, la presencia de los ribosomas no sería relevante para la infectividad viral (2).

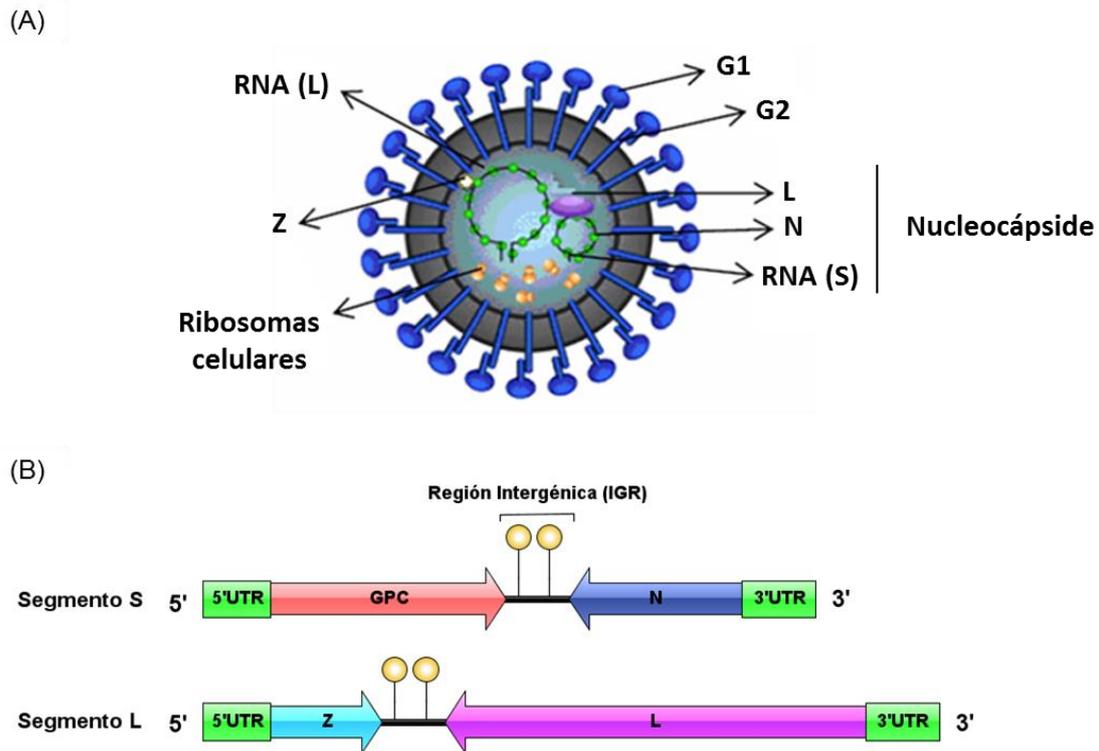


Figura 1. Estructura de los arenavirus (A) y de su genoma (B).

5'UTR: región 5' no codificante. 3'UTR: región 3' no codificante. GPC: precursor de las glicoproteínas de envoltura.

Actualmente, la familia *Arenaviridae* se compone de tres géneros: los géneros *Reptarenavirus* y *Hartmanivirus* comprenden virus que infectan reptiles, mientras que el género *Mammarenavirus* engloba 35 especies que infectan mamíferos. Este último género se divide en dos grandes grupos, los virus del Viejo Mundo (VM) y los virus del Nuevo Mundo (NM) (1–3). El grupo del VM incluye virus generalmente confinados al continente africano como el virus Lassa (LASV, República Central de África), Lujó (LUJV, Zambia y sudeste de África), Mopeia (MOPV, Mozambique y Zimbabwe), entre otros, que tienen como reservorio natural a roedores de la subfamilia *Murinae*. Otro miembro de este grupo es el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), de distribución mundial, cuyo reservorio es la especie *Mus musculus*. El grupo del NM comprende virus que se distribuyen en el continente americano y se encuentra subdividido en cuatro clados (A, B, C y D) (Figura 2). El clado B contiene a los principales patógenos para el hombre: los virus, Machupo (MACV, Bolivia), Chaparé (CHPV, Bolivia), Guanarito (GTOV, Venezuela), Sabiá (SABV, Brasil) y Junín (JUNV, Argentina). El virus Tacaribe (TCRV, Trinidad y Tobago) también pertenece al clado B,

pero no es patógeno para el hombre. A diferencia de los otros miembros del grupo del NM, los cuales poseen como principales hospedadores naturales a roedores de la subfamilia *Sigmodontinae*, TCRV fue aislado a partir de murciélagos del género *Artibeus*. En el clado D se encuentra el virus Whitewater Arroyo el cual también ha sido asociado a infecciones en el hombre (2). Por su parte, el virus Pichindé (PICV) se encuentra en el clado A y si bien este virus no es patógeno para el hombre, la infección de cobayos con PICV es utilizada como modelo de estudio de la patogénesis de LASV debido a que en cobayos la infección con PICV reproduce las manifestaciones clínicas características de la enfermedad producida por LASV en el hombre (1).

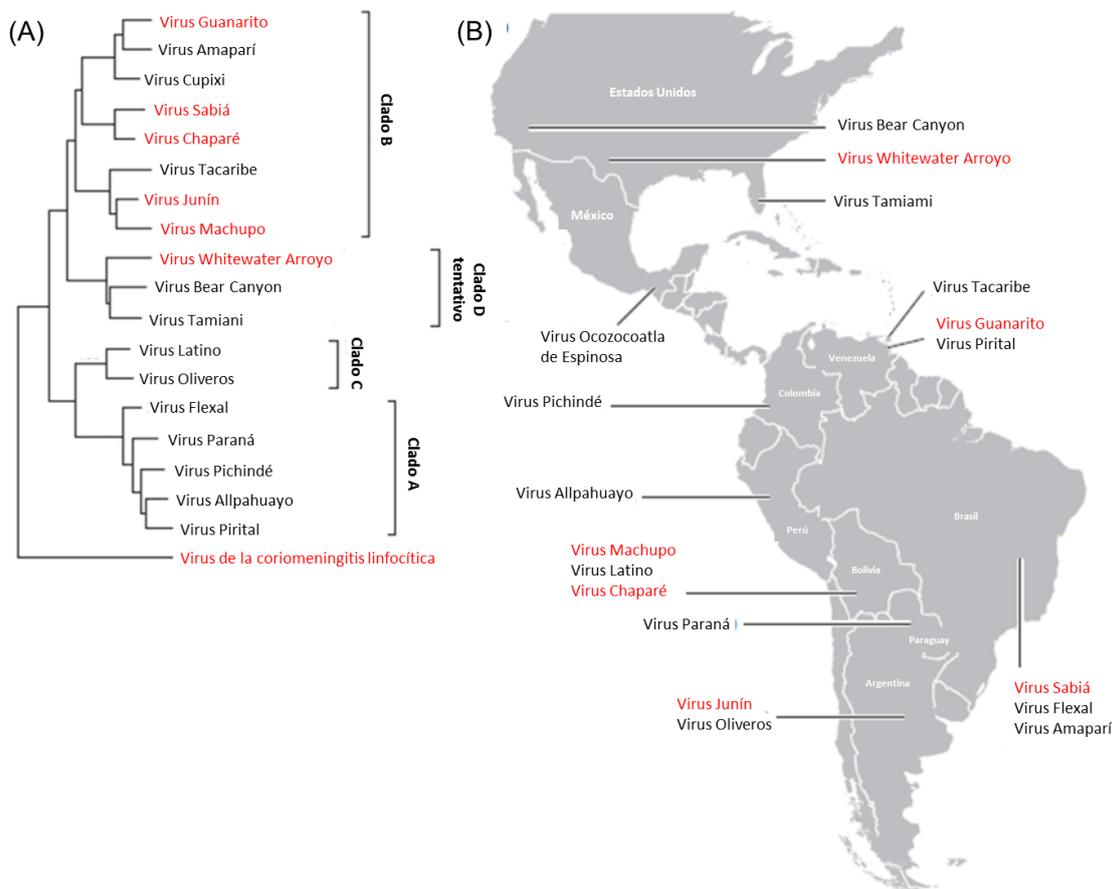


Figura 2. Taxonomía y distribución de los mammarenavirus del Nuevo Mundo.

(A) Cladograma inferido por el método de máxima verosimilitud utilizando el modelo de Kimura de dos parámetros y distribución gamma. La reconstrucción filogenética fue realizada usando el gen completo de GPC. Una cepa de LCMV fue usada como grupo externo. (B) Mapa de América en el que se muestra la distribución geográfica de los principales mammarenavirus del Nuevo Mundo. Los virus patógenos para el hombre se muestran en rojo. (Modificado a partir de (2)).

Algunos mammarenavirus causan en el hombre fiebres hemorrágicas: LASV (fiebre de Lassa), MACV (fiebre hemorrágica boliviana), GTOV (fiebre hemorrágica venezolana), SABV (fiebre hemorrágica brasileña) y JUNV (fiebre hemorrágica argentina, FHA). Los seres humanos usualmente se infectan al entrar en contacto vía inhalación con excreciones y secreciones de roedores infectados, siendo los macrófagos alveolares las primeras células en infectarse. Anualmente se registran alrededor de 200.000 casos de fiebre de Lassa en el oeste de África, de los cuales aproximadamente 5000 son fatales. En el caso de la fiebre hemorrágica boliviana y de la fiebre hemorrágica venezolana los porcentajes de mortalidad son del 35 y 33%, respectivamente (1).

1.1.2. Ciclo de multiplicación

En la figura 3, se muestra un esquema que representa el ciclo de multiplicación de los miembros del género *Mammarenavirus*. Este ciclo, que en las células Vero dura aproximadamente 14 h, por ejemplo (4), consta de los siguientes procesos:

1.1.2.1. Adsorción, internalización y desnudamiento de la partícula viral

El ingreso de los mammarenavirus a la célula comienza con la interacción entre la glicoproteína de envoltura G1 y un receptor celular. Los mammarenavirus del VM y los del NM del clado C utilizan como receptor a la molécula α -distroglicano (α DG). En el caso de LUJV, a pesar de pertenecer al grupo del VM, este virus interactuaría con las proteínas neuropilina-2 (NRP-2) y CD63 para entrar a la célula (5). Por otra parte, otras moléculas podrían funcionar como receptores alternativos para LASV y LCMV como por ejemplo el receptor Axl, de la familia de las proteínas TAM, o algunas lectinas de tipo C (6–8).

Por su parte, los virus del NM del clado B se unen principalmente al receptor de transferrina de tipo 1 (TfR1) y aquellos capaces de infectar al hombre poseen la habilidad de reconocer al TfR1 humano (9). Asimismo, se ha comprobado que JUNV también puede utilizar como receptores a las lectinas de tipo C DC-SIGN (del inglés: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) y L-SIGN (del inglés: Liver/lymph node-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) (10) y existen evidencias que indican que algunos virus del NM del clado

B, como TCRV y JUNV, podrían interactuar con proteínas de la familia TIM para ingresar a la célula (11).

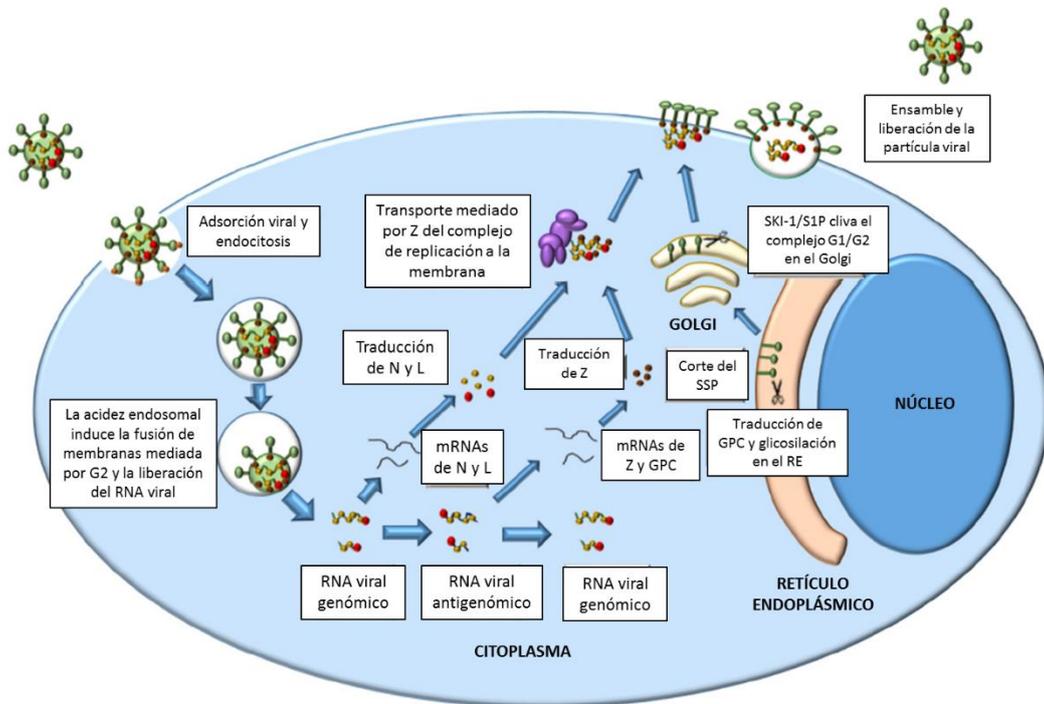


Figura 3. Ciclo de multiplicación de los mammarenavirus.

RE: retículo endoplásmico. Modificado de (1).

Contrariamente a lo descrito para PICV, LCMV y LASV, el proceso de endocitosis por el cual JUNV es incorporado a la célula sería independiente de la presencia de colesterol en la membrana plasmática (12–14). JUNV y PICV entrarían a la célula por endocitosis mediada por clatrina (12,13,15,16), mientras que la entrada de LCMV y LASV sería independiente de la participación de clatrina, caveolina, dinamina y de las GTPasas Rab5 y Rab7 (8,14,16–18).

A pesar de las diferencias en la vía endocítica empleada, la entrada a la célula de todos los mammarenavirus estudiados hasta el momento es dependiente de pH ácido (19–23). Las partículas virales incorporadas a la célula son transportadas a los endosomas y el pH ácido en el interior de estas vesículas induce cambios en la conformación del complejo glicoproteico GP promoviendo la fusión entre la envoltura viral y la membrana endosomal y permite la liberación de las nucleocápsides virales al citoplasma (Figura 3) (9,15,22–24). En el caso de LASV, una vez en el interior de los endosomas, el pH ácido induciría además la interacción de G1 con la proteína

endosomal LAMP1 (5,8,25,26). Los cambios conformacionales en el complejo glicoproteico de envoltura habilitarían la exposición del péptido de fusión, región hidrofóbica de G2, que interactuaría con la membrana endosomal dando lugar al proceso de fusión de membranas y se ha propuesto que el péptido SSP y su miristilación jugarían un papel importante en dicho proceso (9,15,24).

1.1.2.2. Síntesis de proteínas y RNAs virales

Producida la fusión entre la membrana viral y la endosomal y liberada la nucleocápside al citoplasma, la transcripción y replicación del genoma ocurre tal como se ejemplifica para el segmento S en la figura 4. Estudios realizados en base a sistemas de genética reversa, los cuales permiten la expresión de análogos de los genomas de TCRV y LCMV, demostraron que tanto la transcripción como la replicación del genoma requieren de las proteínas virales N y L (27–29). En células infectadas con TCRV se han podido detectar estructuras discretas enriquecidas en proteína N que conformarían los complejos de transcripción-replicación viral en los cuales el RNA viral interactuaría a su vez con lípidos y proteínas celulares, tales como proteínas de la subunidad menor ribosomal, proteínas de gránulos de estrés y algunos factores de inicio de la traducción (30).

En el proceso de transcripción están involucradas tanto las regiones 3'UTR y 5'UTR como la región IGR del genoma viral y los mRNAs resultantes no son poliadenilados (31). Primero ocurre la transcripción a partir de la región 3' del genoma de polaridad negativa, dando lugar a la producción de mRNAs que son subsecuentemente traducidos a las proteínas N y L a partir de los segmentos S y L, respectivamente (Figura 4).

Las estructuras secundarias presentes en IGR jugarían un papel relevante en la terminación de la transcripción (32) y se ha propuesto que la participación de N sería clave para posibilitar el cambio de un proceso de transcripción a un proceso de replicación. En este sentido, se ha propuesto que la acumulación de proteína N sintetizada *de novo* permitiría a la polimerasa viral continuar con la síntesis de RNA más allá de IGR dando origen a la hebra de RNA complementaria al genoma (RNA antigenómico), la cual a su vez sirve de templado para las nuevas moléculas de RNA genómico y para generar los mRNAs subgenómicos que se traducen a GPC y Z a partir de los segmentos S y L antigenómicos, respectivamente (33,34). Sin embargo,

utilizando un sistema de genética reversa basado en un análogo del segmento S de LCMV se demostró que tanto la transcripción como la replicación se ven incrementadas en presencia de cantidades crecientes de N y por lo tanto aún existen dudas acerca del papel de N en el paso del proceso de transcripción al de replicación del genoma de los arnavirus (28). Por otra parte, se ha propuesto que si bien N y L serían constituyentes tanto del complejo proteico involucrado en la síntesis de transcriptos virales (complejo transcriptasa) como de aquel implicado en el proceso de replicación del genoma viral (complejo replicasa), los factores celulares asociados a dichos complejos podrían ser diferentes (28).

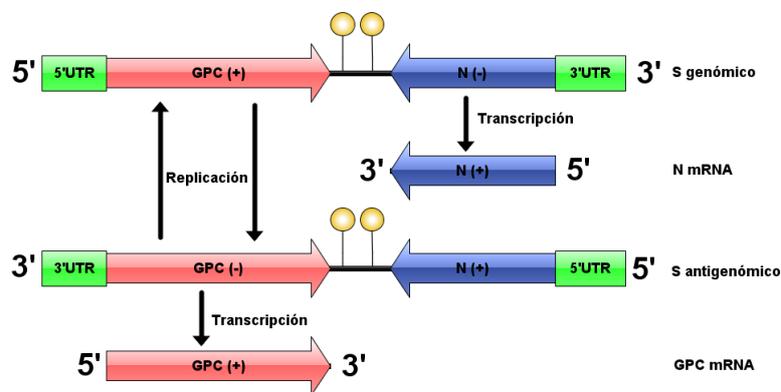


Figura 4. Estrategia de replicación y de transcripción del segmento S del genoma de los arnavirus.

En su extremo 5'UTR los mRNAs virales poseen cap y de 3 a 7 nucleótidos que el virus obtendría a partir de los mRNAs celulares en un proceso de robo de cap (“cap-snatching”) que se piensa sería similar al descrito para otras familias virales como *Orthomyxoviridae*. La proteína L de LASV y de LCMV posee un dominio central con actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA y un dominio N-terminal con actividad de endonucleasa y se presume que éste último estaría involucrado en el robo del cap y de los primeros nucleótidos a los mRNAs celulares (35–38). Asimismo, L posee sitios de unión a otras moléculas de L permitiendo la formación de oligómeros que serían necesarios para la funcionalidad de esta proteína (38). Se ha comprobado que la proteína L de los virus LASV, LCMV, TCRV y MACV interacciona con la proteína de matriz Z y que la sobre-expresión de Z inhibe los procesos de transcripción y replicación del genoma viral. Este efecto inhibitorio ejercido por Z estaría relacionado

con la capacidad de esta proteína de interactuar con L impidiendo la formación de oligómeros de la polimerasa viral (27,39–42).

La proteína de nucleocápside N es la más abundante tanto en las células infectadas como en la partícula viral. Existen evidencias que sugieren que la nucleoproteína N de LASV, LCMV y TCRV forma oligómeros que sufren cambios conformacionales cuando se unen al RNA y se ha demostrado que la auto-asociación de moléculas de N sería indispensable para la síntesis de RNA viral (40,43–46). A través de sus dominios N- y C-terminales, N interactúa con L luego del ensamble de las nucleocápsides de TCRV y esta interacción promovería la liberación transitoria del RNA para que L pueda moverse a lo largo del genoma (40,43,47). N y Z interactúan con L a través de sitios distintos, y se ha comprobado que la interacción de Z con L no afecta la asociación de L con la nucleoproteína N (40).

Por otra parte, se ha descrito que el dominio C-terminal de la proteína N de LASV y de TCRV posee actividad exonucleasa 3'→5' la cual estaría relacionada con la habilidad de esta proteína de suprimir la respuesta de interferón (IFN) por parte de la célula (48,49). Sin embargo, según ensayos enzimáticos realizados *in vitro*, esta función no estaría presente en la proteína N de JUNV (50).

Estudios estructurales sugieren la presencia de una cavidad hidrofóbica en la proteína N de LASV que actuaría como sitio de unión al cap (48). La traducción de los mRNAs virales es dependiente de cap y estudios realizados con mRNAs sintéticos análogos al mRNA de la proteína N de TCRV indican que este proceso estaría regulado por las secuencias 5' y 3' UTR, tal que el extremo 5'UTR estimularía la traducción, mientras que el extremo 3'UTR la inhibiría (51). Los factores de inicio de traducción eIF4A y eIF4G serían indispensables para la traducción de los mRNAs de TCRV, JUNV y PICV, pero el factor eIF4E no participaría en este proceso. Asimismo, se demostró que la proteína N de estos virus posee la capacidad de interactuar con 7-metil guanosina (51,52). Debido a la habilidad de N de unirse al cap y de ser capaz además de interactuar con los factores eIF4A y eIF4G se ha sugerido que N podría reemplazar a eIF4E en la formación del complejo eIF4F conformado por estos tres factores (52). Sin embargo, el hecho de que a concentraciones crecientes de proteína N no se verifique un incremento de la traducción de los análogos de mRNAs de TCRV ha puesto en duda que N pueda sustituir a eIF4E en la formación de eIF4F (51). Contrariamente a lo demostrado para los mammarenavirus del NM, se ha determinado que la proteína N de LCMV co-localiza con el factor de traducción eIF4E,

sin embargo, la interacción de estas proteínas no ha podido ser corroborada por ensayos de inmunoprecipitación (53). Asimismo, se comprobó que durante la infección con LCMV, la proteína Z interaccionaría, de forma directa o a través de la proteína celular de la leucemia promielocítica (PML), con eIF4E y en base a experimentos de sobre-expresión de la proteína Z se ha propuesto que dicha interacción provocaría una disminución de la afinidad del factor eIF4E por el cap lo cual resultaría en la represión de la traducción de algunos mRNA celulares (54–56).

1.1.2.3. Ensamble y liberación de las partículas virales

Las proteínas virales N, Z y L son sintetizadas en ribosomas libres en el citoplasma a partir de los mRNAs virales correspondientes, mientras que GPC, el precursor de las glicoproteínas virales, es sintetizado en ribosomas asociados al retículo endoplásmico (RE) como un precursor pre-GPC que contiene en su extremo N-terminal al péptido señal SSP. El péptido SSP es clivado co-traduccionalmente por la peptidasa de la señal (57,58) (Figura 5).

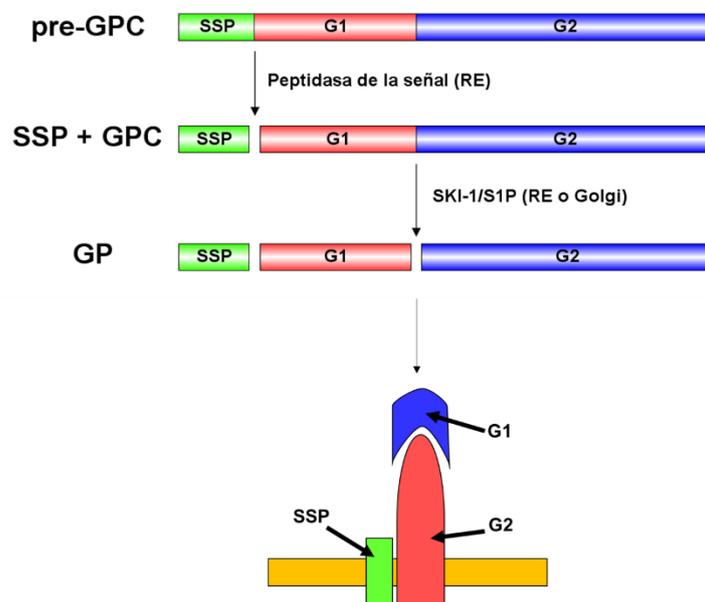


Figura 5. Procesamiento del complejo glicoproteico en diferentes compartimentos celulares.

GPC: precursor de las glicoproteínas de envoltura. SSP: péptido señal. GP: complejo glicoproteico maduro.

Una vez clivado SSP, GPC permanece asociado a SSP y es procesado por la proteasa SKI-1/S1P (Figura 5). El compartimento subcelular en el cual ocurriría el clivaje de GPC para dar origen a G1 y G2 estaría determinado por la secuencia del sitio de corte para la proteasa. Mientras que el clivaje de GPC de LASV ocurriría en el RE/cis-Golgi, para LCMV dicho clivaje tendría lugar en el trans-Golgi (57–60). El clivaje de GPC no sería indispensable para la expresión de G1/G2 en la membrana plasmática (59) pero sí sería necesario para la incorporación de las glicoproteínas a las partículas virales en formación (60). Se ha demostrado que la asociación de SSP a GPC es importante para el transporte y el procesamiento de GPC por SKI-1/S1P y, por otra parte, la presencia de SSP en el complejo GP (Figura 5) es necesaria tanto para el transporte de dicho complejo hacia la membrana plasmática durante el ensamblaje viral como para el proceso de fusión de membranas durante las primeras etapas de la infección (61–63). En particular para JUNV, se ha propuesto que SSP enmascara una señal de retención en RE presente en G2, lo cual posibilitaría el transporte del complejo glicoproteico a través del RE y del Golgi (61). Por otra parte, se ha establecido que la miristilación de SSP, que ocurre luego de su clivaje a partir de pre-GPC, sería relevante para el proceso de fusión de membranas mediado por G2 (64).

Luego de la maduración proteolítica del complejo tripartito SSP/G1/G2, también llamado complejo GP (Figura 5), éste es transportado hacia la membrana plasmática donde tiene lugar el proceso de brotación viral (1,65). La localización del complejo tripartito de JUNV dependería de la presencia de colesterol y de su asociación a dominios “lipid rafts” en la membrana plasmática (66), en tanto que en el caso de LASV, esta asociación dependería del tipo celular infectado (65,67). Una vez en la membrana plasmática, el complejo SSP/G1/G2 de LCMV y LASV interaccionaría con Z, previamente miristilada (68,69). En su extremo C-terminal la proteína Z posee un dominio tardío (dominio L) que le permite interactuar con diferentes factores celulares que intervienen en la brotación de las partículas virales (70–73). A través de determinados motivos de aminoácidos presentes en este dominio L, la proteína Z de JUNV, LASV y LCMV interacciona con componentes del sistema ESCRT (del inglés: Endosomal Sorting Complexes Required for Transport), como Tsg101 (del inglés: Tumor susceptibility gene 101), o las ATPasas Vps4A y Vps4B (67,70,71,74). La brotación de TCRV también depende de la participación de estas ATPasas pero no de Tsg101, mientras que la proteína Z del mammarynavirus del VM LUJV no interaccionaría con ninguno de estos componentes celulares (72,73).

En el caso de MOPV y JUNV, se ha demostrado que la interacción entre las proteínas Z, N y L facilita el reclutamiento de las nucleocápsides durante el ensamblado del virión (75–77). Z interactuaría en primer lugar con las proteínas N y L que forman parte de las nucleocápsides y luego con la membrana plasmática modificando su conformación y dando lugar a la formación de multímeros de Z que a su vez interaccionarían tanto con el péptido SSP de los complejos GP como con componentes de la maquinaria ESCRT, promoviendo de esta forma la curvatura de la membrana plasmática y el proceso de brotación del virus (31,56). Se han reportado evidencias que sugieren que la vía de señalización celular dependiente de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)/Akt participaría de los procesos de brotación de LASV y LCMV (78).

1.2. Fiebre hemorrágica argentina

1.2.1. Características generales

Como se mencionó anteriormente, JUNV es el agente causal de la FHA, enfermedad también conocida como Mal de los Rastrojos, la cual es transmitida por el reservorio natural de JUNV, el roedor *Calomys musculinus* (laucha maicera), cuyo hábitat comprende las zonas rurales del norte y oeste de la provincia de Buenos Aires, sur de Córdoba y Santa Fe y norte de La Pampa (79,80). El virus establece una infección persistente en el roedor y las personas se infectan al entrar en contacto con excretas de animales infectados o al inhalar aerosoles provenientes de las mismas. El virus ingresa entonces al organismo a través de la piel o de las mucosas gástrica o respiratoria (81). Como consecuencia de la infección, en los primeros días el paciente presenta síntomas característicos de un estado gripal como malestar general, dolor de cabeza, fiebre de 38 o 39 °C (82). Conforme avanza la enfermedad, la fiebre persiste, aparecen síntomas como petequias en la mucosa oral y en la región axilar, puede haber hemorragia gingival y suelen presentarse alteraciones neurológicas como disminución de los reflejos y confusión mental. A partir de la segunda semana, la mayoría de los enfermos se recuperan, sin embargo, en ausencia de tratamiento, entre un 15 a un 20 % de los casos son fatales presentando signos vasculares y neurológicos severos (80–82).

Dado que el ingreso del virus al organismo se produce generalmente a través de aerosoles, se ha postulado que las primeras células infectadas serían los macrófagos

alveolares y las células dendríticas que migran a los nódulos linfáticos. Como consecuencia de la replicación viral en dichos órganos JUNV se disemina a través del sistema circulatorio hacia otros órganos como pulmón, riñón, endotelio vascular, órganos linfáticos y sistema nervioso central (82). Durante la fase aguda de la enfermedad, se reducen los niveles de linfocitos B y T y se pueden producir hemorragias causadas tanto por la disfunción del endotelio vascular como por la disminución del número de plaquetas presentes en la sangre (81). Asimismo, en los primeros días de la infección se detecta en sangre una disminución de los niveles de factores de coagulación y un aumento de los niveles de plasminógeno, lo cual contribuiría a explicar el desarrollo de la fase severa de la enfermedad, caracterizada por la aparición de hemorragias (81,82).

1.2.2. Vacunas y tratamiento

Estudios preclínicos mostraron la eficacia de TCRV como vacuna frente a la infección por JUNV. Asimismo, a partir de la cepa viral prototipo de JUNV, denominada XJ, aislada a partir de un enfermo de FHA, se obtuvieron diferentes cepas atenuadas por pasajes sucesivos en cultivos celulares, cerebro de ratón y cobayos. La cepa viral XJCI3, por ejemplo, se obtuvo a partir de la cepa XJ por pasajes sucesivos en cerebro de ratón lactante y posteriormente se clonó en las células MA-111 (riñón de conejo). XJCI3 presentó un fenotipo atenuado en el cobayo y en el ratón respecto a la cepa parental y en base a esta cepa se formuló una vacuna que fue administrada a 636 voluntarios humanos, la mayoría de los cuales desarrollaron una infección subclínica obteniéndose altos títulos de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, los estudios clínicos se discontinuaron debido al hecho de que esta cepa había sido clonada en células heteroploides (82). Posteriormente, la cepa atenuada Candid#1, la cual fue amplificada en la línea celular diploide FRhL-2 (fibroblastos de pulmón de *Macaca mulatta*), mostró ser inmunogénica y segura en estudios preclínicos y clínicos lo cual posibilitó el desarrollo de una vacuna eficaz denominada Candid#1, que en la actualidad es de aplicación gratuita y obligatoria para las personas adultas que viven dentro del área endémica de la enfermedad (80). Sin embargo, resulta importante continuar con los estudios orientados al desarrollo de otros métodos de control debido a las desventajas de este tipo de vacuna tales como la posibilidad de reversión a la virulencia o de menor eficacia frente a la emergencia de nuevas variantes virales (81).

El único tratamiento disponible para hacer frente a la FHA consiste en la administración de suero proveniente de individuos convalecientes. Este tratamiento resulta eficaz siempre y cuando su aplicación tenga lugar durante la primera semana de la infección y presenta además los riesgos propios del uso de hemoderivados (79). Estudios realizados con el compuesto ribavirina, inhibidor de la síntesis de RNA de diversos virus, han demostrado que en algunos casos esta droga es eficaz en el tratamiento de la FHA. Sin embargo, se recomienda su uso sólo dentro de los primeros 5 días de la infección, seguido de la administración de suero inmune (79).

En los últimos años, se han propuesto otras estrategias para el tratamiento de la FHA, como la utilización de anticuerpos monoclonales (83) o de nuevos compuestos antivirales (4,70); sin embargo, estas nuevas terapias se encuentran en fase preclínica de investigación.

1.3. Interacción de JUNV con componentes celulares

El diseño de nuevos tratamientos antivirales, así como la elucidación de los mecanismos de la patogénesis viral, dependen en gran medida del conocimiento de las interacciones de un virus con la maquinaria celular. Sumado a los factores celulares ya mencionados en el ítem 1.1.2., otros trabajos realizados durante los últimos años han aportado un mayor conocimiento acerca del papel de diversos componentes celulares en la replicación de JUNV.

Se comprobó que la internalización de JUNV en células Vero promueve la activación de la vía de señalización celular PI3K/ Akt, la cual estaría involucrada en la entrada del virus a la célula. A su vez, la fosforilación de Akt promovería la supervivencia celular inhibiendo factores pro-apoptóticos y controlando la traducción celular a través de la activación del complejo proteico Raptor/mTOR (del inglés: Regulatory-associated protein of mTOR/ mammalian Target of Rapamycin) (84).

Por otra parte, se ha demostrado que JUNV altera la dinámica de estructuras de silenciamiento de mRNAs reduciendo la formación de gránulos estrés (SGs). La formación de estas estructuras requiere de la fosforilación del factor de inicio de traducción eucariota 2 α (eIF2 α) y se corroboró que tanto la infección con JUNV como la expresión de las proteínas virales N o GPC inhiben la fosforilación de eIF2 α frente al estrés osmótico producido por el tratamiento con arsenito (85). Este estudio demuestra entonces que componentes virales que se expresan tempranamente durante la

infección son capaces de modular la respuesta celular al estrés. La capacidad de JUNV de inhibir la fosforilación de eIF2 α fue corroborada en otro estudio realizado en células A549 (derivadas de carcinoma de pulmón humano) (86). Contrariamente a estos resultados, otros autores reportaron que la infección viral en células A549 incrementaría los niveles de fosfo-eIF2 α (p-eIF2 α) (86,87).

Mediante ensayos de inmunoprecipitación y posterior análisis por espectrometría de masa se determinó la capacidad de la proteína N de JUNV de interactuar con 509 proteínas celulares. Una parte importante de las interacciones establecidas por N se daría con proteínas de unión a nucleótidos y factores celulares involucrados en los procesos de traducción celular y procesamiento, estabilidad y transporte del RNA (86). En otro estudio reciente, de características similares, se estableció la interacción de la proteína viral Z con 262 proteínas celulares, entre las cuales se encuentran proteínas ribosomales, de unión a ATP, del complejo ESCRT y de la superfamilia Ras (88).

Algunos factores celulares que interaccionan con la proteína N como la viperina, cuya síntesis es inducida por IFN, actuarían como factores de restricción de la multiplicación viral (89), mientras que otros componentes celulares favorecerían la replicación de JUNV. Este es el caso de algunas ribonucleoproteínas heterogéneo-nucleares (hnRNPs), proteínas con capacidad de unión a RNA que están involucradas en el procesamiento, transporte núcleo-citoplasmático, traducción y estabilidad de los mRNAs celulares. Si bien estas proteínas son de localización predominantemente nuclear, las mismas fluctúan entre el núcleo y el citoplasma. Las hnRNPs participan en diversos eventos de la replicación diferentes virus con genoma RNA, fundamentalmente en los procesos de síntesis y traducción de RNA virales (90). Nuestro grupo de investigación demostró que la infección con JUNV induce la acumulación citoplasmática de las hnRNPs A/B y K y comprobó que el silenciamiento de estos factores celulares inhibe la multiplicación viral (91,92). Asimismo, se verificó que la proteína N es capaz de interactuar con las hnRNPs del grupo A/B (91), siendo esto posteriormente corroborado por otros autores (86), los cuales también demostraron la interacción de N con otras hnRNPs como hnRNP K. Es interesante destacar que la traslocación de las hnRNPs A/B y K al citoplasma de la célula depende de la fosforilación de estas proteínas por parte de quinasas que forman parte de las vías de señalización celular dependientes de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas).

1.4. Las vías de señalización dependientes de MAP quinasas Raf/MEK/ERK y p38

Las vías de señalización dependientes de MAP quinasas están involucradas en diferentes procesos celulares como regulación del ciclo celular, proliferación, supervivencia, diferenciación y producción de citoquinas, entre otros. Se encuentran altamente conservadas en organismos eucariotas y se componen principalmente de proteínas quinasas modulares que se fosforilan de modo secuencial. Existen 4 subfamilias de vías de señalización dependientes de MAP quinasas que se activan frente a diversos estímulos: Raf/MEK/ERK, p38, JNK y ERK 5. Como se observa en la figura 6, las subfamilias se caracterizan por tener un patrón en común: una proteína quinasa denominada MAPKKK fosforila y activa a otra quinasa, MAPKK, y ésta última fosforila y activa a una MAPK. Una vez activada, MAPK es capaz de fosforilar a diferentes proteínas, entre ellas factores de transcripción, que posibilitan las distintas respuestas biológicas.

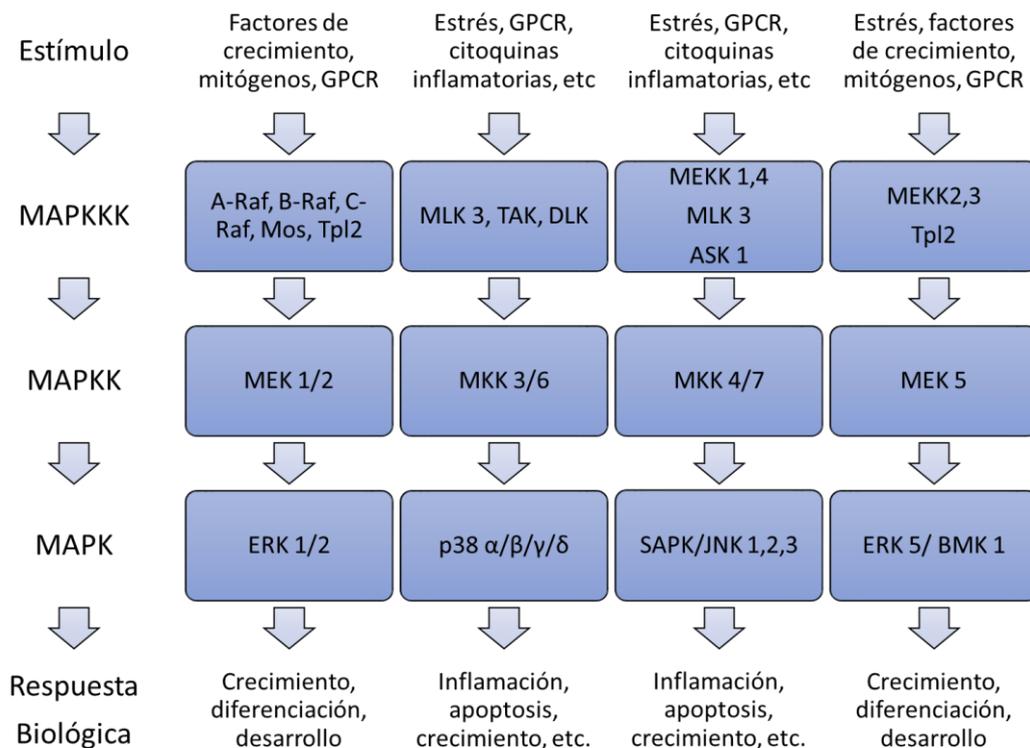


Figura 6. Vías de señalización dependientes de MAP quinasas.

GPCR: receptor acoplado a proteína G. Raf: “Rapidly Accelerated Fibrosarcoma”. Mos: “Moloney Oncogene Sarcoma”. Tpl2: “Tumor Progression Locus 2”. MEK: “MAPK/ERK Kinase”. ERK: “FR”. MLK:

“Mixed-Lineage protein Kinase”. TAK: “Transforming growth factor β -Activated Kinase”. DLK: “Dual Leucine zipper bearing Kinase”. MKK: “Mitogen-activated Kinase”. MEKK: “Mitogen activated protein kinase/ ERK Kinase”. ASK: “Apoptosis Signal-regulating Kinase”. SAPK: “Stress-Activated Protein Kinase”. JNK: “Jun N-terminal Kinase”. BMK: “BiMC related Kinase”. Modificado de (93).

La vía de señalización celular **Raf/MEK/ERK** es activada en respuesta a diversos estímulos que son captados por un receptor tirosina-quinasa (RTK), el cual activa a proteínas miembros de la familia Ras de pequeñas GTPasas, las cuales inician la cascada de señalización hacia las MAPKKs entre las cuales se encuentran las proteínas de la familia de las Raf quinasas. Las Raf quinasas a su vez fosforilan a las MAPKKs MEK1 y MEK2, las cuales tienen como únicos sustratos de fosforilación a las MAPKs ERK1 (44 kDa) y ERK2 (42 kDa) (Figura 6). Esta vía se encuentra implicada en diferentes procesos tales como la traducción, la transcripción, el “splicing” del RNA, la migración, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular y el desarrollo (94).

La vía de Raf/MEK/ERK se interrelaciona con otras vías de señalización celular como por ejemplo la vía dependiente de la proteína quinasa C (PKC). La activación de PKC conduce a la fosforilación de las quinasas Ras y Raf con la consiguiente activación de la cascada Raf/MEK/ERK. PKC puede ser modulada positivamente por ésteres de forbol, como el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), por lo que estos compuestos actúan a su vez como activadores de la vía Raf/MEK/ERK (95) (Figura 7).

La activación de ERK1 y ERK2, las cuales exhiben actividad de serina/ treonina-quinasa, se encuentra regulada espacio-temporalmente, ya que la intensidad y la duración de su activación, así como su localización intracelular, darían lugar a diferentes respuestas (96,97). La localización habitual de ERK1/2 es el citoplasma, pero su activación frente a ciertos estímulos y en presencia de determinados factores celulares reguladores provoca su traslocación al núcleo. En consecuencia, tanto factores citoplasmáticos como nucleares pueden ser sustratos de la fosforilación mediada por ERK1/2. La adición de mitógenos o suero a células quiescentes induce la activación y traslocación de ERK1/2 al núcleo lo cual resulta, por ejemplo, en la fosforilación de factores de transcripción como c-Fos, Fra, Myc y Egr-1 promoviendo la progresión del ciclo celular a G1(94).

Se han desarrollado numerosos inhibidores para la vía Raf/MEK/ERK, los cuales afectan la actividad de diferentes componentes de la misma. Varios de estos

compuestos se encuentran en la actualidad en distintos estadios de evaluación en ensayos clínicos para terapias oncológicas y algunos de ellos han sido incluso aprobados para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (4,98–101). Entre los inhibidores más eficaces podemos mencionar a los siguientes compuestos: sorafenib, dabrafenib y vemurafenib (inhibidores de Raf); U0126, PD98059, selumetinib, trametinib, cobimetinib y refametinib (inhibidores de MEK); y SCH772984, SCH900353, BVD-523 y RG842 (inhibidores de ERK).

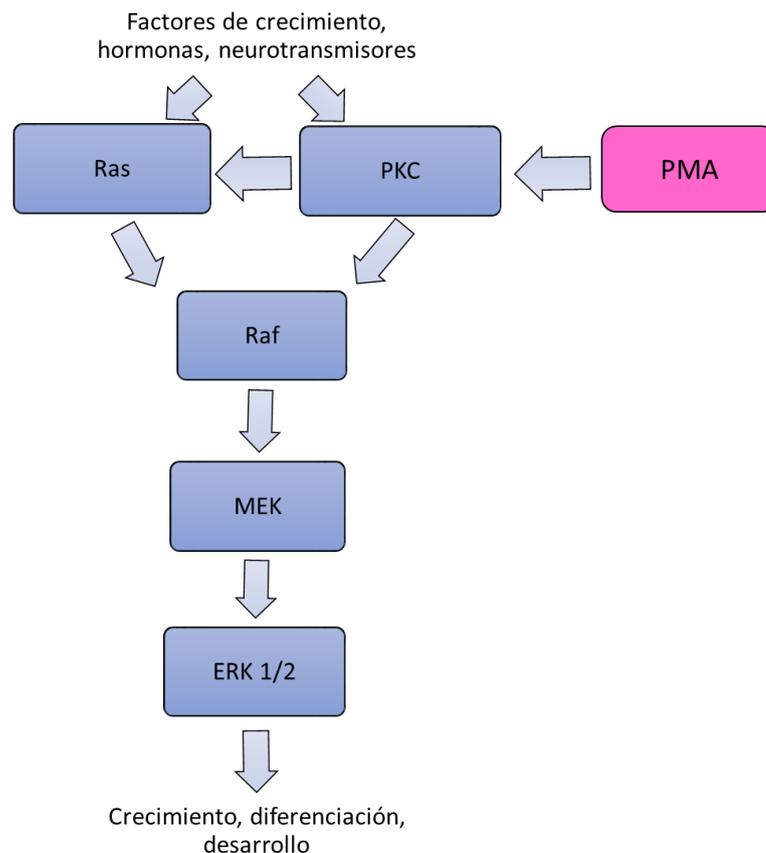


Figura 7. Interrelación de las vías Raf/MEK/ERK y PKC.

PKC: Proteína quinasa C. PMA: forbol 12-miristato-13-acetato.

Por otro lado, la vía de señalización **p38** se activa en respuesta a factores de crecimiento, estrés e inflamación. Esta vía está involucrada principalmente en la inducción de apoptosis y en la producción de citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y las interleuquinas (ILs) IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 (102,103). Existen cuatro isoformas de p38 (α , β , γ y δ) que, si bien tienen algunas funciones

redundantes, también muestran diferencias en cuanto a su capacidad de activar determinados sustratos. Las isoformas α y β han sido hasta el momento las mejor estudiadas y se expresan en una gran variedad de células. La vía p38 comprende distintas MAPKKs, las cuales fosforilan y activan a las MAPKKs denominadas MKK3 y MKK6 (Figura 6). Estas últimas exhiben diferencias en cuanto a su capacidad de fosforilar a las diferentes isoformas de p38 dependiendo del tipo de estímulo. Mientras que frente al estrés ambiental tanto MKK3 como MKK6 son capaces de fosforilar a las isoformas p38 α y p38 β , MKK6 activa p38 γ en respuesta a la citoquina TNF α . A su vez, MKK3 media la activación de p38 γ en respuesta a la exposición a luz UV, a estrés hiperosmótico, al compuesto anisomicina o a TNF α . Las diferentes isoformas de p38 modulan a su vez la expresión de una gran variedad de proteínas entre las que se encuentran proteínas quinasas, fosfatasas, factores de transcripción y reguladores del ciclo celular (104). Por lo general, p38 se localiza en el citoplasma y, frente a determinado tipo de estímulos, parte de las moléculas fosforiladas de p38 permanecerían en el citoplasma regulando la actividad de factores citoplasmáticos, mientras que el resto traslocaría al núcleo y mediaría la fosforilación de componentes nucleares, regulando la apoptosis, el crecimiento celular, la respuesta inmune y la respuesta a daño al DNA (105).

Se han desarrollado diferentes inhibidores específicos de las isoformas α y β de p38, entre ellos podemos mencionar a los compuestos SB203580, SB202190, SCIO-469, losmapimod y SB681323. Algunos inhibidores, como SB203580 y SB202190, compiten con el ATP por la unión al sitio activo de p38; SB202190, al igual que losmapimod y SCIO-469, inhibe tanto la actividad como la fosforilación de p38. En el caso de SB203580, este compuesto inhibe la actividad catalítica de p38 pero no impide su fosforilación (4,103,106–108).

1.4.1. Implicancia de la vía de señalización Raf/MEK/ERK en la replicación de virus patógenos para el hombre

Numerosos virus patógenos para el hombre provocan la activación o inhibición de diferentes vías de señalización celular, entre ellas las rutas dependientes de MAP quinasas. La vía Raf/MEK/ERK ha sido una de las más estudiadas en relación con su

modulación por parte de estos virus y a su implicancia en el ciclo de multiplicación viral (Figuras 8 y 9).

Se ha comprobado que diferentes miembros de las familias *Adenoviridae*, *Hepadnaviridae*, *Herpesviridae*, *Polyomaviridae* y *Poxviridae*, virus con genoma DNA pertenecientes al grupo I de la clasificación de Baltimore, son capaces de inducir la activación de la vía Raf/MEK/ERK (Figura 8). Por otra parte, se ha demostrado que la inhibición de esta vía afecta negativamente la multiplicación viral (109,110,119,111–118).

La activación de ERK inducida por algunos de estos virus conduce a la fosforilación de proteínas celulares de las familias Jun y Fos que se asocian en dímeros que conforman el factor de transcripción AP-1, el cual está involucrado en procesos relacionados con la proliferación y la supervivencia celular. AP-1 es un factor cuya actividad es por lo general regulada de forma positiva por los virus con genoma DNA promoviendo las condiciones intracelulares adecuadas para favorecer la replicación del genoma viral (Figura 9). En este sentido, se ha demostrado que la expresión de la proteína HBx del virus de la hepatitis B (HBV, *Hepadnaviridae*) en células HepG2 (derivadas de hepatocarcinoma humano) induce la fosforilación del factor c-fos a través de la activación de ERK1/2 (109). A su vez, esta activación inducida por HBx podría estar relacionada con el desarrollo de hepatocarcinoma durante la infección crónica por HBV (114). Por su parte, el virus vaccinia (VACV, *Poxviridae*) provoca la activación de la vía Raf/MEK/ERK durante las primeras horas de la infección en fibroblastos murinos y dicha activación estaría relacionada tanto con la fosforilación y traslocación al núcleo de la proteína c-jun para formar parte del factor de transcripción AP-1, como con la inducción del regulador transcripcional EGR-1 (regulador temprano de crecimiento 1), promoviendo la síntesis de DNA viral (113,120). De manera similar se comprobó que tanto la infección con el virus Varicella Zoster (VZV, *Herpesviridae*) como la expresión de la proteína viral ORF12 induce la fosforilación de ERK1/2 y como consecuencia la activación del factor AP-1 (115). Asimismo, en el caso del virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1, *Herpesviridae*) el bloqueo de la vía interfiere con la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S, inhibiendo la transcripción de genes virales y la síntesis de DNA viral (110). Por otra parte, se ha demostrado que la infección de cultivos celulares con algunos miembros de la familia *Polyomaviridae*, como el polyomavirus humano John Cunningham (JCPyV), provoca la activación de ERK, la cual estaría involucrada en la transcripción del genoma viral (112).

Dentro de la familia *Retroviridae* (grupo VI de la clasificación de Baltimore), se ha observado que la interacción de la glicoproteína de envoltura gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) con los receptores celulares, así como la expresión de las proteínas virales Nef, Vpr y Tat, son capaces de inducir la activación de la vía Raf/MEK/ERK. Por otra parte, se comprobó que ERK es incorporada a la partícula viral en formación y existen evidencias que indican que p-ERK es capaz de fosforilar diferentes proteínas virales, entre ellas la proteína p6gag, regulando los procesos de brotación y maduración de las partículas virales (Figura 9) (121–124).



Figura 8. Modulación de la vía Raf/MEK/ERK por virus patógenos para el hombre

Las líneas azules señalan a aquellos virus cuya infección o la expresión de alguna proteína viral provocan la activación de la vía. Las líneas rojas señalan a aquellos virus para los cuales existen reportes que indican que la infección o la expresión de alguna proteína viral inhiben la activación de la vía. Los virus pertenecientes a los distintos grupos de la clasificación de Baltimore se representan con diferentes colores. VLPs: “viral-like particles” o partículas semejantes a virus. HBx: proteína X del virus HBV. NS5A y NS3: proteínas de HCV. EIII: dominio III de la glicoproteína E de DENV.

En el caso de los rotavirus del grupo A (RVA, familia *Reoviridae*), virus con genoma RNA cadena doble (RNAcd) del grupo III según Baltimore, se ha propuesto que la interacción de las proteínas de la cápside con el receptor celular induce la activación de algunas vías de transducción de señales, entre ellas Raf/MEK/ERK, las cuales jugarían un papel importante en la acidificación de los endosomas y por lo tanto en el desnudamiento viral (Figura 9) (125).

Numerosos virus con genoma RNA de cadena simple (RNAs) de polaridad positiva, grupo IV de la clasificación de Baltimore, pertenecientes a las familias *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, y *Picornaviridae* también son capaces de inducir la activación de ERK1/2 (123,126,135–140,127–134).

Dentro de la familia *Flaviviridae* existen reportes contradictorios respecto de la acción de los virus dengue (DENV) y de la hepatitis C (HCV) sobre la activación de la vía Raf/MEK/ERK (Figura 8). Se ha observado que el dominio III de la glicoproteína E de DENV induce la activación de la vía, pero otro reporte señala que la infección viral no induce la activación de ERK sino que por el contrario provoca una disminución de los niveles basales de p-ERK en las células A549 (127,133). En el caso de HCV, se determinó que tanto la expresión de la proteína no estructural NS3 como la interacción de la glicoproteína viral E2 con los receptores celulares, las lectinas L-SIGN y DC-SIGN, inducen la activación de la vía. Sin embargo, la expresión de la proteína no estructural NS5A inhibiría la fosforilación de ERK1/2 y a su vez se han obtenido resultados contradictorios en células que expresan la proteína viral de core (123,139–144). El análisis de la influencia de la cascada Raf/MEK/ERK en la multiplicación de HCV, basado en la medición de la síntesis de RNA a partir de replicones subgenómicos en presencia de inhibidores químicos de la vía o de pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) utilizados para silenciarla, también mostró resultados contrapuestos. Algunos estudios describen que la inhibición de la vía provoca la reducción de la síntesis de RNA viral, mientras que otros autores reportan un aumento de la replicación del RNA viral y un incremento de la síntesis independiente de cap de las proteínas virales (145–147).

En cuanto a los efectos de la inhibición de la vía sobre la infección por miembros del género *Flavivirus* dentro la familia *Flaviviridae*, se ha demostrado que el tratamiento de células Vero con U0126, inhibidor de MEK, reduce la multiplicación del virus de la fiebre amarilla (YFV), de DENV tipo 2 y 3 (DENV-2 y DENV-3) y del virus de la encefalitis

de San Luis (SLEV). En el caso de YFV el tratamiento con U0126 provocó la inhibición de la síntesis de RNA viral y de la formación de invaginaciones en la membrana del RE, estructuras inducidas por la infección en las cuales se localizan los complejos de replicación viral (figura 9) (126). Por otra parte, la inhibición de Raf-1 mediada por oligonucleótidos anti-sentido redujo la replicación de otro flavivirus, el virus de la encefalitis japonesa (JEV), tanto en cultivos celulares como en un modelo de infección letal en ratones (148).

Se ha demostrado que algunos miembros de la familia *Picornaviridae*, como el virus Coxsackie B3 (CVB3) y enterovirus A 71 (EV-A71), activan ERK de forma bifásica, es decir, la infección provoca una primera activación temprana y un segundo pico de activación a tiempos más tardíos. Se comprobó también que la inhibición de la vía provoca una disminución notoria de la producción de partículas y proteínas virales en diferentes tipos de líneas celulares humanas (129,130,134). El proceso de traducción en estos picornavirus es dependiente de la presencia de IRES (sitio interno de entrada ribosomal) y la replicación viral conlleva además la inhibición de la traducción cap-dependiente de los mRNAs celulares debido al clivaje del factor de inicio de traducción eIF4G1 mediado por la proteasa viral 2A. Existe evidencia experimental que indica que la activación de ERK, inducida durante la infección, regularía positivamente la actividad de la proteasa viral 2A, responsable de la inhibición de la traducción celular dependiente de cap, favoreciendo de este modo la traducción independiente de cap de las proteínas virales (Figura 9) (128).

Los virus cuyos genomas están constituidos por RNAs con polaridad negativa, **grupo V** de la clasificación de Baltimore, muestran comportamientos diferentes en cuanto a su efecto sobre ERK1/2 (Figura 8). La expresión de la glicoproteína del virus del Ébola (EboV, familia *Filoviridae*) inhibe la activación de ERK; sin embargo la infección de células dendríticas con partículas virales semejantes a virus (VLPs) conteniendo a las proteínas virales GP y VP40 inducen la activación ERK (123,149). Otras investigaciones indican que la generación de VLPs a partir de la expresión de VP40 en cultivos celulares se encuentra reducida cuando la vía de ERK es inhibida (123)

Los virus influenza A y B (IAV e IBV, familia *Orthomyxoviridae*) promueven la activación de ERK, particularmente IAV lo hace de forma bifásica (123,150–154), de manera similar a lo descrito durante la infección por picornavirus (129,130,134). La activación tardía de ERK1/2 sería consecuencia de la acumulación de la hemaglutinina

viral (HA) en la membrana plasmática (150,152,153,155). El tratamiento de células infectadas con IAV o IBV con el compuesto U0126, inhibidor de la vía, provocó la reducción de la producción viral, tanto en cultivos celulares como en ratones infectados. El análisis del modo de acción antiviral de este inhibidor permitió establecer que el mismo provoca el bloqueo de la exportación de las ribonucleoproteínas (RNPs) virales del núcleo al citoplasma celular durante las etapas tardías del ciclo de multiplicación viral (Figura 9) (150–155).

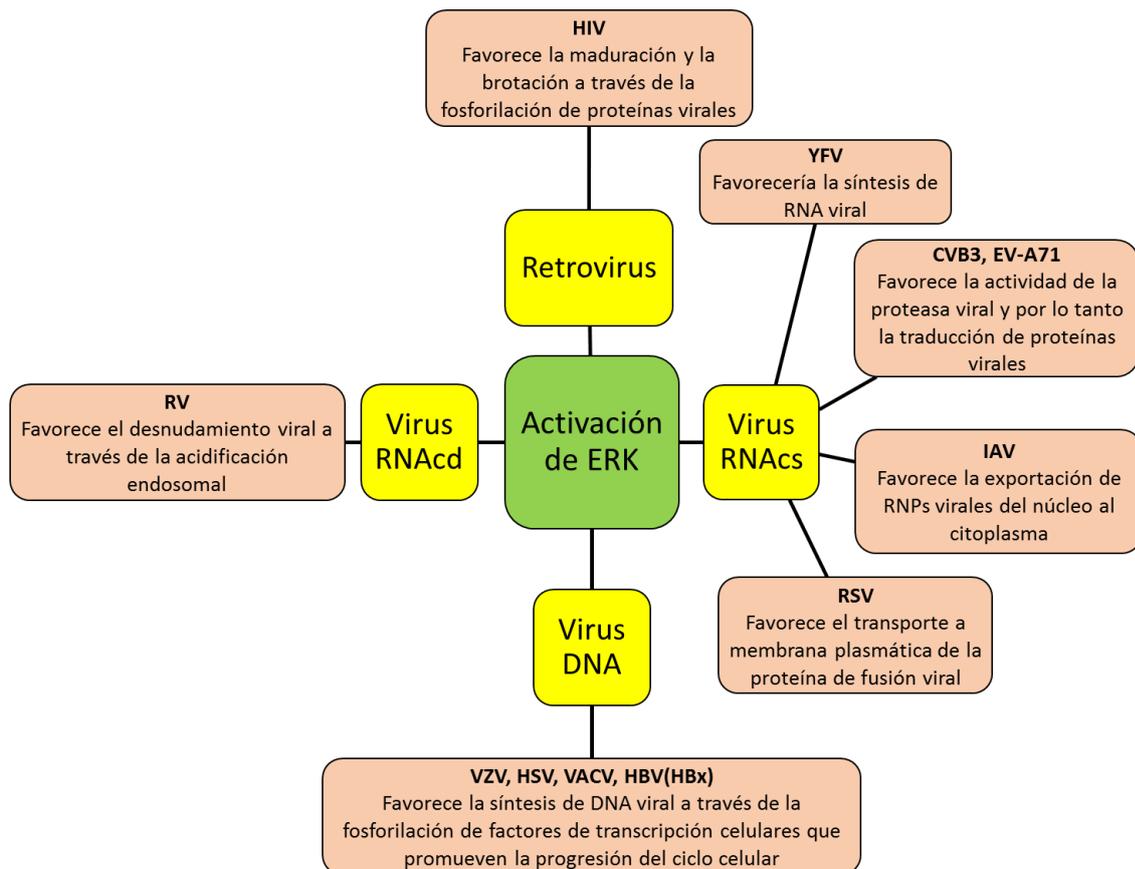


Figura 9. Papel de la vía de señalización Raf/MEK/ERK en el ciclo de multiplicación de diferentes virus.

RNAcd: RNA cadena doble; RNAcs: RNA cadena simple; RNPs: ribonucleoproteínas.

Diferentes virus de la familia *Paramyxoviridae*, como el parainfluenzavirus humano tipo 3 (hPVI3), el virus del sarampión (MV) y el virus respiratorio sincicial (RSV) inducen la activación de la vía Raf/MEK/ERK (Figura 8) y su multiplicación se ve disminuida en presencia de inhibidores de esta vía (119,156–158).

RSV induce una activación bifásica de ERK1/2 en células A549, siendo la activación temprana consecuencia de la unión del virus al receptor celular, mientras

que la estimulación tardía requeriría de la síntesis de macromoléculas virales (156,157). La inhibición de la activación tardía de ERK1/2, en cultivos celulares tratados con los inhibidores de la vía CI-1040 y U0126, no afectaría la síntesis de proteínas o RNA viral pero sí interferiría con el transporte a membrana de la glicoproteína viral de fusión (F), impidiendo la formación de sincicios y la diseminación de la infección (Figura 9) (159).

El conocimiento acerca de la participación de la vía Raf/MEK/ERK en la replicación y patogénesis de los arenavirus es muy limitado. Se ha comprobado que LCMV induce la fosforilación de ERK entre los 60 y los 240 primeros minutos de la infección en fibroblastos murinos (117), mientras que la infección con LASV de células epiteliales de pulmón humano no sólo no induce la activación de ERK sino que impediría que la misma sea fosforilada por activadores específicos de esta vía (Figura 8) (160).

Resultados previos obtenidos en nuestro grupo de investigación mostraron que los mammarenavirus del NM JUNV, TCRV y PICV son capaces de activar la vía Raf/MEK/ERK en cultivos de células Vero (riñón de mono). Asimismo, se demostró que el compuesto U0126, es capaz de inhibir la multiplicación de estos virus en la línea celular mencionada. Por otra parte, la incubación de células Vero infectadas con JUNV en presencia de suero bovino provocó un incremento de la producción viral y del nivel de fosforilación de ERK respecto a la utilización de medio de cultivo sin suero, corroborando que la activación de esta ruta de señalización celular favorece la multiplicación de estos virus.

1.4.2. Implicancia de la vía de señalización p38 en la replicación de virus patógenos para el hombre

La vía p38 es activada por diversos virus con genoma DNAd como HBV (familia *Hepadnaviridae*) o los herpesvirus HSV-1, el virus de Epstein-Barr (EBV) y el citomegalovirus humano (HCMV) (figura 10) (161–168). En líneas celulares derivadas de hepatocitos humanos se comprobó que tanto la infección con HBV como la expresión de la glicoproteína mediana de envoltura viral (AgHBs M) inducen la fosforilación de p38 y dicha activación estaría a su vez relacionada con la producción de IL-6 (161,165). Otro grupo de investigación demostró que el antígeno del core viral (AgHBc) promueve la activación de diferentes cascadas de transducción de señales,

entre las cuales se encuentran Raf/MEK/ERK y p38, en células dendríticas humanas (164). En el caso de EBV, la activación de p38 estaría relacionada con la inducción de autofagia, proceso que promueve el ciclo lítico del virus y se ha demostrado que la inhibición de la vía reduce la producción de proteínas y partículas virales (162,166,169).

Con respecto a la capacidad de los retrovirus de modular la vía p38, la expresión de las proteínas Tat o Nef de HIV-1 en cultivos de células gliales provocó la activación de diversas vías de señalización, entre ellas p38, implicadas en la producción de la quimiocina CCL5 (170,171). Sin embargo, contrariamente a estos resultados, en macrófagos humanos se ha descrito que la infección por HIV-1, o la expresión de la proteína Tat, reducen los niveles de fosforilación de p38 inducidos por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Figura 10) (172).

En el caso de los rotavirus (RV), diferentes cepas son capaces de activar la vía p38 en distintas líneas de células epiteliales de intestino (Figura 10). La inhibición de la vía no altera la expresión de las proteínas estructurales del virus, pero sí afectaría la formación de partículas virales infecciosas. Asimismo, se comprobó que la activación de la vía estaría involucrada en la inducción de la citoquina IL-8 en células intestinales infectadas con RV (173).

Se ha descrito que algunos virus con genoma RNA de polaridad positiva pertenecientes a las familias *Flaviviridae*, *Picornaviridae* y *Coronaviridae* inducen la activación de la vía (174,175,184–191,176–183).

Se demostró que tanto la interacción entre la glicoproteína E2 de HCV con el receptor celular DC-SIGN como la internalización de partículas virales recombinantes no envueltas de HCV promueven la fosforilación de p38 (Figura 10) (174,186). La expresión de la proteína del core de este virus también induciría la activación de p38 y otras cascadas de señalización, las cuales promoverían la expresión de factores que regulan de forma negativa la respuesta inflamatoria en macrófagos, sugiriendo un posible papel de esta proteína viral en el establecimiento de las infecciones crónicas (187). Por otra parte, otro estudio ha propuesto que la activación de p38 por parte de la proteína de core favorecería la proliferación de hepatocitos modulando la transición entre las fases G2-M del ciclo celular (188).

La infección con los flavivirus DENV y Zika (ZIKV) también promueve la activación de la vía p38 (Figura 10). En el caso de DENV la cinética de activación depende del tipo celular y el tratamiento con inhibidores de la vía no afectó o redujo de forma parcial la multiplicación viral (176) y en líneas celulares derivadas de hepatocarcinoma

humano, se demostró que la activación de p38 inducida por DENV llevaría a la apoptosis de los hepatocitos (183). Sin embargo, el principal papel que se le asigna a p38 durante la infección con DENV y ZIKV es la fuerte inducción de citoquinas, la cual es efectivamente bloqueada por inhibidores de p38 (176,189). En el caso de los picornavirus, EV-A71 no sólo induce la activación de p38 (Figura 10) sino también un aumento de la síntesis del mRNA de p38 y se demostró además que la inhibición de la vía reduce la propagación viral, el número de células apoptóticas y la producción de citoquinas inflamatorias inducidas por la infección (185,192). A su vez, se comprobó que el compuesto PD169316, inhibidor de la vía, exhibe actividad antiviral *in vivo* en ratones lactantes infectados con EV-A71 (192).



Figura 10. Modulación de la vía p38 por virus patógenos para el hombre. La líneas azules señalan a aquellos virus cuya infección o la expresión de alguna proteína viral provocan la activación de la vía. Las líneas rojas señalan a aquellos virus para los cuales existen reportes que indican que la infección o

la expresión de alguna proteína viral inhiben la activación de la vía. Los virus pertenecientes a los distintos grupos de la clasificación de Baltimore se representan con diferentes colores. VLPs: partículas semejantes a virus. SARS-CoV: SARS coronavirus; HCoV-229E: coronavirus humano 229E. NELPs: “non-enveloped-like particles”, partículas no envueltas semejantes a virus. Nef y Tat: proteínas de HIV. AgHBs y AgHBc: proteínas de HBV. C y E2: proteínas de HCV. VP24: proteína de EboV. PLpro, 3a, 7a, N y E: proteínas de SARS-CoV, BGLF2: proteína de EBV.

Diferentes virus del grupo V de Baltimore, pertenecientes a las familias *Orthomyxoviridae* y *Paramyxoviridae* poseen la habilidad de activar la vía p38 (Figura 10). IAV y RSV exhiben una activación bifásica de p38, con una primera activación a los 10 min pos-infección (p.i.) y una segunda fase de activación a las 8 h p.i. y en ambos casos la activación temprana se debería a la interacción con el receptor de reconocimiento de patógenos (PRR) de tipo Toll 4 (TLR4) (193). La inhibición de la vía mediante inhibidores químicos (193–197) o microRNAs (198) afectó la multiplicación de IAV, RSV y HPIV así como la producción de citoquinas inducida por la infección. En particular el bloqueo de la vía a tiempos tempranos p.i. interfirió con el tráfico intracelular de las nucleocápsides virales durante el ingreso de RSV y provocó un retraso en la llegada de las RNPs de IAV al núcleo (193).

En el caso de EboV (*Filoviridae*), la sobre-expresión de la proteína VP24 bloquearía la activación de p38 inducida por el tratamiento de cultivos celulares con IFN- β , sin embargo, este efecto dependería del tipo celular (199). No se ha descrito qué ocurre con los niveles de fosforilación de p38 en el contexto de la infección con EboV, pero se ha comprobado que el tratamiento con los inhibidores de la vía SB203580 o SB202190 interfiere con la replicación viral en células presentadoras de antígeno y, a su vez, ensayos realizados con VLPs mostraron que el compuesto SB202190 afecta el proceso de macropinocitosis celular y por lo tanto el ingreso a la célula de las VLPs por esta vía (200).

Respecto de los arenavirus, el conocimiento de la participación de la vía p38 en la replicación de estos virus es prácticamente nulo. Existe un solo reporte que demuestra la activación de p38 en monocitos murinos infectados con PICV (201).

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

JUNV modula la activación de las vías de señalización celular Raf/MEK/ERK y p38 en distintos tipos celulares y dicha regulación resulta esencial para una infección viral productiva. En particular, la vía Raf/MEK/ERK está involucrada en la entrada viral y en la síntesis de macromoléculas virales. Por ello, esta vía puede ser considerada un blanco celular de interés para el desarrollo de nuevas terapias antivirales para hacer frente a las infecciones con JUNV y otros mammarenavirus relacionados.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Identificar factores celulares implicados en la replicación de JUNV, los cuales son imprescindibles para la comprensión de aquellos aspectos de la interacción virus-célula que resultan en una infección productiva, siendo ésta un factor determinante de la patogénesis viral. Asimismo, a través del conocimiento generado en el estudio de la interacción entre el virus y los componentes celulares, posibilitar el hallazgo de nuevos blancos de acción para el desarrollo de compuestos con actividad antiviral para el tratamiento de las infecciones por arenavirus.

2.2.2. Objetivos específicos

1- Analizar el estado de activación de las vías de señalización celular dependientes de MAP quinasas, Raf/MEK/ERK y p38, en diferentes tipos celulares infectados con JUNV y evaluar el efecto de moduladores de ambas vías sobre la multiplicación viral.

2- Establecer cuál es el papel de la cascada Raf/MEK/ERK en el ciclo de multiplicación de JUNV.

3. Materiales y métodos

3.1. Células

La línea celular Vero (ATCC: CCL-81, riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*) fue crecida en medio de Eagle modificado (MEM, Invitrogen) suplementado con 5% de suero de ternero recién nacido (NBCS, GIBCO) inactivado y gentamicina (50 µg/mL). Para el mantenimiento de las células la concentración de suero se redujo a 1,5% (medio de mantenimiento: MM).

Las células A549 (ATCC: CCL-185, carcinoma de pulmón humano) y HEK-293 (ATCC: CRL-1573, riñón de embrión humano) se crecieron en MEM suplementado con 10% de NBCS y gentamicina (50 µg/mL). Para el MM la concentración de NBCS se redujo a 5%.

Las líneas celulares BHK-21 (ATCC: CCL-10, riñón de hámster bebé) y BSR (un clon de células BHK-21) fueron crecidas con medio esencial mínimo de Glasgow (GMEM, Invitrogen) suplementado con L-glutamina (2 mM), 10% de suero fetal bovino (SFB, Invitrogen), y penicilina (100 U/mL)-estreptomina (100 µg/mL) (Invitrogen). Para el MM la concentración de suero se redujo a 1%.

La línea celular HeLa (ATCC: CCL-2, adenocarcinoma de cuello de útero humano) fue crecida en MEM suplementado con 5% de NBCS (GIBCO) inactivado y gentamicina (50 µg/mL). Para el MM la concentración de NBCS se redujo a 0,5%.

La línea celular crecida en suspensión U937 (ATCC: CRL-1593.2), mielomonocitos provenientes de un linfoma histiocítico humano, se propagó en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB (Natocor) inactivado y 50 µg/mL de gentamicina. Para el MM la concentración de SFB se redujo a 5%.

Cuando los cultivos se incubaron en estufa con 4% de CO₂, los medios se suplementaron con 0,2 % de bicarbonato de sodio y se llevaron a pH 7,2 con ácido clorhídrico.

Una vez crecidos los cultivos celulares, los experimentos de este trabajo de tesis se llevaron a cabo en el medio de cultivo correspondiente para cada línea celular y en ausencia de suero para evitar la influencia de los componentes del mismo en la activación de las vías de señalización estudiadas, con excepción de aquellos experimentos en los cuales se explicita el agregado de suero o de medio conteniendo suero.

3.2. Virus

Se usó la cepa atenuada de JUNV (XJCI3) (202,203), la cual fue manipulada en el nivel 2 de bioseguridad y su stock se obtuvo en células BHK-21.

3.3. Compuestos

U0126 (Cell Signaling), ribavirina (Sigma-Aldrich), SB203580 (Cell Signaling), SB202190 (Cell Signaling), clorpromazina (CZ) (Sigma-Aldrich) y forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich) fueron preparados en dimetilsulfóxido (DMSO) y luego diluidos en medio de cultivo libre de suero antes de su uso. La anisomicina (AN) (Sigma-Aldrich) fue preparada en agua y luego diluida en MEM libre de suero antes de su uso. El cloruro de amonio (NH_4Cl) se preparó en buffer fosfato salino (PBS) y se diluyó en MEM sin suero para su uso. En los cultivos no tratados (controles) se usó en cada caso medio de cultivo conteniendo el mismo porcentaje de DMSO que contenían los cultivos tratados con los moduladores de las vías.

3.4. Anticuerpos

Se usaron los siguientes anticuerpos primarios:

- Anticuerpo (Ab) monoclonal (mAb) de ratón SA02-BG12 (dilución 1/250 en PBS) para la detección de la proteína de nucleocápside N de JUNV (204) en los ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI).
- mAb de ratón QC03-BF11 (dilución 1/100 en PBS) para la detección de GPC/G1 de JUNV (Sánchez et. al, 1989) en los ensayos de IFI.
- mAb de conejo anti fosfo-ERK1/2 (p-ERK) (Cell Signaling) (dilución 1/300 en PBS) en los ensayos de IFI.
- mAb de ratón NA05-AG12 (dilución 1/600 en PBS) para la detección de la proteína de nucleocápside N de JUNV o de TCRV (204) en los ensayos de Western Blot (WB).
- mAb de ratón anti GAPDH (Abcam) (dilución 1/20000 en buffer Tris salino (TBS), tween 0,1%, leche descremada 4%) para WB.

- mAb de conejo anti fosfo-ERK1/2 (p-ERK) (Cell Signaling) (dilución 1/1000 en TBS, tween 0,1%, seroalbúmina bovina (BSA) 3%) para WB.
- Ab policlonal de conejo anti ERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology) (dilución 1/2000 en TBS, tween 0,1%, leche descremada 4%) para WB.
- Ab policlonal de conejo anti fosfo-p38 (p-p38) (Cell Signaling) (dilución 1/1000 en TBS, tween 0,1%, BSA 3%) para WB.
- mAb de conejo anti fosfo-eIF2 α (p-eIF2 α) (Cell Signaling) (dilución 1/1000 en TBS, tween 0,1%, BSA 3%) para WB.
- Ab policlonal de conejo anti fosfo-MAPKAPK-2 (p-MAPAPK-2) (Santa Cruz Biotechnology) (dilución 1/500 en TBS, tween 0,1%, BSA 3%) para WB.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios:

- IgG de cabra anti-ratón conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich) (dilución 1/100 en PBS) para IFI.
- IgG de cabra anti-conejo conjugada a TRITC (Sigma-Aldrich) (dilución 1/300 en PBS) para IFI.
- IgG de cabra anti-ratón conjugada a peroxidasa (HRP) (Sigma-Aldrich) (dilución 1/2000 en TBS, tween 0,1%, leche descremada 4%) para WB.
- IgG de cabra anti-conejo conjugada a peroxidasa (HRP) (Amersham) (dilución 1/2000 en TBS, tween 0,1%, leche descremada 4%) para WB.

3.5. Pequeños RNAs de interferencia y plásmidos

En los ensayos de silenciamiento de ERK1/2 se usó un pool de 6 pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) (205): 5'-GACCGGAUGUUAACCUUUA-3', 5'-GAAACUACCUACAGUCUCU-3' y 5'-GCUACACGCAGUUGCAUA-3' para inhibir la expresión de ERK1; 5'-CCAAAGCUCUGGACUUAUU-3', 5'-CAAGAGGAUUGAAGUAGAA-3' y 5'-GUACAGGGCUCCAGAAUU-3' para silenciar la expresión de ERK2. El RNA usado como control (cRNA) posee la siguiente secuencia: 5'-GACCACAATTCTCGATATACAUU-3'.

Los plásmidos pTCRV N y pTCRV L, que expresan las proteínas N y L de TCRV, respectivamente, fueron construidos previamente (43,206). El plásmido pMG-LUC

expresa, bajo el control del promotor T7, un minigenoma (designado “MG-FLUC”), análogo al segmento genómico S de TCRV, que contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga (FLUC) con orientación antisentido reemplazando la secuencia génica de N, flanqueado por las secuencias no codificantes 5' y 3' (5'UTR y 3'UTR) del segmento S. El plásmido pAG-FLUC expresa, bajo el control del promotor T7, un RNA análogo al segmento antigenómico de S de TCRV (designado “AG-FLUC”) que contiene al gen FLUC reemplazando la secuencia codificante de N.

Para obtener el plásmido pAG-FLUC, se obtuvo primero un fragmento de DNA correspondiente a las posiciones 67 a 3066 del RNA de S a partir del plásmido p2b2 (207), previamente digerido con las enzimas Nco I y BstE II. El fragmento se intercambió por el fragmento NcoI-BstEII del plásmido p15-2 (27), que contiene las secuencias terminales no codificantes del segmento S de TCRV. El plásmido resultante, pSag wt, contiene la secuencia completa antigenómica del segmento S, clonada entre el promotor para la RNA polimerasa de T7 y la secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis δ . Finalmente, la secuencia de N fue reemplazada por la secuencia de FLUC en pSag wt; para ello, un fragmento de DNA conteniendo la secuencia de FLUC fue escindido del plásmido p5'wt/3'wt_2 (51), usando las enzimas Sac I y Sfi I, y luego insertado entre los sitios de Sac I y Sfi I de pSag wt.

El plásmido pCMV-T7pol expresa la RNA polimerasa del bacteriófago T7 bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV) (208) y fue provisto generosamente por el Dr. Martín A. Billeter (Universidad de Zurich, Irchel, Suiza).

El plásmido p5'wt/3'wt_2 expresa un transcripto que mimetiza al mRNA de N de TCRV; el plásmido p β Glo/poly(A) expresa un mRNA celular (llamado β -Glo/poly(A)) que contiene la región 5'UTR del mRNA de la β -globina humana y una secuencia poli(A) flanqueando la secuencia de FLUC. El plásmido pRLUC, usado para generar un mRNA sintético que exprese la enzima luciferasa de *Renilla reniformis* (RLUC), fue construido previamente (51).

3.6. Ensayos de viabilidad celular

El efecto citotóxico de los diferentes tratamientos realizados a lo largo de este trabajo se evaluó mediante los siguientes métodos:

3.6.1. Método de exclusión del azul tripán

Este método, basado en la capacidad de las células vivas de excluir el colorante azul tripán del interior celular, se utilizó para evaluar el efecto citotóxico de la transfección de los siRNAs en células Vero y A549 y la viabilidad de las células U937 crecidas en suspensión frente al tratamiento con el compuesto U0126.

Las monocapas de células Vero o A549, crecidas en microplacas de 24 cavidades, transfectadas con los siRNAs o con el cRNA durante 24 h se disgregaron con una solución de tripsina/EDTA (tripsina 0,15%, NaCl 1,6%, KCl 0,08%, glucosa 0,2%; NaHCO₃ 0,2%, EDTA 0,04%) y se resuspendieron en MM. Una alícuota de 0,1 mL de estas células o de células U937 crecidas en suspensión en microplacas de 24 cavidades, tratadas o no con diferentes concentraciones de U0126 durante 24 h, se mezcló con 0,1 mL de una solución de azul tripán 0,4% en PBS. Luego de 10 min de incubación a temperatura ambiente se procedió al recuento de células viables en cámara de Neubauer. Este proceso se realizó por triplicado y el porcentaje de viabilidad se calculó como:

$$\text{Viabilidad Celular (\%)} = \frac{\text{Número promedio de células viables en cada tratamiento}}{\text{Número promedio de células viables en cultivos sin tratar}} * 100$$

3.6.2. Método de MTT

En el caso de las células Vero, A549, HEK293, HeLa o BSR crecidas en monocapa en microplacas de 96 o 24 cavidades, tratadas con los diferentes compuestos a ensayar, la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Este método también se utilizó para evaluar la viabilidad de los cultivos en el ensayo de replicones y se basa en la capacidad de las células vivas de reducir la sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma-Aldrich) dando como resultado un producto coloreado (violeta) e insoluble en agua. Luego de los diferentes tratamientos, se agregó el MTT (concentración final: 1 µg/mL) y las células se incubaron durante 1 h a 37 °C. Al cabo de este tiempo se descartó el medio de cultivo y el producto coloreado precipitado se resuspendió en etanol 96%. La absorbancia se leyó a 570 nm en un lector de placas. Este proceso se realizó por triplicado y el porcentaje de viabilidad se calculó como:

$$\text{Viabilidad Celular (\%)} = \frac{\text{Absorbancia de células tratadas}}{\text{Absorbancia promedio de células sin tratar}} * 100$$

3.7. Titulación viral (método de UFP)

Para realizar la cuantificación de la infectividad viral, se empleó el método de titulación por unidades formadoras de placa (UFP). Monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades se infectaron por triplicado con 0,1 mL de diluciones en MM seriadas al décimo de la muestra a titular.

Luego de la infección, las células se incubaron durante 1 h a 37 °C con una atmósfera conteniendo 4% de CO₂. Transcurrido el periodo de adsorción viral se retiró el inóculo y cada cavidad se cubrió con 1 mL de medio de plaqueo (MP: MEM suplementado con NBCS 0,5%, metilcelulosa 0,7% y gentamicina (50 µg/mL)). Las células fueron luego incubadas a 37 °C (en 4% de CO₂) durante 7 días al cabo de los cuales las placas de lisis se revelaron fijando las células con formol 10% durante 15 min y luego de dos lavados con agua corriente las células se tiñeron 10 min con solución de cristal violeta (1% en 10% de etanol) a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de tinción los cultivos se lavaron con agua corriente para retirar el exceso de colorante, se dejaron secar al aire y se realizó el recuento de placas en aquellas diluciones que contenían entre 20 y 100 placas. El cálculo del título de virus se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Título viral} = \frac{\text{Promedio N° placas} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de inóculo}}$$

3.8. Transfección de siRNAs

Las células A549 y Vero se crecieron sobre cubreobjetos contenidos en una microplaca de 24 cavidades. Para cada cultivo a transfectar se prepararon dos mezclas: una conteniendo 600 nM de RNA en 50 µL de Opti-MEM (GIBCO) y la otra conteniendo 1 µL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 50 µL de Opti-MEM. Cada mezcla se dejó 5 minutos a temperatura ambiente y luego ambas se combinaron y se incubaron con las células durante 4 h a 37 °C. A continuación, las células de cada cavidad se dispersaron con una solución de tripsina/EDTA (ver ítem 3.6.1) y se sembraron en dos

cavidades distintas con MEM conteniendo 5% NBCS. A las 24 h se procedió a una nueva ronda de silenciamiento y 24 h más tarde las células se infectaron con JUNV (m.i.=1). A las 24 h p.i. se cuantificó el rendimiento viral a partir de los sobrenadantes de los cultivos y se analizó la expresión de la proteína viral N en las células del cultivo utilizando un ensayo de IFI.

3.9. Ensayo de Western Blot (WB)

Células crecidas en microplacas de 24 cavidades fueron lavadas con PBS y luego resuspendidas en 50 μ L de buffer de siembra para electroforesis (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, SDS 4%, β -mercaptoetanol 10%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,02%). Como marcador de peso molecular se utilizó una mezcla de marcadores preteñidos (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad). Las muestras se hirvieron durante dos minutos y se sembraron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida 10% PAGE-SDS (Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, con SDS 12%, utilizando como agentes catalizadores TEMED y persulfato de amonio). La electroforesis se realizó a 150 V durante 1 h en buffer de corrida (Tris-HCl 0,025 mM, pH 8,3, glicina 0,192 M, SDS 0,1%). Luego se llevó a cabo la transferencia de proteínas utilizando un sistema de electro-transferencia semi-seco (LBK Electrophoretic transfer 2117 2500 BROMMA) a una membrana de PVDF previamente activada con metanol y equilibrada con buffer de transferencia (composición similar a la del buffer de corrida, pero sin SDS y con metanol 20%). Esto se realizó durante 1,5 horas a 0,9 mA por cm de membrana.

Terminada la transferencia las membranas se lavaron una vez con TBS (Tris-HCl 0,02M, NaCl 0,15M), dos veces con TBS conteniendo 0,1% de Tween- 20 (TBS-Tween) y se bloquearon en TBS-Tween conteniendo leche descremada 5% (solución de bloqueo) durante 1h a 37°C.

Para la detección de las proteínas celulares fosforiladas, las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario. Posteriormente, se realizaron tres lavados con TBS-Tween y las membranas se incubaron durante 1,5 h en agitación a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween y se incubaron 1 min con el reactivo de quimioluminiscencia comercial Western Lightning ECL (PERKInElmer) y se procedió al revelado por impresión en película radiográfica. Para el revelado del resto de las

proteínas virales o celulares se utilizó un reactivo de quimioluminiscencia preparado en nuestro laboratorio (ver más adelante).

Con el fin de reutilizar las membranas para la detección de otras proteínas virales o celulares no fosforiladas, luego del revelado las membranas se lavaron cuatro veces por 5 min en TBS-Tween, se incubaron a 37 °C durante 1 h en solución de bloqueo y luego se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente. A continuación, se realizaron tres lavados con TBS-Tween y las membranas se incubaron durante 1,5 h en agitación a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario. Como control de carga se analizó la expresión de ERK o de gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y se procedió tal como fue descrito anteriormente.

La cuantificación de los resultados obtenidos en los ensayos de WB se realizó utilizando el programa Image J. Los resultados se expresaron como la intensidad relativa de las bandas correspondientes a N, p-ERK, p-p38, p-MAPKAPK2 o p-eIF2 α con respecto a ERK o GAPDH.

Preparación de reactivo de quimioluminiscencia: Se prepararon las soluciones stock de luminol (250 mM) y de ácido cumárico (90 mM) en DMSO las cuales se guardaron a -20 °C. Luego se prepararon las soluciones 1 y 2 y se guardaron en heladera por un máximo de 1 semana. La solución 1 se preparó con 4,6 mL de H₂O; 0,333 mL de Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8; 0,022 mL de ácido cumárico 90 mM y 0,050 mL de luminol 250 mM. La solución 2 se preparó con 4,66 mL H₂O; 0,333 mL de Tris 1,5 M pH 8,8 y 0,01 mL de H₂O₂ 30%. Las soluciones 1 y 2 se mezclaron en relación 1:1 al momento de realizar el revelado.

3.10. Efecto de los compuestos moduladores de las MAP-quinasas sobre el rendimiento viral

Las células Vero, A549, HeLa, HEK-293 o BSR, crecidas en monocapa en microplacas de 24 cavidades, se infectaron con JUNV (m.i.=1). Luego de 1 h a 37 °C se descartó el inóculo y los cultivos se cubrieron con 0,5 mL de medio sin suero con distintas concentraciones de los compuestos U0126, SB203580, SB202190, PMA o AN. Luego de 24 h de incubación se cosecharon los sobrenadantes a fin de cuantificar el rendimiento viral y las células se lisaron en buffer se siembra para electroforesis para realizar el análisis de la expresión de proteínas por WB.

En el caso de las células U937 crecidas en suspensión, las mismas se transfirieron a tubos eppendorf y se infectaron con una m.i. de 10 UFP/célula en un volumen total de 0,2 mL en RPMI sin suero. Luego de un periodo de adsorción de 2 h a 37 °C con agitación periódica, cada suspensión celular se transfirió a la cavidad de una microplaca de 24 cavidades donde se agregaron 0,3 mL de las distintas concentraciones de U0126 diluido en RPMI libre de suero. Todas las células se incubaron durante 24 h a 37 °C, momento en el cual las suspensiones celulares se centrifugaron a baja velocidad y se cuantificó la infectividad viral por el método de UFP a partir del sobrenadante. Por otra parte, las células presentes en el sedimento se resuspendieron en buffer de siembra para electroforesis a fin de realizar el análisis de la expresión de proteínas por WB.

3.11. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Para la detección de las proteínas p-ERK y N se realizó un ensayo de IFI total en el cual las monocapas de células Vero o A549, crecidas sobre cubreobjetos, se lavaron 3 veces durante 5 min con PBS en agitación y se fijaron con metanol.

En el ensayo de IFI total para la detección de GPC/G1, las células Vero crecidas sobre cubreobjetos se lavaron 3 veces durante 5 min con PBS en agitación y se fijaron con paraformaldehído (4% en PBS) durante 10 min a temperatura ambiente. Luego las células se permeabilizaron incubándolas en PBS conteniendo Tritón X-100 (0,2%) durante 10 min a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, las células se lavaron con NH₄Cl (50 mM) durante 15 min a temperatura ambiente en agitación. En el ensayo de IFI de membrana para la detección de G1 se omitió el paso de permeabilización.

En todos los casos las células fijadas se incubaron con el anticuerpo primario durante 1h a 37 °C, se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min con agitación y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1h a 37 °C. Seguidamente, las células se lavaron con PBS y los núcleos celulares se tiñeron con el reactivo de Hoechst 33258 (1 µg/mL). Los cubreobjetos fueron montados en solución de glicerina 90% en PBS (pH 7,2) conteniendo 2,5% 1,4-diazabicyclo(2,2,2)octano (DABCO, Sigma Aldrich) y visualizados en microscopio de fluorescencia. El porcentaje de células infectadas se obtuvo contando al menos 300 células en cada muestra (de 20 campos elegidos al azar; aumento 400X).

3.12. Ensayo de adsorción viral

Células Vero se incubaron con MEM conteniendo o no U0126 (15 μ M) durante 30 min y luego se infectaron con JUNV (m.i.=1) en presencia o ausencia del inhibidor a 4 °C durante 1 h. Luego de 3 lavados con PBS las células se lisaron mediante 2 ciclos de congelamiento/descongelamiento y los restos celulares fueron separados por centrifugación a baja velocidad durante 5 min. El título viral en los sobrenadantes se cuantificó por el método de UFP.

A partir de otra serie de cultivos infectados y tratados de forma similar a la descrita en el párrafo anterior las células se resuspendieron en buffer de siembra para electroforesis y se analizó la expresión de las proteínas p-ERK y ERK mediante WB.

3.13. Ensayo de internalización viral

Células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades se infectaron con aproximadamente 100 UFP de JUNV por cavidad durante 1 h a 4 °C. Luego, se retiraron los inóculos, y se añadió MEM con U0126 (15 μ M) o CZ (40 μ M). Los cultivos se incubaron a 37 °C y, a diferentes tiempos, las células se lavaron con buffer citrato (pH 3,0) durante 1 min para inactivar a las partículas virales no internalizadas. Finalmente, los cultivos se cubrieron con MP y los viriones internalizados fueron cuantificados por el método de UFP.

3.14. Ensayo de desnudamiento viral

Células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades se infectaron con aproximadamente 100 UFP de JUNV por cavidad, a 4 °C durante 1 h y luego se transfirieron a 37°C. A diferentes tiempos se agregó U0126 (15 μ M) o NH₄Cl (50 mM) o medio sin inhibidor (control). Luego de 3 h de tratamiento, las células se lavaron con buffer citrato (pH 3,00) durante 1 min, para eliminar las partículas no internalizadas, y se cubrieron con MP determinándose el número de placas obtenidas en cada tratamiento y en los cultivos controles.

3.15. Tinción con naranja de acridina

Células Vero se incubaron con MEM conteniendo o no U0126 (15 μ M) o NH_4Cl (50 mM) durante 2 h a 37°C. Luego se tiñeron con naranja de acridina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 15 min a 37 °C. Finalmente los preparados se lavaron 3 veces con PBS, se montaron en PBS y se observaron al microscopio de fluorescencia.

3.16. Ensayo de formación de sincicios

Células Vero crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades se infectaron con JUNV (m.i. 1) y a distintos tiempos se trataron con U0126 (15 μ M) o en ausencia del inhibidor. A las 14 h p.i, las células se incubaron durante 30 min a pH ácido (MEM pH 5,0) y luego a 37 °C en MEM (pH 7,0) durante toda la noche. Luego las células se fijaron con metanol a temperatura ambiente durante 15 min y se tiñeron con Giemsa 0,1% en PBS durante 15 min. Las células fueron visualizadas en un microscopio óptico y el número y tamaño de los sincicios se calculó contando al menos 300 núcleos a partir de cada muestra (de 20 campos elegidos al azar; aumento 400X).

3.17. RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)

3.17.1.Extracción de RNA

El RNA total se extrajo usando el reactivo TRI (Genbiotech) a partir de células Vero crecidas en microplaca de 6 cavidades. Para ello, las células se levantaron con 500 μL de TRI por cavidad y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 400 μL de cloroformo, se agitó durante 15 s y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 20.000 g durante 20 min a 4 °C, y se separó la fase acuosa, la cual se mezcló 5 veces por inversión con 1 volumen de isopropanol y se incubó a -70 °C durante 30 min. A continuación, la muestra se centrifugó nuevamente a 20.000 g durante 20 min a 4 °C y el sedimento obtenido se lavó con etanol 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió en 90 μL de agua (libre de RNasas) y se agregaron 10 μL de acetato de sodio 3,0 M y 250 μL de etanol 100%, incubando la muestra nuevamente a -70 °C durante 30 min. Luego se centrifugó a 20.000 g durante 20 min a

4 °C y el sedimento obtenido se lavó con etanol 70%. Después de dejar secar a temperatura ambiente, el precipitado se resuspendió en 20 µL de agua (libre de RNasas) y se cuantificó el RNA con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), verificando que las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 tuviesen un valor aproximado de 2.

3.17.2. Síntesis de DNA copia (cDNA)

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 2 µg de RNA en un volumen final de reacción de 20 µL. Para ello, se preparó una mezcla de reacción A de la siguiente forma:

- 1 µL de los dNTPs (10 mM),
 - 4 µL de buffer de reacción 5X para la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega),
 - 1 µL de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (250 U/µL) (Promega),
 - 1 µL del inhibidor recombinante para ribonucleasas RNasin (40 U/µL) (Promega),
- y
- 3 µL de agua (libre de RNasas).

Luego se preparó una mezcla de reacción B:

- 2 µg de RNA,
- 1,6 µL de primer forward arena 10 µM (5'-CGCACAGTGGATCCTAGGC-3'), complementario a las posiciones 3393 a 3501 del segmento genómico S de JUNV,
- 1,6 µL de primer forward acti1 10 µM (5'-GAGACCTTCAACACCCCAGCC-3'), complementario al mRNA de la β-actina y
- agua (libre de RNasa) hasta completar volumen de 10 µL.

La mezcla B se incubó 5 min a 65 °C y luego se añadió la mezcla A. La solución resultante fue incubada a 42 °C durante 2 h.

3.17.3. PCR cuantitativa (Q-PCR)

Se llevó a cabo por triplicado utilizando 2 µL del cDNA obtenido en el paso anterior, en un volumen final de reacción de 25 µL, añadiendo:

- 0,2 µL de primer arena (100 µM), 0,2 µL de primer 186 (100 µM) (5'-GGCATCCTTCAGAACATC-3'), 10,1 µL de agua libre de RNasas y 12,5 µL de mezcla para PCR (Fast Start Universal SYBR Green Master, Roche) para la amplificación de un fragmento de 186 pb correspondiente a la secuencia antisentido de N; o

- 0,4 µL de primer acti1 (50 µM), 0,4 µL de primer acti2 (50 µM) (5'-GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'), 9,7 µL de agua libre de RNasas y 12,5 µL de mezcla para PCR (Fast Start Universal SYBR Green Master, Roche) para la amplificación de un fragmento de 309 pb correspondientes a la secuencia sentido de la β-actina.

La amplificación y detección se llevó a cabo en un termociclador IQ (Bio-Rad) empleando las siguientes condiciones: 5 min 95 °C; 45 ciclos: 30 s a 95 °C, 45 s a 57 °C, 30 s a 72 °C, 10 s a 70 °C (toma de dato); 5 min 72 °C. También se realizó una curva de melting para corroborar la pureza de las muestras. Para cada muestra se calculó el QR con los datos de C_t de la PCR:

$$QR = 2^{(C_t^{viral} - C_t^{celular})_{control} - (C_t^{viral} - C_t^{celular})_{tratado}}$$

3.18. Ensayo de replicones

Se utilizó un sistema de genética reversa basado en TCRV (27,43,206). Para ello, células BSR crecidas en microplaca de 24 cavidades se transfectaron, utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), con 0,5 µg del plásmido pCMV-T7pol, 1,5 µg de pTCRV N, 0,5 µg de pTCRV L y 1,3 µg del plásmido pMG-FLUC o 1,2 µg de pAG-FLUC. En los cultivos controles, se reemplazaron los plásmidos que expresan N y L por la misma masa de un plásmido vacío. En todas las condiciones, se añadieron 40 ng por cavidad del vector pRLUC que expresa el gen luciferasa de *Renilla sp.* (RLUC) que permite estimar la eficiencia de transfección. Luego de las 4 h de transfección, los sobrenadantes se descartaron, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en presencia o ausencia de U0126 (15 µM) durante 24 h a 37 °C. Finalmente, las actividades de FLUC y RLUC se cuantificaron utilizando un sistema de

multidetección GloMax (Promega). Para cada muestra, la actividad se normalizó respecto a la actividad de RLUC, y la señal de “ruido” en los cultivos celulares no transfectados se restó a los valores obtenidos en los cultivos transfectados con el set completo de plásmidos.

3.19. Ensayo de traducción *in vivo*

Se utilizaron dos mRNAs con cap en su extremo 5' previamente construidos (51): El mRNA tipo viral, que mimetiza al mRNA correspondiente a la proteína N de TCRV, comprende la región 5'UTR del mismo fusionada a la secuencia codificante de FLUC seguida de la región 3'UTR del mRNA viral. El mRNA tipo celular (β -Glo/poly(A)) contiene la región 5'UTR del mRNA de la β -globina humana, la secuencia codificante de FLUC y un segmento 3' de 53 nucleótidos de adenina (poli(A)). Células BSR crecidas en microplaca de 24 cavidades se transfectaron con los mRNA sintéticos anteriormente indicados (100 ng/cavidad) junto con el mRNA de RLUC (50 ng/cavidad) usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en GMEM libre de suero (51). Después de 3 h, se retiró la mezcla de transfección y los cultivos se incubaron en presencia o ausencia de U0126 (15 μ M) durante 4 h a 37 °C. Finalmente se realizó la cuantificación de las actividades de FLUC y RLUC tal como se describió en el ensayo con replicones.

3.20. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante modelos lineales generalizados (GLMs) y GLM mixtos (GLMMs) usando el software R Studio 1.0.153 (209). Los títulos virales, así como el número y tamaño de los sincicios, se analizaron mediante el paquete glmmTMB (210,211), usando una distribución de Poisson truncada en cero o no, según corresponda, con una función de enlace de tipo logarítmica. El resto de los datos se analizaron mediante el paquete stats incluido en R, realizando análisis por ANOVA o test de Student. La elección del modelo se realizó de acuerdo con el Criterio de Información de Akaike (AIC); y en el caso de variables aleatorias en los modelos, éstas se seleccionaron mediante test de devianza. Las comparaciones de Dunnett y Tukey se realizaron usando el paquete lsmeans de R (212). Los valores de p menores a 0,05 fueron considerados significativos.

4. Resultados

4.1. Capítulo 1: Estudio de la importancia de las vías Raf/MEK/ERK y p38 en la multiplicación de JUNV

4.1.1. Participación de la vía Raf/MEK/ERK en la multiplicación de JUNV

4.1.1.1. Análisis de los niveles de fosforilación de ERK en cultivos de células humanas infectados con JUNV

Como se mencionó en la introducción, resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio mostraron que la infección con JUNV provoca la activación de la vía Raf/MEK/ERK en células Vero. Con el propósito de investigar si JUNV inducía la fosforilación de ERK en líneas celulares humanas, cultivos de células A549 y U937 sin infectar o infectados con JUNV (m.i.=1) se incubaron a 37 °C durante 24 h, al cabo de las cuales se examinó el nivel de fosforilación de ERK por la técnica de WB. En paralelo se analizó también la fosforilación de ERK en células Vero. Como se muestra en la figura 11, se observó un incremento en el nivel de fosforilación de ERK en los cultivos infectados respecto a los cultivos sin infectar en las tres líneas celulares ensayadas.

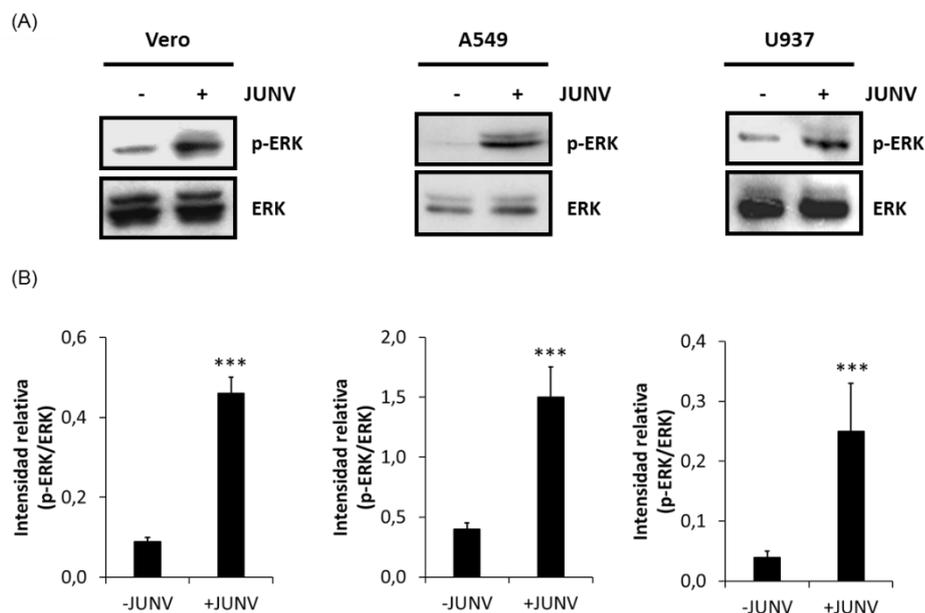


Figura 11. Activación de ERK en cultivos celulares infectados con JUNV.

(A) Células Vero, A549 o U937 se infectaron o no con JUNV (m.i.=1) y a las 24 h p.i. se determinaron los niveles de p-ERK y ERK por medio de WB. (B) Los gráficos muestran la relación p-ERK/ERK de los

resultados obtenidos en (A) en base a la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes utilizando el programa Image J. Los resultados representan el promedio de tres determinaciones \pm desvío estándar (DE). Los datos se analizaron mediante test t de Student (** $p < 0,001$).

Para corroborar la activación de ERK durante la infección viral, se realizó un ensayo de IFI para la detección de la proteína ERK fosforilada (p-ERK) en cultivos de células Vero infectados o no con JUNV. Esto permitió además estudiar la distribución intracelular de p-ERK durante la infección. Asimismo, parte de los cultivos infectados se trataron con el compuesto U0126 (15 μM), inhibidor de la vía Raf/MEK/ERK, durante 24 h. Como se observa en la figura 12A, JUNV indujo la activación de ERK y la localización de p-ERK fue tanto citoplasmática como nuclear. Por otro lado, en los cultivos infectados y tratados con el compuesto U0126 no se detectó activación de ERK. Como se puede observar en la figura 12B la concentración de U0126 utilizada no afectó la viabilidad celular.

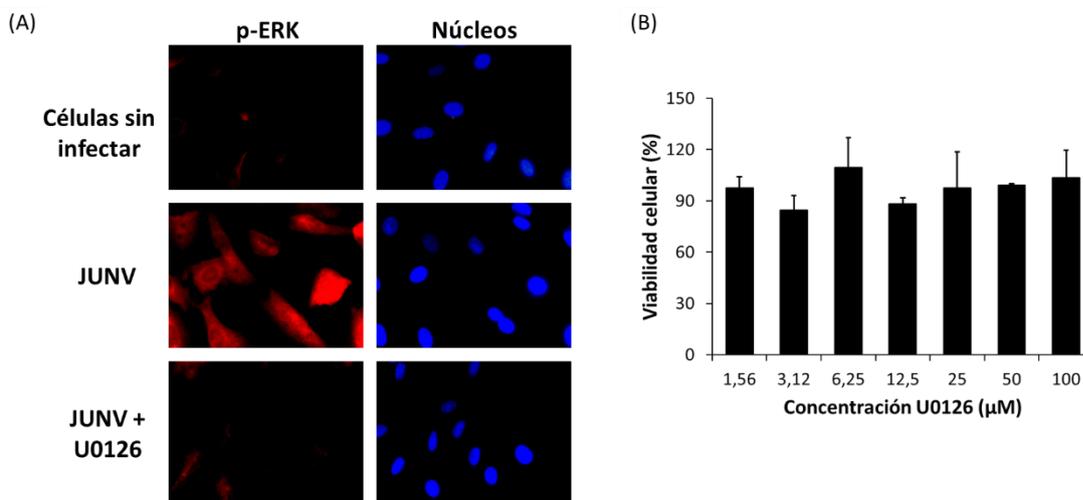


Figura 12. Activación de ERK en cultivos de células Vero infectados con JUNV.

(A) Células Vero se infectaron o no con JUNV (m.i.=1). A las 2 h p.i. los cultivos se incubaron en MEM conteniendo o no U0126 (15 μM) y a las 24 h p.i. las células se fijaron y la activación de ERK se analizó mediante la detección de p-ERK a través de IFI. Los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst 33258. Aumento: 400X. (B) Células Vero se trataron con diferentes concentraciones de U0126 y al cabo de 24 h de incubación a 37 °C se determinó la viabilidad celular por el método de MTT. Los resultados representan el promedio de tres determinaciones \pm DE. Los datos se analizaron mediante ANOVA y posterior test de Dunnett ($p > 0,05$).

4.1.1.2. Cinética de activación de ERK frente a la infección con JUNV

Luego se decidió analizar la cinética de activación de ERK durante las primeras horas de la infección con JUNV. Para ello, cultivos de células Vero y A549 se infectaron con JUNV (m.i.=1) y a distintos tiempos p.i. se analizó la activación de ERK por medio de ensayos de WB (Figuras 13 y 15). Se observó que JUNV indujo una activación bifásica de ERK en células Vero (Figuras 13A y B): una primera activación entre los 15 y los 30 min luego de la infección (activación temprana), y una segunda activación de menor intensidad a las 7 h p.i. (activación tardía).

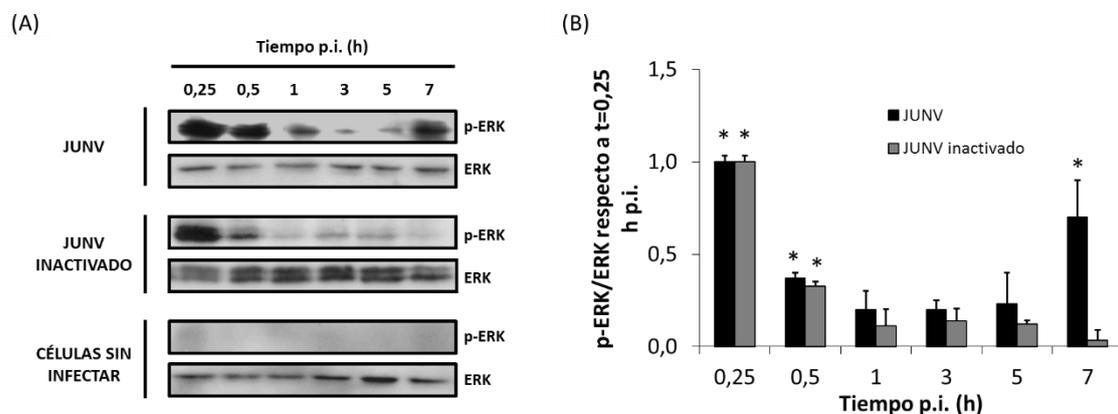


Figura 13. Cinética de activación de ERK en cultivos celulares infectados con JUNV.

(A) Células Vero se infectaron o no con JUNV (m.i.=1) y a distintos tiempos p.i. se determinaron los niveles de p-ERK y ERK por medio de WB. (B) Se muestra la relación p-ERK/ERK obtenida en (A) en base a la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes utilizando el programa Image J. Los resultados se expresan como el promedio de la relación $\left(\frac{p-ERK}{ERK}\right)_{t=i} / \left(\frac{p-ERK}{ERK}\right)_{t=0,25} \pm DE$ en base a la cuantificación de tres experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante ANOVA y test de Dunnett (* $p < 0,05$ respecto a las células sin infectar).

En paralelo las células Vero se infectaron con partículas virales previamente inactivadas con luz UV, capaces de ingresar a la célula, pero no de replicar. En las figuras 13A y B, se muestra que el virus inactivado sólo produjo la activación de ERK a tiempos tempranos p.i. Esto indicaría que la primera fase de activación de la vía podría ser inducida por la interacción inicial del virus con el receptor celular o el ingreso de las partículas virales a la célula, mientras que la fase tardía de activación de ERK requeriría de la replicación viral.

Con el objetivo de determinar si la adsorción del virus a la célula era suficiente para inducir la activación de la vía Raf/MEK/ERK, células Vero se trataron o no con U0126 (15 μ M) durante 30 min y luego se infectaron con JUNV (m.i.=1) e incubaron a 4 °C durante 1 h en presencia o ausencia del inhibidor. Otros cultivos se infectaron en paralelo con JUNV (m.i.=1) durante 1 h a 37 °C y a continuación todos los cultivos se procesaron a fin de determinar el nivel fosforilación de ERK por WB. A diferencia de lo observado en los cultivos infectados a 37 °C, no se detectó activación de ERK en los cultivos infectados a 4 °C, indicando que la internalización viral sería necesaria para la activación de la vía (Figura 14).

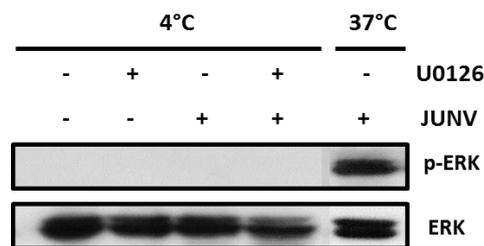


Figura 14. Efecto de la adsorción de JUNV a las células sobre la activación de ERK.

Células Vero pre-tratadas o no con U0126 (15 μ M) durante 30 min fueron infectadas o no con JUNV (m.i.=1) durante 1 h a 4 °C en presencia o ausencia de U0126. En paralelo otros cultivos de células Vero se infectaron con JUNV (m.i.=1) durante 1 h a 37 °C. Posteriormente las células se lisaron y los niveles de p-ERK y ERK se determinaron por WB.

Al analizar la cinética de activación de ERK en las células A549, a diferencia de lo observado en las células Vero, se determinó que durante las primeras horas de la infección JUNV indujo una activación moderada y continua de ERK hasta las 5 h luego de iniciada la infección (Figuras 15A y B).

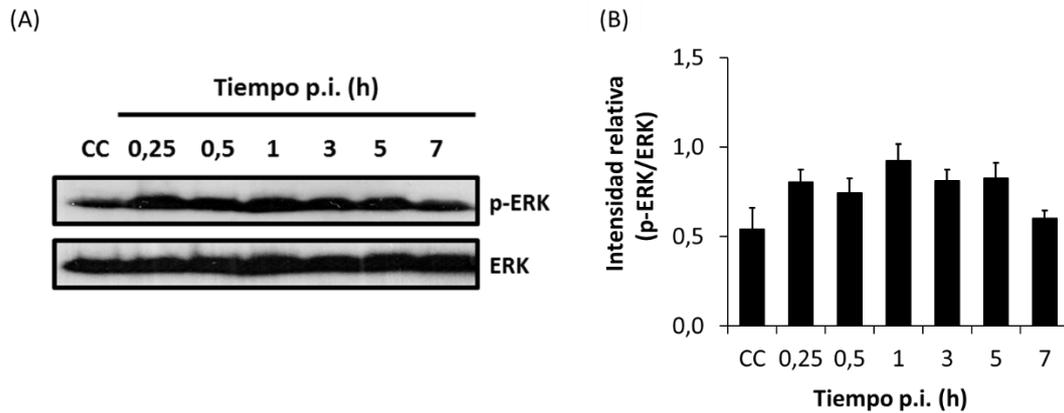


Figura 15: Cinética de activación de ERK en células A549.

(A) Células A549 se infectaron o no con JUNV (m.i.=1) y a distintos tiempos p.i. se determinaron los niveles de p-ERK y ERK por medio de WB. (B) Se muestra la relación p-ERK/ERK obtenida en (A) en base a la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes utilizando el programa Image J. CC: control de células sin infectar procesadas luego de 7 h de incubación. Los resultados se expresan como el promedio de la relación p-ERK/ERK \pm DE en base a la cuantificación de tres experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante ANOVA y test de Dunnett ($p > 0,05$).

4.1.1.3. Efecto del inhibidor U0126 sobre la multiplicación de JUNV en líneas celulares humanas

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio habían demostrado que la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK en células Vero infectadas con JUNV reducía la producción de partículas virales infecciosas. Con el fin de examinar la participación de la vía sobre la multiplicación viral en líneas celulares humanas, en primer lugar, células A549 y U937 se trataron con diferentes concentraciones de U0126 a 37 °C y al cabo de 24 h se analizó la viabilidad celular. En segundo lugar, otra serie de cultivos se infectaron con JUNV y luego de una hora de adsorción a 37 °C las células se trataron con diferentes concentraciones del inhibidor U0126 durante 24 h, al cabo de las cuales se determinó el título viral y se analizaron los niveles de p-ERK obtenidos. El tratamiento con el compuesto U0126 no afectó la viabilidad celular en el rango de concentraciones ensayado (Figura 16A) e inhibió de manera dosis-dependiente la fosforilación de ERK (Figura 16B) y el rendimiento viral (Figura 16C) en ambos tipos celulares.

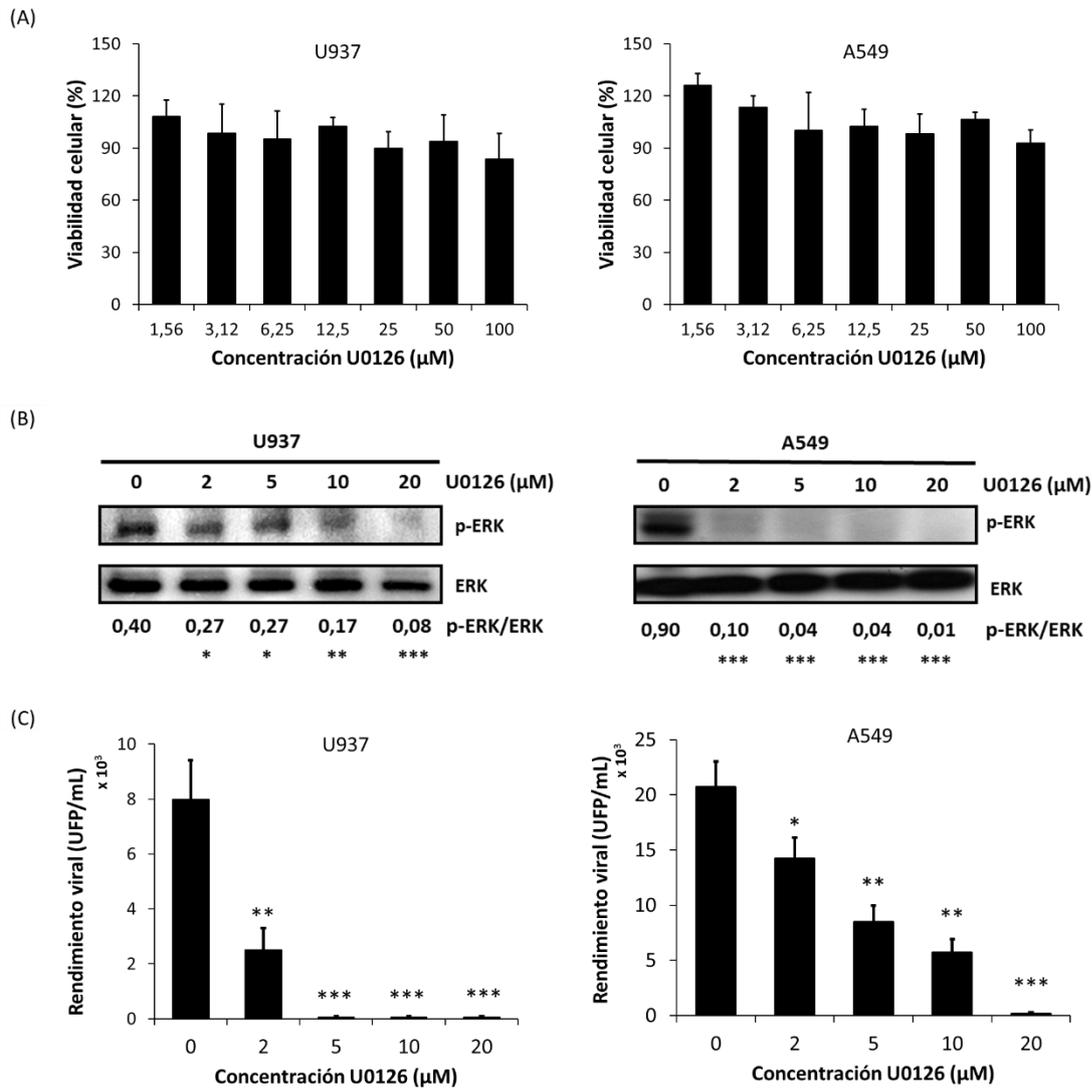


Figura 16. Efecto de la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK sobre la multiplicación de JUNV en cultivos de células humanas.

(A) Células U937 y A549 se trataron con diferentes concentraciones de U0126 y al cabo de 24 h se midió la viabilidad celular por medio del método de exclusión de azul tripán en el caso de las células U937 y por medio del ensayo de MTT en el caso de las células A549. Los resultados representan el promedio de tres determinaciones \pm DE. Los datos se analizaron mediante ANOVA y posterior test de Dunnett ($p > 0,05$). (B y C) Células U937 y A549 se infectaron con JUNV y luego de una hora de adsorción, los cultivos se trataron con diferentes concentraciones de U0126. A las 24 h p.i. se analizó la fosforilación de ERK por WB (B) y se cuantificó el título viral (C). En (B), los números representan el promedio de la relación p-ERK/ERK obtenido en tres experimentos en base a la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes utilizando el programa Image J. Los datos se analizaron mediante ANOVA y posterior test de Dunnett (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). En (C) los datos representan el promedio de tres experimentos \pm DE y se analizaron mediante un modelo GLM de Poisson truncado y posterior test de Dunnett (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.1.1.4. Reversibilidad del efecto inhibitorio de U0126 sobre la activación de ERK

Con el objetivo de analizar cuál era la duración del efecto inhibitorio del U0126 sobre la activación de ERK luego de haber sido removido de los cultivos, células Vero fueron pre-incubadas durante 1 h en medio de cultivo sin suero (MEM) conteniendo o no U0126 (15 μ M). Al cabo de ese tiempo, el medio se reemplazó por MEM o MEM conteniendo 10% NBCS y se estudió la activación de ERK luego de distintos tiempos de incubación a 37 °C. Se observó que en las células que fueron pre-incubadas y posteriormente incubadas en MEM (tratamiento 1) el nivel de p-ERK fue muy bajo y similar en los distintos tiempos analizados, mientras que en las células pre-incubadas con MEM y luego tratadas con MEM conteniendo 10% de suero (tratamiento 2) se detectó una mayor activación de ERK a partir de los 30 min y hasta las 4 h de incubación (Figura 17). Por otra parte, en las células que fueron pre-incubadas con U0126 y luego tratadas con MEM (tratamiento 3) se observaron muy bajos niveles de activación de ERK hasta las 4 h de incubación. Cuando los cultivos pre-tratados con U0126 se incubaron luego en MEM conteniendo 10% de suero (tratamiento 4), los niveles de p-ERK se incrementaron respecto a los cultivos incubados en MEM sin suero (tratamiento 3). Sin embargo, la activación de ERK en el tratamiento 4 resultó algo menor a la observada en los cultivos pre-tratados en ausencia del inhibidor y posteriormente incubados con MEM conteniendo suero (tratamiento 2). Estos resultados indicarían que una vez retirado el compuesto U0126, su efecto inhibitorio puede ser revertido, al menos de forma parcial, por la presencia de un inductor de la activación de la vía.

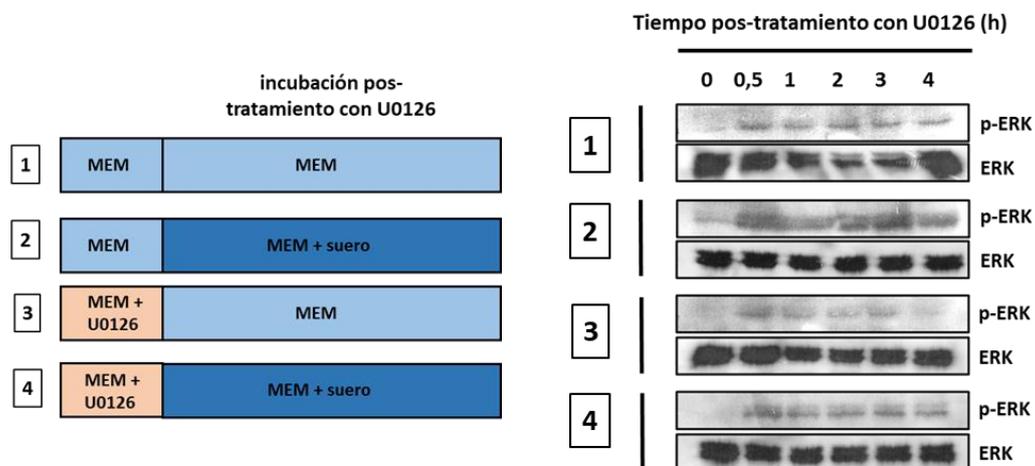


Figura 17. Reversión del efecto inhibitorio de U0126 en presencia de suero bovino.

Células Vero fueron tratadas con MEM conteniendo o no U0126 (15 μ M) durante 1 h a 37 °C. Luego se retiró el sobrenadante y se reemplazó por MEM con o sin 10% NBS y a distintos tiempos de incubación a 37 °C se analizó la activación de ERK por medio de WB.

4.1.1.5. Efecto del silenciamiento de ERK1/2 sobre la infección viral

Con el objeto de corroborar que la vía Raf/MEK/ERK cumple un rol importante en la multiplicación de JUNV, se evaluó el efecto del silenciamiento de ERK en células Vero y A549 infectadas con JUNV. Los cultivos se transfectaron con un pool de siRNAs específicos para ERK1 y ERK2 o con un RNA control (cRNA) y a las 24 h post-transfección se procedió a la infección con JUNV. Luego de 24 h de infección, las células se fijaron con metanol a fin de realizar un ensayo de IFI para examinar la expresión de la proteína viral N y se cuantificó además el rendimiento viral a partir de los sobrenadantes de los cultivos. La ausencia de citotoxicidad del tratamiento se evaluó por el método de exclusión del azul tripán, obteniéndose en los cultivos transfectados un porcentaje de viabilidad celular mayor al 80% con respecto a las células sin transfectar, tanto en las células Vero como A549, mientras que la eficacia del silenciamiento de ERK se corroboró mediante WB. Se observó una marcada disminución en los niveles de expresión de ERK en los cultivos transfectados con siRNA respecto a los transfectados con cRNA (Figura 18A). Además, el silenciamiento de ERK causó una reducción del 65,5% y 91,6% del rendimiento viral en las células Vero y A549, respectivamente (Figura 18B). La figura 18C muestra el efecto inhibitorio del silenciamiento de ERK sobre la expresión de la proteína N en células A549, corroborando la participación de la cascada Raf/MEK/ERK en la multiplicación de JUNV.

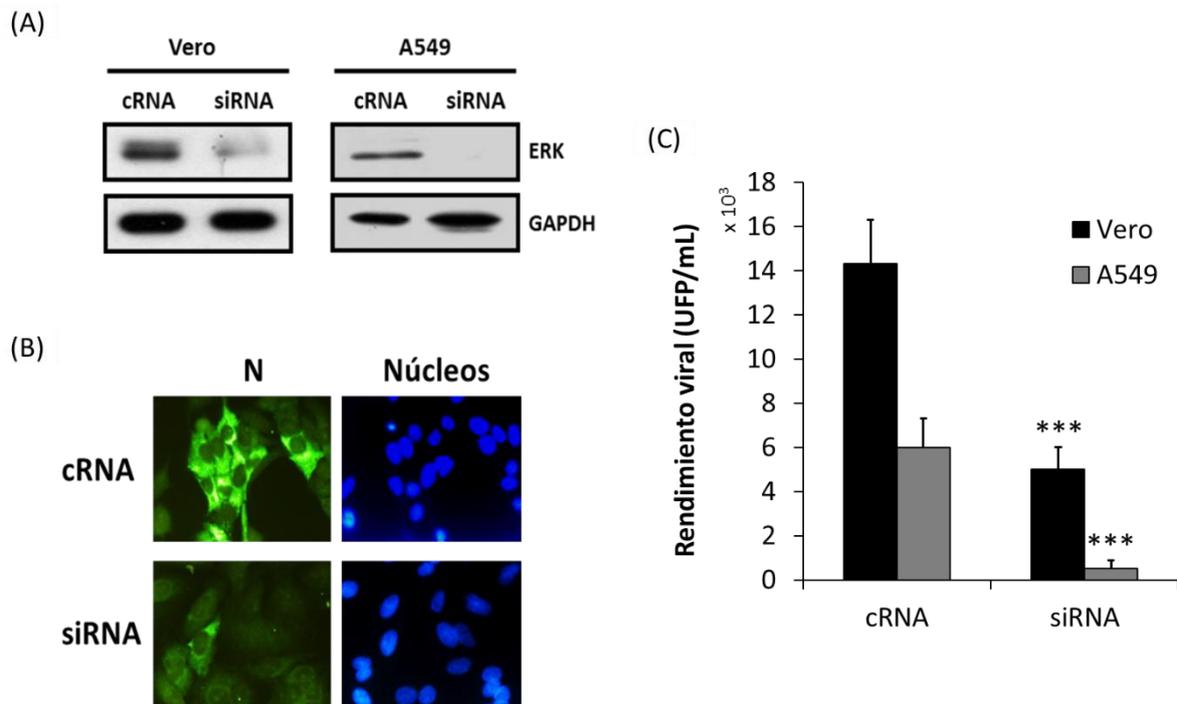


Figura 18. Efecto del silenciamiento de ERK sobre la expresión de N y la multiplicación de JUNV. Células Vero o A549 se transfectaron con una mezcla de siRNAs dirigidos a ERK1 y 2 o con un RNA control (cRNA) y a las 24 h pos-transfección el nivel de expresión de ERK se evaluó por WB (A). Otro conjunto de cultivos idénticamente transfectados se infectaron con JUNV (m.i.=1) a las 24 h pos-transfección. Transcurridas 24 h de infección se cuantificó el rendimiento viral (B) y se analizó la expresión de N por IFI, mientras que los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst 33258. Aumento: 400X (C). En (B) los datos representan el promedio de tres experimentos \pm DE y se analizaron mediante un modelo GLM de Poisson truncado y posterior test de Tukey (**p<0,001).

4.1.1.6. Efecto de la activación de la vía Raf/MEK/ERK sobre la producción viral

La vía de señalización Raf/MEK/ERK puede ser activada por diversos estímulos, tales como factores de crecimiento, trombina y ésteres de forbol. En particular, como se describió en la introducción, el compuesto PMA activa ERK a través de la modulación de la vía de señalización PKC, cuya activación implicaría la fosforilación de Raf y, en consecuencia, la señalización a través ERK (95). Para estudiar el efecto de la activación de la vía Raf/MEK/ERK sobre la multiplicación viral, células Vero fueron infectadas o no con JUNV (m.i.=1) durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se retiró el inóculo y los cultivos se trataron con distintas concentraciones de PMA. A las 24 h p.i. se analizó el estado de activación de ERK y la producción viral. El tratamiento con PMA indujo la fosforilación

de ERK tanto en células infectadas como sin infectar de forma dependiente de la concentración (Figuras 19A y B). Asimismo, las máximas concentraciones de PMA ensayadas provocaron un incremento del rendimiento viral de entre 6 y 12 veces con respecto al obtenido en el cultivo incubado en ausencia de compuesto (Figura 19C).

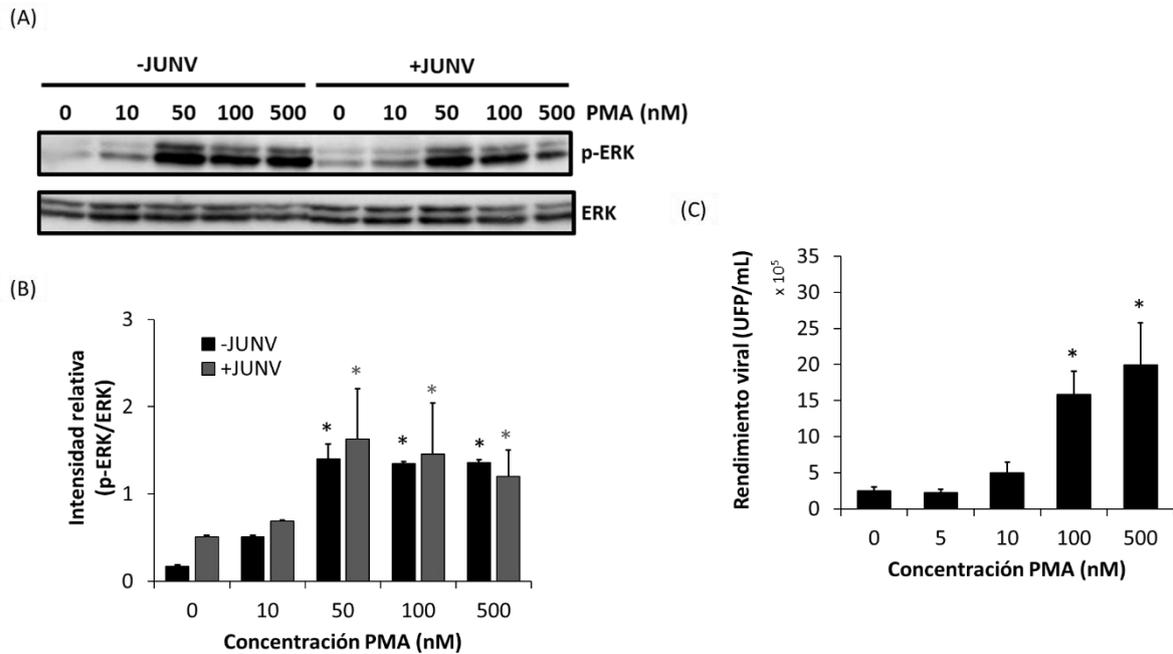


Figura 19. Efecto de la activación de la vía Raf/MEK/ERK sobre la multiplicación de JUNV.

(A) Células Vero se infectaron o no con JUNV (m.i.=1) durante 1 h a 37 °C. Luego se retiró el inóculo y los cultivos se incubaron con diferentes concentraciones de PMA. A las 24 h p.i. se analizó la activación de ERK por medio de WB. (B) Cuantificación de la intensidad de las bandas de p-ERK y ERK obtenidas en el ensayo descrito en (A), a partir de tres determinaciones, utilizando el programa Image J. Los datos representan el promedio de la relación p-ERK/ERK de tres experimentos \pm DE y fueron analizados mediante ANOVA y posterior test de Dunnett (* $p < 0,05$). (C) Otra serie de cultivos fueron infectados con JUNV (m.i.=1) durante 1 h a 37 °C y luego tratados con diferentes concentraciones de PMA. A las 24 h p.i. se cosecharon y titularon los sobrenadantes por el método de UFP. Se representa el promedio de tres experimentos \pm DE, los datos fueron analizados mediante un modelo GLM de Poisson truncado y posterior test de Dunnett (* $p < 0,05$).

4.1.2. Participación de la vía p38 en la multiplicación de JUNV

4.1.2.1. Análisis de los niveles de fosforilación de p38 en cultivos de células Vero infectados con JUNV

Con el fin de estudiar si la infección con JUNV induce la activación de la vía p38 en cultivos celulares, monocapas de células Vero se infectaron (m.i.=1) y a distintos tiempos p.i. se analizó el nivel de fosforilación de p38 mediante ensayos de WB. Se observó que la infección induce una leve activación de la vía entre las 3 y las 16 h p.i., siendo mayor el nivel de activación de p38 a partir de las 24 h p.i. (Figura 20) indicando que JUNV induce una fuerte activación de p38 a tiempos tardíos de la infección en esta línea celular. A fines comparativos se analizó en paralelo la fosforilación de p38 en células Vero sin infectar tratadas con anisomicina (AN), activador de la vía, durante 24 h (Figura 20).

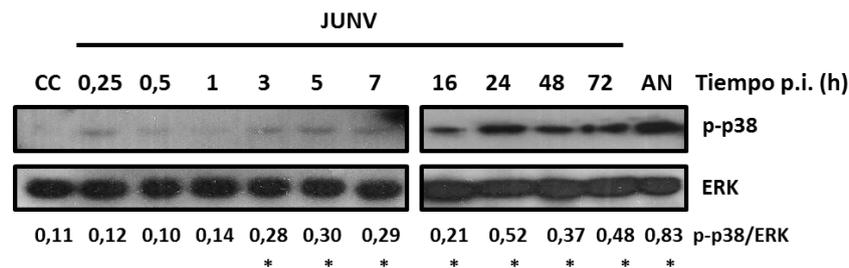


Figura 20. Efecto de la infección con JUNV sobre la activación de p38 en células Vero.

Células Vero se infectaron con JUNV (m.i.=1) y se incubaron a 37 °C. A distintos tiempos p.i. se analizó el nivel de fosforilación de p38 mediante WB. La detección de ERK se utilizó como control de carga. CC: control de células Vero sin infectar incubadas durante 24 h. AN: células Vero sin infectar y tratadas con AN (100 nM) durante 24 h. Los números representan el promedio de la relación p-p38/ERK en base a la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes utilizando el programa Image J. Los datos provienen de tres experimentos independientes y se analizaron mediante ANOVA y posterior test de Dunnett (* $p < 0,05$).

4.1.2.2. Efecto de la inhibición de la vía p38 sobre la multiplicación de JUNV en células Vero

Con el objetivo de investigar si la cascada de señalización p38 tiene alguna implicancia en la multiplicación de JUNV en células Vero, en primer lugar, se examinó

la actividad citotóxica de dos inhibidores de la vía: SB203580 (compuesto que inhibe la actividad quinasa de p38) y SB202190 (compuesto que inhibe la actividad quinasa de p38 y su fosforilación). Para ello, los cultivos de células Vero se incubaron con medio conteniendo distintas concentraciones de cada inhibidor durante 24 h a 37 °C y se cuantificó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Otro grupo de cultivos infectados con JUNV (m.i.=1) se trataron con diferentes concentraciones de SB203580 o SB202190 y a las 24 h p.i se tituló el rendimiento viral.

Tal como se observa en la figura 21A, el inhibidor SB203580 no afectó la viabilidad celular en el rango de concentraciones ensayado, mientras que las mayores concentraciones de SB202190 empleadas (50 y 100 μM) provocaron una disminución parcial de la viabilidad celular. Asimismo, se observó que concentraciones no citotóxicas de ambos inhibidores produjeron la inhibición dosis dependiente de la multiplicación a viral (Figuras 21B y C).

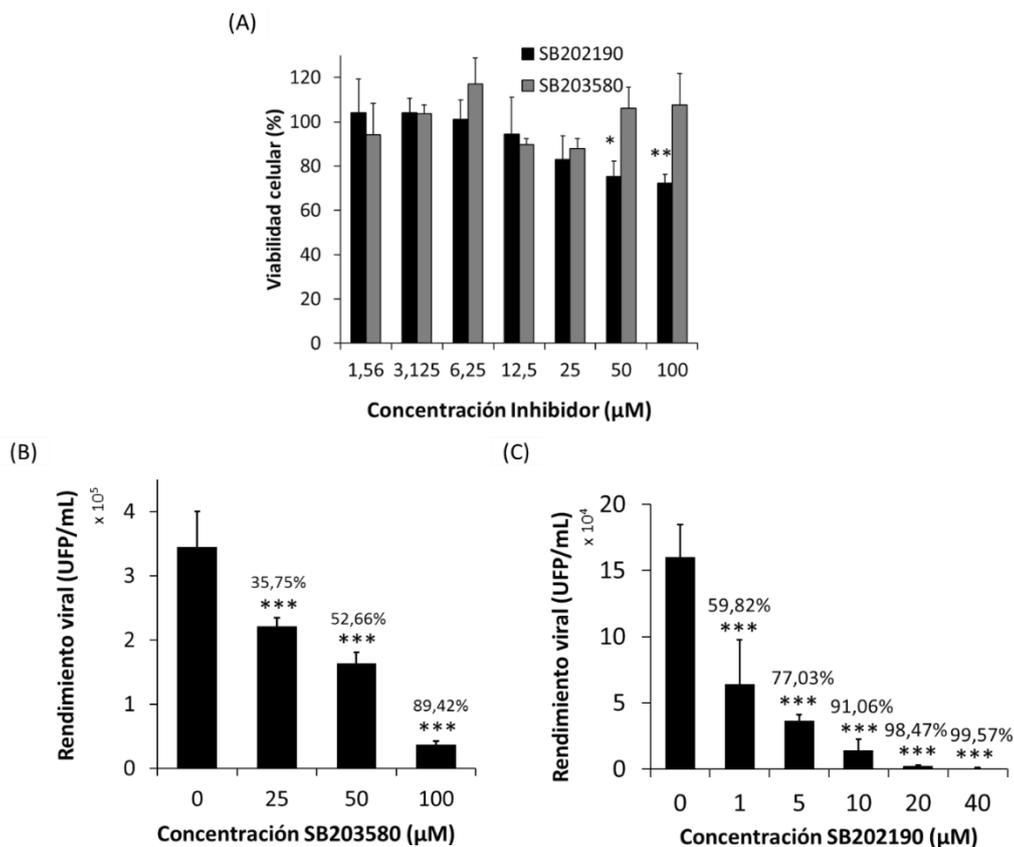


Figura 21. Efecto de la inhibición de la vía p38 sobre la multiplicación de JUNV en cultivos de células Vero.

(A) Células Vero se trataron con diferentes concentraciones de SB203580 o SB202190 durante 24 h, al cabo de las cuales se midió la viabilidad celular por medio del método de MTT. Se representan los valores

promedio de un experimento realizado por triplicado \pm DE. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y posterior test de Dunnett (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). (B y C) Células Vero se infectaron con JUNV (m.i.=1) y luego de 1h de adsorción se trataron con diferentes concentraciones de SB203580 (B) o SB202190 (C). A las 24 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se cuantificó el rendimiento viral mediante el método de UFP. Se representan los valores promedio de un experimento realizado por triplicado \pm DE. Arriba de las barras se indica el porcentaje de inhibición obtenido para cada concentración de compuesto con respecto al control sin droga. Los datos fueron analizados mediante un modelo GLMM con distribución de Poisson truncada en cero y posterior test de Dunnett (** $p < 0,001$) (B y C).

4.1.2.3. Expresión de la proteína N de JUNV en células Vero tratadas con los inhibidores de p38.

Para corroborar los resultados que demostraban que la inhibición de la cascada p38 afectaba la multiplicación viral, analizamos el efecto de los inhibidores de la vía sobre la expresión de la proteína de nucleocápside N. Para ello, células Vero se infectaron con JUNV (m.i.=1) y luego de 1 h a 37 °C los cultivos se trataron o no con SB203580 (100 μ M) o SB202190 (40 μ M). A las 24 h p.i. las células se fijaron y la expresión de N se analizó mediante un ensayo de IFI. Otra serie de cultivos fueron infectados de la misma forma y luego tratados o no, a 1 h p.i., con diferentes concentraciones de SB203580. A las 24 h p.i. se analizó la expresión de N utilizando la técnica de WB.

Se observó una disminución en la expresión de N en células infectadas y tratadas con el inhibidor tanto por medio de los ensayos de IFI (Figuras 22A y B) como por la técnica de WB (Figura 22C). En este último caso, se corroboró una reducción de la expresión de la proteína viral dependiente de la dosis de inhibidor ensayada. Para corroborar el efecto inhibitorio de SB203580 sobre la vía p38, dado que este compuesto no afecta la fosforilación de p38, se cuantificó la fosforilación de MAPKAPK2, sustrato de p38, por medio de WB (Figura 22D). Tanto en los cultivos infectados como en aquellos sin infectar, los niveles de fosforilación de MAPKAPK2 en presencia de SB203580 se redujeron de manera significativa respecto a los cultivos no tratados.

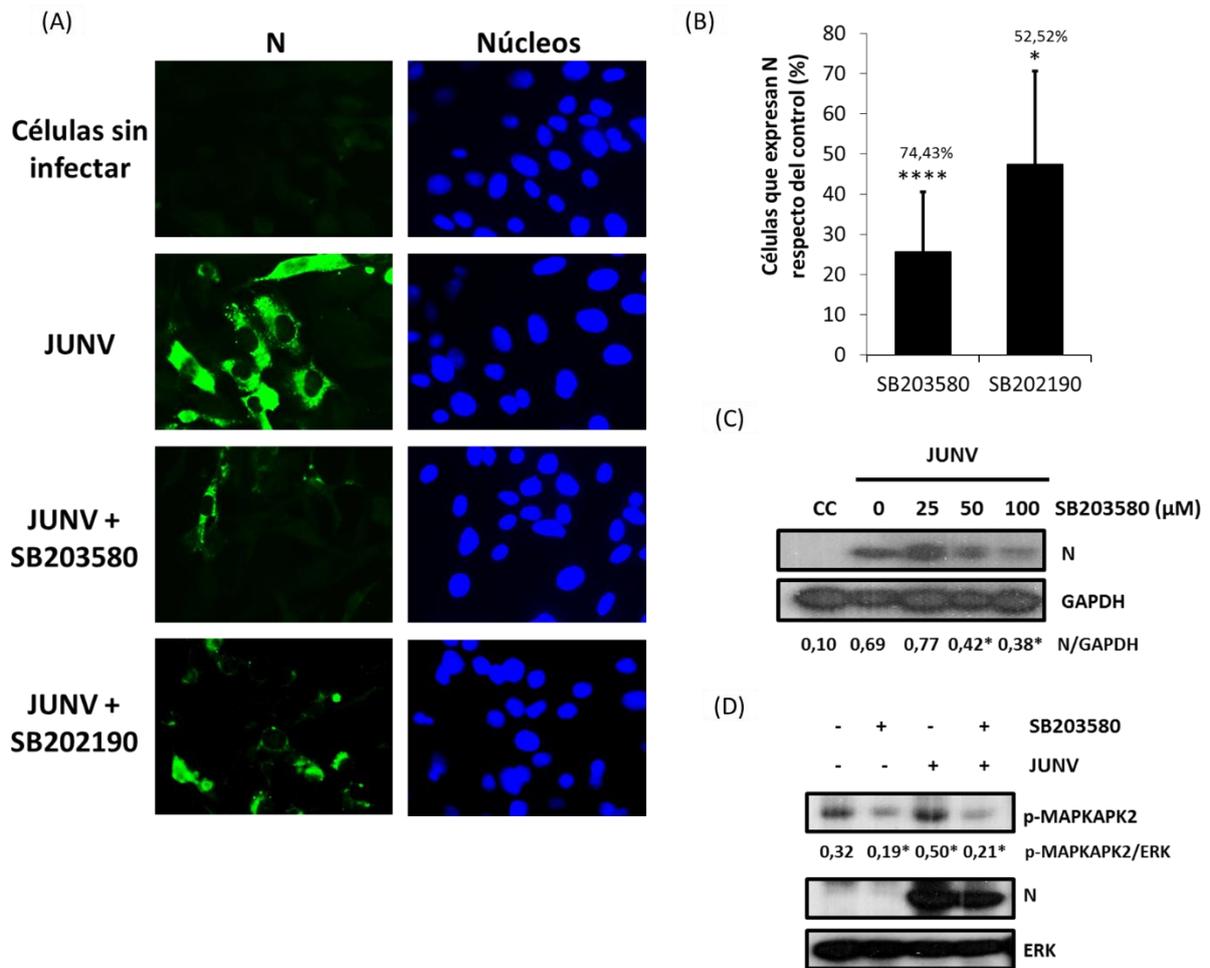


Figura 22. Efecto de la inhibición de la vía p38 sobre la expresión de la proteína N de JUNV en cultivos de células Vero.

(A) Células Vero sin infectar o infectadas con JUNV (m.i.=1) se trataron luego de 1 h de adsorción con SB203580 (100 μM) o SB202190 (40 μM). A las 24 h las células se fijaron con metanol y se analizó la expresión de N mediante IFI. Los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst 33258. Aumento: 400X. (B) Recuento del porcentaje de células que expresan N en los cultivos infectados y tratados con SB203580 o SB202190 respecto de los cultivos infectados sin tratar correspondientes al ensayo mostrado en (A). Los datos representan el promedio de tres experimentos ± DE y se analizaron mediante un modelo GLMM con distribución de Poisson (****p<0,0001). Los números sobre las barras indican el porcentaje de inhibición del número de células fluorescentes respecto al control sin droga. Los números sobre las barras indican el porcentaje de inhibición del número de células que expresan N respecto al control para cada compuesto. (C) Células Vero fueron infectadas con JUNV (m.i.=1) y a 1 h p.i. se trataron con distintas concentraciones de SB203580. A las 24 h p.i. se analizó la expresión de N por medio de WB. CC: control de células Vero sin infectar. Los números representan los valores promedio de la relación N/GAPDH de un experimento realizado por triplicado en base a la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes utilizando el programa Image J. (D) Células Vero sin infectar o infectadas con JUNV (m.i.=1) se trataron con SB203580 (50 μM) y luego de 24 h se analizó el nivel de expresión de p-MAPKAPK2, N y ERK por WB. Los números representan los valores promedio de la relación p-

MAPKAPK2/ERK de un experimento realizado por triplicado en base a la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes utilizando el programa Image J. En (C y D) los datos fueron analizados mediante ANOVA y posterior test de Dunnett (* $p < 0,05$).

4.1.2.4. Efecto de la activación de la vía p38 sobre la multiplicación de JUNV en células Vero

La vía de señalización p38 se activa en respuesta a diferentes estímulos como estrés, citoquinas y factores de crecimiento (104,105) y, tal como se observa en la figura 20, se induce durante la infección con JUNV. El compuesto AN es un antibiótico producido por *Streptomyces griseolus* que a muy bajas concentraciones promueve la fosforilación de p38 (105). Por lo tanto, se decidió evaluar el efecto de la activación de p38 sobre la multiplicación de JUNV. Para ello, las células Vero se infectaron con JUNV (m.i.=1) y a 1 h p.i. se trataron con diferentes concentraciones de AN; finalmente a las 24 h p.i. se analizaron los niveles de p-p38 y N mediante WB y la producción viral por el método de UFP.

En primer lugar, se corroboró el efecto activador de AN sobre la vía p38, el cual se acentúa a las mayores concentraciones de compuesto utilizadas (25 y 50 nM) (Figura 23A). Con respecto a su efecto sobre la multiplicación del virus, el tratamiento con AN no afectó significativamente la producción de virus infeccioso (Figura 23B) en el rango de concentraciones ensayado, así como tampoco se observó efecto alguno sobre la expresión de N ya que la cuantificación de las bandas obtenidas en el ensayo de WB no mostró diferencias significativas respecto al control de células infectadas no tratadas con AN (Figura 23A).

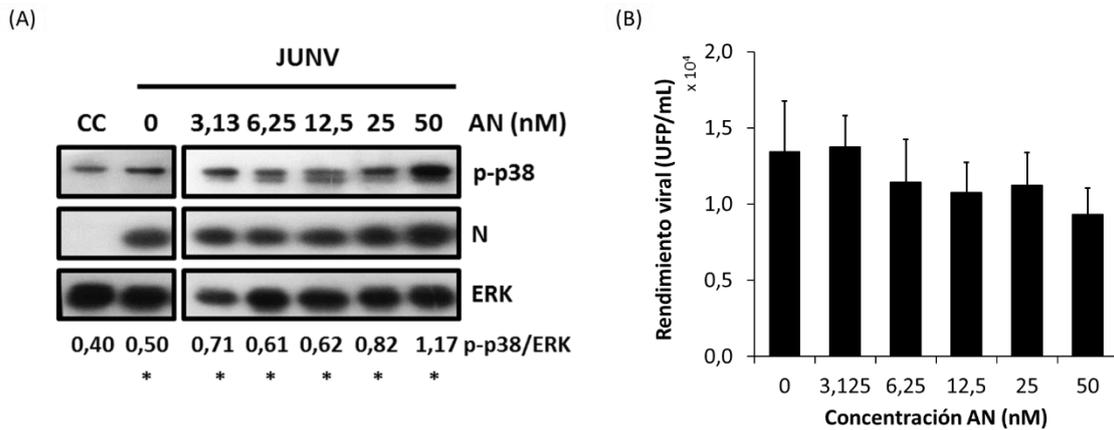


Figura 23. Efecto de la activación de la vía p38 sobre la multiplicación de JUNV.

(A) Células Vero se infectaron con JUNV (m.i.=1) y luego de 1 h de infección se trataron con diferentes concentraciones de AN. A las 24 h p.i. se analizó el estado de fosforilación de p38 y la expresión de N por WB. La detección de ERK se utilizó como control de carga. CC: control de células Vero sin infectar. Los números representan el promedio de la relación p-p38/ERK \pm DE en base a la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes utilizando el programa Image J. Los datos provienen de tres experimentos independientes y se analizaron mediante ANOVA y posterior test de Dunnett (* $p < 0,05$). (B) A partir de los sobrenadantes de los cultivos mencionados en (A) se determinó el rendimiento viral por el método de UFP. Se representan los valores promedio de tres experimentos \pm DE. Los datos fueron analizados mediante un modelo GLMM con distribución de Poisson truncada en cero y posterior test de Dunnett ($p > 0,05$).

4.1.2.5. Efecto de la inhibición de la vía p38 sobre la multiplicación de JUNV en células humanas

Puesto que la inhibición de la vía p38 en cultivos de células Vero afectó la multiplicación de JUNV, decidimos estudiar el efecto de dicha inhibición en cultivos de células humanas. Para ello, en primer lugar, células HeLa y HEK-293 fueron tratadas durante 24 h con diferentes concentraciones de SB202190, al cabo de la cuales se analizó la viabilidad celular por medio de un ensayo de MTT. En el rango de concentraciones ensayado el inhibidor no afectó la viabilidad de las células HeLa, mientras que en el caso de las células HEK-293 el tratamiento con la concentración más alta de compuesto (100 μ M) provocó una disminución significativa de la viabilidad celular (Figura 24A).

Otro grupo de cultivos celulares se infectaron con JUNV (m.i.=1) y luego de la adsorción del inóculo viral durante 1 h a 37 °C las células se trataron con diferentes concentraciones de SB202190; a las 24 h p.i se tituló el rendimiento viral por el método de UFP y se analizó la expresión de la proteína viral N por WB. Tal como se muestra en las figuras 24B y C, en ausencia de inhibidor no se observó un incremento en la fosforilación de p38 luego de la infección e incluso en las células HeLa el nivel de p-p38 fue menor al detectado en las células sin infectar.

Con relación al efecto de SB202190 sobre la multiplicación de JUNV, se determinó que concentraciones no citotóxicas de este compuesto produjeron la inhibición de la multiplicación a viral en ambas líneas celulares (Figuras 24D y E). A la mayor concentración de compuesto empleada se obtuvo un 90,70% y 90,72% de inhibición del rendimiento viral en células HeLa y HEK-293, respectivamente. En el caso de las células HeLa se observó una correlación entre la reducción de los niveles de p-p38 y la disminución tanto de la infectividad como de la expresión de proteína viral (Figuras 24B y D). Sin embargo, en el caso de las células HEK-293, si bien la concentración 50 μ M de compuesto produjo una disminución significativa de la producción viral y de la expresión de N, los niveles de fosforilación de p38 resultaron variables en las diferentes réplicas del experimento, lo cual resultó en un nivel promedio de p-p38 que no difirió de manera significativa del obtenido en el control de células no tratadas con SB202190 (Figuras 24C y E). Por el contrario, a una concentración mayor (75 μ M) el compuesto SB202190 provocó una disminución significativa de los niveles de p-p38, de la expresión de proteína N y de la producción de virus infeccioso.

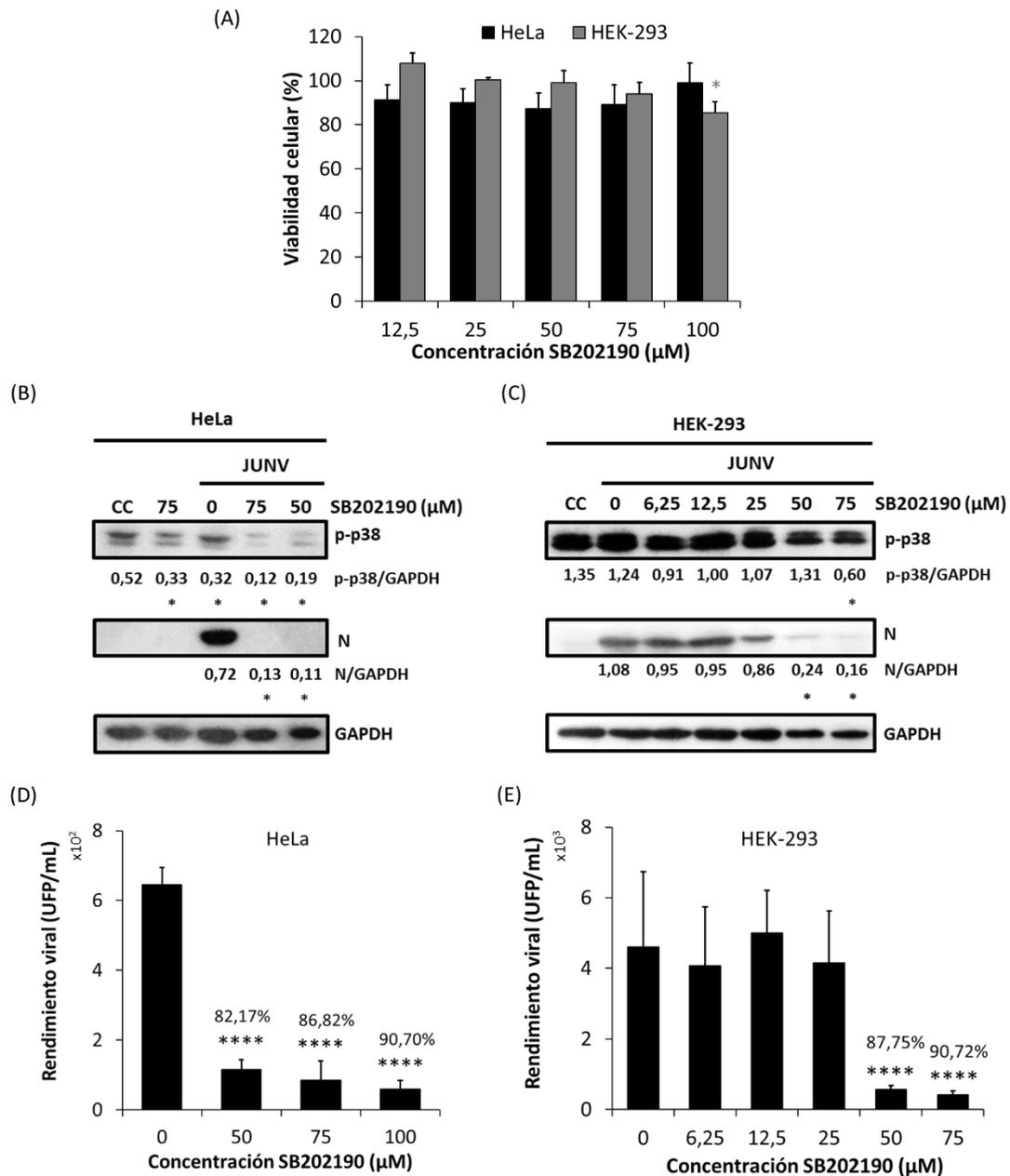


Figura 24. Efecto de la inhibición de la vía p38 sobre la expresión de la proteína N y la producción de virus en cultivos de células humanas.

(A) Células HeLa y HEK-293 se trataron con diferentes concentraciones de SB202190 durante 24 h, al cabo de las cuales se midió la viabilidad celular por el método de MTT. Se representan los valores promedio de un experimento realizado por triplicado ± DE. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y posterior test de Dunnett (*p<0,05). Células HeLa (B) y HEK-293 (C) se infectaron con JUNV (m.i.=1) y luego de 1 h de adsorción se trataron con diferentes concentraciones de SB202190. A las 24 h p.i., se analizó el estado de activación de p38 y la expresión de la proteína viral N por WB. Los números representan el promedio de la relación p-p38/GAPDH o N/GAPDH en base a la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes utilizando el programa Image J de un experimento realizado por triplicado. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y posterior test de Dunnett (*p<0,05). CC:

control de células sin infectar (D y E) A las 24 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes de los cultivos correspondientes a (B) y (C) y se cuantificó el rendimiento viral mediante el método de UFP. Se representan los valores promedio de un experimento realizado por triplicado \pm DE. Se indica además sobre las barras el porcentaje de inhibición obtenido para cada concentración de compuesto respecto del control sin droga. Los datos fueron analizados mediante un modelo GLMM con distribución de Poisson truncada en cero y posterior test de Dunnett (**** $p < 0,0001$).

4.2. Capítulo 2: Análisis del papel de la vía Raf/MEK/ERK en el ciclo de multiplicación de JUNV

4.2.1. Efecto de la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK sobre las etapas iniciales de la multiplicación de JUNV.

A fin de determinar si la inhibición de la fosforilación de ERK provocaba algún cambio en la capacidad de JUNV de adsorberse a la célula, los cultivos de células Vero previamente incubados durante 30 min con medio conteniendo o no U0126, se infectaron con JUNV (m.i.=1) durante 1 h a 4 °C en presencia o en ausencia del inhibidor. Luego se procedió a cuantificar el virus adsorbido, por el método de UFP, a partir de los lisados celulares obtenidos por congelamiento/descongelamiento de los cultivos. Como puede observarse en la figura 25, no se hallaron diferencias significativas en la cantidad de virus adsorbido entre las células tratadas y no tratadas con U0126, indicando que la activación de ERK no sería necesaria para la adsorción viral.

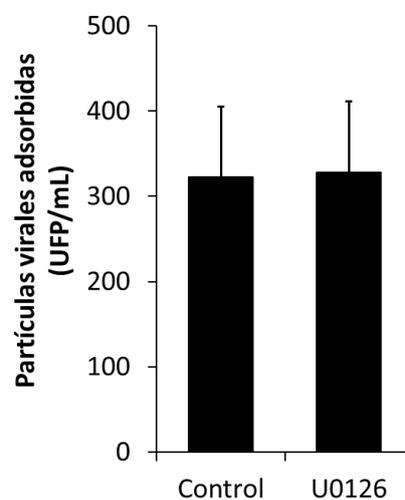


Figura 25. Efecto del U0126 sobre la adsorción de JUNV.

Células Vero, previamente tratadas o no con U0126 (15 μ M) durante 30 min, se infectaron con JUNV (m.i.=1) a 4 °C durante 1 h en presencia o ausencia de U0126 (15 μ M). Luego las células se sometieron a dos ciclos de congelamiento/descongelamiento y el virus adsorbido se determinó por medio de la técnica de UFP. Se representa el valor promedio de tres determinaciones \pm DE. Los datos fueron analizados mediante un modelo GLMM con distribución de Poisson truncada en cero ($p=0,901$).

Con el objetivo de continuar investigando el rol de la activación temprana de ERK en la entrada del virus a la célula se analizó el efecto del inhibidor U0126 sobre la entrada de JUNV. Para ello, células Vero fueron incubadas a 4 °C con aproximadamente 100 UFP durante 1 h. Descartado el inóculo, se agregó MEM o MEM conteniendo U0126 (15 μ M) o el compuesto clorpromazina (CZ, 40 μ M) como inhibidor de referencia de la endocitosis mediada por clatrina. Los cultivos se incubaron a 37 °C y a distintos tiempos p.i., el virus no internalizado fue inactivado con buffer citrato durante 1 min y se procedió a la titulación directa del virus internalizado cubriendo los cultivos con medio de plaqueo. En la figura 26 se muestra que, mientras el compuesto CZ inhibió significativamente la internalización viral, el tratamiento con U0126 no afectó la cinética de entrada del virus con respecto a lo observado en el control sin droga. Estos resultados indicarían que la internalización viral no depende de la activación de la vía Raf/MEK/ERK.

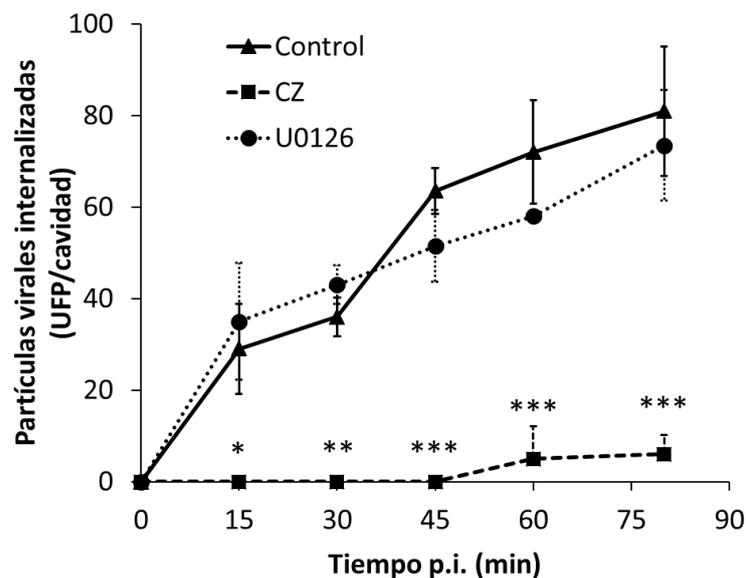


Figura 26. Efecto del U0126 sobre la internalización de JUNV.

Células Vero se infectaron con JUNV (100 UFP) a 4 °C durante 1 h. Luego se añadió MEM o MEM conteniendo U0126 (15 μ M) o CZ (40 μ M) y los cultivos se incubaron a 37 °C. A distintos tiempos p.i. se inactivó el virus no internalizado y las partículas virales internalizadas se cuantificaron por UFP. Los datos representan la media \pm DE obtenida a partir de tres experimentos realizados en forma independiente y se analizaron mediante un modelo Hurdle (inflado en cero) con distribución de Poisson y luego las comparaciones se realizaron mediante el test de Tukey (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Como se mencionó en la introducción, existe un antecedente bibliográfico reciente que propone que la vía Raf/MEK/ERK está implicada en el mantenimiento del pH ácido de las vesículas endosomales y por consecuencia, la inhibición de la vía afectaría el desnudamiento de RVA bloqueando la fusión dependiente de pH ácido de las membranas viral y endosomal (125). Teniendo en cuenta que la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK no afectaba los procesos de adsorción e internalización de JUNV se decidió estudiar el rol de la vía en el desnudamiento viral. Para ello, las células Vero se infectaron con JUNV (100 UFP) durante 1 h a 4 °C. Luego se retiró el inóculo viral, se adicionó MEM y los cultivos se incubaron a 37 °C. A distintos tiempos p.i. (entre 0 y 100 min), se agregó MEM o MEM conteniendo NH₄Cl (concentración final 50 mM), compuesto que eleva el pH endosomal impidiendo el desnudamiento viral, o U0126 (concentración final 15 µM). Luego de incubar cada tratamiento durante 3 h a 37 °C, se procedió a la inactivación del virus no internalizado con buffer citrato a pH 3,0. Finalmente, las células se lavaron dos veces con MEM y se cubrieron con medio de plaqueo. Las placas se revelaron por tinción con cristal violeta a los 7 días p.i. Se observó que el tratamiento con NH₄Cl afectó de manera significativa el desnudamiento viral, incluso cuando el compuesto se agregó a los 80 min p.i. Por el contrario, los cultivos tratados con U0126 a diferentes tiempos p.i. no mostraron diferencias significativas en el número de placas respecto del control sin droga (Figura 27), señalando que la inhibición de la vía no afectaría el desnudamiento viral.

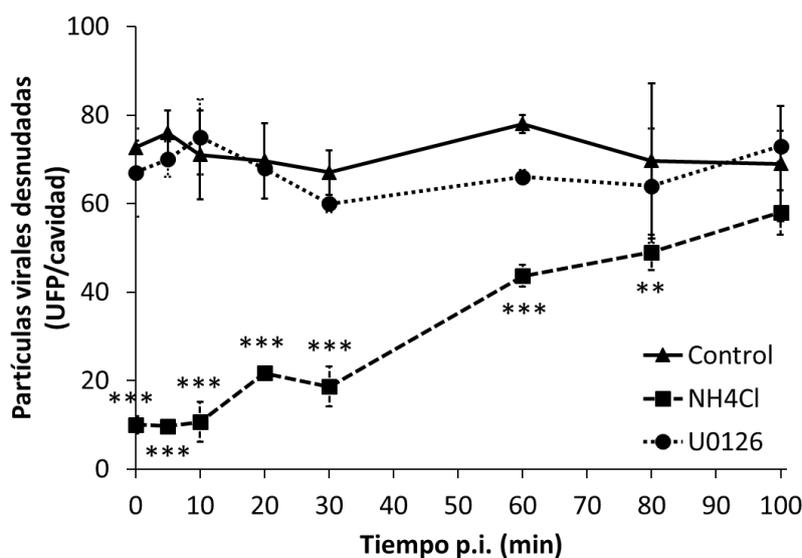


Figura 27. Efecto del U0126 sobre el desnudamiento de JUNV.

Células Vero se infectaron con JUNV (100 UFP) a 4 °C durante 1 h y luego se incubaron a 37 °C. A distintos tiempos p.i. los cultivos se trataron durante 3 h con U0126 (15 µM), NH₄Cl (50 mM) o en ausencia de inhibidor (control). A continuación, el virus no internalizado se inactivó con buffer citrato (pH 3,0) y posteriormente los cultivos se lavaron y cubrieron con medio de plaqueo y se determinó el porcentaje de placas respecto al control para ambos tratamientos. Se representa el valor promedio ± DE obtenido a partir de tres determinaciones. Los datos fueron analizados mediante un modelo GLMM con distribución de Poisson truncada y posterior test de Tukey (*p<0,001).

Por otra parte, se evaluó el papel desempeñado por la vía Raf/MEK/ERK en la acidificación de las vesículas endocíticas. Para ello, las células Vero se trataron con U0126 (15 µM) o con NH₄Cl (50 mM) durante 2 h y luego se tiñeron con naranja de acridina, un colorante catiónico que se acumula principalmente en el interior de vesículas celulares ácidas y se detecta como un puntillado perinuclear con fluorescencia naranja. El aumento del pH intravesicular provoca una disminución en la intensidad o la ausencia de dicha fluorescencia. Como se muestra en la figura 28, las células tratadas con NH₄Cl no exhibieron fluorescencia naranja, mientras que en los cultivos tratados con U0126 el patrón de fluorescencia puntillada naranja alrededor de los núcleos celulares resultó similar al observado en los cultivos control sin droga, indicando que la inhibición de la vía no afectaría el pH de las vesículas ácidas intracelulares.

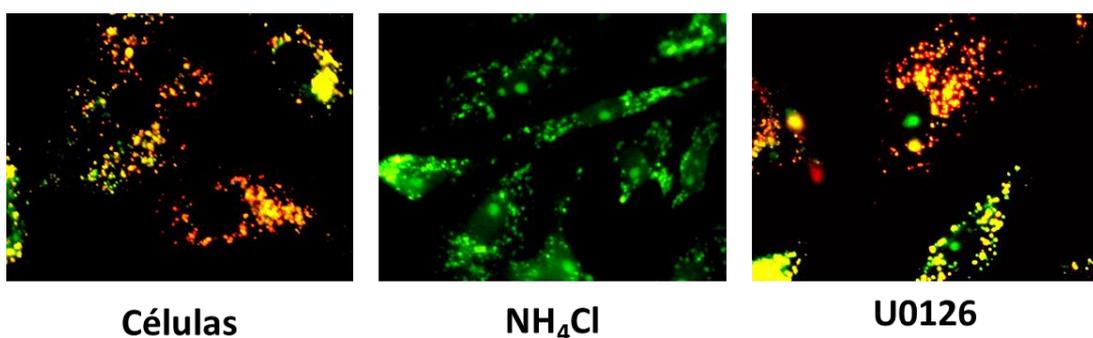


Figura 28. Efecto del U0126 sobre la acidificación de vesículas ácidas intracelulares.

Células Vero se incubaron en MEM conteniendo o no U0126 (15 µM) o NH₄Cl (50 mM) durante 2 h. Luego las células se tiñeron con naranja de acridina, se montaron en PBS y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Aumento 400X.

4.2.2. Efecto de la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK sobre la expresión de las proteínas virales

Dado que la inhibición de la vía de Raf/MEK/ERK impidió la multiplicación de JUNV sin afectar las etapas iniciales del ciclo de multiplicación viral, se decidió analizar el rol de esta cascada de señalización en la expresión de la proteína viral N sintetizada a lo largo de un único ciclo de multiplicación viral. Para ello, los cultivos de células Vero se infectaron con JUNV (m.i.=1) y a las 2, 6 o 10 h p.i. se agregó U0126 (15 μ M). A las 14 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes para su titulación y se analizó la síntesis de N por medio de WB. Se observó que la expresión de N era menor conforme el inhibidor se añadía más temprano (Figuras 29A y B) y lo mismo sucedió con los títulos virales (Figura 29D), los cuales fueron menores respecto al control incluso en aquellos cultivos en los cuales el U0126 se agregó a las 10 h p.i. No se observó variación en la viabilidad celular de células infectadas con JUNV y tratadas con U0126 a los distintos tiempos ensayados (Figura 29C).

Continuando con el análisis del efecto de la inhibición de Raf/MEK/ERK sobre la expresión de las proteínas virales, se procedió a estudiar la expresión de G2 en la membrana plasmática por medio de la formación de sincicios inducidos a pH ácido. Para ello, las células Vero fueron infectadas con JUNV (m.i.=1) y a distintos tiempos p.i. (2, 6 o 10 h p.i.) se agregó U0126. A las 14 h p.i. las células se incubaron con MEM (pH 5,0) durante 30 min a fin de inducir el cambio conformacional de las espículas virales presentes en la membrana de la célula infectada, cambio necesario para que G2 medie la fusión de la membrana celular con la membrana de las células vecinas. Para visualizar los sincicios las células se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa.

Como puede observarse en la figura 30, conforme el compuesto U0126 se agregó más temprano, los sincicios resultantes fueron de menor tamaño (Figura 30A) y se produjeron en menor cantidad respecto de las células infectadas no tratadas con el inhibidor (Figura 30B). Estos resultados señalan que la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK produciría una disminución ya sea de la expresión de G2 en la membrana celular o de su capacidad fusogénica.

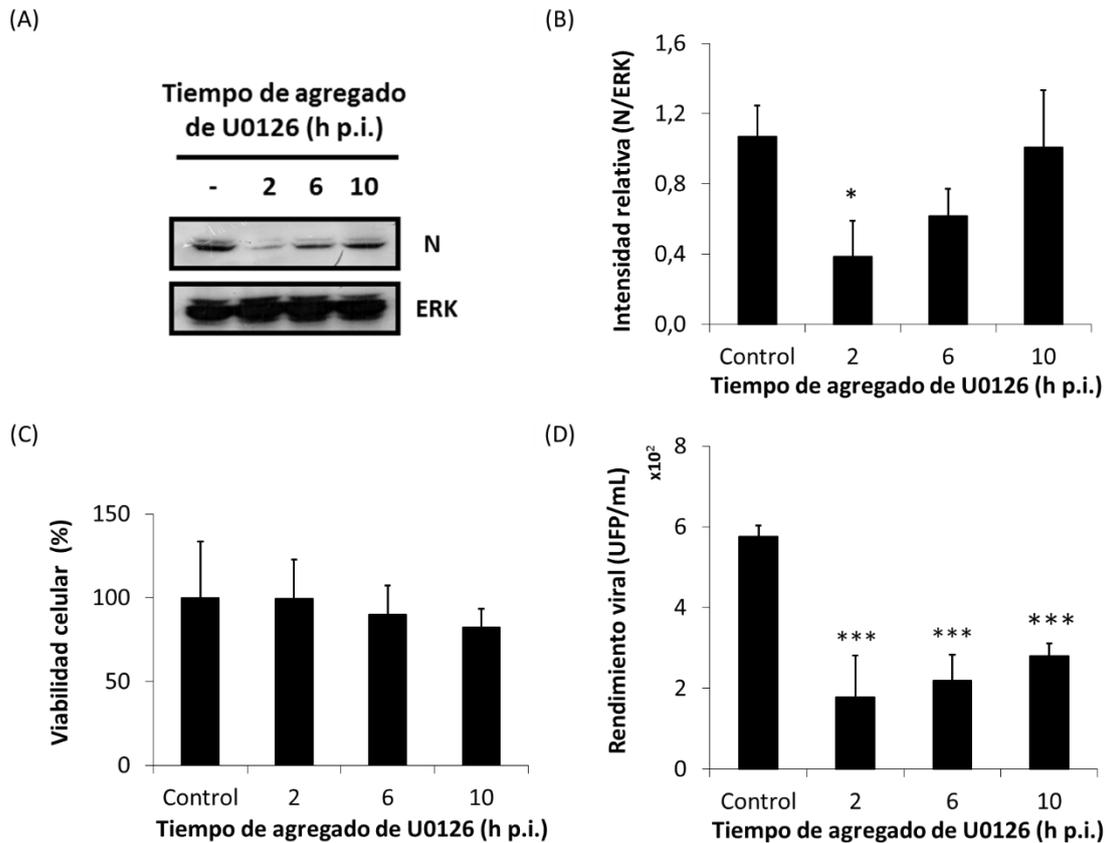


Figura 29. Efecto del agregado de U0126 a distintos tiempos p.i. sobre la expresión de N y la multiplicación de JUNV en cultivos de células Vero.

(A) Células Vero se infectaron con JUNV (m.i.=1) y a distintos tiempos p.i. se agregó U0126 hasta una concentración final de 15 μ M. A las 14 h p.i. se analizó la expresión de N por medio de WB. (B) Promedio de la relación N/ERK \pm DE obtenida a partir de tres experimentos independientes determinada mediante la cuantificación de las bandas con el programa Image J. Los datos se analizaron mediante ANOVA y posterior test de Dunnett (* $p < 0,05$). (C) A partir de otra serie de cultivos tratados de la misma forma que en (A) se midió la viabilidad celular por el método de MTT. Los datos representan el promedio de tres experimentos \pm DE y fueron analizados mediante ANOVA y posterior test de Dunnett ($p > 0,05$). (D) A partir de los sobrenadantes de los cultivos mencionados en (A) se tituló la producción viral por el método de UFP. Los datos representan el promedio de tres experimentos \pm DE y fueron analizados mediante un modelo GLMM con distribución de Poisson truncada (** $p < 0,001$).

Dado que la inhibición en la formación de sincicios observada en los cultivos tratados con U0126 podría estar indicando que el bloqueo de la vía afecta la expresión de las glicoproteínas virales en la membrana plasmática, se decidió analizar el rol de la vía Raf/MEK/ERK en la expresión y el transporte de la glicoproteína viral G1 a la membrana celular por medio de ensayos de IFI total y de membrana. Con este

propósito, células Vero se infectaron con JUNV (m.i.=1) y a las 2 h p.i. se trataron o no con U0126 (15 μ M). En los primeros experimentos se intentó realizar la detección de G1 a las 14 h p.i. pero los niveles de fluorescencia eran demasiado bajos como para llevar a cabo la cuantificación de la expresión de esta proteína. Por lo tanto, se decidió realizar la fijación de las células a las 20 h p.i., momento en que los cultivos controles mostraban entre un 30 y un 40% de células fluorescentes (Figura 31A). La expresión de G1 se estudió utilizando, como anticuerpo primario, un anticuerpo monoclonal reactivo frente a GPC y a la proteína madura G1. La figura 31 muestra que cuando las células infectadas se trataron con U0126 la reducción en el número de células que expresaban GPC/G1 en el citoplasma resultó similar a la reducción del número de células que expresaban G1 en la membrana celular, indicando que el compuesto afectaría principalmente la síntesis de GPC y no el subsecuente transporte de las glicoproteínas maduras a la membrana plasmática.

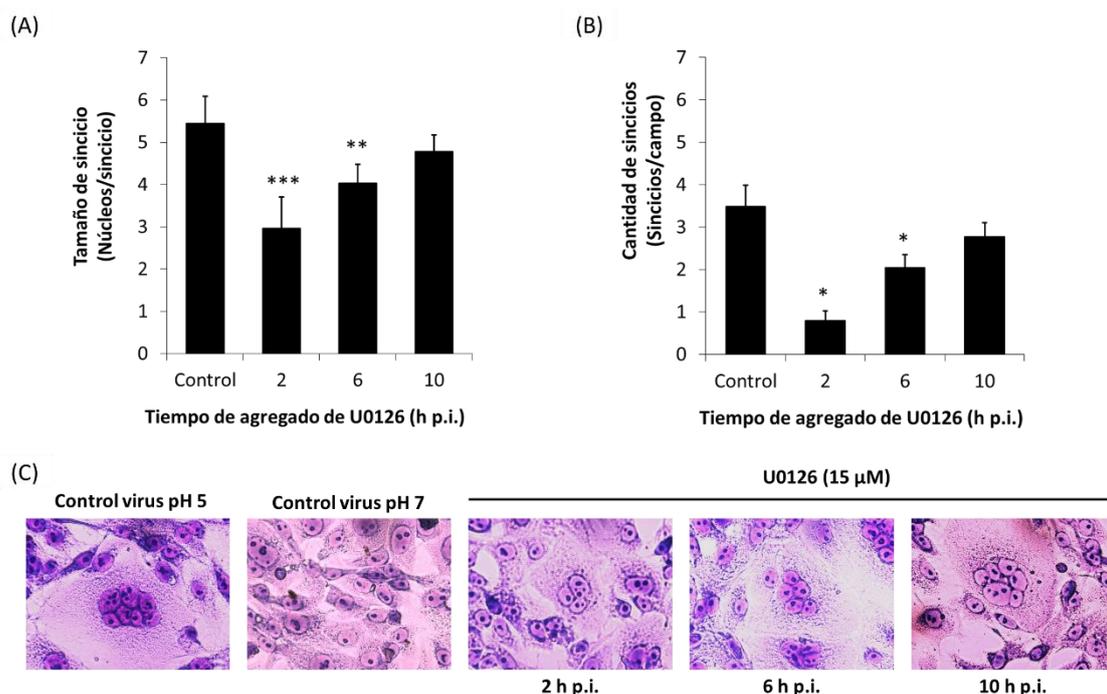


Figura 30. Efecto del U0126 sobre la formación de sincicios inducida a pH ácido en células infectadas con JUNV.

Células Vero se infectaron con JUNV (m.i.=1) y a distintos tiempos p.i. (2, 6 o 10 h p.i.) se trataron o no con U0126 (15 μ M). A las 14 h p.i. las células se trataron con medio ácido (pH 5,0) durante 30 min y luego se incubaron toda la noche en medio de cultivo a pH neutro; a las 20 h p.i. las células se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa. (A) Tamaño de los sincicios observados, calculado en base al recuento del número de núcleos por sincicio en 20 campos. (B) Recuento de la cantidad de sincicios

observados en 20 campos para cada uno de los tratamientos realizados. En (A) y (B) los datos representan el promedio de tres experimentos \pm DE y se analizaron mediante un modelo GLMM con distribución de Poisson y posterior test de Dunnett (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$). (C) Sincicios observados en los tratamientos con U0126 a distintos tiempos p.i. (2, 6 o 10 h p.i.). Se muestran además las imágenes de células infectadas e incubadas a las 14 h p.i. con medio a pH ácido (control virus pH 5) o con medio a pH neutro (control virus pH 7).

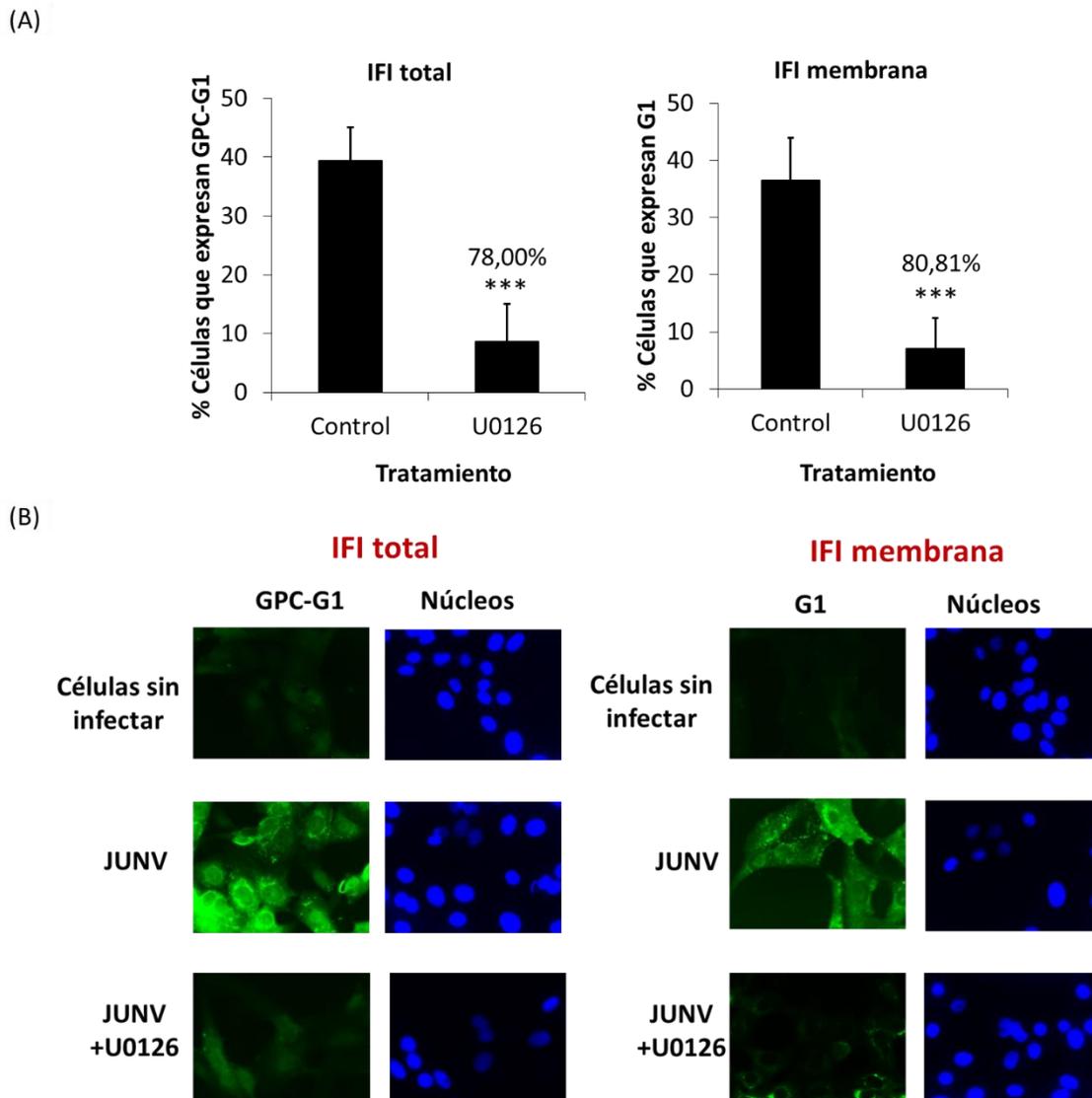


Figura 31. Efecto del U0126 sobre la expresión y transporte a membrana de G1 en cultivos celulares infectados con JUNV.

Células Vero se infectaron con JUNV (m.i.=1) y a las 2 h p.i. se trataron o no con U0126 (15 μ M). A las 20 h p.i. las células se fijaron con paraformaldehído 4% (IFI membrana) y en algunos casos se permeabilizaron con Tritón X-100 (0,1%) (IFI total). Finalmente se reveló la expresión de GPC/G1 total y de G1 de membrana mediante un ensayo de IFI. (A) Recuento del porcentaje de células que expresan GPC/G1 en los cultivos infectados, tratados o no tratados con U0126. Los datos representan el promedio

de tres experimentos \pm DE y se analizaron mediante el test t de Student (** $p < 0,001$). Los números sobre las barras indican el porcentaje de inhibición del número de células fluorescentes respecto al control sin droga. (B) Imágenes de la expresión de GPC/G1 en cultivos infectados y tratados o no con U0126 detectada por IFI. Los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst 33258. Aumento: 400X.

4.2.3. Efecto de la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK sobre la síntesis de RNA viral

Seguidamente, se investigó el rol de la vía Raf/MEK/ERK en la replicación del genoma viral. Para ello, células Vero se infectaron con JUNV (m.i.=1) durante 1h, al cabo de la cual se retiró el inóculo y las células se incubaron con MEM conteniendo o no U0126 (15 μ M), PMA (100 nM) o ribavirina (100 μ M), este último compuesto utilizado como inhibidor de referencia de la síntesis de RNA viral. A las 14 h p.i. se extrajo el RNA total y el RNA viral genómico se cuantificó por qRT-PCR.

La figura 32A muestra la estrategia de replicación/transcripción del segmento S del genoma viral. En primer lugar, se transcribe el gen que codifica para la proteína N (mRNA de N) y sólo después de la traducción de N ocurre la síntesis de RNA viral complementario completo (antigenoma). El RNA antigenómico sirve luego de molde para la síntesis de mRNA de GPC y del RNA genómico.

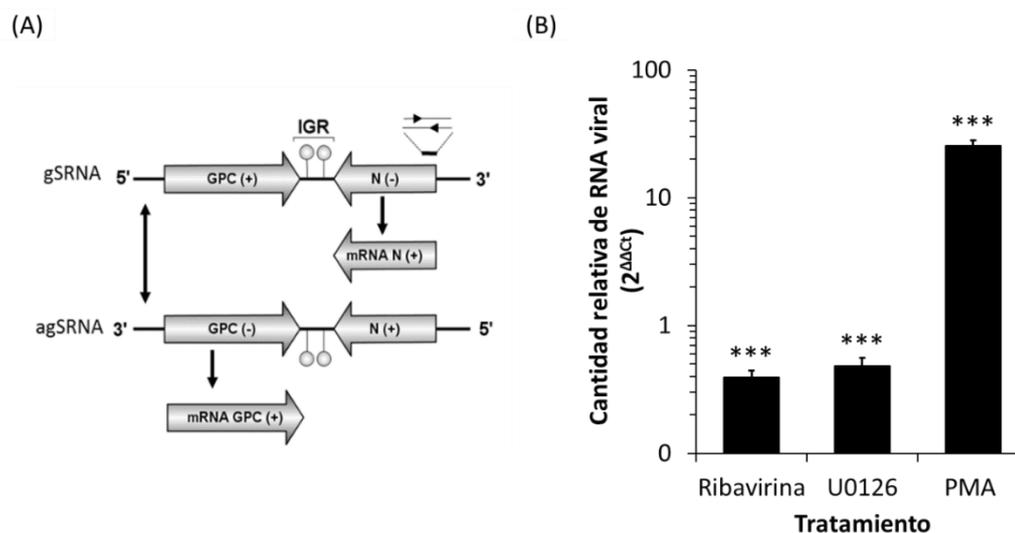


Figura 32. Efecto de la modulación de la vía Raf/MEK/ERK sobre la síntesis de genoma viral.

(A) Esquema de la replicación del segmento S de JUNV. gSRNA: segmento S genómico del RNA viral. agSRNA: segmento S antigenómico del RNA viral. Con flechas se indica la región del gSRNA amplificada

por qRT-PCR. (B) Células Vero se infectaron con JUNV (m.i.=1) durante 1 h, al cabo de la cual se retiró el inóculo y las células se incubaron en MEM o MEM conteniendo U0126 (15 μ M), ribavirina (100 μ M) o PMA (100 nM). A las 14 h p.i. se extrajo el RNA total y el RNA genómico viral se cuantificó por qRT-PCR. Los resultados se expresan como la cantidad relativa de RNA viral en cada tratamiento respecto al control sin tratar y representan el promedio de tres experimentos independientes \pm DE. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y posterior test de Dunnett (**p<0,001).

La figura 32B muestra que tanto en presencia de ribavirina como de U0126 la síntesis de RNA viral genómico disminuyó, mientras que la incubación con PMA provocó un notorio incremento en la cantidad relativa de RNA viral. Estos resultados indican que la activación de la vía Raf/MEK/ERK sería importante para la síntesis de RNA viral.

Teniendo en cuenta la capacidad del compuesto U0126 de inhibir la multiplicación de otros arenavirus como TCRV (213) y con el objetivo de corroborar el papel de la vía Raf/MEK/ERK en la síntesis de RNA viral se decidió utilizar dos sistemas de genética reversa diseñados por el grupo de la Dra. Nora López (Centro de Virología Animal, CONICET) basados en la expresión de un gen reportero a partir de un minigenoma (MG-FLUC), análogo del segmento S del genoma de TCRV, o a partir de un antígenoma (AG-FLUC), análogo del segmento S antígenómico de TCRV. Dado que las condiciones de transfección de los componentes de estos sistemas de genética reversa habían sido optimizadas en cultivos de células BSR, se decidió en primer lugar determinar el efecto de U0126 sobre la viabilidad celular y el rendimiento de JUNV en esta línea celular. Para ello células BSR fueron tratadas con diferentes concentraciones de U0126 durante 24 h y luego se cuantificó la viabilidad celular por medio del ensayo de MTT. La figura 33A muestra que U0126 no presentó efectos citotóxicos hasta una concentración de 25 μ M en esta línea celular.

A fin de evaluar el efecto del U0126 sobre el rendimiento viral en las células BSR, los cultivos celulares se infectaron con JUNV (m.i.=1) y a 1 h p.i. se trataron con diferentes concentraciones de U0126. A las 24 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por el método de UFP. Se corroboró el efecto inhibitorio del inhibidor de MEK sobre la producción viral en este sistema celular, observándose que a concentraciones crecientes de U0126 se produjo una mayor inhibición de la multiplicación viral (Figura 33B).

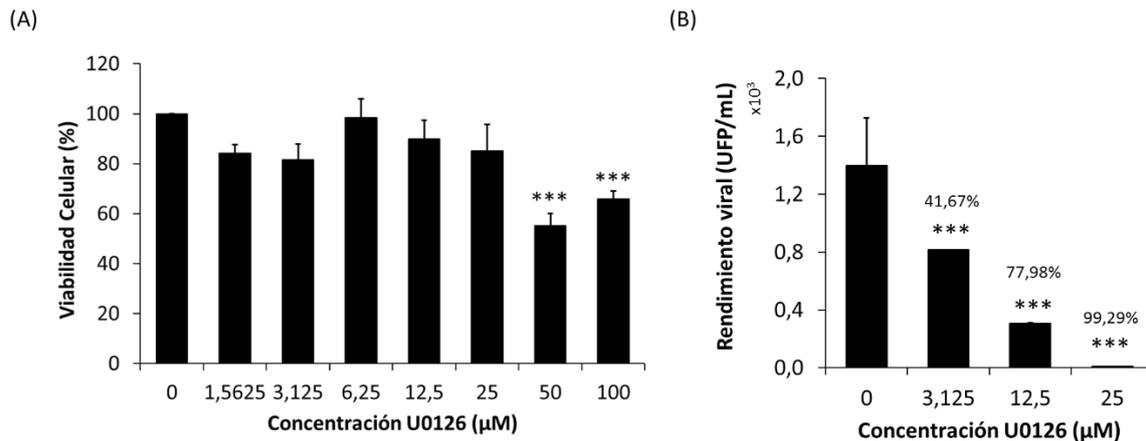


Figura 33. Efecto de la inhibición de la vía ERK sobre la multiplicación de JUNV en células BSR.

(A) Células BSR se trataron con diferentes concentraciones de U0126 durante 24 h, al cabo de las cuales se analizó la citotoxicidad del compuesto por medio del ensayo de MTT. Se representa el valor promedio \pm DE. Los datos se analizaron mediante ANOVA y posterior test de Dunnett ($***p < 0,001$). (B) Células BSR se infectaron con JUNV (m.i.=1) y luego de 1 h de adsorción a 37 °C, las células se trataron con diferentes concentraciones de U0126. A las 24 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por el método de UFP. Se representa el valor promedio de los títulos virales \pm DE y sobre las barras se indica el porcentaje de inhibición obtenido respecto de los cultivos no tratados. Los datos se analizaron mediante un modelo GLMM con distribución de Poisson truncada en cero y posterior test de Dunnett ($***p < 0,001$) (B).

A continuación, se decidió evaluar el efecto del tratamiento con U0126 sobre la replicación del análogo del segmento S genómico (MG-FLUC) y del análogo del segmento S antígenómico (AG-FLUC) de TCRV en células BSR. MG-FLUC contiene los extremos 5' y 3' del segmento S de TCRV y expresa el gen reportero FLUC en reemplazo de la secuencia antisentido de N, mientras que AG-FLUC contiene los extremos 5' y 3' del segmento S antígenómico y expresa FLUC en reemplazo de la secuencia sentido de N (Figura 34A). Estos análogos forman parte de un sistema de genética reversa que a su vez consta de otros 2 plásmidos que permiten la expresión de las proteínas virales N y L, respectivamente. La co-expresión de la nucleoproteína N y la RNA polimesara L es suficiente para promover el ciclo completo de replicación del minigenoma. Como se muestra en la figura 34B la presencia de U0126 provocó una disminución significativa de la expresión de FLUC tanto a partir de MG-FLUC y como a partir de AG-FLUC.

Es importante destacar que la inhibición de la vía no afectó los niveles de expresión de N en los cultivos transfectados (Figura 34C), indicando que la expresión de las proteínas virales que constituyen la base del sistema de genética reversa utilizado no fue afectada por la presencia de U0126 y, por otra parte, como se muestra en la figura 34D, el tratamiento con el inhibidor no alteró los niveles de viabilidad celular respecto a los cultivos sin tratar.

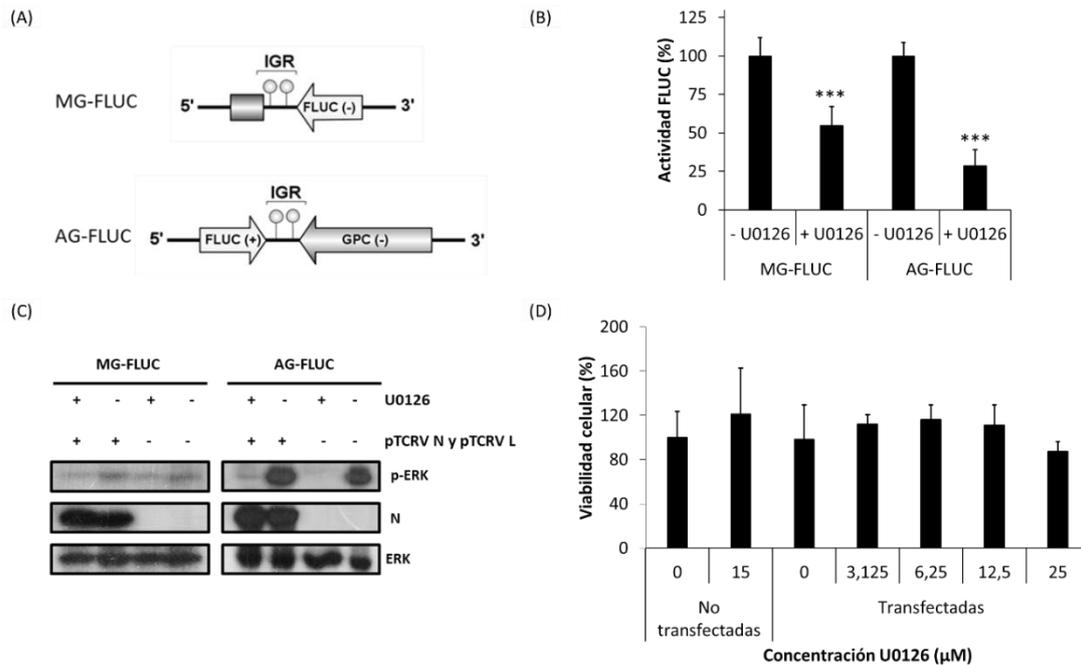


Figura 34. Efecto del U0126 sobre la síntesis de RNA viral.

(A) Esquema de los replicones empleados en el sistema de genética reversa: MG-FLUC: análogo del segmento S genómico de TCRV; AG-FLUC: análogo del segmento S antigenómico de TCRV. (B) Células BSR fueron co-transfectadas con los plásmidos MG-FLUC o AG-FLUC y los plásmidos que expresan las proteínas N y L. Las mezclas de transfección incluían además un plásmido para la expresión de RLUC. Luego de la transfección las células se trataron o no con U0126 (15 μM) durante 24 h, al cabo de las cuales se cuantificó la actividad de FLUC y RLUC. Los datos de la actividad de FLUC se normalizaron respecto a la expresión de RLUC. Se representa el promedio obtenido a partir de un experimento representativo realizado por triplicado ± DE. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y posterior test de Tukey (***) $p < 0,001$. (C) La expresión de las proteínas N y p-ERK en las diferentes muestras correspondientes al experimento mostrado en (B) se analizó por WB, utilizándose la expresión de ERK como control de carga. (D) Células BSR se transfectaron o no con los plásmidos utilizados en el ensayo de replicación mostrado en (B) y se trataron con diferentes concentraciones de U0126 durante 24 h. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de MTT. Los datos representan el valor promedio ± DE y se analizaron por ANOVA y posterior test de Dunnett ($p > 0,05$).

4.2.4. Efecto de la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK sobre la traducción viral

Los resultados obtenidos en los sistemas de genética reversa podrían deberse a un bloqueo en la síntesis de RNA y/ o a una traducción ineficiente del mRNA de FLUC. Para distinguir entre estas dos posibilidades, realizamos un ensayo de traducción en células BSR con el objeto de analizar el efecto de la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK sobre la traducción de transcritos sintéticos. Utilizamos un mRNA que mimetiza el mRNA de N de TCRV y contiene al gen reportero FLUC entre las secuencias 5'UTR y 3'UTR del mRNA viral. Como control utilizamos un mRNA sintético que mimetiza un transcripto celular, el cual contiene la secuencia de FLUC precedida por la región 5'UTR del mRNA de β -globina y en el extremo 3'UTR posee una secuencia poli(A) (Figura 35A).

Ambos tipos de mRNAs se transfectaron en células BSR, las cuales luego se trataron con U0126 (15 μ M) durante 4 h. Mientras que la expresión del mRNA celular disminuyó ligeramente, los niveles de traducción del mRNA viral en los cultivos tratados con U0126 no difirieron significativamente de los niveles detectados en las células no tratadas (Figura 35B). Estos resultados sugieren que la inhibición de la síntesis de genoma de JUNV (Figura 32B) y de la expresión de FLUC a partir de los análogos del segmento S de TCRV (Figura 34B) en los cultivos tratados con U0126 no podría atribuirse a un efecto adverso del compuesto sobre la traducción del mRNA viral.

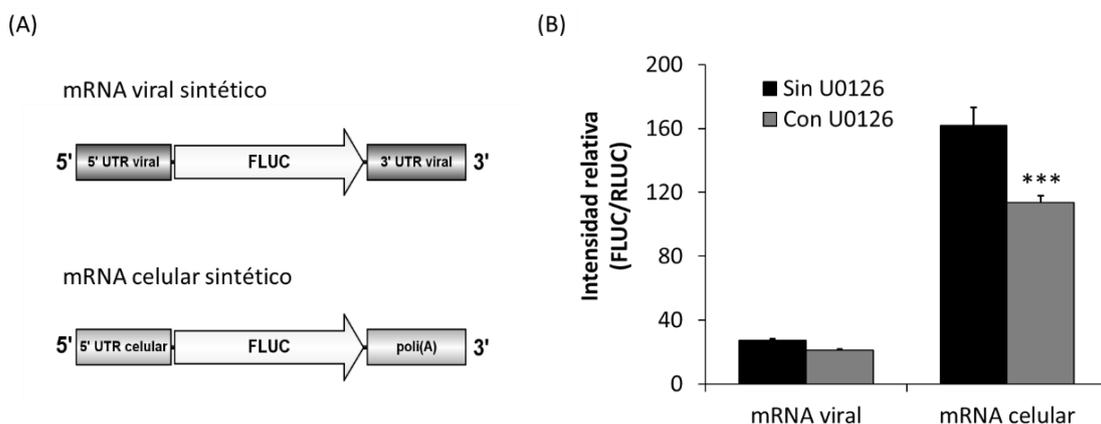


Figura 35. Efecto del U0126 sobre la traducción de mRNA virales.

(A) Esquema de los mRNAs sintéticos empleados en el ensayo de traducción en células BSR. (B) Células BSR fueron transfectadas con el mRNA viral o celular, junto con un transcripto (RLUC) que permite la

expresión de RLUC de manera independiente de cap. Luego las células se trataron o no con U0126 (15 μ M) durante 4 h. Finalmente, se cuantificó la actividad de FLUC y RLUC y los datos de la actividad de FLUC se normalizaron respecto a la expresión de RLUC. Se representa el promedio obtenido a partir de un experimento representativo realizado por triplicado \pm DE. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y posterior test de Tukey (** $p < 0,001$).

4.2.5. Efecto de la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK sobre la fosforilación de eIF2 α

eIF2 α es un factor celular esencial para la etapa de iniciación de la traducción celular que es activo en su estado hipofosforilado. Se ha descrito que inhibidores de MEK, como U0126, pueden promover la fosforilación de eIF2 α inhibiendo así el proceso de traducción celular (214). Por lo tanto, para determinar si los efectos provocados por la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK se relacionaban con cambios en la fosforilación de eIF2 α se procedió a cuantificar los niveles de eIF2 α fosforilado (p-eIF2 α) tras el tratamiento con U0126 de células Vero infectadas o no con JUNV. En concordancia con los resultados obtenidos en estudios previos (85), en ausencia de U0126, los niveles de fosforilación de eIF2 α en células infectadas con JUNV fueron comparables a los de cultivos no infectados (Figura 36). Además, la inhibición de la vía no alteró los niveles de p-eIF2 α ni en las células sin infectar ni en las infectadas con JUNV (Figura 36). Estos resultados indican que la inhibición de la síntesis de macromoléculas virales observada en cultivos tratados con U0126 no estaría relacionada con un aumento de la fosforilación de eIF2 α .

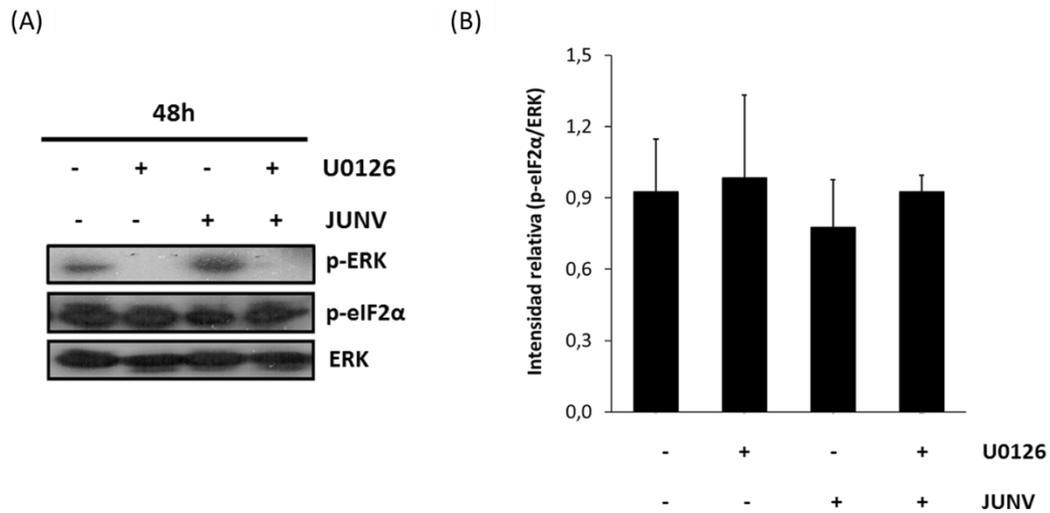


Figura 36. Influencia de la inhibición de la vía de Raf/MEK/ERK sobre la fosforilación de eIF2α.

(A) Células Vero infectadas o no con JUNV (m.i.=1) se incubaron desde las 36 hasta las 48 h p.i. en presencia o en ausencia de U0126 (15 μ M) y los niveles de fosforilación de eIF2 α se analizaron por WB a las 48 h p.i. (B) Cuantificación de la expresión de p-eIF2 α . Se representa el promedio obtenido a partir de un experimento representativo realizado por triplicado \pm DE. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y posterior test de Dunnett ($p > 0,05$).

5. Discusión

El área de incidencia de la FHA ha ido creciendo desde el primer aislamiento de JUNV en 1958, lo cual ubica a este virus en la categoría de patógeno humano emergente con alta capacidad de dispersión (80). La terapia para FHA no está basada en compuestos antivirales específicos sino en el tratamiento paliativo de los síntomas y la administración de suero inmune. Candid#1 ha demostrado ser una vacuna segura, inmunogénica y efectiva en la prevención de FHA, sin embargo, presenta los riesgos inherentes a una vacuna basada en virus atenuado. Asimismo, el empleo de los arnavirus causantes de fiebres hemorrágicas como potenciales componentes de armas biológicas empleadas en bioterrorismo ha despertado en las últimas décadas gran interés en los estudios básicos y aplicados de estos agentes en relación con sus propiedades biológicas, su interacción con componentes celulares y con el desarrollo de vacunas, nuevos agentes terapéuticos y mejores pruebas de diagnóstico.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la participación de las vías dependientes de MAP quinasas Raf/MEK/ERK y p38 en la infección con JUNV en cultivos celulares y dilucidar el papel que juega la cascada Raf/MEK/ERK en diferentes etapas de la replicación viral.

Teniendo en cuenta los antecedentes acerca de la importancia de la ruta de señalización Raf/MEK/ERK en la replicación de diversos virus (Figuras 8 y 9) y algunos resultados que habían sido previamente obtenidos por nuestro grupo de trabajo, se comenzó analizando la implicancia de esta vía en la multiplicación de JUNV. En el desarrollo de la presente investigación se encontró que, sumado a los resultados previos que indicaban un aumento en los niveles de fosforilación de ERK en células Vero infectadas con JUNV, la infección con este virus también induce la activación de ERK en las líneas celulares humanas A549 y U937 (Figura 11). La activación de la vía a las 24 h p.i. resultó ser aproximadamente 4, 3 y 7 veces superior al nivel basal de activación de los cultivos sin infectar en las células Vero, A549 y U937, respectivamente. La capacidad de activar esta cascada de señalización en diferentes tipos celulares también ha sido reportada para otros virus con genoma RNA (117,123,136,137,151–158,125,159,215,126,129–132,134,135).

La activación de ERK no siempre lleva a la localización de p-ERK en el núcleo. La proteína celular Sef, por ejemplo, es un inhibidor de la vía que se activa frente a determinados estímulos, provocando que p-ERK quede retenida en el citoplasma. Este regulador impide que, una vez fosforilada, ERK se disocie de MEK, por lo cual en este caso p-ERK sólo induciría la fosforilación de factores citoplasmáticos. Por el contrario,

la traslocación de p-ERK al núcleo habilita la fosforilación de diversos factores de transcripción nucleares. Por consiguiente, la localización intracelular de ERK afecta el tipo de respuesta celular que se desencadena (97). Los ensayos de IFI para la detección de p-ERK permitieron establecer que, en cultivos de células Vero, JUNV no sólo induce la fosforilación de ERK, sino que además provoca su traslocación al núcleo (Figura 12). En este sentido, existen escasos reportes acerca de la localización de ERK una vez que la misma es activada por una infección viral o en células que expresan proteínas virales. Se ha descrito que la infección de cultivos celulares con el rhadinovirus del mono *Rhesus*, un gammaherpesvirus, provoca la traslocación casi total de p-ERK al núcleo celular (216), mientras que por el contrario, la expresión de la proteína de tegumento Us2 del virus pseudorabia, un alfa herpesvirus, induce la relocalización de p-ERK en la región perinuclear sin que se detecte p-ERK en el núcleo (217). Sin embargo, la gran mayoría de los estudios acerca de la activación de la vía Raf/MEK/ERK por parte de virus o componentes virales no analizan la distribución intracelular de p-ERK.

El análisis de la cinética de fosforilación de ERK durante las primeras horas de infección con JUNV en las células Vero mostró que el virus induce una primera activación intensa a los 15 y 30 min luego de iniciada la infección y una activación de menor intensidad a las 7 h p.i. (Figura 13). Este tipo de activación bifásica de la vía ha sido previamente descrita para varios virus con genoma RNA como RVA, CVB3, EV-A71, IAV y RSV (125,129,130,134,154,156,157) Por otra parte, la incubación de las células Vero con partículas de JUNV inactivadas con luz UV sólo indujo la activación temprana de ERK (Figura 13), en concordancia con lo que otros autores han demostrado para YFV, CVB3 y EV-A71 (125,130,134). La falta de activación tardía de Raf/MEK/ERK exhibida por las partículas de JUNV inactivadas estaría indicando que el primer pico de activación podría ser consecuencia de los procesos iniciales del ciclo de multiplicación de JUNV, como la adsorción o la internalización de la partícula viral, mientras que la segunda fase de activación de la vía solo ocurre si la partícula viral ingresante es capaz de replicar.

Para aquellos virus para los cuales se ha descrito una activación bifásica de Raf/MEK/ERK, a semejanza de lo observado para JUNV, la primera etapa de activación ocurre entre los 10 y 30 min p.i y en el caso de los virus RVA, CVB3, EV-71 y RSV se ha propuesto que la misma sería consecuencia de la interacción de las proteínas de la superficie viral con el receptor celular (125,130,134,157). La activación de

Raf/MEK/ERK a través de la interacción de proteínas de la superficie viral con el receptor también ha sido reportada para HIV, HCV y DENV (121,133,139,140). Como se mencionó en la introducción, el receptor celular utilizado por JUNV es TfR1 (9) y se conoce que la interacción de TfR1 y TfR2 con sus respectivos ligandos dispara la fosforilación de ERK (218,219). Sin embargo, a diferencia de lo observado cuando JUNV interacciona con la célula a 37 °C, la interacción del virus con su receptor a 4 °C no provocó un incremento en los niveles de fosforilación de ERK respecto a los cultivos no infectados (Figura 14), lo cual podría indicar que no solamente es necesaria la unión del virus a su receptor, sino también la internalización de la partícula viral para desencadenar la señalización vía ERK. Con el objetivo de corroborar estos resultados, se realizaron diferentes ensayos que no fueron incluidos en el presente trabajo en los cuales se intentó evaluar el grado de fosforilación de ERK en células infectadas con JUNV y tratadas o no con diferentes compuestos que inhiben la endocitosis mediada por clatrina, como la CZ, la dansilcadaverina o el dinasore. Sin embargo, no fue posible sacar conclusiones a partir de estos experimentos dado que la presencia de estos inhibidores provocaba un incremento en los niveles de p-ERK, incluso en aquellos cultivos celulares no infectados.

Como se mencionó en la introducción, los arenavirus del VM LCMV y LASV modularían la vía Raf/MEK/ERK con efectos opuestos. Mientras que se ha descrito que la infección con LCMV produce una leve activación de la vía a las 2 h p.i. en fibroblastos de ratón que expresan la molécula CD1 (células L-CD1) (117), la infección con LASV en las células WI-26 VA4 (epitelio pulmonar humano) impide la activación de la misma (160). El principal receptor celular utilizado por LCMV y LASV es el α DG (9), lo cual podría explicar la ausencia de activación de la vía en los primeros minutos de la infección, que sí es posible observar en las células infectadas con JUNV. Se ha demostrado que la unión de LASV al receptor α DG provoca el secuestro de MEK por parte del dominio citoplasmático del α DG, impidiendo la fosforilación de ERK. Algo similar se ha descrito ante la unión de la laminina LG4 al α DG, interacción que también resulta en la falta de activación de la vía Raf/MEK/ERK frente a un estímulo activador (160). Cabe destacar que estos estudios se enfocan en analizar el estado de activación de la vía al inicio de la infección y no existen reportes acerca de los niveles de fosforilación de ERK a tiempos más avanzados de la infección con mammarenavirus del VM.

En cuanto a la activación tardía de Raf/MEK/ERK inducida por JUNV en las células Vero, la misma podría ser consecuencia de la síntesis de macromoléculas virales, como la síntesis de RNA o de proteínas virales, pero tampoco puede descartarse que el transporte de los componentes virales a la membrana plasmática, donde tiene lugar el ensamblaje de la progenie viral, pueda desencadenar la activación de la vía. En este sentido se ha establecido que en el caso de CVB3 el segundo pico de activación de ERK coincide con el máximo de replicación viral (130); por el contrario, la activación tardía de la vía en células MDCK (riñón canino) infectadas con IAV sería consecuencia de la acumulación de la glicoproteína viral HA en la membrana plasmática (152). Llamativamente, la activación bifásica de la vía Raf/MEK/ERK no parece ser una característica que abarque a todos los influenzavirus ya que en el caso de la infección de células MDCK con IBV se detectó un incremento progresivo de la fosforilación de ERK entre los 15 min y las 8 h p.i. (151).

Contrariamente a la activación bifásica que mostraron las células Vero, en las células A549 la infección con JUNV produjo una leve y sostenida activación de ERK entre los 15 min y las 5 h p.i. (Figura 15). Tanto en células Vero como en células A549, JUNV ingresa a través de un mecanismo de endocitosis mediada por el receptor TfR1, con participación de la proteína clatrina (220). Por lo tanto, la diferencia en el perfil y magnitud de la activación de ERK detectada en células A549 podría atribuirse a una menor eficiencia de infección en estas células respecto a lo que ocurre en las células Vero. De hecho, en cultivos infectados a una m.i. de 1 UFP/célula, transcurrido 1 día de infección, el rendimiento viral obtenido en las células A549 es aproximadamente 10 veces menor al que se alcanza en las células Vero y esto podría ser consecuencia de un menor número de células inicialmente infectadas. En consecuencia, cuando se analiza la activación de la vía Raf/MEK/ERK en células A549 a tiempos tempranos de la infección, ERK podría encontrarse activada en un número reducido de células, por lo que se dificultaría su detección por WB.

Otra diferencia importante entre las células Vero y A549 consiste en que las segundas son productoras de IFN tipo I, mientras que las células Vero sólo son capaces de responder al mismo, pero no de producirlo (221). Los antecedentes respecto a la relación entre el IFN y la activación de Raf/MEK/ERK aportan resultados contradictorios. En algunos casos se ha descrito que el IFN induciría la activación de ERK (147,222–227) o inhibiría la activación de fosfatasas que regulan negativamente la activación de la vía (225) y en consecuencia esto conduciría a niveles de p-ERK

sostenidos en el tiempo. Por el contrario, existen también reportes que postulan al IFN como un regulador negativo de la fosforilación de ERK (228).

Nuestros resultados y los datos obtenidos a partir de la bibliografía indican que las características de la activación de Raf/MEK/ERK dependerían tanto del virus como del sistema celular empleado. Se ha demostrado que la magnitud y duración de la activación de la vía están reguladas por la naturaleza del estímulo inductor y por la actividad de diferentes factores celulares que actúan como reguladores de dicha activación. Como ejemplo podemos citar el caso de las células PC12 (glándula adrenal de rata), en las cuales el tratamiento con el factor de crecimiento nervioso induce una activación sostenida de la vía conduciendo a la diferenciación celular, mientras que el tratamiento con el factor de crecimiento epidérmico provoca una estimulación transitoria de Raf/MEK/ERK promoviendo la proliferación celular. Se comprobó que estos factores de crecimiento provocarían la activación de diferentes componentes que se encuentran río arriba de ERK en la cascada de señalización (94,97). Teniendo en cuenta estos antecedentes, la estimulación a diferentes niveles de la cascada de señalización también podría explicar las diferencias en el perfil de activación de la vía observada en la infección por distintos virus. Por otra parte, es sabido que dependiendo del contexto celular en el cual ocurre la activación de la vía Raf/MEK/ERK, la misma puede conducir a diferentes respuestas por parte de la célula. Existen factores celulares que regulan la magnitud de la activación de ERK, como las proteínas KSR (quinasa supresora de RAS) y MP1 (socia de MEK-1), las cuales interaccionan con diferentes componentes de la vía incrementando los niveles de p-ERK (97). Por lo tanto, las diferencias encontradas en la intensidad y en el perfil de activación temprana de ERK en las células Vero y A549 infectadas con JUNV no sólo podrían explicarse por una menor eficiencia de infección en las células A549, sino también por la expresión diferencial en ambos tipos celulares de factores reguladores de la vía.

De forma similar a los resultados previamente obtenidos por nuestro grupo en las células Vero, el tratamiento con U0126 de los cultivos de células U937 y A549 inhibió la replicación de JUNV de forma dosis-dependiente (Figura 16). Asimismo, el silenciamiento de ERK causó una reducción importante de la multiplicación viral en las células Vero y A549. (Figura 18). Estos resultados, sumados al hecho de que el tratamiento con PMA, activador de la vía, produjo un incremento notable del rendimiento viral (Figura 19), sugieren que la activación de la vía Raf/MEK/ERK promueve la multiplicación de JUNV en diferentes tipos celulares.

Otras investigaciones han demostrado que la activación de la vía inducida por el tratamiento con PMA promueve la multiplicación viral, incrementando los niveles de DNA viral en células Vero o HEL-299 (fibroblastos de pulmón humano) infectadas con el virus BK (*Polyomaviridae*) (229) o aumentando la producción de virus en células murinas o de murciélago persistentemente infectadas con EboV (230). Cabe destacar también un trabajo publicado en 1995 en el cual se había reportado que el tratamiento con PMA de células THP-1 (monocitos humanos) infectadas con PICV provocaba un incremento en la producción de RNAs virales (231). Si bien el PMA es utilizado para inducir la diferenciación de las células THP-1, su efecto sobre la multiplicación viral podría explicarse a través de la inducción de la expresión de factores celulares que intervienen en el ciclo viral. Como se señaló en la introducción, el PMA promueve la activación de la cascada de señalización dependiente de PKC y de manera indirecta la activación de la vía Raf/MEK/ERK, por lo cual podría pensarse que la activación de PKC también podría favorecer la multiplicación viral y ser en parte responsable del incremento en la producción de virus en los cultivos de células Vero infectados con JUNV y tratados con PMA (Figura 19). Sin embargo, recientemente se han presentado evidencias que sostienen que la vía PKC actuaría como un regulador negativo de la multiplicación de TCRV ya que la inhibición de esta vía favorece la replicación viral (232).

Resulta interesante resaltar que se ha reportado que el tratamiento con PMA, al igual que la infección con JUNV en células Vero (Figura 12), induce tanto la fosforilación de ERK como su traslocación al núcleo celular (97), por lo cual sería interesante en un futuro investigar si dicha traslocación es una condición necesaria para promover la multiplicación de JUNV.

A continuación, se investigó la implicancia de la vía p38 en la multiplicación de JUNV. Se demostró que el virus induce la activación intensa y sostenida de esta vía en células Vero a partir de las 24 h p.i. (Figura 20), mientras que, durante las primeras horas de la infección, correspondientes al primer ciclo de multiplicación viral, solamente se detectó una leve activación de p38. Probablemente, la activación intensa observada a partir de las 16 h p.i. sea consecuencia de un mayor número de células infectadas, lo que permite detectar niveles mayores de activación de la vía. Un perfil similar de activación de la vía p38 en células Vero ha sido descrito para SARS-CoV, el cual también induce una activación de p38 creciente que alcanza un máximo a las 18 h p.i.

(181,182). El mammarenavirus PICV, que produce en cobayos una patología similar a la que LASV causa en humanos, también induce la activación de p38. Se han caracterizado dos cepas virales que difieren en el grado de virulencia exhibido en cobayos: la cepa atenuada P2 y la cepa patógena P18, la cual da lugar a una infección letal en este modelo animal. Un abordaje quinómico realizado en macrófagos murinos demostró que estas cepas presentan cinéticas de activación diferentes ya que la cepa patógena P18 indujo una activación significativa recién a las 16 h p.i. mientras que la cepa no patógena P2 exhibió un nivel máximo de activación de la vía entre las 2 h y 4 h p.i. (201).

Por otro lado, en los cultivos de células humanas HEK-293 y HeLa infectados con JUNV no se detectó un incremento en la fosforilación de p38 a las 24 h p.i. (Figuras 24B y C). En las células de HeLa se observó una disminución de la fosforilación de p38 respecto al control no infectado, mientras que la infección de las células HEK-293 no produjo una alteración significativa de los niveles de p-p38 respecto a las células sin infectar. Estas diferencias observadas respecto de las células Vero podrían estar relacionadas con la menor eficiencia de infección del virus en las líneas celulares humanas. Contrariamente a nuestros resultados, otros virus con genoma RNA inducen la activación de p38 en cultivos de células humanas con distintas cinéticas, como por ejemplo el virus Ross River (RRV), ZIKV, DENV, HCV, RSV y hPIV (173,186,189,193,196,233–235)

La inhibición de la actividad de p38 en células Vero tratadas con los compuestos SB203580 y SB202190 causó una reducción dependiente de la dosis de los títulos virales (Figuras 21B y C) y una disminución en el número de células que expresan N (Figuras 22A y B). Además, a concentraciones crecientes del compuesto SB203580 se produjo una disminución progresiva de la expresión de la proteína N (Figura 22C). Estos resultados indican que la activación de p38 sería necesaria para una infección productiva.

Por otro lado, el tratamiento con el inhibidor SB202190 en células HeLa y HEK-293 provocó la reducción de los niveles de p-p38 (Figuras 24B y C), de la expresión de N (Figuras 24B y C) y de la multiplicación viral (Figuras 24D y E). En las células HEK-293 esta correlación sólo se observó a la mayor concentración de compuesto ensayada. En el caso de los cultivos de células HEK-293 tratados con la concentración 50 μ M de SB202190, se deberían realizar nuevos experimentos independientes a fin de corroborar el hecho de que se produzca la inhibición de la multiplicación del virus sin

que se detecte una disminución significativa de la fosforilación de p38, ya que esto indicaría que el compuesto podría tener un efecto adicional a la inhibición de p38 capaz de interferir con la multiplicación de JUNV.

Por último, si bien el virus no provocó un incremento de la activación de la ruta p38 en las células humanas, la inhibición de la vía afectó la multiplicación viral y estos resultados sugieren que los niveles basales de activación de p38 serían suficientes para promover la replicación del virus. Esto también se ha comprobado en la infección de células A549 con RSV, en las cuales RSV no induce la activación de p38 pero la inhibición de la vía provoca la disminución de la síntesis de proteínas virales y de los títulos virales (197). El hecho de que bajos niveles de activación de p38 alcancen para favorecer la multiplicación de JUNV podría explicar por qué la activación adicional de la vía p38 mediada por el compuesto anisomicina no causa un incremento en los niveles de producción de virus respecto a los cultivos no tratados (Figura 23). De todas formas, no podemos excluir que a otros tiempos de infección diferentes al analizado en este trabajo (24 h p.i.) se pueda detectar la activación de p38 en estos cultivos de células humanas.

Como se comentó previamente, la expresión de proteínas virales y la interacción de proteínas virales con el receptor celular son fenómenos capaces de provocar la fosforilación de p38. Actualmente, el conocimiento acerca de la participación de esta vía de señalización en el ciclo de multiplicación de los virus es sumamente escaso. Si bien se ha demostrado que su inhibición provoca una disminución en los niveles de RNAs y proteínas virales y en la apoptosis inducida por la infección de ciertos virus, no se conoce el mecanismo por el cual esta vía promovería la multiplicación viral. Se ha demostrado que p38 es necesaria para el transporte al núcleo del complejo ciclina B1-CDK1 durante la infección de HCV en células HepG2, lo que permitiría regular el ciclo celular y favorecer la replicación viral (188) y en el caso de los influenzavirus, p38 participaría del tráfico de las RNPs virales al núcleo luego de la internalización de los viriones (193). Hasta el momento, esta área de investigación dentro del campo de la virología ha sido pobremente explorada por lo que sería interesante continuar los estudios tendientes a comprender los mecanismos que subyacen a la activación de la vía y que influyen en los diferentes eventos de la multiplicación de los mammarenavirus.

En el segundo capítulo de este trabajo de tesis se investigó con mayor profundidad la implicancia de Raf/MEK/ERK en la multiplicación de JUNV analizando el efecto de la modulación de la vía en diferentes etapas del ciclo de multiplicación viral.

Como se mencionó anteriormente, la infección con JUNV en células Vero indujo, durante los primeros minutos de la infección, una primera fase de activación de la vía Raf/MEK/ERK. Con el objetivo de determinar si esta activación temprana era necesaria para el ingreso del virus a la célula, se examinó el efecto del tratamiento con U0126 sobre las etapas iniciales de la multiplicación viral. Se demostró que la inhibición de la vía no afectó ni el proceso de adsorción, ni el de internalización de JUNV a la célula (Figuras 25 y 26), siendo estos resultados coincidentes con los reportados para el flavivirus YFV (126) y para IAV (236).

A su vez, el análisis del efecto del tratamiento con U0126 sobre el desnudamiento viral mostró que, en presencia del inhibidor, el desnudamiento del virus presenta una cinética similar a la obtenida en los cultivos sin tratar (Figura 27). Por otra parte, se determinó que la incubación de células Vero con U0126 no modifica el pH de las vesículas ácidas intracelulares, tal como muestran los ensayos de tinción con naranja de acridina (Figura 27). Estos resultados difieren de los reportados por otro grupo de investigación (125), el cual ha descrito que el tratamiento con U0126 provoca un incremento en el pH de las vesículas endosomales en células MA-104, células que al igual que las células Vero han sido obtenidas a partir de riñón de *Cercopithecus aethiops*. A su vez, estos autores comprobaron que el tratamiento de estas células con el inhibidor impide el desnudamiento de las partículas de RVA incorporadas por endocitosis. Sin embargo, la concentración de U0126 utilizada en este reporte es de 50 μM , más de tres veces superior a la empleada en el presente trabajo de tesis, lo cual podría explicar las diferencias encontradas respecto a la implicancia de la vía Raf/MEK/ERK en la acidificación endosomal y el desnudamiento viral.

Por lo tanto, la activación de la cascada Raf/MEK/ERK no sería necesaria para la incorporación de las partículas de JUNV a la célula hospedadora ni tampoco tendría influencia en el proceso de liberación de las nucleocápsides virales al citoplasma celular.

En los ensayos mostrados en el capítulo 1, el estudio del efecto del U0126 sobre la producción de virus y proteínas virales se había realizado analizando el título viral y la expresión de proteica a las 24 h p.i. A los efectos de distinguir cuál era la etapa del ciclo viral afectada por la inhibición de la vía, se decidió entonces cuantificar estos

parámetros a las 14 h p.i., en células Vero tratadas con el inhibidor a distintos tiempos a lo largo de un único ciclo de multiplicación viral. La máxima inhibición de la producción de virus infeccioso se observó en aquellos cultivos tratados con U0126 de forma temprana (a las 2 h p.i.), sin embargo, el agregado del compuesto a las 10 h p.i. también produjo una inhibición significativa del rendimiento viral (Figura 29 D). Por otra parte, la mayor reducción en los niveles de expresión de la proteína N (Figuras 29A y B) y de las glicoproteínas virales (Figuras 30 y 31), se obtuvo cuando el compuesto U0126 se agregó a las 2 h p.i. Estos resultados, sumado a la falta de efecto del inhibidor sobre las etapas iniciales de la infección, indicarían que la inhibición de la vía interfiere con un evento temprano del ciclo de multiplicación posterior a la penetración de las partículas virales a la célula.

Para diversos virus con genoma RNA, como RVA, HCV, YFV, CVB3, EV-A71 y hPIV3, se ha comprobado que la inhibición de la actividad de ERK provoca la reducción de la síntesis de proteínas virales (125,126,130,131,134,147,158) y de la replicación del RNA de RVA, YFV, EV-A71 y JEV (125,126,134,147,148). Por el contrario, la inhibición de esta vía no afecta la expresión de las proteínas virales en cultivos infectados con IBV o RSV (151,159). En cuanto a RSV, se demostró además que la activación de la vía sería necesaria para el transporte de la proteína F a la membrana plasmática (159). En el caso de JUNV, sin embargo, el análisis comparativo de la expresión de GPC/G1 en ensayos de IFI total y de membrana puso en evidencia que, si bien los cultivos tratados con U0126 exhiben una reducción en el nivel de expresión de las glicoproteínas virales, el transporte de las mismas a la membrana plasmática no se encontraría afectado (Figura 31). Sin embargo, estos ensayos no descartan la posibilidad de que exista algún efecto de la inhibición de la cascada Raf/MEK/ERK a nivel del procesamiento pos-traducciona l y maduración del complejo glicoproteico en su tráfico hacia la membrana plasmática.

Al evaluar la acción de los moduladores de la vía Raf/MEK/ERK sobre la síntesis de RNA viral, se comprobó que mientras la presencia del inhibidor U0126 redujo de forma significativa los niveles de RNA genómico, el tratamiento con PMA estimuló de forma marcada la síntesis de RNA viral (Figura 32), siendo esto último coincidente con el incremento en la infectividad viral mostrado en la figura 19. Como hemos dicho anteriormente, existen reportes en los que se señala que la inhibición de la vía de Raf/MEK/ERK afecta negativamente la síntesis de RNA viral. En particular, se ha

demostrado que durante la infección con YFV, la inhibición de la vía reduce la síntesis de RNA viral genómico y antigenómico (126).

Con el objeto de corroborar la implicancia de Raf/MEK/ERK en la síntesis del RNA de los arenavirus, se utilizó un sistema de genética reversa para analizar el efecto del tratamiento con U0126 sobre la replicación de análogos de los RNAs genómico y antigenómico del segmento S de TCRV, los cuales expresan el gen reportero FLUC. Este sistema permitió cuantificar la síntesis de RNA viral en un contexto en el cual las proteínas virales N y L se expresan a partir de plásmidos, es decir, de manera independiente de la replicación del genoma viral. El bloqueo de la vía Raf/MEK/ERK inhibió la replicación de ambos análogos (Figura 34B), confirmando que esta cascada de señalización tiene un papel importante en la replicación del genoma de los mammarenavirus JUNV y TCRV.

La realización de un ensayo de traducción en células permitió demostrar que la traducción de un mRNA sintético que mimetiza al mRNA que codifica para la proteína N de TCRV no se ve afectada por la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK (Figura 35). Estos resultados sugieren que la inhibición en la expresión de las proteínas virales en los cultivos infectados con JUNV y tratados con el inhibidor U0126 no podría atribuirse a un efecto del compuesto sobre la traducción de los mRNAs virales, sino sobre la síntesis de RNA viral. Es llamativo que la inhibición de la vía haya afectado moderadamente la traducción del transcripto sintético de tipo celular. Sin embargo, este efecto adverso no sería relevante para la eficiencia de la traducción celular. De hecho, el compuesto U0126 no afectó los niveles de proteínas virales expresados en el contexto del sistema replicón (Figura 34C) o los niveles de ERK en las células infectadas (Figuras 29A y 36). La vía de señalización de Raf/MEK/ERK no solo regula la transcripción de genes celulares sino que también ejerce un control post-transcripcional de ciertos mRNAs, como aquellos que contienen el elemento rico en AU (ARE) y codifican para una variedad de proteínas involucradas en la proliferación celular y en las respuestas inmune e inflamatoria (237,238). Por lo tanto, la posibilidad de que el compuesto U0126 pueda regular negativamente la traducción de un subconjunto de mRNAs celulares debería ser tenida en cuenta.

Finalmente, se descartó que algunos de los efectos inhibitorios ejercidos por el compuesto U0126 se debieran a un incremento de la fosforilación del factor de inicio de traducción eIF2 α , ya que los niveles de p-eIF2 α , tanto en células infectadas como en células sin infectar, no se alteraron frente al tratamiento con el inhibidor (Figura 36). Por

lo tanto, no existiría una relación entre los niveles de fosforilación de eIF2 α y la disminución de la traducción del transcripto celular sintético o la reducción de la expresión de las proteínas virales frente al tratamiento con U0126.

En coincidencia con este conjunto de resultados obtenidos con JUNV y TCRV, un estudio realizado con un coronavirus no patógeno para el hombre, el virus de la hepatitis murina (MHV), mostró que la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK interfiere con la síntesis de RNA viral sin alterar la capacidad del virus de ingresar a la célula y sin afectar la traducción de los mRNAs virales (239)

Si bien los resultados obtenidos mostraron que el compuesto U0126 ejercería su efecto inhibitorio principalmente sobre la síntesis de RNA viral, cabe destacar que la presencia del inhibidor entre las 2 y las 14 h p.i. causó una disminución del 50% en los niveles de RNA viral (Figura 32B) y una inhibición del 69% de la producción de virus infeccioso (Figura 29D). Por otro lado, el tratamiento con U0126 de 10 a 14 h p.i. tuvo poco efecto sobre la expresión de la proteína N (Figuras 29A y B), pero produjo una reducción de alrededor del 60% del rendimiento viral (Figura 29D). El hecho de que la producción de partículas virales infecciosas muestre niveles de reducción mayores a los observados para los componentes virales sugiere que la inhibición de la vía podría estar afectando no solo la síntesis de RNA sino también eventos posteriores del ciclo de multiplicación viral. Es por ello que no se puede descartar la posibilidad de que la activación de la vía Raf/MEK/ERK pueda ser relevante en eventos tardíos del ciclo replicativo tales como el ensamblaje, la brotación o la liberación de partículas virales al medio extracelular. En este sentido, se ha comprobado por ejemplo que ERK se incorpora a las partículas de HIV siendo capaz de fosforilar a la proteína p6gag, favoreciendo la maduración y liberación del virus al espacio extracelular (122).

Los resultados mostrados en este segundo capítulo de la tesis señalan que la activación de la vía Raf/MEK/ERK promovería la síntesis de RNA viral (Figura 37). Una posible explicación para estos resultados sería que esta ruta de señalización regule la fosforilación de algún componente del virus involucrado en los procesos de transcripción/replicación del RNA de JUNV. La fosforilación dependiente de ERK de proteínas virales ha sido descrita por ejemplo para HIV (122,240). Gran parte del conocimiento existente sobre la participación de ERK en la replicación de un virus con genoma RNA proviene de los estudios realizados con los virus IAV e IBV (151,152,154,236). Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo, la inhibición de la vía no afecta la síntesis de RNA de IAV e IBV, sino

que interfiere con la salida del núcleo celular de las RNPs recién sintetizadas, lo cual impide la llegada de las RNPs a la membrana plasmática donde ocurre el ensamblaje de las partículas virales (151,154). Algunas evidencias muestran que ERK mediaría la fosforilación de una de las proteínas no estructurales de IAV, la proteína NS1, sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado que dicha proteína participe de la exportación de las RNPs virales del núcleo al citoplasma de la célula (241).

En el caso de JUNV, el análisis de la secuencia de aminoácidos de las proteínas N, L y Z, realizado mediante el programa PhosphoMotif Finder (<http://www.hprd.org>), reveló que las proteínas N y L de JUNV contienen 3 y 22 sitios consenso de fosforilación por ERK, respectivamente. Como se mencionó en la introducción, mediante un sistema de genética reversa se comprobó que la auto-asociación entre moléculas de N, así como la interacción entre N y L, son indispensables para la transcripción y replicación del RNA de TCRV (43,242). Por lo tanto, la fosforilación de N o L, mediada de forma directa o indirecta por ERK, podría ser relevante para la formación y/o actividad de los complejos de proteínas virales que llevan a cabo la síntesis del RNA viral. En consecuencia, el bloqueo de la señalización de ERK podría dificultar la fosforilación de las proteínas virales inhibiendo así la replicación del genoma de JUNV y TCRV. De hecho, y corroborando la importancia de N en la replicación del genoma de los mammarenavirus, se ha demostrado que dos residuos de aminoácidos presentes en la proteína N de LCMV, que se encuentran conservados en todos los arenavirus de mamíferos, son esenciales en la regulación de la replicación del RNA viral (53). Asimismo, existe un reporte en el cual se describe que la proteína N de LCMV sería fosforilada en residuos serina y treonina (243).

Además del requisito de una interacción coordinada entre las proteínas N y L con el RNA, la síntesis de RNA viral involucraría interacciones con factores de la célula hospedadora (244). Por lo tanto, existe la posibilidad de que algún factor celular implicado en los procesos de replicación y transcripción viral sea sustrato de ERK y por lo tanto su actividad esté regulada por esta ruta de señalización (Figura 37). Se ha propuesto que la RNA polimerasa L de los arenavirus formaría parte de dos complejos diferentes, uno encargado de la transcripción y otro de la replicación del genoma y se ha sugerido que los factores celulares involucrados en dichos complejos podrían ser diferentes. En el caso de los virus con genoma RNAs de polaridad negativa estos factores interactuarían con L y/o modificarían la conformación de los extremos 3'UTR y 5'UTR del RNA favoreciendo o bien la transcripción o bien la replicación del genoma

(245–247). Se ha descrito, por ejemplo, la interacción del complejo de la polimerasa de influenzavirus con la enzima RNA polimerasa II, lo cual permitiría no sólo el robo del cap a los mRNAs celulares sino también la estabilización del complejo ribonucleoproteico a fin de que sólo tenga lugar la transcripción del RNA viral y no su replicación (248,249).

Asimismo, recientemente se ha demostrado que la proteína prohibitina (PHB), proteína involucrada en la activación de las quinasas Raf, interactúa con la proteína N de LCMV (244). En el mismo trabajo se demostró además que el tratamiento con rocaglamida, un compuesto que inhibe la actividad de PHB, reduce la producción de virus en cultivos celulares infectados con LCMV, LASV o JUNV y afecta la síntesis de RNA de LCMV, proporcionando evidencia adicional de la relevancia que tendría la activación de la vía Raf/MEK/ERK en la síntesis de RNA de los mammarenavirus.

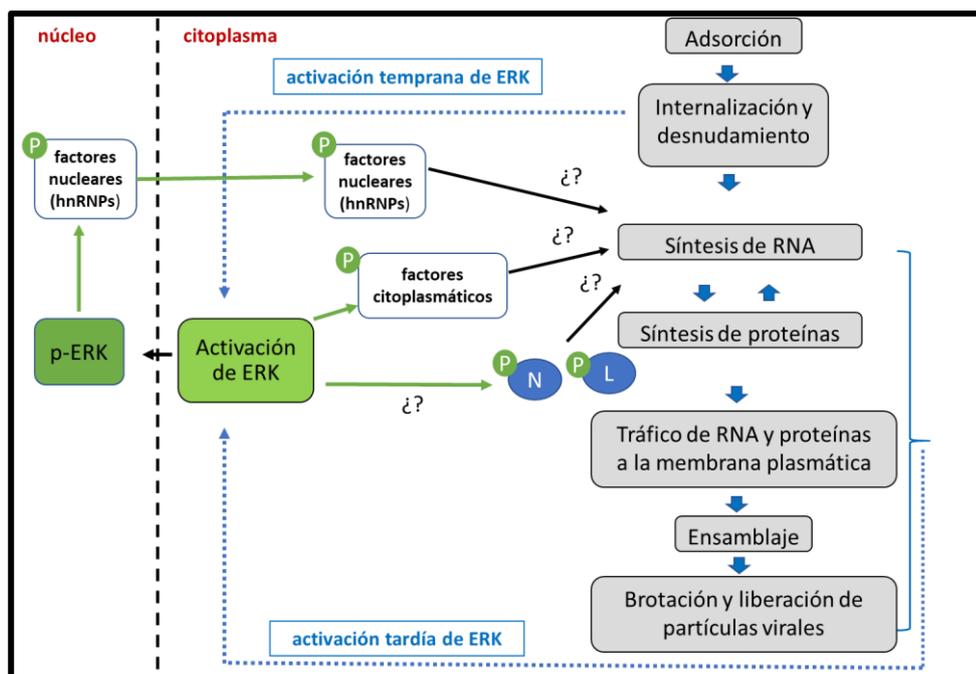


Figura 37. Papel de la vía Raf/MEK/ERK en la multiplicación de JUNV.

Los ensayos realizados en células Vero mostraron que la internalización viral provocaría la activación temprana de la vía Raf/MEK/ERK, mientras que la activación tardía de la vía se daría como consecuencia de la multiplicación viral. La infección induce además la traslocación de p-ERK al núcleo, por lo cual, factores celulares tanto nucleares como citoplasmáticos podrían ser fosforilados por p-ERK e incluso se promovería la traslocación de factores nucleares, como algunas hnRNPs, al citoplasma de la célula. La estimulación de la síntesis de RNA viral promovida por la activación de la vía podría ser entonces consecuencia de la fosforilación mediada por ERK, de forma directa o indirecta, de factores celulares o virales involucrados en la transcripción y replicación del genoma viral.

Como se mencionó en la introducción, las hnRNPs son proteínas de unión a RNA que participan en diferentes eventos a lo largo de ciclo de multiplicación de diversos virus, habiéndose establecido un rol importante de varias de estas proteínas celulares en la síntesis de RNA de algunos virus con genoma RNA como HCV, DENV, IAV, picornavirus, rhabdovirus y coronavirus (90,250,251). Resultados previos obtenidos por nuestro grupo han demostrado que JUNV induce la traslocación al citoplasma de las hnRNPs A1, A2 y K, lo cual a su vez favorece la multiplicación viral (91,92). Asimismo, se corroboró la interacción de la proteína N de JUNV con hnRNP A1 (91) y hnRNP K (86). La vía Raf/MEK/ERK regula la fosforilación de hnRNP K promoviendo el transporte de esta proteína al citoplasma (252), mientras que la quinasa MNK1 (del inglés: MAP kinase signal-integrating kinases 1), cuya actividad depende de la activación de las vías de señalización Raf/MEK/ERK y p38, tiene como sustrato de fosforilación a hnRNP A1, la cual una vez fosforilada se traslocaría al citoplasma de la célula (253,254). Por lo cual, es posible que la activación de la vía Raf/MEK/ERK inducida por la infección viral conduzca a la fosforilación y acumulación citoplasmática de algunos componentes celulares, como por ejemplo las hnRNPs A1 y K, los cuales podrían formar parte o interactuar con los complejos de transcripción/replicación promoviendo la síntesis de RNA viral (Figura 37).

Los avances recientes en el conocimiento de la biología de los arenavirus han contribuido en gran medida al desarrollo de nuevos tratamientos antivirales que se encuentran aún en etapa de experimentación (4). La capacidad de los virus de modular la actividad de las cascadas de transducción de señales les permite crear un ambiente intracelular adecuado para favorecer su propia replicación. Por este motivo, las vías de señalización celular representan un blanco atractivo para el desarrollo de nuevas estrategias antivirales con bajo riesgo de aparición de resistencia viral y que además podrían ser efectivas contra diferentes arenavirus. Este trabajo constituye el primer estudio que aborda de manera específica la interacción de los mammarenavirus con las vías de señalización Raf/MEK/ERK y p38, incluyendo además un análisis detallado de la relevancia de la vía Raf/MEK/ERK en diferentes eventos a lo largo de la infección viral. En la actualidad se dispone de una variedad de compuestos de nueva generación, capaces de inhibir de manera específica cada una de las vías dependientes de MAP-

quinasas. Algunos de estos compuestos presentan buenos perfiles de seguridad y han sido aprobados, o se encuentran actualmente en fase clínica de experimentación, para el tratamiento de diferentes patologías en el hombre, por lo cual constituyen una alternativa prometedora en el desarrollo de nuevas terapias antivirales para hacer frente a la infección por mammarenavirus.

6. Conclusiones

• JUNV induce la activación de la vía Raf/MEK/ERK tanto en células Vero como en las líneas celulares humanas A549 y U937. En las células Vero se corroboró además que la infección promueve la traslocación de p-ERK al núcleo celular.

• El perfil y la intensidad de activación de la vía Raf/MEK/ERK depende del tipo celular. En las células Vero se observa una clara activación bifásica: una fase temprana de activación inducida por la entrada del virus a la célula y una segunda activación tardía que requiere de la multiplicación viral.

• La activación de la vía p38 en cultivos celulares infectados con JUNV durante 24 h depende del tipo celular ensayado. En células Vero se detectó un incremento significativo de la activación de la vía, mientras que en las líneas celulares humanas HeLa y HEK-293 no se observó un aumento en los niveles de p-p38.

• La inhibición de las vías Raf/MEK/ERK y p38 afecta la expresión de proteínas virales y la multiplicación del virus. Por lo tanto, ambas vías de señalización son necesarias para la multiplicación de JUNV en distintos cultivos celulares.

• La activación de la vía Raf/MEK/ERK, mediada por el compuesto PMA, promueve la multiplicación de JUNV, mientras que el tratamiento con el compuesto anisomicina, activador de la vía p38, no afecta la producción de virus, sugiriendo que niveles bajos de p-p38 bastarían para favorecer la multiplicación viral.

• La inhibición de la vía Raf/MEK/ERK no tiene efecto alguno sobre las etapas tempranas (adsorción, internalización y desnudamiento viral) del ciclo de multiplicación de JUNV.

• La vía Raf/MEK/ERK estaría involucrada en la síntesis de RNA viral, pero no en la traducción de los mRNAs virales.

• Los efectos observados en los cultivos tratados con el compuesto U0126, inhibidor de la vía Raf/MEK/ERK, no estarían relacionados con una alteración en los niveles de fosforilación del factor celular eIF2 α .

7. Bibliografía

1. Hallam SJ, Koma T, Maruyama J, Paessler S. Review of mammarenavirus biology and replication. *Front Microbiol.* 2018;9:1-8.
2. Sarute N, Ross SR. New World Arenavirus Biology. *Annu Rev Virol.* 2017;4:141-58.
3. Radoshitzky SR, Bao Y, Buchmeier MJ, Charrel RN, Clawson AN, Clegg CS, et al. Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Arch Virol.* 2015;160:1851-74.
4. Castilla V, Brunetti JE, Armiento MN, Scolaro LA. CHAPTER 2 Recent Advances in the Development of Antiviral Approaches against Hemorrhagic-Fever-Causing Arenaviruses. *Front Clin Drug Res - Anti-Infectives.* 2017;4:3-38.
5. Raaben M, Jae LT, Herbert AS, Kuehne AI, Stubbs SH, Chou Y ying, et al. NRP2 and CD63 Are Host Factors for Lujo Virus Cell Entry. *Cell Host Microbe.* 2017;22(5):688-696.e5.
6. Shimojima M, Kawaoka Y. Cell Surface Molecules Involved in Infection Mediated by Lymphocytic Choriomeningitis Virus Glycoprotein. *J Vet Med Sci.* 2012;74(10):4-7.
7. Shimojima M, Ströher U, Ebihara H, Feldmann H, Kawaoka Y. Identification of Cell Surface Molecules Involved in Dystroglycan-Independent Lassa Virus Cell Entry. *J Virol.* 2012;2067-78.
8. Fedeli C, Torriani G, Galan-Navarro C, Moraz M-L, Moreno H, Gerold G, et al. Axl can serve as entry factor for Lassa virus depending on the functional glycosylation of dystroglycan. *J Virol.* 2017;JVI.01613-17.
9. Nunberg JH, York J. The curious case of arenavirus entry, and its inhibition. *Viruses.* 2012;4(1):83-101.
10. Martinez MG, Bialecki MA, Belouzard S, Cordo SM, Candurra NA, Whittaker GR. Utilization of human DC-SIGN and L-SIGN for entry and infection of host cells by the New World arenavirus, Junín virus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;441(3):612-7.
11. Jemielity S, Wang JJ, Chan YK, Ahmed AA, Li W, Monahan S, et al. TIM-family Proteins Promote Infection of Multiple Enveloped Viruses through Virion-associated Phosphatidylserine. *PLoS Pathog.* 2013;9(3).
12. Martínez MG, Cordo SM, Candurra NA. Characterization of Junin arenavirus cell entry. *J Gen Virol.* 2007;88(6):1776-84.
13. Vela EM, Zhang L, Colpitts TM, Davey RA, Aronson JF. Arenavirus entry occurs through a cholesterol-dependent, non-caveolar, clathrin-mediated endocytic

- mechanism. *Virology*. 2007;369(1):1-11.
14. Rojek JM, Perez M, Kunz S. Cellular Entry of Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *J Virol*. 2008;82(3):1505-17.
 15. Fedeli C, Moreno H, Kunz S. Novel Insights into Cell Entry of Emerging Human Pathogenic Arenaviruses. *J Mol Biol*. 2018;430(13):1839-52.
 16. Rojek JM, Kunz S. Cell entry by human pathogenic arenaviruses. *Cell Microbiol*. 2008;10(4):828-35.
 17. Kunz S. Receptor binding and cell entry of Old World arenaviruses reveal novel aspects of virus-host interaction. *Virology*. 2009;387(2):245-9.
 18. Quirin K, Eschli B, Scheu I, Poort L, Kartenbeck J, Helenius A. Lymphocytic choriomeningitis virus uses a novel endocytic pathway for infectious entry via late endosomes. *Virology*. 2008;378(1):21-33.
 19. Borrow P, Oldstone MB. Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells. Vol. 198, *Virology*. 1994. p. 1-9.
 20. Castilla V, Mersich SE, Candurra NA, Damonte EB. The entry of Junin virus into Vero cells. *Arch Virol*. 1994;136(3-4):363-74.
 21. Castilla V, Palermo LM, Coto CE. Involvement of vacuolar proton ATPase in Junin virus multiplication. *Arch Virol*. 2001;146(2):251-63.
 22. Castilla V, Mersich SE. Low-pH-induced fusion of Vero cells infected with Junin virus. *Arch Virol*. 1996;141(7):1307-17.
 23. Di Simone C, Zandonatti MA, Buchmeier MJ. Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike. Vol. 198, *Virology*. 1994. p. 455-65.
 24. York J, Nunberg JH. Myristoylation of the Arenavirus Envelope Glycoprotein Stable Signal Peptide Is Critical for Membrane Fusion but Dispensable for Virion Morphogenesis. *J Virol*. 2016;90(18):8341-50.
 25. Cohen-Dvashi H, Israeli H, Shani O, Katz A, Diskin R. Role of LAMP1 Binding and pH Sensing by the Spike Complex of Lassa Virus. *J Virol*. 2016;90(22):10329-38.
 26. Cohen-Dvashi H, Cohen N, Israeli H, Diskin R. Molecular Mechanism for LAMP1 Recognition by Lassa Virus. *J Virol*. 2015;89(15):7584-92.
 27. Lopez NL, Jacamo RJ, Franze-Fernandez MT. 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*. 2001;75(24):12241-51.
 28. Pinschewer DD, Perez M, de la Torre JC. Role of the virus nucleoprotein in the

- regulation of lymphocytic choriomeningitis virus transcription and RNA replication. *J Virol.* 2003;77(6):3882-7.
29. Lee KJ, Novella IS, Teng MN, Oldstone MB, de La Torre JC. NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *J Virol.* 2000;74(8):3470-7.
 30. Baird NL, York J, Nunberg JH. Arenavirus Infection Induces Discrete Cytosolic Structures for RNA Replication. *J Virol.* 2012;86(20):11301-10.
 31. Pinschewer DD, Perez M, De La Torre JC. Dual Role of the Lymphocytic Choriomeningitis Virus Intergenic Region in Transcription Termination and Virus Propagation. *J Virol.* 2005;79(7):4519-26.
 32. López N, Franze-Fernández MT. 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.* 2007;124(1-2):237-44.
 33. Tortorici MA, Albariño CG, Posik DM, Ghiringhelli PD, Lozano ME, Rivera-Pomar R V, et al. Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity in vivo. *Virus Res.* 2001;73:41-55.
 34. Meyer BJ, de La Torre JC, Southern PJ. Arenaviruses: Genomic RNAs, Transcription, and Replication. En: Oldstone MBA, editor. *Arenaviruses I: The Epidemiology, Molecular and Cell Biology of Arenaviruses.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2002. p. 445.
 35. Lelke M, Brunotte L, Busch C, Gunther S. An N-Terminal Region of Lassa Virus L Protein Plays a Critical Role in Transcription but Not Replication of the Virus Genome. *J Virol.* 2010;84(4):1934-44.
 36. Lehmann M, Pahlmann M, Jérôme H, Busch C, Lelke M, Günther S. Role of the C Terminus of Lassa Virus L Protein in Viral mRNA Synthesis. *J Virol.* 2018;88(15):8713-7.
 37. Morin B, Coutard B, Lelke M, Ferron F, Kerber R, Jamal S, et al. The N-terminal domain of the arenavirus L protein is an RNA endonuclease essential in mRNA transcription. *PLoS Pathog.* 2010;6(9).
 38. Brunotte L, Lelke M, Hass M, Kleinstauber K, Becker-Ziaja B, Günther S. Domain Structure of Lassa Virus L Protein □. *J Virol.* 2011;85(1):324-33.
 39. Kranzusch PJ, Whelan SPJ. Arenavirus Z protein controls viral RNA synthesis by

- locking a polymerase – promoter complex. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(49).
40. Loureiro ME, D'Antuono A, Macleod JML, López N. Uncovering viral protein-protein interactions and their role in arenavirus life cycle. Vol. 4, *Viruses.* 2012. p. 1651-67.
 41. Jácamo R, López N, Wilda M, Franze-Fernández MT. Tacaribe Virus Z Protein Interacts with the L Polymerase Protein To Inhibit Viral RNA Synthesis. *J Virol.* 2003;77(19):10383-93.
 42. Cornu TI, de la Torre JC. Characterization of the Arenavirus RING Finger Z Protein Regions Required for Z-Mediated Inhibition of Viral RNA Synthesis †. *J Virol.* 2002;76(13):6678-88.
 43. D'Antuono A, Loureiro ME, Foscaldi S, Marino-Buslje C, Lopez N. Differential Contributions of Tacaribe Arenavirus Nucleoprotein N-Terminal and C-Terminal Residues to Nucleocapsid Functional Activity. *J Virol.* 2014;88(11):6492-505.
 44. Hastie KM, Liu T, Li S, King LB, Ngo N, Zandonatti MA, et al. Crystal structure of the Lassa virus nucleoprotein-RNA complex reveals a gating mechanism for RNA binding. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(48):19365-70.
 45. Iwasaki M, Ngo N, Cubitt B, de la Torre JC. Efficient Interaction between Arenavirus Nucleoprotein (NP) and RNA-Dependent RNA Polymerase (L) Is Mediated by the Virus Nucleocapsid (NP-RNA) Template. *J Virol.* 2015;89(10):5734-8.
 46. Ortiz-Riaño E, Cheng BYH, de la Torre JC, Martínez-Sobrido L. D471G mutation in LCMV-NP affects its ability to self-associate and results in a dominant negative effect in viral RNA synthesis. *Viruses.* 2012;4(10):2137-61.
 47. Kerber R, Rieger T, Busch C, Flatz L, Pinschewer DD, Kummerer BM, et al. Cross-Species Analysis of the Replication Complex of Old World Arenaviruses Reveals Two Nucleoprotein Sites Involved in L Protein Function. *J Virol.* 2011;85(23):12518-28.
 48. Qi X, Lan S, Wang W, Schelde LML, Dong H, Wallat GD, et al. Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure. *Nature.* 2010;468(7325):779-85.
 49. Jiang X, Huang Q, Wang W, Dong H, Ly H, Liang Y, et al. Structures of arenaviral nucleoproteins with triphosphate dsRNA reveal a unique mechanism of immune suppression. *J Biol Chem.* 2013;288(23):16949-59.
 50. Zhang Y, Li L, Liu X, Dong S, Wang W, Huo T, et al. Crystal structure of Junin

- virus nucleoprotein. *J Gen Virol.* 2013;94:2175-83.
51. Foscaldi S, D'Antuono A, Noval MG, Prat Gay G de, Scolaro L, Lopez N. Regulation of Tacaribe Mammarenavirus Translation: Positive 5' and Negative 3' Elements and Role of Key Cellular Factors. *J Virol.* 2017;91(14):1-15.
 52. Linero F, Welnowska E, Carrasco L, Scolaro L. Participation Of Eif4F Complex In Junin Virus Infection: Blockage Of Eif4E Does Not Impair Virus Replication. *Cell Microbiol.* 2013;15(10):1766-82.
 53. Knopp KA, Ngo T, Gershon PD, Buchmeier MJ. Single nucleoprotein residue modulates arenavirus replication complex formation. *MBio.* 2015;6(3):1-11.
 54. Kentsis A, Dwyer EC, Perez JM, Sharma M, Chen A, Pan ZQ, et al. 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.* 2001;312(4):609-23.
 55. Campbell Dwyer EJ, Lai H, MacDonald RC, Salvato MS, Borden KL. The lymphocytic choriomeningitis virus RING protein Z associates with eukaryotic initiation factor 4E and selectively represses translation in a RING-dependent manner. *J Virol.* 2000;74(7):3293-300.
 56. Urata S, Yasuda J. Molecular mechanism of arenavirus assembly and budding. *Viruses.* 2012;4(10):2049-79.
 57. Burri DJ, da Palma JR, Kunz S, Pasquato A. Envelope glycoprotein of arenaviruses. *Viruses.* 2012;4(10):2162-81.
 58. Burri DJ, Pasqual G, Rochat C, Seidah NG, Pasquato A, Kunz S. Molecular Characterization of the Processing of Arenavirus Envelope Glycoprotein Precursors by Subtilisin Kexin Isozyme-1/Site-1 Protease. *J Virol.* 2012;86(9):4935-46.
 59. Beyer WR, Pöplau D, Garten W, von Laer D, Lenz O. Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J Virol.* 2003;77(5):2866-72.
 60. Lenz O, Meulen J ter, Klenk H-D, Seidah NG, Garten W. The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(22):12701-5.
 61. Agnihothram SS, York J, Nunberg JH. Role of the Stable Signal Peptide and Cytoplasmic Domain of G2 in Regulating Intracellular Transport of the Junin Virus Envelope Glycoprotein Complex. *J Virol.* 2006;80(11):5189-98.

62. Bederka LH, Bonhomme CJ, Ling EL, Buchmeier MJ. Arenavirus stable signal peptide is the keystone subunit for glycoprotein complex organization. *MBio*. 2014;5(6):1-14.
63. Eichler R, Lenz O, Strecker T, Garten W. Signal peptide of Lassa virus glycoprotein GP-C exhibits an unusual length. *FEBS Lett*. 2003;538(1-3):203-6.
64. York J, Romanowski V, Lu M, Nunberg JH. The Signal Peptide of the Junín Arenavirus Envelope Glycoprotein Is Myristoylated and Forms an Essential Subunit of the Mature G1-G2 Complex. *J Virol*. 2004;78(19):10783-92.
65. Schlie K, Maisa A, Lennartz F, Stroher U, Garten W, Strecker T. Characterization of Lassa Virus Glycoprotein Oligomerization and Influence of Cholesterol on Virus Replication. *J Virol*. 2010;84(2):983-92.
66. Cordo SM, Valko A, Martinez MG, Candurra NA. Membrane localization of Junín virus glycoproteins requires cholesterol and cholesterol rich membranes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;430(3):912-7.
67. Urata S, Yasuda J. Cis-and cell-type-dependent trans-requirements for Lassa virus-like particle production. *J Gen Virol*. 2015;96(7):1626-35.
68. Perez M, Greenwald DL, de la Torre JC. Myristoylation of the RING Finger Z Protein Is Essential for Arenavirus Budding. *J Virol*. 2004;78(20):11443-8.
69. Capul AA, Perez M, Burke E, Kunz S, Buchmeier MJ, de la Torre JC. Arenavirus Z-Glycoprotein Association Requires Z Myristoylation but Not Functional RING or Late Domains. *J Virol*. 2007;81(17):9451-60.
70. Lu J, Han Z, Liu Y, Liu W, Lee MS, Olson MA, et al. A Host-Oriented Inhibitor of Junin Argentine Hemorrhagic Fever Virus Egress. *J Virol*. 2014;88(9):4736-43.
71. Perez M, Craven RC, de la Torre JC. The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: Implications for antiviral strategies. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(22):12978-83.
72. Urata S, Yasuda J, de la Torre JC. The Z Protein of the New World Arenavirus Tacaribe Virus Has Bona Fide Budding Activity That Does Not Depend on Known Late Domain Motifs. *J Virol*. 2009;83(23):12651-5.
73. Urata S, Weyer J, Storm N, Miyazaki Y, van Vuren PJ, Paweska JT, et al. Analysis of Assembly and Budding of Lujo Virus. *J Virol*. 2015;90(6):3257-61.
74. Urata S, Noda T, Kawaoka Y, Yokosawa H, Yasuda J. Cellular Factors Required for Lassa Virus Budding. *J Virol*. 2006;80(8):4191-5.
75. Shtanko O, Imai M, Goto H, Lukashevich IS, Neumann G, Watanabe T, et al. A

- Role for the C Terminus of Mopeia Virus Nucleoprotein in Its Incorporation into Z Protein-Induced Virus-Like Particles. *J Virol.* 2010;84(10):5415-22.
76. Shtanko O, Watanabe S, Jasenosky LD, Watanabe T, Kawaoka Y. ALIX/AIP1 Is Required for NP Incorporation into Mopeia Virus Z-Induced Virus-Like Particles. *J Virol.* 2011;85(7):3631-41.
77. Groseth A, Wolff S, Strecker T, Hoenen T, Becker S. Efficient Budding of the Tacaribe Virus Matrix Protein Z Requires the Nucleoprotein. *J Virol.* 2010;84(7):3603-11.
78. Urata S, Ngo N, de la Torre JC. The PI3K/Akt Pathway Contributes to Arenavirus Budding. *J Virol.* 2012;86(8):4578-85.
79. Enria DA, Briggiler AM, Sánchez Z. Treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 2008;78(1):132-9.
80. Ambrosio A, Saavedra M, Mariani M, Gamboa G, Maiza A. Argentine hemorrhagic fever vaccines. *Hum Vaccin.* 2011;7(6):694-700.
81. Gómez RM, Jaquenod de Giusti C, Sanchez Vallduvi MM, Frik J, Ferrer MF, Schattner M. Junín virus. A XXI century update. *Microbes Infect.* 2011;13(4):303-11.
82. Grant A, Seregin A, Huang C, Kolokoltsova O, Brasier A, Peters C, et al. Junín virus pathogenesis and virus replication. *Viruses.* 2012;4(10):2317-39.
83. Zeitlin L, Geisbert JB, Deer DJ, Fenton KA, Bohorov O, Bohorova N, et al. Monoclonal antibody therapy for Junin virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(16):4458-63.
84. Linero FN, Scolaro LA. Participation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in Junín virus replication in vitro. *Virus Res.* 2009;145(1):166-70.
85. Linero FN, Thomas MG, Boccaccio GL, Scolaro LA. Junín virus infection impairs stress-granule formation in Vero cells treated with arsenite via inhibition of eIF2 α phosphorylation. *J Gen Virol.* 2011;92(12):2889-99.
86. King BR, Hershkowitz D, Eisenhauer PL, Weir ME, Ziegler CM, Russo J, et al. A Map of the Arenavirus Nucleoprotein-Host Protein Interactome Reveals that Junín Virus Selectively Impairs the Antiviral Activity of Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase (PKR). *J Virol.* 2017;91(15):e00763-17.
87. Huang C, Kolokoltsova OA, Mateer EJ, Koma T, Paessler S. Highly pathogenic New World arenavirus infection activates the pattern recognition receptor PKR without attenuating virus replication in human cells. *J Virol.*

- 2017;91(20):JVI.01090-17.
88. Ziegler CM, Eisenhauer P, Kelly JA, Dang LN, Beganovic V, Bruce EA, et al. A proteomic survey of Junín virus interactions with human proteins reveals host factors required for arenavirus replication. *J Virol*. 2017;92:JVI.01565-17.
 89. Peña Cárcamo JR, Morell ML, Vázquez CA, Vatansever S, Upadhyay AS, Överby AK, et al. The interplay between viperin antiviral activity , lipid droplets and Junín mammarenavirus multiplication. *Virology*. 2018;514:216-29.
 90. Castilla V, Scolaro LA. Involvement of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in viral multiplication. *Future Virol*. 2012;7(6):575-91.
 91. Maeto CA, Knott ME, Linero FN, Ellenberg PC, Scolaro LA, Castilla V. Differential effect of acute and persistent Junín virus infections on the nucleo-cytoplasmic trafficking and expression of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins type A and B. *J Gen Virol*. 2011;92(9):2181-90.
 92. Brunetti JE, Scolaro LA, Castilla V. The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) is a host factor required for dengue virus and Junín virus multiplication. *Virus Res*. 2015;203:84-91.
 93. Ostad SN, Pars M. Breast Cancer from Molecular Point of View: Pathogenesis and Biomarkers. En: *Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis*. 2011.
 94. Eblen ST. Extracellular-Regulated Kinases: Signaling From Ras to ERK Substrates to Control Biological Outcomes. 1.^a ed. Vol. 138, *Advances in Cancer Research*. Elsevier Inc.; 2018. 99-142 p.
 95. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways : cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci*. 2011;36(6):320-8.
 96. Sun Y, Liu WZ, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou HF. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct*. 2015;35(6):600-4.
 97. Ebisuya M. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci*. 2005;118(14):2997-3002.
 98. Lambert PJ, Shahrier AZ, Whitman AG, Dyson OF, Reber AJ, McCubrey J a, et al. Targeting the PI3K and MAPK pathways to treat Kaposi's-sarcoma-associated herpes virus infection and pathogenesis. *Expert Opin Ther Targets*. 2007;11(5):589-99.

99. Maik-Rachline G, Seger R. The ERK cascade inhibitors: Towards overcoming resistance. *Drug Resist Updat.* 2016;25:1-12.
100. Vela EM, Bowick GC, Herzog NK, Aronson JF. Genistein treatment of cells inhibits arenavirus infection. *Antiviral Res.* 2008;77(2):153-6.
101. Vela EM, Bowick GC, Herzog NK, Aronson JF. Exploring kinase inhibitors as therapies for human arenavirus infections. *Future Virol.* 2008;3(3):243-51.
102. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J.* 2010;429(3):403-17.
103. Schindler JF, Monahan JB, Smith WG. P38 pathway kinases as anti-inflammatory drug targets. *J Dent Res.* 2007;86(9):800-11.
104. Stramucci L, Pranteda A, Bossi G. Insights of crosstalk between p53 protein and the MKK3/MKK6/p38 MAPK signaling pathway in cancer. *Cancers (Basel).* 2018;10(5):9-11.
105. Corre I, Paris F, Huot J. The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that transduces stress and metastatic signals in endothelial cells. *Oncotarget.* 2017;8(33):55684-714.
106. Banerjee A, Koziol-White C, Panettieri R. P38 MAPK inhibitors, IKK2 inhibitors, and TNF α inhibitors in COPD. *Curr Opin Pharmacol.* 2012;12(3):287-92.
107. Bühler S, Laufer SA. p38 MAPK inhibitors: a patent review (2012 – 2013). *Expert Opin Ther Pat.* 2014;24(5):535-54.
108. Turner NA. Therapeutic regulation of cardiac fibroblast function: targeting stress-activated protein kinase pathways. *Future Cardiol.* 2011;7(5):673-91.
109. Benn J, Su F, Doria M, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Virol.* 1996;70(8):4978-85.
110. Colao I, Pennisi R, Venuti A, Nygårdas M, Heikkilä O, Hukkanen V, et al. The ERK-1 function is required for HSV-1-mediated G1/S progression in HEP-2 cells and contributes to virus growth. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-13.
111. De Magalhães JC, Andrade AA, Silva PNG, Sousa LP, Ropert C, Ferreira PCP, et al. A mitogenic signal triggered at an early stage of vaccinia virus infection. Implication of MEK/ERK and protein kinase A in virus multiplication. *J Biol Chem.* 2001;276(42):38353-60.
112. DuShane JK, Wilczek MP, Mayberry CL, Maginnis MS. ERK Is a Critical Regulator of JC Polyomavirus Infection. *J Virol.* 2018;92(7):e01529-17.

113. Leite FGG, Torres AA, De Oliveira LC, Da Cruz AFP, Soares-Martins JAP, Pereira ACTC, et al. c-Jun integrates signals from both MEK/ERK and MKK/JNK pathways upon vaccinia virus infection. *Arch Virol.* 2017;162(10):2971-81.
114. Liao B, Zhou H, Liang H, Li C. Regulation of ERK and AKT pathways by hepatitis B virus X protein via the Notch1 pathway in hepatocellular carcinoma. Vol. 51, *International Journal of Oncology.* 2017. 1449-1459 p.
115. Liu X, Li Q, Dowdell K, Fischer ER, Cohen JI. Varicella-Zoster Virus ORF12 Protein Triggers Phosphorylation of ERK1/2 and Inhibits Apoptosis. *J Virol.* 2012;86(6):3143-51.
116. Rahaus M, Desloges N, Wolff MH. Varicella-zoster virus influences the activities of components and targets of the ERK signalling pathway. *J Gen Virol.* 2006;87(4):749-58.
117. Renukaradhya GJ, Webb TJR, Khan MA, Lin YL, Du W, Brutkiewicz RR, et al. Virus-Induced Inhibition of CD1d1-Mediated Antigen Presentation: Reciprocal Regulation by p38 and ERK. *J Immunol.* 2005;175:4301-8.
118. Schümann M, Dobbstein M. Adenovirus-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylation during the late phase of infection enhances viral protein levels and virus progeny. *Cancer Res.* 2006;66(3):1282-8.
119. Torres NI, Castilla V, Bruttomesso AC, Eiras J, Galagovsky LR, Wachsman MB. In vitro antiviral activity of dehydroepiandrosterone, 17 synthetic analogs and ERK modulators against herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res.* 2012;95(1):37-48.
120. de Oliveira LC, Brasil BSAF, Unger B, Trindade GS, Abrahão JS, Kroon EG, et al. The host factor early growth response gene (EGR-1) regulates vaccinia virus infectivity during infection of starved mouse cells. *Viruses.* 2018;10(4):1-13.
121. Furler RL, Uittenbogaart CH. Signaling through the P38 and ERK pathways: A common link between HIV replication and the immune response. *Immunol Res.* 2010;48(1-3):99-109.
122. Hemonnot B, Cartier C, Gay B, Rebuffat S, Bardy M, Devaux C, et al. The host cell MAP kinase ERK-2 regulates viral assembly and release by phosphorylating the p6gag protein of HIV-1. *J Biol Chem.* 2004;279(31):32426-34.
123. Pleschka S. RNA viruses and the mitogenic Raf/MEK/ERK signal transduction cascade. *Biol Chem.* 2008;389(10):1273-82.
124. Schragar JA, Minassian V Der, Marsh JW. HIV Nef increases T cell ERK MAP kinase activity. *J Biol Chem.* 2002;277(8):6137-42.

125. Soliman M, Seo JY, Kim DS, Kim JY, Park JG, Alfajaro MM, et al. Activation of PI3K, Akt, and ERK during early rotavirus infection leads to V-ATPase-dependent endosomal acidification required for uncoating. *PLoS Pathog.* 2018;14(1):1-32.
126. Albarnaz JD, De Oliveira LC, Torres AA, Palhares RM, Casteluber MC, Rodrigues CM, et al. MEK/ERK activation plays a decisive role in yellow fever virus replication: Implication as an antiviral therapeutic target. *Antiviral Res.* 2014;111:82-92.
127. Chang TH, Chen SR, Yu CY, Lin YS, Chen YS, Kubota T, et al. Dengue virus serotype 2 blocks extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor- κ B activation to downregulate cytokine production. *PLoS One.* 2012;7(8):4-11.
128. Duan H, Zhu M, Xiong Q, Wang Y, Xu C, Sun J, et al. Regulation of enterovirus 2A protease-associated viral IRES activities by the cell's ERK signaling cascade: Implicating ERK as an efficiently antiviral target. *Antiviral Res.* 2017;143:13-21.
129. Jensen KJ, Garmaroudi FS, Zhang J, Lin J, Boroomand S, Zhang M, et al. An ERK-p38 subnetwork coordinates host cell apoptosis and necrosis during coxsackievirus B3 infection. *Cell Host Microbe.* 2013;13(1):67-76.
130. Luo H, Yanagawa B, Zhang J, Luo Z, Zhang M, Esfandiarei M, et al. Coxsackievirus B3 replication is reduced by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *J Virol.* 2002;76(7):3365-73.
131. Shi W, Hou X, Peng H, Zhang L, Li Y, Gu Z, et al. MEK/ERK signaling pathway is required for enterovirus 71 replication in immature dendritic cells. *Virol J.* 2014;11(1):1-13.
132. Shi Y, He X, Zhu G, Tu H, Liu Z, Li W, et al. Coxsackievirus A16 elicits incomplete autophagy involving the mTOR and ERK pathways. *PLoS One.* 2015;10(4):1-23.
133. Shyu H, Lin Y, Chen L, Wang Y, Yeh T, Su S, et al. The dengue virus envelope protein induced PAI-1 gene expression via MEK/ERK pathways. *Thromb Haemost.* 2010;104(6):1219-27.
134. Wang B, Zhang H, Zhu M, Luo Z, Peng Y. MEK1-ERKs signal cascade is required for the replication of Enterovirus 71 (EV71). *Antiviral Res.* 2012;93(1):110-7.
135. Wang C, Gao L, Jin Y, Cardona CJ, Xing Z. Regulation of host responses and viral replication by the mitogen-activated protein kinases in intestinal epithelial cells infected with Enterovirus 71. *Virus Res.* 2015;197:75-84.
136. Xin L, Ma X, Xiao Z, Yao H, Liu Z. Coxsackievirus B3 induces autophagy in HeLa cells via the AMPK/MEK/ERK and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways. *Infect*

- Genet Evol. 2015;36:46-54.
137. Yang TC, Lai CC, Shiu SL, Chuang PH, Tzou BC, Lin YY, et al. Japanese encephalitis virus down-regulates thioredoxin and induces ROS-mediated ASK1-ERK/p38 MAPK activation in human promonocyte cells. *Microbes Infect.* 2010;12(8-9):643-51.
 138. Zhao LJ, Wang W, Liu Y, Ren H, Qi ZT. Interference with ERK and STAT signaling pathways and inhibition of hepatitis C virus replication by ribavirin. *Antiviral Res.* 2012;96(2):260-8.
 139. Zhao LJ, Wang W, Ren H, Qi ZT. ERK signaling is triggered by hepatitis C virus E2 protein through DC-SIGN. *Cell Stress Chaperones.* 2013;18(4):495-501.
 140. Zhao LJ, Wang W, Ren H, Qi ZT. Interaction of L-SIGN with Hepatitis C Virus Envelope Protein E2 Up-Regulates Raf-MEK-ERK Pathway. *Cell Biochem Biophys.* 2013;66(3):589-97.
 141. Lu L, Zhang Q, Wu K, Chen X, Zheng Y, Zhu C, et al. Hepatitis C virus NS3 protein enhances cancer cell invasion by activating matrix metalloproteinase-9 and cyclooxygenase-2 through ERK/p38/NF- κ B signal cascade. *Cancer Lett.* 2015;356(2):470-8.
 142. Macdonald A, Chan JK, Harris M. Perturbation of epidermal growth factor receptor complex formation and Ras signalling in cells harbouring the hepatitis C virus subgenomic replicon. *J Gen Virol.* 2005;86:1027-33.
 143. Macdonald A, Crowder K, Street A, McCormick C, Saksela K, Harris M. The Hepatitis C Virus Non-structural NS5A Protein Inhibits Activating Protein – 1 Function by Perturbing Ras-ERK Pathway Signaling. *J Biol Chem.* 2003;278(20):17775-84.
 144. Mankouri J, Griffin S, Harris M. The Hepatitis C Virus Non-Structural Protein NS5A Alters the Trafficking Profile of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Traffic.* 2008;9:1497-509.
 145. Gretton S, Hughes M, Harris M. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by Ras-Erk signalling. *J Gen Virol.* 2010;91(3):671-80.
 146. Ndjomou J, Park IW, Liu Y, Mayo LD, He JJ. Up-regulation of hepatitis C virus replication and production by inhibition of MEK/ERK signaling. *PLoS One.* 2009;4(10):1-8.
 147. Zhao LJ, Wang W, Wang WB, Ren H, Qi ZT. Involvement of ERK pathway in interferon alpha-mediated antiviral activity against hepatitis C virus. *Cytokine.*

- 2015;72(1):17-24.
148. Zhang L, Li Q, Ding X, Zhang B, Zhang Q, Qu X, et al. Antisense Oligonucleotides Targeting Raf-1 Block Japanese Encephalitis Virus In Vitro and In Vivo. *Nucleic Acid Ther.* 2017;27(2):78-86.
 149. Zampieri CA, Fortin J-F, Nolan GP, Nabel GJ. The ERK Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Contributes to Ebola Virus Glycoprotein-Induced Cytotoxicity. *J Virol.* 2007;81(3):1230-40.
 150. Ludwig S. Targeting cell signalling pathways to fight the flu: Towards a paradigm change in anti-influenza therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2009;64(1):1-4.
 151. Ludwig S, Wolff T, Ehrhardt C, Wurzer WJ, Reinhardt J, Planz O, et al. MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants. *FEBS Lett.* 2004;561(1-3):37-43.
 152. Marjuki H, Alam MI, Ehrhardt C, Wagner R, Planz O, Klenk HD, et al. Membrane accumulation of influenza A virus hemagglutinin triggers nuclear export of the viral genome via protein kinase C α -mediated activation of ERK signaling. *J Biol Chem.* 2006;281(24):16707-15.
 153. Marjuki H, Yen HL, Franks J, Webster RG, Pleschka S, Hoffmann E. Higher polymerase activity of a human influenza virus enhances activation of the hemagglutinin-induced Raf/MEK/ERK signal cascade. *Virology.* 2007;4:1-19.
 154. Pleschka S, Wolff T, Ehrhardt C, Hobom G, Planz O, Rapp UR, et al. Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol.* 2001;3(3):301-5.
 155. Pinto R, Herold S, Cakarova L, Hoegner K, Lohmeyer J, Planz O, et al. Inhibition of influenza virus-induced NF-kappaB and Raf/MEK/ERK activation can reduce both virus titers and cytokine expression simultaneously in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 2011;92(1):45-56.
 156. Kong X, San Juan H, Behera A, Peeples ME, Wu J, Lockey RF, et al. ERK-1/2 activity is required for efficient RSV infection. *FEBS Lett.* 2004;559(1-3):33-8.
 157. Monick MM, Staber JM, Thomas KW, Hunninghake GW. Respiratory Syncytial Virus Infection Results in Activation of Multiple Protein Kinase C Isoforms Leading to Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase. *J Immunol.* 2001;166:2681-7.
 158. Caignard G, Komarova A V., Bouraï M, Mourez T, Jacob Y, Jones LM, et al. Differential regulation of type I interferon and epidermal growth factor pathways

- by a human Respirovirus virulence factor. *PLoS Pathog.* 2009;5(9).
159. Preugschas HF, Hrinčius ER, Mewis C, Tran GVQ, Ludwig S, Ehrhardt C. Late activation of the Raf/MEK/ERK pathway is required for translocation of the RSV F protein to the plasma membrane and efficient viral replication. *Cell Microbiol.* 2018;(August):e12955.
 160. Rojek JM, Moraz ML, Pythoud C, Rothenberger S, Van der Goot FG, Campbell KP, et al. Binding of Lassa virus perturbs extracellular matrix-induced signal transduction via dystroglycan. *Cell Microbiol.* 2012;14(7):1122-34.
 161. Chang W-W, Su I-J, Lai M-D, Chang W-T, Huang W, Lei H-Y. Suppression of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits hepatitis B virus replication in human hepatoma cell: the antiviral role of nitric oxide. *J Viral Hepat.* 2008;15(7):490-7.
 162. Gonnella R, Granato M, Farina A, Santarelli R, Faggioni A, Cirone M. PKC theta and p38 MAPK activate the EBV lytic cycle through autophagy induction. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2015;1853(7):1586-95.
 163. Hargett D, McLean T, Bachenheimer SL. Herpes simplex virus ICP27 activation of stress kinases JNK and p38. *J Virol.* 2005;79(13):8348-60.
 164. Li M, Zhou Z-H, Sun X-H, Zhang X, Zhu X-J, Jin S-G, et al. Hepatitis B core antigen upregulates B7-H1 on dendritic cells by activating the AKT/ERK/P38 pathway: a possible mechanism of hepatitis B virus persistence. *Lab Investig.* 2016;96(11):1156-64.
 165. Li YX, Ren YL, Fu HJ, Zou L, Yang Y, Chen Z. Hepatitis B virus middle protein enhances IL-6 production via p38 MAPK/NF- κ B pathways in an ER stress-dependent manner. *PLoS One.* 2016;11(7):1-13.
 166. Liu X, Cohen JI. Epstein-Barr Virus (EBV) Tegument Protein BGLF2 Promotes EBV Reactivation through Activation of the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *J Virol.* 2016;90(2):1129-38.
 167. Xiao J, Deng J, Lv L, Kang Q, Ma P, Yan F, et al. Hydrogen peroxide induce human cytomegalovirus replication through the activation of p38-MAPK signaling pathway. *Viruses.* 2015;7(6):2816-33.
 168. Zachos G, Clements B, Conner J. Herpes simplex virus type 1 infection stimulates p38/c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinase pathways and activates transcription factor AP-1. *J Biol Chem.* 1999;274(8):5097-103.
 169. Johansson P, Jansson A, Ruetschi U, Rymo L. The p38 Signaling Pathway Upregulates Expression of the Epstein-Barr Virus LMP1 Oncogene. *J Virol.*

- 2010;84(6):2787-97.
170. Liu X, Shah A, Gangwani MR, Silverstein PS, Fu M, Kumar A. HIV-1 Nef Induces CCL5 production in astrocytes through p38-MAPK and PI3K/Akt pathway and utilizes NF- κ B, CEBP and AP-1 transcription factors. *Sci Rep.* 2014;4:1-10.
 171. Nookala AR, Shah A, Noel RJ, Kumar A. HIV-1 tat-mediated induction of CCL5 in astrocytes involves NF- κ B, AP-1, C/EBP α and C/EBP γ transcription factors and JAK, PI3K/Akt and p38 MAPK signaling pathways. *PLoS One.* 2013;8(11):1-13.
 172. Gajanayaka N, O'Hara S, Konarski Y, Fernandes J, Muthumani K, Kozlowski M, et al. HIV and HIV-Tat inhibit LPS-induced IL-27 production in human macrophages by distinct intracellular signaling pathways. *J Leukoc Biol.* 2017;102(September).
 173. Holloway G, Coulson BS. Rotavirus activates JNK and p38 signaling pathways in intestinal cells, leading to AP-1-driven transcriptional responses and enhanced virus replication. *J Virol.* 2006;80(21):10624-33.
 174. Chen QL, Zhu SY, Bian ZQ, Zhao LJ, Cao J, Pan W, et al. Activation of p38 MAPK Pathway by Hepatitis C Virus E2 in Cells Transiently Expressing DC-SIGN. *Cell Biochem Biophys.* 2010;56(1):49-58.
 175. Fung TS, Liao Y, Liu DX. Regulation of Stress Responses and Translational Control by Coronavirus. *Viruses.* 2016;8(184):1-15.
 176. García CC, Quintana VM, Castilla V, Damonte EB. Chapter 2: Towards Host Cell-Targeting Therapies to Treat Dengue Virus Infections. En: Atta-ur-Rahman F, Choudhary MI, editores. *Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery.* Sharjah: Betham Science Publishers Ltd.; 2017. p. 45-87.
 177. Kono M, Tatsumi K, Imai AM, Saito K, Kuriyama T, Shirasawa H. Inhibition of human coronavirus 229E infection in human epithelial lung cells (L132) by chloroquine : Involvement of p38 MAPK and ERK. *Antiviral Res.* 2008;77:150-2.
 178. Kopecky-Bromberg SA, Martinez-Sobrido L, Palese P. 7a Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Inhibits Cellular Protein Synthesis and Activates p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *J Virol.* 2006;80(2):785-93.
 179. Lee C-H, Chen R-F, Liu J-W, Chang J-C, Liu P-M, Eng H-L, et al. Altered p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Expression in Different Leukocytes with Increment of Immunosuppressive Mediators in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *J Immunol.* 2004;172:7841-7.
 180. Li S, Wang C, Jou Y, Yang T, Huang S, Wan L. SARS coronavirus papain-like

- protease induces Egr-1-dependent up-regulation of TGF- β 1 via ROS / p38 MAPK / STAT3 pathway. *Sci Rep* [Internet]. 2016;(April):1-13. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/srep25754>
181. Mizutani T. Signal Transduction in SARS-CoV-Infected Cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;95:86-95.
 182. Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;319:1228-34.
 183. Nagila A, Netsawang J, Suttitheptumrong A, Morchang A, Khunchai S, Srisawat C, et al. Inhibition of p38MAPK and CD137 signaling reduce dengue virus-induced TNF- α secretion and apoptosis. *Viol J*. 2013;10:1-7.
 184. Padhan K, Minakshi R, Towheed AM Bin, Jameel S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein activates the mitochondrial death pathway through p38 MAP kinase activation. *J Gen Virol*. 2008;89:1960-9.
 185. Peng H, Shi M, Zhang L, Li Y, Sun J, Zhang L, et al. Activation of JNK1/2 and p38 MAPK signaling pathways promotes enterovirus 71 infection in immature dendritic cells. *BMC Microbiol*. 2014;14(1):1-9.
 186. Serti E, Doumba PP, Thyphronitis G, Tsitoura P, Katsarou K, Foka P, et al. Modulation of IL-2 expression after uptake of hepatitis C virus non-enveloped capsid-like particles: The role of p38 kinase. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(3):505-22.
 187. Song X, Yao Z, Yang J, Zhang Z, Deng Y, Li M, et al. HCV core protein binds to gC1qR to induce A20 expression and inhibit cytokine production through MAPKs and NF- κ B signaling pathways. *Oncotarget*. 2016;7(23):33796-808.
 188. Spaziani A, Alisi A, Sanna D, Balsano C. Role of p38 MAPK and RNA-dependent protein kinase (PKR) in hepatitis C virus core-dependent nuclear delocalization of cyclin B1. *J Biol Chem*. 2006;281(16):10983-9.
 189. Zhu S, Luo H, Liu H, Ha Y, Mays ER, Lawrence RE, et al. p38MAPK plays a critical role in induction of a pro-inflammatory phenotype of retinal Müller cells following Zika virus infection. *Antiviral Res*. 2017;145:70-81.
 190. Su H-L, Liao C-L, Lin Y-L. Japanese Encephalitis Virus Infection Initiates Endoplasmic Reticulum Stress and an Unfolded Protein Response. *J Virol*. 2002;76(9):4162-71.
 191. Jimenez-Guardeño JM, Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Regla-Nava JA, Fernandez-Delgado R, Castaño-Rodríguez C, et al. The PDZ-Binding Motif of

- Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Envelope Protein Is a Determinant of Viral Pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2014;10(8):e1004320.
192. Zhang Z, Wang B, Wu S, Wen Y, Wang X, Song X, et al. PD169316, a specific p38 inhibitor, shows antiviral activity against Enterovirus71. *Virology.* 2017;508(March):150-8.
193. Marchant D, Singhera GK, Utokaparch S, Hackett TL, Boyd JH, Luo Z, et al. Toll-Like Receptor 4-Mediated Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is a Determinant of Respiratory Virus Entry and Tropism □. *J Virol.* 2010;84(21):11359-73.
194. Börgeling Y, Schmolke M, Viemann D, Nordhoff C, Roth J, Ludwig S. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase impairs influenza virus-induced primary and secondary host gene responses and protects mice from lethal H5N1 infection. *J Biol Chem.* 2014;289(1):13-27.
195. Choi M-S, Heo J, Yi C-M, Junsu B, Lee N-J, Lee N-R, et al. A novel p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) specific inhibitor suppresses respiratory syncytial virus and influenza A virus replication by inhibiting virus-induced p38 MAPK activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;477:311-6.
196. Galván Morales MÁ, Cabello Gutiérrez C, Mejía Nepomuceno F, Valle Peralta L, Valencia Maqueda E, Manjarrez Zavala ME. Parainfluenza virus type 1 induces epithelial IL-8 production via p38-MAPK signalling. *J Immunol Res.* 2014;2014.
197. Fricke J, Koo LY, Brown CR, Collins PL. p38 and OGT Sequestration into Viral Inclusion Bodies in Cells Infected with Human Respiratory Syncytial Virus Suppresses MK2 Activities and Stress Granule Assembly. *J Virol.* 2013;87(3):1333-47.
198. McCaskill JL, Ressel S, Alber A, Redford J, Power UF, Schwarze J, et al. Broad-Spectrum Inhibition of Respiratory Virus Infection by MicroRNA Mimics Targeting p38 MAPK Signaling. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2017;7(June):256-66.
199. Halfmann P, Neumann G, Kawaoka Y. The Ebolavirus VP24 protein blocks phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Infect Dis.* 2011;204(SUPPL. 3):953-6.
200. Johnson JC, Martinez O, Honko AN, Hensley LE, Olinger GG, Basler CF. Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 MAP kinase impair viral entry and reduce cytokine induction by Zaire ebolavirus in human dendritic cells. *Antiviral Res.* 2014;107:102-9.

201. Bowick GC, Fennewald SM, Scott EP, Zhang L, Elsom BL, Aronson JF, et al. Identification of Differentially Activated Cell-Signaling Networks Associated with Pichinde Virus Pathogenesis by Using Systems Kinomics. *J Virol.* 2007;81(4):1923-33.
202. Candurra NA, Damonte EB, Coto CE. Antigenic relationships between attenuated and pathogenic strains of junin virus. *J Med Virol.* 1989;27(2):145-50.
203. Castilla V, Contigiani M, Mersich SE. Inhibition of cell fusion in Junin virus-infected cells by sera from Argentine hemorrhagic fever patients. *J Clin Virol.* 2005;32(4):286-8.
204. Sanchez A, Pifat DY, Kenyon RH, Peters CJ, McCormick JB, Kiley MP. Junin virus monoclonal antibodies: Characterization and cross-reactivity with other arenaviruses. *J Gen Virol.* 1989;70(5):1125-32.
205. Steinmetz R, Wagoner HA, Zeng P, Hammond JR, Hannon TS, Meyers JL, et al. Mechanisms Regulating the Constitutive Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Signaling Pathway in Ovarian Cancer and the Effect of Ribonucleic Acid Interference for ERK1/2 on Cancer Cell Proliferation. *Mol Endocrinol.* 2004;18(10):2570-82.
206. Casabona JC, Macleod JML, Loureiro ME, Gomez GA, Lopez N. 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.* 2009;83(14):7029-39.
207. Franze-Fernandez MT, Zetina C, Iapalucci S, Lucero MA, Bouissou C, Lopez R, et al. Molecular structure and early events in the replication of Tacaribe arenavirus S RNA. *Virus Res.* 1987;7(4):309-24.
208. Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, Kaelin K, Huber M, Dötsch C, et al. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J.* 1995;14(23):5773-84.
209. Team RC. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Viena, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2017. Disponible en: <https://www.r-project.org/>
210. Brooks ME, Kristensen K, van Benthem KJ, Magnusson A, Berg CW, Nielsen A, et al. Modeling zero-inflated count data with glmmTMB. *bioRxiv.* 2017;1-14.
211. Magnusson A, Skaug HJ, Nielsen A, Berg CW, Kristensen K, Mächler M, et al. glmmTMB: Generalized Linear Mixed Models using Template Model Builder [Internet]. CRAN; 2019. Disponible en: <https://github.com/glmmTMB>

212. Lenth R V. Least-Squares Means : The R Package lsmeans. *J Stat Softw.* 2016;69(1).
213. Rodríguez ME, Brunetti JE, Wachsman MB, Scolaro LA, Castilla V. Raf/MEK/ERK pathway activation is required for Junín virus replication. *J Gen Virol.* 2014;95:799-805.
214. Monick MM, Powers LS, Gross TJ, Flaherty DM, Barrett CW, W G, et al. Active ERK Contributes to Protein Translation by Preventing JNK-Dependent Inhibition of Protein Phosphatase 1. *J Immunol.* 2006;177:1636-45.
215. Cooray S, Jin L, Best JM. The involvement of survival signaling pathways in rubella-virus induced apoptosis. *Virology.* 2005;2:1-12.
216. Woodson EN, Anderson MS, Loftus MS, Kedes DH. Progressive Accumulation of Activated ERK2 within Highly Stable ORF45-Containing Nuclear Complexes Promotes Lytic Gammaherpesvirus Infection. *PLoS Pathog.* 2014;10(4).
217. Lyman MG, Randall JA, Calton CM, Banfield BW. Localization of ERK / MAP Kinase Is Regulated by the Alphaherpesvirus Tegument Protein Us2. *J Virol.* 2006;80(14):7159-68.
218. Huang W, Zhan Y, Zheng Y, Han Y, Hu W, Hou J. Upregulated Ferritin in Periodontitis Promotes Inflammatory Cytokine Expression in Human Periodontal Ligament Cells through Transferrin Receptor via ERK/P38 MAPK Pathways. *Clin Sci.* 2019;133(1):135-48.
219. Poli M, Luscieti S, Gandini V, MacCarinelli F, Finazzi D, Silvestri L, et al. Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) signaling. implications for transferrin-dependent hepcidin regulation. *Haematologica.* 2010;95(11):1832-40.
220. Martinez MG, Forlenza MB, Candurra NA. Involvement of cellular proteins in Junin arenavirus entry. *Biotechnol J.* 2009;4(6):866-70.
221. Desmyter JAN, Melnick JL, Rawls WE. Defectiveness of Interferon Production and of Rubella Virus Interference in a Line of African Green Monkey Kidney Cells (Vero). *J Virol.* 1968;2(10):955-61.
222. Vahedi F, Lee AJ, Collins SE, Chew M V, Lusty E, Chen B, et al. Cytokine IL-15 and IFN- γ signal through the ERK pathway to inhibit HCV replication , independent of type I IFN signaling. *Cytokine.* 2018;(December 2017):0-1.
223. Zhao L-J, Hua X, He S-F, Ren H, Qi Z-T. Interferon alpha regulates MAPK and

- STAT1 pathways in human hepatoma cells. *Virology*. 2011;8(157):1-7.
224. Chai Y, Huang H, Hu D-J, Luo X, Tao Q-S, Zhang X-L, et al. IL-29 and IFN- α regulate the expression of MxA, 2', 5'-OAS and PKR genes in association with the activation of Raf-MEK- ERK and PI3K-AKT signal pathways in HepG2.2.15 cells. *Mol Biol Rep*. 2011;38:139-43.
225. Valledor AF, Arpa L, Sánchez-Tilló E, Comalada M, Casals C, Xaus J, et al. IFN- α – mediated inhibition of MAPK phosphatase expression results in prolonged MAPK activity in response to M-CSF and inhibition of proliferation. *Blood*. 2008;112(8):3274-83.
226. Caraglia M, Marra M, Pelaia G, Maselli R, Caputi M, Marsico SA, et al. Alpha-Interferon and Its Effects on Signal Transduction Pathways. *J Cell Physiol*. 2005;202:323-35.
227. Katze MG, He Y, Gale Jr M. Viruses and Interferon: A Fight for Supremacy. *Nat Rev*. 2002;2(September):675-87.
228. Inamura K, Matsuzaki Y, Uematsu N, Honda A, Tanaka N, Uchida K. Rapid inhibition of MAPK signaling and anti-proliferation effect via JAK / STAT signaling by interferon- α in hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1745:401-10.
229. Seamone ME, Wang W, Acott P, Beck PL, Tibbles AL, Muruve DA. MAP kinase activation increases BK polyomavirus replication and facilitates viral propagation in vitro. *J Virol Methods*. 2010;170(1-2):21-9.
230. Strong JE, Wong G, Jones SE, Grolla A, Theriault S, Kobinger GP, et al. Stimulation of Ebola virus production from persistent infection through activation of the Ras / MAPK pathway. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(46):1-6.
231. Polyak SJ, Zheng S, Harnish DG. Analysis of Pichinde arenavirus transcription and replication in human THP-1 monocytic cells. *Virus Res*. 1995;36:37-48.
232. Foscaldi SA, D'Antuono A, Rey O, López N. Regulación de la replicación del arenavirus Tacaribe por Proteína Kinasa C (PKC). En: XII Congreso Argentino de Virología, V Simposio de Virología Clínica, III Simposio de Virología Veterinaria. 26 al 28 de septiembre, Buenos Aires; 2017.
233. Ceballos-Olvera I, Chávez-Salinas S, Medina F, Ludert JE, del Angel RM. JNK phosphorylation, induced during dengue virus infection, is important for viral infection and requires the presence of cholesterol. *Virology*. 2010;396:30-6.
234. Huerta-Zepeda A, Cabello-Gutiérrez C, Cime-Castillo J, Monroy-Martínez V,

- Manjarrez-Zavala ME, Gutiérrez-Rodríguez M, et al. Crosstalk between coagulation and inflammation during Dengue virus infection. *Thromb Haemost.* 2008;99(5):936-43.
235. Roth H, Magg V, Uch F, Mutz P, Klein P, Haneke K, et al. Flavivirus Infection Uncouples Translation Suppression from Cellular. *MBio.* 2017;8:1-19.
236. Marjuki H, Gornitzky A, Marathe BM, Ilyushina NA, Aldridge JR, Desai G, et al. Influenza A virus-induced early activation of ERK and PI3K mediates V-ATPase-dependent intracellular pH change required for fusion. *Cell Microbiol.* 2011;13(4):587-601.
237. Proud CG. Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem J.* 2007;403(2):217-34.
238. Bakheet T, Hitti E, Khabar KSA. ARED-Plus: An updated and expanded database of AU-rich element-containing mRNAs and pre-mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D218-20.
239. Cai Y, Liu Y, Zhang X. Suppression of Coronavirus Replication by Inhibition of the MEK Signaling Pathway. *J Virol.* 2007;81(2):446-56.
240. Yang X, Gabuzda D. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by the ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol.* 1999;73(4):3460-6.
241. Hale BG, Knebel A, Botting CH, Galloway CS, Precious BL, Jackson D, et al. CDK/ERK-mediated phosphorylation of the human influenza A virus NS1 protein at threonine-215. *Virology.* 2009;383(1):6-11.
242. Levingston Macleod JM, D'Antuono A, Loureiro ME, Casabona JC, Gomez GA, Lopez N. Identification of Two Functional Domains within the Arenavirus Nucleoprotein. *J Virol.* 2011;85(5):2012-23.
243. Howard CR, Buchmeier MJ. A Protein Kinase Activity in Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Identification of the Phosphorylated Product Using Monoclonal Antibody. *Virology.* 1983;126:538-47.
244. Iwasaki M, Minder P, Kuhn JH, Yates III JR, Torbett BE, de la Torre JC. Interactome analysis of the lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein in infected cells reveals ATPase Na⁺ / K⁺ transporting subunit Alpha 1 and prohibitin as host-cell factors involved in the life cycle of mammarenaviruses. *PLoS Pathog.* 2018;14(2).
245. Reguera J, Gerlach P, Cusack S. Towards a structural understanding of RNA

- synthesis by negative strand RNA viral polymerases. *Curr Opin Struct Biol.* 2016;36:75-84.
246. Ortín J, Martín-Benito J. The RNA synthesis machinery of negative-stranded RNA viruses. *Virology.* 2015;479-480:532-44.
247. Ferron F, Weber F, de la Torre JC, Reguera J. Transcription and replication mechanisms of Bunyaviridae and Arenaviridae L proteins. *Virus Res.* 2017;234:118-34.
248. Pflug A, Lukarska M, Resa-infante P, Reich S, Cusack S. Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine. *Virus Res.* 2017;234:103-17.
249. Martin IS, Hengrung N, Renner M, Sharps J, Martínez-Alonso M, Masiulis S, et al. A Mechanism for the Activation of the Influenza Virus Transcriptase. *Mol Cell.* 2018;70:1101-10.
250. Chang C-K, Chen C-J, Wu C-C, Chen S-W, Shih S-R, Kuo R-L. Cellular hnRNP A2 / B1 interacts with the NP of influenza A virus and impacts viral replication. *PLoS One.* 2017;12(11):1-15.
251. Friedrich S, Engelmann S, Schmidt T, Szczepankiewicz G, Bergs S, Liebert UG, et al. The Host Factor AUF1 p45 Supports Flavivirus Propagation by Triggering the RNA Switch Required for Viral Genome Cyclization. *J Virol.* 2018;92:1-15.
252. Habelhah H, Shah K, Huang L, Ostareck-Iederer A, Burlingame AL, Shokat KM, et al. ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP K and subsequent inhibition of mRNA translation. *Nat Cell Biol.* 2001;3(March):325-30.
253. Ziaei S, Shimada N, Kucharavy H, Hubbard K. MNK1 expression increases during cellular senescence and modulates the subcellular localization of hnRNP A1. *Exp Cell Res.* 2011;318:500-8.
254. Buxadé M, Parra JL, Rousseau S, Shpiro N, Marquez R, Morrice N, et al. The Mnks Are Novel Components in the Control of TNF alfa Biosynthesis and Phosphorylate and Regulate hnRNP A1. *Immunity.* 2005;23:177-89.