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

La enzima farnesil pirofosfato sintetasa FPPS como blanco antiviral en la infección con el virus Junín

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

Bióloga Johanna Briyith Diaz Sierra

Directora de Tesis: Dra. SANDRA M. CORDO
Directora Adjunta: Dra. CYBELE C. GARCÍA
Consejera de estudios: Dra. ANDREA A. BARQUERO

Lugar de trabajo: Laboratorio de Procesos Moleculares de la Interacción Virus-Célula. Laboratorio de Estrategias Antivirales. Departamento de Química Biológica, FCEyN-UBA, IQUIBICEN-CONICET.

Buenos Aires, abril 2024

La enzima farnesil pirofosfato sintetasa FPPS como blanco antiviral en la infección con el virus Junín

El virus Junín (JUNV) es un arenavirus que puede ocasionar un síndrome de fiebre hemorrágica (FH) aguda, una enfermedad zoonótica endémica no erradicable de Argentina y para la cual no existe un tratamiento antiviral específico. La infección por arenavirus induce una reprogramación de los procesos celulares, incluyendo alteraciones en los mensajeros, en las vías metabólicas, biosíntesis de lípidos y organización de las membranas intracelulares y organelas.

JUNV se asocia a microdominios de membrana enriquecidos en colesterol conocidos como balsas lipídicas para su brotación y ensamble. La enzima farnesil pirofosfato sintetasa (FPPS) es una enzima clave en la vía metabólica del mevalonato. En esta vía se sintetiza colesterol y otros lípidos que forman parte de la membrana plasmática celular, incluyendo las balsas lipídicas.

Los bisfosfonatos (BPs) son inhibidores de la FPPS utilizados desde hace más de cuatro décadas como terapia para tratar enfermedades asociadas con la reabsorción del calcio, y varios tipos de cáncer. Son análogos químicamente estables de fosfatos y pirofosfatos, que actúan emulando a los sustratos que intervienen en la vía del mevalonato. La mayoría de los BPs tienen un efecto directo sobre la FPPS humana (hFPPS). Otros BPs tienen como blanco enzimas homólogas en organismos tales como parásitos protozoarios e insectos.

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo estudiar la enzima FPPS como posible blanco antiviral para la intervención del ciclo de multiplicación de JUNV y la búsqueda de un agente quimioterapéutico específico.

En primer lugar, se evaluó la actividad antiviral de BPs frente a la multiplicación de JUNV en cultivos de células Vero y A549. Se determinó que BPs comerciales y no comerciales ejercen un efecto inhibidor sobre la producción de JUNV en forma dependiente de la dosis y sin actividad virucida.

Al profundizar el estudio de la acción de los BPs sobre la multiplicación de JUNV, se pudo determinar que afectan la actividad fusogénica de la glicoproteína GP2 de JUNV, así como la formación de partículas similares a virus impulsada por la proteína de matriz Z. Además, los BPs exhiben su acción inhibitoria en una etapa tardía del ciclo de multiplicación viral, observándose 1 log de diferencia en el rendimiento viral al ser adicionado a partir de las 18 horas post-infección.

Por otro lado, los BPs presentaron significativa actividad antiviral frente a otros modelos virales con genoma de RNA relevantes para nuestra región, como dengue, Zika y Chikungunya y, un modelo subrogado de SARS-CoV2.

Basándonos en los resultados obtenidos en esta tesis proponemos un nuevo blanco antiviral con acción contra virus envueltos con genoma de RNA. En el futuro se investigará el efecto de estos compuestos sobre la formación de las balsas lipídicas necesarias para la brotación del virus Junín.

Palabras clave: Arenavirus, virus Junín, enzima farnesil pirofosfato sintetasa, bisfosfonatos.

The enzyme farnesyl pyrophosphate synthase FPPS as an antiviral target in Junín virus infection

Junín virus (JUNV) is an arenavirus that can cause acute hemorrhagic fever (FV) syndrome, a non-eradicable endemic zoonotic disease in Argentina and for which there is no specific antiviral treatment. It is known that arenavirus infection induces a reprogramming of cellular processes, including alterations in messengers, metabolic pathways, lipid biosynthesis and organization of intracellular membranes and organelles.

JUNV associates with cholesterol-enriched membrane microdomains known as lipid rafts for their budding and assembly. The enzyme farnesyl pyrophosphate synthetase (FPPS) is a key enzyme in the mevalonate metabolic pathway. In this pathway, cholesterol and other lipids that are part of the cell plasma membrane, including lipid rafts, are synthesized.

Bisphosphonates (BPs) are FPPS inhibitors used for more than four decades as therapy to treat diseases associated with calcium reabsorption, and various types of cancer. They are chemically stable analogues of phosphates and pyrophosphates, with act by emulating the substrates involved in the mevalonate pathway. Most BPs have a direct effect on human FPPS (hFPPS). Others BPs target homologous enzymes in organisms such as protozoan parasites and insects.

The goal of this thesis work was to study the FPPS enzyme as a possible antiviral target for the intervention of the JUNV multiplication cycle and the search for a specific chemotherapeutic agent.

First, the antiviral activity of BPs against JUNV multiplication was evaluated in Vero and A549 cells cultures. It was determined that commercial and non-commercial BPs exert an inhibitory effect on JUNV production in a dose-dependent manner and without virucidal activity.

By further studying the action of BPs on JUNV multiplication, it was determined that they affect the fusogenic activity of the JUNV glycoprotein GP2, as well as the formation of virus-like particles driven by the matrix protein Z. Furthermore, the BPs exhibited their inhibitory action at a late stage of the viral multiplication cycle, with a 1 log difference in viral yield being observed when added after 18 hours post-infection.

On the other hand, BPs presented significant antiviral activity against other viral models with RNA genome relevant to our region, such as dengue, Zika, Chikungunya, and a surrogate model of SARS-CoV2.

Base on the results obtained in this thesis, we propose a new antiviral target with action against enveloped viruses with an RNA genome. In the future, the effect of these compounds on the formation of the lipid rafts necessary for the budding of the Junín virus will be investigated.

Keywords: Arenavirus, Junín virus, farnesyl pyrophosphate synthetase enzyme, bisphosphonates.

AGRADECIMIENTOS

Agradecida con la oportunidad de vivir y aprender de cada etapa, de cada persona, situación y lugar, agradecida con esa fuerza que vive en nuestro ser que nos impulsa a sentir y a plasmar los deseos más locos o coherentes. Fue un deseo constante en mi ser que me impulsó a buscar nuevos caminos por recorrer, cada mañana que iba de casa hacia mi universidad en la tierrita colombiana me preguntaba qué había detrás de esas montañas verdes que observaban mis ojos; fue ese deseo sumado a las ganas de seguir estudiando que me motivaron a buscar otras oportunidades en tierras donde el vino, el asado y los mates se comparten entre amigos.

Gracias a mis directoras, la Dra. Sandra Cordo y la Dra. Cybele García por aceptarme en su laboratorio, por su apoyo, por su agilidad para pasar de la debilidad a la fortaleza, por su infinita paciencia y por guiarme a través de mi proceso de aprendizaje. Sé que no fue fácil al inicio, pero he puesto todas las ganas por aprender y escuchar cada una de sus recomendaciones.

Gracias al Dr. Jhon Carlos Castaño Osorio por su apoyo y colaboración, por haber sido mi codirector ante CONICET para solicitar mi Beca Doctoral Latinoamericana y poder continuar con mis estudios, su apoyo fue muy importante.

Gracias a la profe Andrea por su alegría, sus risas y sus eufóricos saludos que me hacían reír con solo escucharla a unos cuantos pasillos, por todas sus historias, por ser una profe tesa y por ser mi consejera de estudios.

Gracias a la Dra. Elsa Damonte, por sus clases de virología, por su buena disposición y calidez, y a la Dra. Nélida Candurra por acordarse de mis cumpleaños y mandarme un mensajito siempre.

Gracias al profe Luis por sus charlas de evolución que en clase no terminaban, por todas las veces que busque su ayuda para resolver mis dudas, por sus ocurrencias que me hicieron reír mucho, mil gracias.

Gracias a la profe Vivi por su ternura para dar sus clases de virología, por su amabilidad y buena disposición y sus consejos.

Gracias a la profe Clau por su calidez, por su excelente disposición para enseñarme, por todas las botellitas de células compartidas, por los jalones de oreja y por estar siempre pendiente para que todo marche mejor en cultivo.

Gracias a la profe Flavia, Carlitos, Laura, Susan, Josefina, Erina, Carlos P., por su excelente disposición para ayudarme y enseñarme.

Gracias al papa Guille por su labor en el laboratorio, por preparar los medios de cultivo, y por todas sus ocurrencias que a más de uno nos pone nerviosos.

Gracias a todas las personas que forman parte del personal de apoyo de los laboratorios de Química biológica: Eva, los chicos de bedelía, Martin, Teresa y Alejandra pues sin ellos las cosas serían más complejas.

Gracias a todos mis compañeros de carrera doctoral que me introdujeron en el mundo del matecito, el asado y los ricos vinos, además de todas las palabras aprendidas del gentilicio argentino.

Gracias a mis compañeros de Viro-team que estuvieron y a los presentes: Niny, Lau, Ceci, Agos, Florecita rockera, Ale, Ema, Lua Lua, Maxixiviris, Eugy, José, Coni, Nadia, Nichi, Rosanel, Vero y a los recién llegados Belu, Emili, Jose, Freddy nelson, Migue, Malenuch, Dari, Aaron, Carlo y Mariel. Por ayudarme siempre que lo necesite, por todos los almuerzos compartidos, por todas las salidas, las risas, por todo lo que he podido aprender de cada uno de ustedes, siempre tendré algo que recordar.

Gracias al Dr. Jaime Castellanos y a la Dra. Miriam Velandia que me abrieron las puertas de su laboratorio en Colombia para realizar una pasantía investigativa, al profe Giovanni, al Profe Jhan, a la Dra. Eliana, a la profe Leidy, Anita, Carito, Sigrid, Lili, María Angelica, Dorita, Alejandro, Sebastián, Luisa, a la señora Miriam, personas hermosas que conocí, aprendí y compartí en la tierrita colombiana.

Gracias a mi madre hermosa que me apoyo con todo su amor desde el día que decidí buscar la oportunidad para seguir estudiando, por escucharme, por cuidar a mi perrita Layla que ahora es su compañía, por su fuerza y apoyo incondicional, porque a través de la distancia las dos hemos fortalecido la relación de madre e hija, por creer en mí, te amo madre hermosa.

Gracias a Mica, Indio y Juaqui por los momentos compartidos en “Experiencias Didácticas”, fue muy lindo conocerlos y compartirles la pasión que sentimos por la virología.

Gracias a la Universidad de Buenos Aires, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y al CONICET por la oportunidad de ser beneficiaria de la Beca Doctoral Latinoamericana, que me permitió continuar mi formación académica.

¡¡¡Muchísimas gracias a todos!!!

A mi madre hermosa

A mis abuelos por todo su amor, siempre los llevo en mi corazón.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. Fiebre hemorrágica viral
2. Arenavirus
   2.1 Clasificación
3. Características del virión
   3.1 Estructura molecular
   3.2 Genoma viral
   3.3 Proteínas virales
      3.3.1 Segmento S: Codifica la información para la nucleoproteína y la glicoproteína
      3.3.2 Segmento L: Codifica la información para la proteína de matriz y la RNA polimerasa
4. Ciclo de replicación
   4.1 Entrada
   4.2 Replicación
   4.3 Ensamble y brotación
5. Epidemiología
   5.1 Fiebre hemorrágica Argentina
   5.2 Patogénesis
   5.3 Vacuna y Tratamiento
6. Terapia antiviral dirigida a los blancos celulares
   6.1 Factores celulares que modulan la replicación de JUNV
      6.1.1 Quinasas ERK1/2
      6.1.2 Inosina monofosfato deshidrogenasa 2
   6.2 Maduración y ensamble de proteínas de JUNV en componentes de transporte celular
   6.3 Alteraciones en lípidos de membrana celular
7. Farnesil pirofosfato sintetasa (FPPS)
   7.1 Función la enzima FPPS humana (hFPPS) en la MVA
   7.2 La FPPS como blanco terapéutico
8. Inhibidores de la enzima FPPS: Bisfosfonatos
   8.1 Bisfosfonatos que contienen nitrógeno (N-BPs)
9. Mecanismo de inhibición de los bisfosfonatos frente a la función de hFPPS
10. Bisfosfanatos y uso clínico

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares
2. Virus
3. Titulación de la infectividad viral por el método de UFP
4. Determinación de la citotoxicidad
5. Ensayos de inhibición del rendimiento viral
6. Bisfosfonatos empleados en el estudio
7. Ensayo de actividad virucida
8. Efecto del tiempo de adición de los bisfosfonatos frente al rendimiento viral
9. Transfección con plásmidos
10. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta
11. Inmunodetección por Western Blot
12. Ensayo de actividad fusogénica de la glicoproteína de JUNV
13. Cuantificación de los niveles de RNA
14. Interacción molecular *"in silico"* de la enzima FPPS humana con los Bisfosfonatos
    14.1 Preparación de los ligandos
    14.2 Preparación de la enzima hFPPS
    14.3 Docking molecular
15. Gráficos, análisis de imágenes y estadísticas

RESULTADOS

CAPITULO I. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA FPPS

1. Efecto de los bisfosfonatos comercial zoledronato sobre la viabilidad celular y la multiplicación de JUNV.
2. Evaluación de bisfosfonatos no comerciales sobre la viabilidad celular y la multiplicación de JUNV

2.1 Evaluación del efecto inactivante de los bisfosfonatos sobre JUNV

3. Estudio *in silico* con bisfosfonatos no-comerciales

CAPITULO I. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

CAPITULO II: EFECTO DE LOS BISFOSFONATOS SOBRE LA MULTIPLICACION VIRAL

1. Expresión de proteínas virales

1.1 Expresión del antígeno GPC/GP1 de JUNV en presencia de BP 18 en células infectadas
1.2 Expresión del antígeno viral Z de JUNV en presencia de BP 18 en células infectadas
1.3 Expresión del antígeno viral NP de JUNV en presencia de BP 18 en células infectadas
1.4 Expresión del antígeno GPC/GP1 de JUNV en presencia de BP 18 en células transfectadas
1.5 Expresión del antígeno viral Z de JUNV en presencia de BP 18 en células transfectadas
1.6 Expresión del antígeno viral NP de JUNV en presencia de BP 18 en células transfectadas
2. Evaluación de la funcionalidad de las proteínas virales
2.1 Evaluación de la actividad fusogénica de la proteína viral GP2 de JUNV en presencia de BP 18
2.2 Efecto del bisfosfonato BP 18 sobre la función de matriz de Z y la formación de VLPs de JUNV
3. Efecto de BP18 en los niveles de RNA de JUNV
4. Evaluación del tiempo de adición de bisfosfonatos durante la multiplicación viral

CAPITULO II. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

CAPITULO III. EFECTO DE LOS BISFOSFONATOS SOBRE OTROS MODELOS VIRALES

1. Evaluación de la citotoxicidad y la actividad antiviral de bisfosfonatos no comerciales sobre la multiplicación de CCoV en la línea celular CRFK
2. Actividad antiviral del bisfosfonato ZA sobre la multiplicación de ZIKV
3. Actividad antiviral de bisfosfonato ZA sobre la multiplicación de DENV-2
4. Evaluación de la citotoxicidad y actividad antiviral de ZA y BP 9 sobre la multiplicación de CHIKV en células Huh-7

4.1 Efecto de ZA y BP9 en los niveles de RNA de CHIKV en células Huh-7
4.2 Evaluación de la citotoxicidad y actividad antiviral de ZA y BP 9 sobre la multiplicación de CHIKV en células Vero
4.3 Efecto de ZA y BP9 en los niveles de RNA de CHIKV en células Vero

CAPITULO III: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

REFERENCIAS

ABREVIATURAS

2iP: isopentenil adenina

agRNA: RNA antigenómico

ATP5B: ATP sintasa

BPs: bisfosfonatos

$CC_{50:}$ concentración citotóxica 50

CCoV: Coronavirus canino

cDNA: DNA copia

CE_{50}: concentración efectiva 50

CHAPV: virus Chapare

CHIKV: virus Chikungunya

DABCO: 1,4-diazabiciclo (2,2,2) octano

DAPI: diclorhidrato de 4’,6-diamidino-2-fenilindol

DE: desvió estándar

DENV: virus Dengue

DMAPP: dimetilalilo pirofosfato

DMEM: Dubecco´s minimal essential medium

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

ERK1/2: quinasas 1 y 2

ESCRT: complejo de clasificación endosomal necesario para el transporte

EUA: Estados Unidos de América

FHA: fiebre hemorrágica Argentina

FOH: farnesol

FPP: farnesil pirofosfato

FPPS: enzima farnesil pirofosfato sintetasa

GP1: glicoproteína 1

GP2: glicoproteína 2

GGOH: gernilgeraniol

GGPP: geranilgeranil pirofosfato

GGPPS: enzima geranilgeranil pirofosfato sintetasa

GPC: precursor glicoproteíco

GPP: geranil pirofosfato

gRNA: RNA genómico

GTOV: virus Guanarito

h.p.i.: horas post infección

h.p.t.: horas post transfección

h: hora

hFPPS: enzima farnesil pirofosfato sintetasa humana

HMGCR: enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa

hnRNPs: ribonucleoproteína nuclear heterogénea

IBD: enfermedad de los cuerpos de inclusión

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IMP: enzima inosina monofosfato

IMPDH2: enzima celular inosina monofosfato deshidrogenasa 2

INF-I: interferón tipo I

IPP: isopentil pirofosfato

IPP-isomerasa: enzima isopentil pirofosfato isomerasa

IS: índice de selectividad

JUNV: virus Junín

kDa: kilodalton

L: RNA polimerasa RNA dependiente

LASV: virus Lassa

LCMV: virus de la coriomeningitis linfocítica

lectina WGA: Lectina de germen de trigo que se une a glicoproteínas y glicolípidos

LR: lipid rafts

LUJV: virus Lujo

m.i.: multiplicidad de infección

MACV: virus Machupo

MDA5: melanoma differentiation-associated protein 5

MEM: medio esencial de mantenimiento

mitógenos (MAPK) e integra la cascada Raf/MEK/ERK

mRNA: RNA mensajero

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

MVA: vía del mevalonato

N-BPs: bisfosfonatos nitrogenados

NP: nucleoproteína de los *arenavirus*

NW: virus del Nuevo Mundo

OPS: Organización Paramericana de la Salud

OptiMEM: medio de cultivo con suero reducido

ORFs: marcos de lectura abiertos

OW: virus del Viejo Mundo

PBS: suero fetal bovino

PCR: polymerase chain reaction

PEI: polietilenimina

PFA: paraformaldehído

PML: proteína de la leucemia promielocítica

PNUD: Programa de Desarrollo de las Naciones Unidas

PPi: pirofosfato inorgánico

SKI/SP1: proteasa celular

qPCR: PCR cuantitativa o Real Time PCR

RE: retículo endoplásmico

RIG-I: retinoic acid-inducible gene I

RNP: ribonucleoproteínas

SABV: virus Sabiá

SDS: sodium dodecyl sulfate

SFB: suero fetal bovino

siRNA: RNA pequeño de interferencia

SS: enzima escualeno sintetasa

SSP: péptido señal de la glicoproteína GPC

ST: suero de ternera

TM: dominio transmembrana

TCRV: virus Tacaribe

tRNAs: RNA de transferencia

Tsg101: proteína del gen 101 de susceptibilidad tumoral

UFP: unidades formadoras de placa

VHF: fiebre hemorrágica viral

HIV: virus de la inmunodeficiencia humana

VIP: viperina

VLPs: partículas parecidas a virus

VSV: virus de la estomatitis vesicular

WHO: Organización Mundial de la Salud

XMP: xantosina monofosfato

Z: proteínas de matriz de los *arenavirus*

ZA: Ácido zoledrónico

ZIKV: virus Zika

αDG: receptor α-distroglicano

TfR1: receptor de transferrina-1

INTRODUCCIÓN

1. Fiebre hemorrágica viral

La fiebre hemorrágica viral (VHF) es una enfermedad zoonótica transmitida por animales vertebrados como roedores y murciélagos, artrópodos, como garrapatas o mosquitos, que también pueden actuar como vectores, y en algunos casos la transmisión puede ser directa. La VHF es causada por cuatro familias de virus de RNA, *Arenaviridae, Bunyaviridae, Filoviridae* y *Flaviviridae,* (**Figura 1**). Sus reservorios, distribución y modos de transmisión, así como el curso clínico de la enfermedad varían dependiendo del virus. En los humanos produce un cuadro clínico variado que puede manifestarse de forma leve o grave, y con frecuencia provocar la muerte del paciente que la contrae, alcanzando en ocasiones una mortalidad del 90% (Hidalgo *et al*., 2017). El síndrome de fiebre hemorrágica aguda, producido por los virus hemorrágicos, se caracteriza por fiebre elevada, afectación multisistémica y aumento de la permeabilidad vascular con manifestaciones hemorrágicas. Estas manifestaciones en ocasiones evolucionan rápidamente, induciendo la muerte. Debido al potencial de transmisión interhumana que poseen algunos de estos virus, por medio de fluidos, secreciones o excreciones corporales; en algunos casos se pueden presentar brotes epidémicos o infecciones nosocomiales importantes (Solomon, 2003).

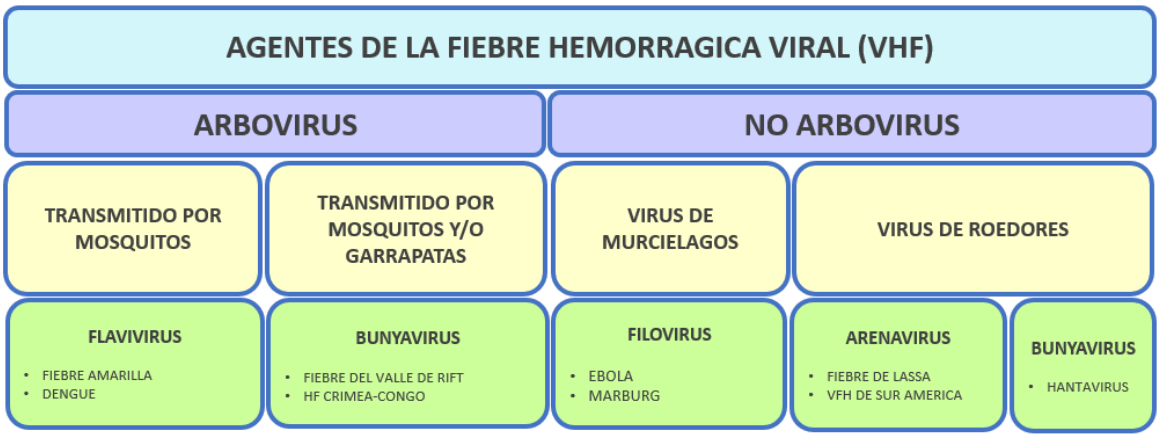


Figura 1. Fiebre hemorrágica viral (FHV) causada por las familias de virus de RNA. *Flaviviridae, Bunyaviridae, Filoviridae y Arenaviridae*, y sus agentes transmisores.

2. Arenavirus

2.1 Clasificación

Los arenavirus se clasifican dentro de la familia *Arenaviridae*. Durante el año 2012 y 2013 se secuenciaron nuevos arenavirus aislados de serpientes cautivas del infraorden

Alethinophidia, que sufrían de la enfermedad de los cuerpos de inclusión (IBD). Por análisis metagenómico de estos nuevos aislamientos se lograron establecer dos nuevos géneros: *Reptarenavirus* y *Hartmanivirus* (Maes *et al.,* 2018). Por lo tanto, esta familia de virus está constituida actualmente por cuatro géneros, *Mammarenavirus, Reptarenavirus, Hartmanivirus*, y *Antennavirus* (**Figura 2**), (Shi *et al*., 2018; Maes *et al*., 2019).

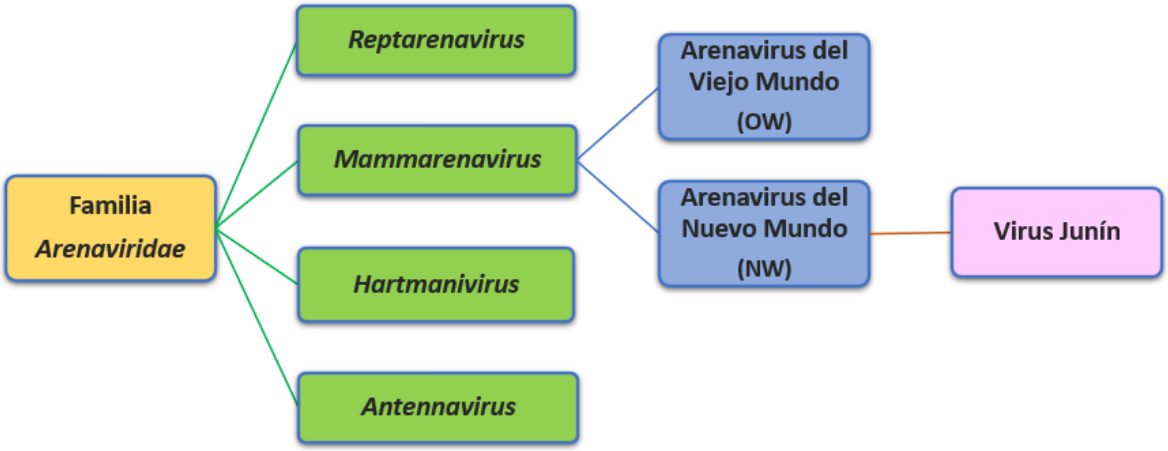


Figura 2. Géneros de la familia *Arenaviridae.* Virus del viejo mundo y del nuevo mundo.

El género *Mammarenavirus* es clasificado en dos grupos de acuerdo a su distribución geográfica, propiedades antigénicas y relaciones filogenéticas. El grupo de virus del Viejo Mundo (OW) con distribución en Europa y África, incluye el virus prototipo de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) de distribución mundial, así como el virus que produce la fiebre de Lassa (LASV). El grupo de virus del Nuevo Mundo (NW) incluye miembros altamente patogénicos en América del Sur, como el virus Machupo, Chapare, Guanarito, Sabia y Junín (Forni *et al*., 2018). Hay más de 30 especies descriptas para OW y NW, de los cuales 8 pueden causar VHF en humanos (Radoshitzky *et al.,* 2015; Forni *et al*., 2018). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (WHO), las fiebres hemorrágicas por arenavirus representan un gran riesgo para la salud pública y son catalogadas como enfermedades emergentes para las cuales se requiere investigación e identificación de blancos terapéuticos (WHO *online*, 2022).

3. Características del virión

3.1 Estructura molecular

La partícula viral se caracteriza por poseer una morfología pleomórfica, con un diámetro entre 60 y 300 nm. Está recubierta por una membrana lipídica que contiene proyecciones dispersas de glicoproteínas en su superficie, y que corresponden a las espículas virales de 8 a 10 nm. A través de microscopia electrónica se puede identificar, en el interior de la mayoría de las partículas, gránulos densos de 20-25 nm de diámetro. Estos corresponden a ribosomas provenientes de las células hospederas y por esta característica microscópica se denominó "arena" al nombre de la familia (Radoshitzky *et al*., 2015; Hallam *et al.,* 2018).

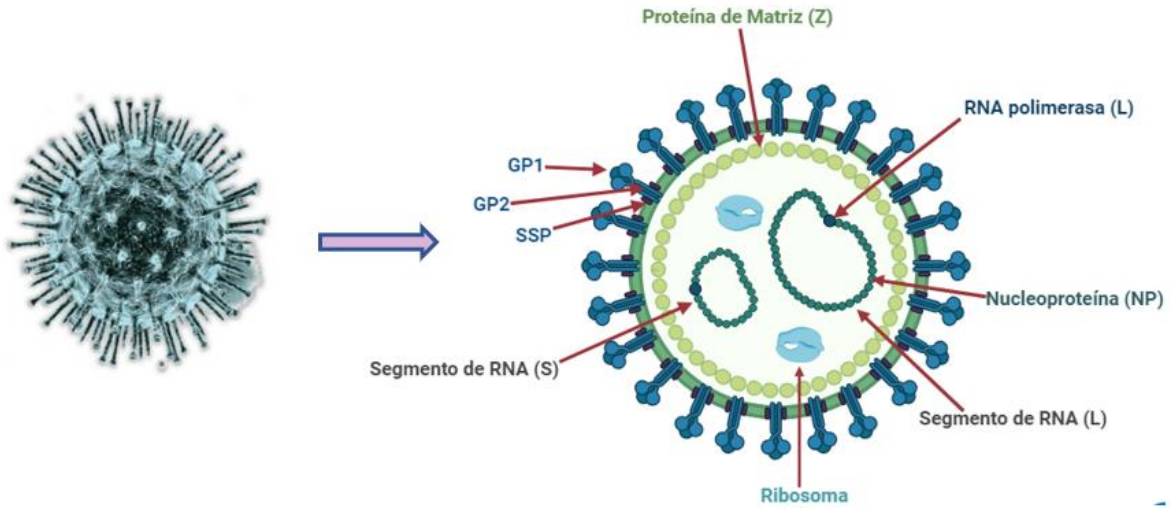


Figura 3. Estructura del virión y sus principales componentes. La partícula viral contiene el complejo de las glicoproteínas (GP1-GP2-SSP) y las proteínas de matriz (Z). El RNA genómico, la nucleoproteína (NP) y la proteína RNA polimerasa dependiente de RNA (L) conforman las ribonucleoproteínas (RNP) situadas en el interior de la partícula. El genoma bisegmentado de RNA (S y L), además de los ribosomas provenientes de la célula hospedera.

En la **Figura 3** se observa un esquema de la partícula viral. Este virus posee una envoltura lipoproteica de origen celular adquirida durante la brotación de las células infectadas. En el interior de la partícula se encuentra el genoma, el cual consta de dos moléculas de cadena sencilla de RNA (segmento S y L). Las espículas de la envoltura viral están formadas por heterotrímeros de los polipéptidos GP1, GP2 y SSP, originados por el clivaje proteolítico del precursor de las glicoproteínas de la envoltura (GPC), (Hallam *et al.,* 2018). Las moléculas

del polipéptido GP1 forman tetrámeros globulares en el exterior del virión y tetrámeros del polipéptido GP2 que atraviesan la bicapa lipídica. El dominio N-terminal de GP2 se encuentra hacia el exterior del virión y la parte C-terminal en su interior. Asimismo, esta proteína tetramérica transmembrana GP2 se conecta por enlaces no covalentes con los tetrámeros globulares GP1 y en el interior con las nucleocápsides virales (Koma *et al*., 2021). De esta manera GP1 y GP2 constituyen las típicas espículas observadas por microscopia electrónica de la cubierta viral.

En el interior del virión se encuentra localizada la nucleoproteína (NP), que está asociada a los RNAs virales y conformando la nucleocápside de simetría helicoidal (Pyle *et al*., 2021). Dentro del virión se encuentran en cantidades minoritarias, la RNA polimerasa dependiente de RNA llamada proteína L y la proteína de matriz Z de 94 aminoácidos, la cual tiene motivos estructurales tipo zinc (Hallam *et al*., 2020). Estas proteínas forman un complejo ribonucleico activo para la replicación y transcripción en el citoplasma celular (Nguyen et al., 2022).

3.2 Genoma viral

A excepción del género *Antennavirus* que tiene un genoma trisegmentado, los arenavirus presentan un genoma compuesto por dos segmentos de RNA de cadena simple. La estructura del genoma es circular debido a la existencia de secuencias complementarias en los extremos 3’ y 5’. Cada segmento tiene dos marcos de lectura abiertos (ORFs) y una estrategia codificante ambisentido. Los genes de cada segmento están orientados de manera opuesta y separados por una región intergénica no codificante. Esta región se pliega en una estructura de tipo horquilla, la cual es correspondiente a la terminación de la transcripción (Buchmeier *et al*., 2007; Iwasaki *et al*., 2015). El extremo 3’ UTR de cada segmento contiene el promotor genómico que dirige la replicación de RNA y la transcripción de los genes.

El segmento pequeño (S) de 3,4 Kb de longitud, codifica para GPC y NP. El segmento grande (L) de 7,2 Kb codifica para la proteína L y Z. En el segmento S la proteína NP es la primera en transcribirse para luego a partir del intermediario de replicación permitir la transcripción del gen de GPC. Asimismo, en el segmento L es la proteína L la primera en transcribirse para luego a partir del intermediario de replicación permitir la transcripción del gen de Z. De esta forma los arenavirus se comportan como virus de polaridad negativa, a pesar de que ambos segmentos genómicos contienen secuencias codificantes (**Figura 4**).

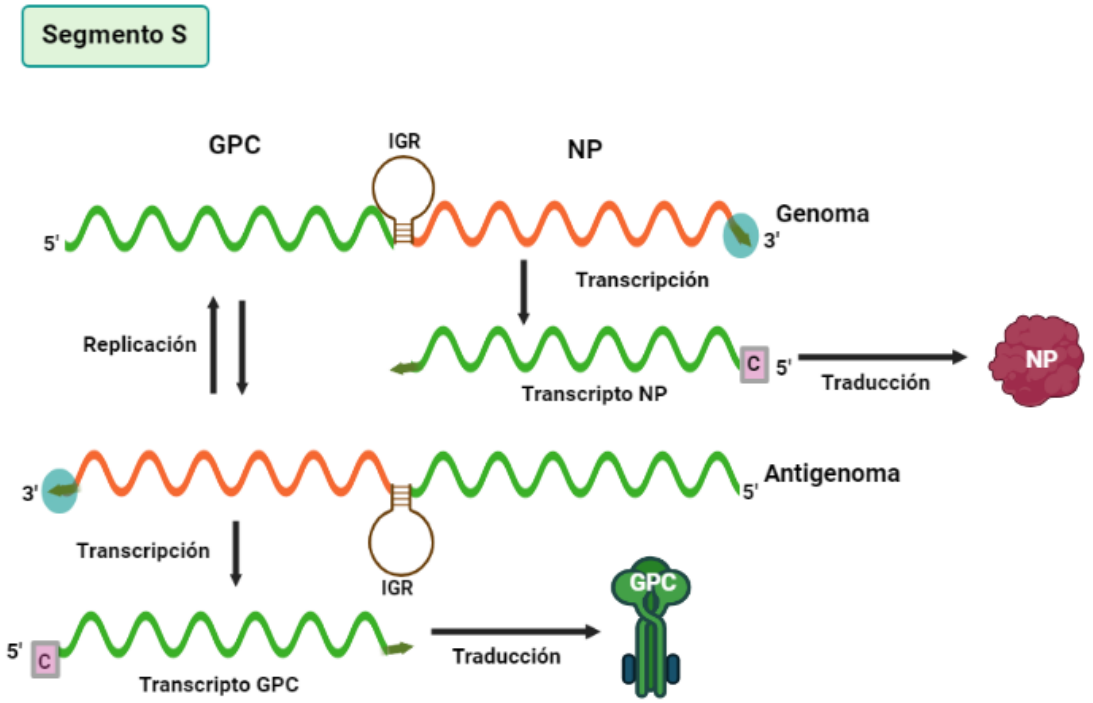


Figura 4. **Genoma viral de los arenavirus.** Los géneros *Mammarenavirus*, *Hartmanivirus* y *Reptarenavirus* presentan genomas virales bisegmentados. Representación del segmento S el cual codifica para GPC y la nucleoproteína NP.

3.3 Proteínas virales

3.3.1 Segmento S: Codifica la información para la nucleoproteína y la glicoproteína.

Nucleoproteína

La NP tiene 60-68 kDa y constituye el polipéptido más abundante de los viriones. Se encuentra asociada al RNA del virión y junto con L forma la nucleocápside o ribonucleoproteína viral (RNP). Entre los arenavirus esta proteína posee un alto grado de conservación tanto de secuencia como de motivos estructurales y su función principal es su asociación al RNA. Esta asociación le confiere protección al genoma y asegura su participación en los procesos de transcripción y replicación (Meyer *et al*., 2002). Mediante análisis bioinformático de las secuencias de aminoácidos de NP de diferentes arenavirus y ensayos de unión a metales, se determinó la presencia de un dominio de unión a zinc. Este motivo del tipo CHCC está ubicado en el extremo carboxi-terminal de NP, el cual estaría involucrado en su unión al RNA viral (Baird *et al*., 2012). Recientemente, Shao *et al.,* (2018), señalaron un nuevo rol de NP de los arenavirus, la cual puede bloquear la vía de producción de IFN-I, a través de la inhibición especifica de proteínas celulares, como RIG-I, que sirven

de sensores en una infección viral. Por otro lado, esta capacidad para bloquear la respuesta de IFN-I se ha propuesto que es mediada por el dominio exonucleasa de NP durante la infección con arenavirus (Nguyen *et al*., 2022).

Glicoproteína

GPC es un polipéptido de 70-80 kDa y es clivado post-traduccionalmente en la célula infectada por la enzima SK1-S1P. El clivaje da origen a tres productos: las glicoproteínas GP1, GP2 y un péptido señal SSP de 58 aminoácidos. Este proceso puede llevarse a cabo ya sea en el retículo endoplásmico (RE) o en el aparato de Golgi. SSP posee dos dominios hidrofóbicos, que atraviesan la membrana dos veces quedando tanto el dominio N-terminal como el dominio C-terminal hacia el citosol. Este producto se obtiene mediante un clivaje inicial mediado por peptidasas celulares **(Figura 5).**

Asimismo, ha sido demostrado que el *loop* no citoplasmático del SSP juega un rol central en la respuesta de GP2 a pH ácido para la fusión de membranas (Pasquato *et al*., 2018; Schlie *et al*., 2010). Después de la traducción, SSP es miristilado, mientras que el complejo GP1/GP2 experimenta una extensa glicosilación en varios sitios en su extremo amino-terminal. Estas modificaciones post-traduccionales son importantes para el correcto clivaje, maduración y transporte del complejo glicoproteíco (York & Nunberg *et al*., 2016; Koma *et al*., 2021).

GP1 de 40-48 kDa se localiza en el extremo de las espículas y es la responsable de interacción del virus con los receptores de las células hospederas (Radoshitzky *et al*., 2007; Helguera *et al*., 2012). Además, GP2 de 35-38 kDa es una proteína transmembrana que interactúa con GP1 a través de su extremo amino-terminal, y es la responsable de la fusión de la envoltura viral con las membranas de la vesícula endosomal, permitiendo el ingreso del genoma viral al citoplasma de la célula hospedera. El péptido señal podría cumplir con diversas funciones más allá de la dirección de los polipéptidos hacia el RE-Golgi. Entre estas funciones se han propuesto roles adicionales en procesos biosintéticos y de tráfico intracelular (York & Nunberg, 2016; Acciani *et al*., 2017; Shao *et al.,* 2018).

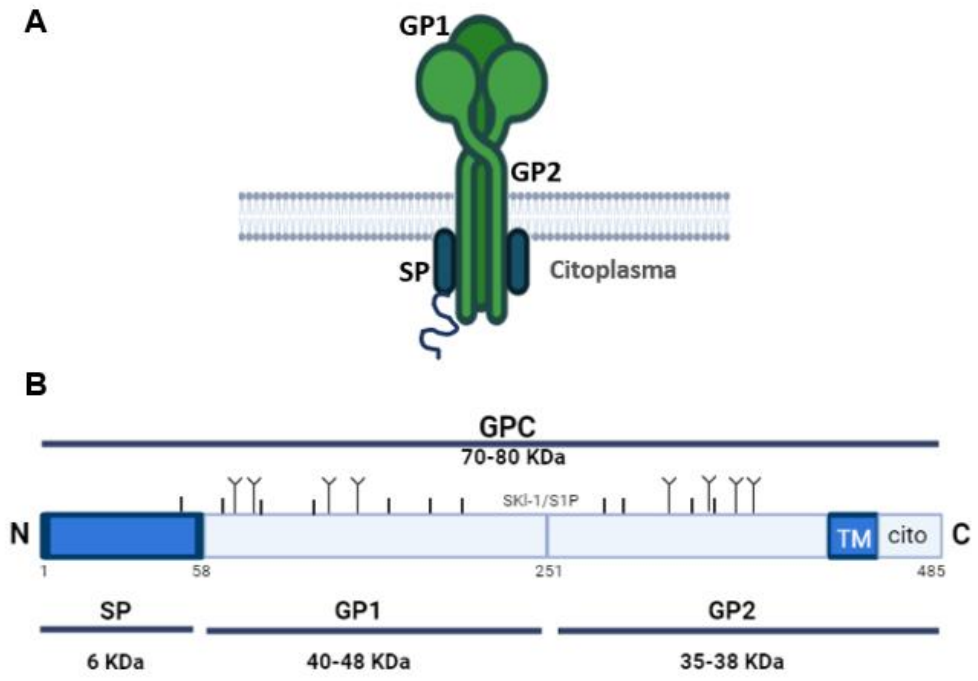


Figura 5: A) Modelo estructural del complejo glicoproteíco viral inserto en la membrana plasmática. B) Diagrama de la organización tripartida propuesta para GPC de JUNV. Los aminoácidos han sido numerados desde la metionina inicial (extremo N-terminal), indicándose los residuos cisteína (I) y los potenciales sitios de glicosilación (Y). Además, se muestran los sitios de clivaje de SP y de corte para SKI-1/S1P, así como las resultantes glicoproteínas GP1, GP1, y el péptido señal SP, con sus respectivos PMs. En la región C-terminal de GP2 se indican los dominios transmembrana (TM) y el citoplasmático (cito). Adaptación de Gómez & col., 2011.

3.3.2 Segmento L: Codifica la información para la proteína de matriz y la proteína RNA polimerasa.

RNA polimerasa

La proteína L es la RNA polimerasa dependiente de RNA y en los arenavirus es un elemento esencial para la replicación y la transcripción. Esta proteína viral de aproximadamente 2200 aminoácidos (aa), es un polipéptido no glicosilado y tiene un peso molecular promedio de 180-250 kDa. Esta proteína se asocia con la NP formando el complejo RNP, y estos dos elementos constituyen los factores mínimos necesarios, en *trans*, para permitir la síntesis de RNA. Además, posee motivos altamente conservados entre los virus con genoma de RNA con polaridad negativa (Vieth *et al*., 2004).

Otros estudios revelaron que los dominios L1 y L3 de la proteína L para virus Tacaribe interactúan con la proteína Z (Wilda *et al*., 2008). Por analogía con el virus influenza y los bunyavirus, la proteína L de los arenavirus puede tener dominios responsables de un

mecanismo denominado "*cap-snatching*", lo cual explicaría la diversidad de las secuencias en los transcriptos de RNA. Estudios de cristalización y caracterización funcional de 196 residuos de la parte N-terminal (NL-1) de la proteína L de LCMV, mostraron que también este dominio exhibe actividad endonucleasa "*cap-snatching*" similar al extremo N-terminal de la proteína PA de los virus influenza. NL-1 es un dominio conservado y tiene actividad cruzada en las familias *Arenaviridae, Bunyaviridae* y *Orthomyxoviridae* (Morin *et al.,* 2010).

Aunque al dominio NL-1 de la proteína L de los arenavirus se le ha atribuido la actividad de endonucleasa, el aislamiento de este dominio por estudios bioquímicos de la proteína L de LASV no reveló esta actividad de clivaje (Reguera *et al*., 2016; Vogel *et al.,* 2019). De esta forma resta identificar en que contexto especifico el mecanismo de "*cap snatching*" tiene lugar en la polimerasa de los arenavirus (Ferron *et al*., 2017).

Proteína Z

La proteína de matriz o Z se encuentra codificada en el extremo 5´ del segmento L de RNA y tiene un peso molecular de 11 kDa. Se compone de tres regiones principales que contienen diferentes dominios: el amino-terminal (dominio de miristilación), el central (dominio RING), y el carboxi-terminal (dominio tardío) (Goñi *et al*., 2010; Fehling *et al*., 2012). El dominio RING característico de Z se une a iones tipo zinc a través de 3 motivos conservados y es el responsable de su función.

Entre las funciones descriptas para esta pequeña proteína se destaca su efecto inhibitorio sobre la replicación del RNA viral y la transcripción a través de su interacción con la proteína L (Wilda *et al*., 2008; Kranzusch & Whelan, 2011), así como su capacidad de interactuar y reclutar la NP viral (Shtanko *et al*., 2010). Otras propiedades interesantes propuestas para Z incluyen interacciones con factores celulares como la proteína de la leucemia promielocítica (PML). Esta interacción con PML es dependiente de la integridad del motivo RING de Z y podría representar una estrategia viral para establecer la infección crónica (Fehling *et al*., 2012). Otro de los factores celulares propuestos que interacciona con Z para inhibir la replicación del RNA viral es el factor de iniciación de la traducción eucariótica eIF4E (Volpon *et al*., 2010). Asimismo, Z también interactúa con el complejo de clasificación endosomal necesario para el transporte (ESCRT), y modula la expresión del factor IRF7 en células dendríticas plasmocitoides infectadas por arenavirus (Colina *et al,* 2008; Fehling *et al*., 2012).

La evidencia actual sugiere que los *Hartmanivirus* carecen de la proteína Z (Hepojoki *et al*., 2015), lo cual indica que los arenavirus pueden tener diversos mecanismos para el ensamble del virión y la salida de la célula. Sin embargo, en el caso de los *Mammarenavirus* y *Reptarenavirus*, la proteína Z direcciona el ensamble y la brotación de las partículas virales (York & Nunberg, 2016). En los pasos finales del ciclo de infección en los que Z es requerida, su función como componente principal para la brotación viral es oligomerizar y formar la matriz de las partículas de la progenie viral (Fehling *et al*., 2012). Esta proteína aporta la fuerza motriz necesaria para brotación de los arenavirus. Esta actividad se lleva a cabo principalmente a través del motivo tardío presente en el extremo carboxi-terminal de Z (PTAP en los arenavirus del NW y PPPY en los arenavirus del OW) (Strecker *et al.,* 2003). Por otro lado, es importante destacar que la NP de los arenavirus parece ser necesaria para la brotación mediada por Z en TCRV (Groseth *et al*., 2010) y PICV (Kumar *et al*., 2012), posiblemente por interacciones específicas de NP y Z (Casabona *et al*., 2009; Capul *et al*., 2011).

La proteína Z realiza muchas otras funciones durante la replicación. Primero interactuando con L para inhibir la función polimerasa (Kranzusch & Whelan, 2011) y después con NP facilitando la translocación del complejo ribonucleoproteico (RNP) a la membrana celular para facilitar el ensamblado viral. Finalmente, la acumulación de Z en la membrana permite la brotación de partículas virales y producción de nuevos viriones infecciosos.

Recientemente se demostró que la proteína Z inhibe la vía de inducción de IFN-I, al unirse directamente al dominio CARD N-terminal de las proteínas intracelulares sensoras de patógenos RIG-I y MDA5. La proteína Z de todos los arenavirus patógenos conocidos (LASV, LUJV, JUNV, MACV, SABV, CHAPV, GTOV), como también de LCMV, es capaz de unirse a RIG-I y MDA5 para suprimir la producción de interferón beta (IFN-β). En contraste, la proteína Z de otros arenavirus no patogénicos no se une a RIG-I o MDA5 para inhibir la vía de IFN (Xing *et al*., 2015; Bell *et al*., 2016; McElroy *et al.,* 2017; Galaka *et al*., 2019).

4. Ciclo de multiplicación

4.1 Entrada

El ciclo de replicación de los arenavirus comienza con la unión del virus a la superficie celular a través de la interacción de GP1 con los diferentes receptores celulares. Los virus del OW tales como LASV y LCMV emplean el receptor α-distroglicano (αDG), una glicoproteína de la matriz extracelular comúnmente encontrada en la membrana basal celular (Spiropoulou *et al*., 2002; Quirin *et al*., 2008). Por otro lado, los virus del NW (JUNV, MACV, GTOV, SABV

y CHAPV) utilizan el receptor de transferrina-1 (TfR1) de su hospedador natural y humano (hTfR1). El TfR1 es un receptor de hierro/transferrina, que es regulado por los niveles citosólicos de hierro. Tras la unión al receptor, el complejo GP1-TfR1 es internalizado a través de la vía endocítica mediada por clatrinas (Martinez *et al*., 2007). Se ha demostrado que JUNV puede utilizar también el receptor tipo lectina *dendritic cell-specific intercelular adhesión molecule -3- grabbing non-integrin* (DC-SIGN y L-SIGN) para la unión y entrada del virus a la célula hospedera (Martinez *et al*., 2013). En otros reportes, las proteínas de la familia TIM también han mostrado que mejoran la infectividad de los arenavirus del NW (Jemielity *et al.,* 2013).

Después de la internalización del virus este viaja por la vía endocítica, específicamente por un endosoma temprano (pH = 6.2-6.5) que luego se fusiona con un endosoma tardío de bajo pH (pH = 5-6). La acidificación de la vesícula endocítica es un evento necesario para la completa internalización del virus. El pH bajo dispara los cambios conformacionales de las glicoproteínas generando la disociación irreversible de GP1 de las subunidades GP2 y SSP en los arenavirus. De esta forma la exposición de GP2 junto con SSP media la fusión entre las membranas del virión y del endosoma tardío; facilitando de esta forma la liberación del genoma viral al citoplasma (Nunberg et al., 2012).

4.2 Replicación

Una vez que el genoma viral fue liberado en el citoplasma de la célula infectada, comienza la biosíntesis de las moléculas virales. En este proceso los arenavirus producen 3 tipos de RNA: RNA genómico (gRNA), RNA antigenomico (agRNA) y RNA mensajero (mRNA) (**Figura 4**). Durante la replicación los gRNA y agRNA son replicados como RNA de longitud completa, los mRNAs se transcriben a partir del promotor y terminan en las regiones intergénicas altamente estructuradas y conservadas. Como la estrategia de codificación es ambisentido, los mRNAs de NP y L, se transcriben directamente del gRNA, pero los mRNAs de GPC y Z, sólo pueden ser transcriptos a partir de agRNAs. Para mediar la transcripción y la replicación del RNA viral se ha demostrado que solo son necesarias y suficientes las proteínas NP y L (López *et al*., 2001; Hass *et al*., 2004).

La replicación ocurre en dos etapas: en la etapa temprana después de la fusión, las RNP son liberadas en el citoplasma y la polimerasa L asociada al RNA comienza la biosíntesis de los mRNA. La transcripción de los mRNAs para NP y L, a partir de los segmentos S y L, ocurre en el citoplasma celular. Estos mRNAs contienen *cap* pero no son poliadenilados (Singh *et al*., 1987, Southern *et al*., 1987). La región intergénica no codificante tiene la capacidad de

formar un plegamiento estable en forma de horquilla debido a la presencia de secuencias complementarias conservadas a través de la evolución de esta familia. Estas secuencias sirven como señal de terminación de la transcripción o en la encapsidación del genoma viral (Tortorici *et al*., 2001; Lopez & Franze, 2007).

En la etapa tardía luego de que se ha producido la síntesis de NP, puede producirse la replicación con la síntesis de cadena completa de agRNA. Este agRNA sirve tanto como intermediario de replicación en la síntesis del genoma RNA completo y, como molde para la transcripción de los mRNAs subgenómicos de S y L, correspondientes a GPC y Z. En el retículo endoplásmico (RE) se traduce GPC y es sometida a glucosilaciones y luego es clivado SSP de GP1/GP2 por SK1/S1P (Eicheler *et al.,* 2003). Aunque los dos fragmentos del genoma contienen secuencias en sentido positivo en sus regiones 5´, no existen evidencias de que pueden ser directamente traducidas a GPC y Z hasta el momento (de la Torre, 2005).

4.3 Ensamble y brotación

Una vez sintetizado el genoma viral, este es encapsidado por múltiples copias de NP formando el complejo RNP viral, que se asocia fuertemente a la proteína L. Este evento es llevado a cabo en el citoplasma. El complejo GPC es transportado a través de la vía secretora RE-Golgi donde se produce su procesamiento y maduración. Una vez glucosilada en el aparato de Golgi, y con ayuda de factores celulares, GPC se localiza en sitios específicos de la membrana celular. Luego la RNP se ensambla con el complejo Z-GPC inserto en la membrana celular, donde ocurre la morfogénesis viral. La adecuada incorporación de GPC y la producción de viriones infectivos dependen del perfil de lípidos de la membrana plasmática. Particularmente del contenido de colesterol en los microdominios o balsas lipídicas (*lipid rafts)*, (Beyer *et al*., 2003; York *et al.,* 2004; Cordo *et al*., 2013; Gaudin & Barteneva, 2015; Gallo *et al*., 2022). Como se mencionó anteriormente la proteína de matriz Z es la principal fuerza impulsora para la brotación y la liberación de las partículas virales. Z en conjunto con varias proteínas celulares facilita la salida viral y la compleción del ciclo de replicación (Strecker *et al.,* 2003; Urata *et al.,* 2006; Capul *et al.,* 2007; Gallo *et al*., 2022).
En ausencia de otras proteínas virales y del RNA genómico, Z ha mostrado que inicia la autobrotación dando como resultado la producción de partículas parecidas a virus (VLPs). Por lo que se considera como el factor mínimo de brotación para el virus (Hoenen *et al.,* 2007; Ziegler *et al*., 2016). Sería entonces la principal responsable del ensamblaje y la brotación de las partículas virales.

5. Epidemiología

JUNV es el agente etiológico de la fiebre hemorrágica Argentina (FHA). La etiología viral de esta enfermedad fue establecida de forma independiente en 1958 por dos grupos de investigación (Parodi *et al*., 1958). El agente etiológico recibió el nombre de la ciudad de Junín (Provincia de Buenos Aires), donde se efectuó el primer aislamiento de un paciente. Al realizar estudios de captura de los roedores en el área endémica de FHA, se encontró que el principal reservorio de JUNV en la naturaleza es *Calomys musculinus.* Este ratón de campo con hábitos rurales pertenece a la familia *Cricétidae*. Asimismo, se halló que JUNV también puede infectar otras especies de cricétidos (Busch *et al*., 2000; Chiappero *et al*., 2018).

La distribución del virus se deduce de la distribución geográfica de casos que se ha ido extendiendo progresivamente, desde el primer reporte en la ciudad de Junín. Actualmente el área endémica es de más de 150.000 Km^2 abarcando parte de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos y La Pampa. Estas regiones corresponden a la zona agrícola-ganadera y la población más vulnerable son los trabajadores rurales (Bonwitt *et al*., 2017).

JUNV genera infecciones persistentes y asintomáticas en su hospedador reservorio. La transmisión horizontal a través de encuentros agresivos entre roedores adultos machos, es el principal mecanismo de persistencia del virus en la naturaleza debido a la alta carga viral en la saliva de los ratones. La transmisión vertical podría contribuir al mantenimiento del virus cuando disminuye el número de individuos en la población de roedores. La prevalencia de la infección con JUNV en roedores es del 10,9% en regiones endémicas y del 0,2% en regiones no endémicas (Radoshitzky *et al*., 2020).

5.1 Fiebre hemorrágica Argentina

El riesgo de contraer FHA depende en gran medida de la densidad poblacional del vector. Esta densidad se encuentra influenciada por factores tanto bióticos (calidad y disponibilidad de hábitat) como abióticos (variables climáticas, condiciones edáficas, etc.). En este sentido y a lo largo de los años se ha demostrado que la FHA es una enfermedad estacional. Con una mayor frecuencia durante la época de cosecha del maíz y de otros cereales (durante los meses de mayo-junio), debido a la disponibilidad de alimento y la explosión de las poblaciones del vector roedor (Piacenza *et al.,* 2018). Esta enfermedad afecta principalmente a las personas que residen, visitan o trabajan en el medio rural o periurbano a través del contacto con la piel lacerada, mucosas y/o inhalación de partículas que portan el virus proveniente de las excretas del ratón.

La prevalencia de la FHA es del 4,7 a 12,3% en las regiones endémicas y del 0,44% en regiones no endémicas. La falta de tratamiento de la enfermedad hace que alcance una tasa de mortalidad del 20 al 30% (Radoshitzky *et al*., 2020).

En el año 2022 se notificaron 212 casos para la FHA con residencia habitual en la provincia de Santa Fe. Del total de los casos notificados y residentes de la Provincia, se confirmaron 21 casos (9,91%), 44 casos (20,75%) se descartaron y 147 casos (69,34%) se definieron como sospechosos no conclusivos. Además, se informaron 5 casos fallecidos con FHA con residencia en los departamentos de Caseros (1 caso) notificado en la semana 14, Constitución (1 caso) notificado en la semana 21 y Rosario (3 casos) notificados en la semana 22, 26 y 31 respectivamente (Boletín Epidemiológico, Ministerio de Salud de la Provincia de Santa Fe, 01/2023).

5.2 Patogénesis

El virus ingresa al organismo y se deposita en el pulmón y es allí donde ocurre la replicación viral inicial. La infección de las células presentadoras de antígenos, células dendríticas y macrófagos facilitan el acceso del virus al sistema linfático y como consecuencia la infección sistemática. El arenavirus JUNV puede replicar en el hígado, riñones, pulmones, glándulas adrenales y corazón (Lan S. *et al.,* 2020).

Debido a la concentración del virus, se ha observado dilatación de los capilares e inflamación de las paredes vasculares; también se ha observado en la médula ósea eritroblastopenia. Esta condición provoca una deficiencia en los eritroblastos que producen hemoglobina (Marta *et al.,* 2000). En la fase aguda de la enfermedad el sistema inmune se ve afectado por la disminución de los linfocitos T y B; en otros casos hay disminución de la respuesta a mitógenos (Schattner *et al.,* 2013).

La FHA presenta un periodo de incubación de 7 a 14 días. En los humanos se desarrolla un cuadro febril mayor a 38°C, cefalea, anorexia, malestar, dolor retro-ocular, dolor muscular, vómito, náuseas, petequias en cara, cuello, tórax y linfoadenopatías (Kerber *et al*., 2015). Durante la primera semana de la enfermedad se presenta una progresiva leucopenia y trombocitopenia (Gómez *et al*., 2011). La mayoría de los pacientes mejora después de la primera o segunda semana, pero cerca del 30% de los casos no tratados se transforman a un estado severo, con una tasa fatal cercana al 10%. En estos pacientes las señales hemorrágicas y neuronales son más probables. Asimismo, por análisis de laboratorio se observan anomalías inespecíficas en electrocardiogramas, mientras que las radiografías de tórax son normales si no existen infecciones secundarias. Los pacientes que se recuperan

durante la segunda semana de FHA muestran la aparición de anticuerpos neutralizantes. La convalecencia perdura varias semanas con poliuria, fatiga, alopecia y mareos (Radoshitzky & de la Torre, 2020).

5.3Vacuna y tratamientos

Desde los inicios de la enfermedad se investigó con el objetivo de desarrollar una vacuna. Un proyecto conjunto que contó con la colaboración de los gobiernos de los Estados Unidos de América (EUA) y Argentina, la Organización Paramericana de la Salud (OPS) y el Programa de Desarrollo de las Naciones Unidas (PNUD). Todo esto permitió aunar recursos humanos y esfuerzos. Finalmente, esto conllevó al desarrollo en el año 1984 de la vacuna a virus Junín vivo atenuado denominada: Candid#1.

La vacuna demostró ser segura y eficaz, además de generar anticuerpos neutralizantes contra JUNV. Su fabricación se realiza en el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. JI Maiztegui", en Pergamino, Argentina (Maiztegui *et al*., 1998; Enria *et al*., 1984; Sánchez *et al*., 1989; Ambrosio *et al*., 2011). A partir del año 2007 Candid#1 fue incorporada al calendario nacional de inmunizaciones y desde entonces está disponible para la población mayor de 15 años en las cuatro provincias del área endémica. Desde su implementación se logró una importante reducción de la incidencia de la enfermedad (Briggiler *et al*., 2015).

Para tratar la FHA, a los infectados se suministra plasma de convalecientes con alto contenido de anticuerpos neutralizantes específicos contra JUNV. Este tratamiento puede reducir la mortalidad del 1 0% al 1% cuando se administra en la primera semana de la enfermedad, aunque presenta riesgos propios de los hemoderivados. Por ejemplo, se ha observado que el 10% de los pacientes tratados puede desarrollar un síndrome neurológico tardío (Moraz & Kunz, 2011; Zeitlin *et al*., 2016).

6. Terapia antiviral dirigida a blancos celulares

El desarrollo de agentes quimioterapéuticos en los últimos años, se ha focalizado en factores celulares que participan en la infección viral como potenciales blancos antivirales. Las ventajas de este tipo de estrategia se basan fundamentalmente en la factibilidad de obtener fármacos de amplio espectro activos contra diferentes virus patógenos. La posibilidad de evitar la resistencia antiviral, que es uno de los inconvenientes al momento del desarrollo de agentes quimioterapéuticos, también es una ventaja de los blancos

celulares antivirales. Sin embargo, la desventaja de esta estrategia antiviral, es la posibilidad de presentar mayor citotoxicidad respecto al uso de blancos específicos virales.

La reutilización de fármacos o drogas ya aprobados para la clínica y con nuevos fines terapéuticos es una estrategia que ha retomado vigencia. La ventaja de trabajar con fármacos con conocido perfil de seguridad, permite reposicionar su uso hacia otros nuevos blancos resulta atractiva y prometedora. Durante los últimos años se han documentado reportes significativos de factores celulares que participan activamente en las diferentes etapas del ciclo de multiplicación de JUNV. En el caso de las proteínas celulares con rol antiviral, los virus desarrollan mecanismos para anteponerse a esa respuesta intrínseca celular. Por lo tanto, estas interacciones entre el virus-célula son relevantes para la infección con JUNV, y este conocimiento contribuye a la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos.

A continuación, se describen los blancos celulares relevantes como posibles alternativas en la terapia antiviral frente a JUNV.

6.1 Factores celulares que modulan la replicación de JUNV

6.1.1 Quinasas ERK1/2

En el contexto de blancos celulares, muchos virus modulan las redes de supervivencia celular como estrategia para evitar la muerte celular y mantener la replicación viral. Particularmente, las quinasas 1 y 2 (ERK1/2) son reguladas por señales extracelulares y, han sido implicadas en la replicación viral y en la regulación de la respuesta inmune innata contra infecciones virales (Pleschka, S. *et al*., 2008; DuShane *et al*., 2019; Bonjardim *et al*., 2017; Hemmat *et al.,* 2021). ERK1/2 pertenece a la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) e integra la cascada Raf/MEK/ERK, la cual está involucrada en la expresión de genes y el metabolismo celular (Yang *et al*., 2013; Plotnikov *et al*., 2011). En reportes iniciales se demostró que la infección con JUNV induce la activación de ERK1/2. Por lo tanto, el tratamiento con el inhibidor selectivo U0126 de MEK provocó la reducción en la expresión de NP y GPC, así como la disminución en la producción de partículas infecciosas de JUNV en cultivo celular. ERK1/2 no solo fue fosforilado en células infectadas con JUNV, sino que también por TCRV y PICV (Rodríguez *et al*., 2014). Posteriormente, el inhibidor U0126 también afectó la actividad funcional del segmento S de TCRV en un sistema de minireplicón, por lo tanto, este resultado respalda que MAPK desempeña un

papel importante en la replicación/transcripción viral de los arenavirus (Brunetti *et al*., 2018).

6.1.2 Inosina monofosfato deshidrogenasa 2 (IMPDH2)

Se identificaron recientemente por proteómica a gran escala una serie de factores celulares asociados a la proteína Z de JUNV, y algunos fueron encontrados en partículas de JUNV. Por ejemplo, la enzima celular inosina monofosfato deshidrogenasa 2 (IMPDH2) cataliza la conversión de inosina monofosfato (IMP) a xantosina monofosfato (XMP). Actuando como precursor en el camino biosintético de nucleótidos de guanosina (Hedstrom *et al*., 2009), esta proteína fue necesaria para la replicación de JUNV, así como para la liberación de VLPs de JUNV. Esto sugiere la participación de IMPDH2 en el ensamblaje viral y/o la brotación (Ziegler *et al*., 2018). Consistente con este resultado Tong *et al*., (2018) utilizó Merimepodib (VX-497) un potente inhibidor de IMPDH, provocando un efecto antiviral frente a JUNV. Este efecto se evidenció en la reducción de la producción viral. En otros experimentos con JUNV, utilizando un sistema minireplicón se mostró que un inhibidor no competitivo de IMPDH redujo la síntesis de RNA viral. Por otro lado, el silenciamiento de IMPDH2 humana con siRNAs afectó la producción de VLPs que contienen minigenomas. Por lo tanto, se propuso que la actividad de IMPDH2 tiene un papel clave en la síntesis de RNA viral (Dunham *et al*., 2018).

6.2 Maduración y ensamble de proteínas de JUNV en componentes de transporte celular

Otros posibles blancos de inhibición son los eventos de maduración postraduccional de proteínas virales llevado a cabo por los componentes celulares en la vía secretora del RE-Golgi. Considerados como blancos antivirales, entre estos, se destacan los estudios sobre potenciales inhibidores del clivaje proteolítico del precursor de GPC efectuado por la proteasa celular SK1/S1P. A través de modelos animales y en ensayos sobre cultivos celulares se logró inhibir la actividad especifica de SK1/S1P con el compuesto PF-429242. El perfil de citotoxicidad y las propiedades farmacocinéticas lo definieron como un candidato promisorio frente a los arenavirus del OW como LCMV y LASV (Hawkins *et al*., 2008; Urata *et al*., 2011). El inhibidor PF-429242 también fue evaluado frente arenavirus del NW. Como modelo viral se utilizó la cepa JUNV de la vacuna Candid#1, presentando este inhibidor una potente actividad antiviral. Se evitó la propagación del virus de célula a célula y, de igual manera, se afectó la producción de partículas virales infecciosas (Pasquato *et al*., 2012).

6.3 Alteraciones en lípidos de membrana celular

La composición lipídica de las membranas celulares es determinante para la fluidez y la permeabilidad de las mismas, por lo tanto, es otro factor celular que influye en la infección viral. Como se mencionó anteriormente la adecuada incorporación del complejo GPC a los viriones parece depender del perfil de lípidos en la membrana plasmática. En estudios previos de nuestro laboratorio se demostró que el complejo GPC de JUNV migra a la superficie y se asocia principalmente con microdominios de membrana enriquecidos en colesterol, también conocidos como balsas lipídicas o *lipid rafts.* Se determinó que, al provocar la reducción del colesterol de membrana, se reduce la asociación de glicoproteínas virales con la membrana celular, alterando de esta manera la brotación de partículas de JUNV a partir de estos microdominios y provocando inhibición en la infectividad del virus (Cordo *et al*., 2013). Otros estudios han confirmado estos hallazgos mediante el análisis especifico de las partículas virales de JUNV, las cuales mostraron contener proteínas celulares marcadoras de estos microdominios (Gaudin & Barteneva, 2015). Entre los agentes que han sido abordados para causar alteraciones de los lípidos de la membrana celular, podemos mencionar los ácidos grasos. Cadenas carbonadas de variada longitud (C10-C18), fueron los inhibidores más activos contra la replicación de JUNV (Bartolotta *et al*., 2001). También el anticuerpo monoclonal quimérico bavituximab reactivo con fosfolípidos aniónicos expuestos en la membrana, fue efectivo en células infectadas y viriones (Soares *et al*., 2008). Otro estudio demostró que un derivado de rodamina denominado LJ001 que se inserta en la membrana lipídica viral, impide la entrada y propagación de una amplia variedad de virus con envoltura, incluyendo a JUNV (Wolf *et al*., 2010). Existe una gran variedad de compuestos que pueden ser empleados para provocar una disminución en el colesterol, y que tienen como blanco las principales enzimas de biosíntesis de isoprenoides. Por ejemplo, la familia de las estatinas afecta la función celular de la enzima hidroximetil glutaril-CoA reductasa (HMGCR) y, los bisfosfonatos inhiben la función de la enzima farnesil pirofosfato sintetasa (FPPS).

7. Farnesil pirofosfato sintetasa (FPPS)

La **FPPS** es una enzima que tiene una estructura homodimérica dependiente de $Mg2^{+}$ y un peso molecular de 41 KDa. Esta enzima pertenece a la familia de las transferasas y evolutivamente está conservada en bacterias, arqueas y eucariotas. Asimismo, participa en la producción de una amplia gama de metabolitos biosintéticos y en varios estudios han

localizado la FPPS en cloroplastos, mitocondrias y citosol (Gupta *et al*., 1999; Martín *et al*., 2007; Manoj *et al*., 2013). Esta enzima posee un rol regulador que es clave en la vía del mevalonato (MVA) y para la biosíntesis de isoprenoides y terpenoides. La MVA es llevada a cabo en el citosol y está presente en la mayoría de organismos. Esta ruta biosintética origina todos los isoprenoides, un grupo grande y diverso de moléculas orgánicas que contienen motivos de isopreno. Muchos metabolitos esenciales pertenecen a este grupo como, por ejemplo, los ácidos biliares, la vitamina D, hormonas esteroideas, grupo hemo A, dolicol, isopentenil adenina (2iP) y ubiquinonas (Goldstein *et al*., 1990; Simons *et al*., 2002; Park *et al*., 2017). Estos metabolitos isoprenoides juegan un rol fundamental en varios procesos celulares, tales como la formación de las membranas celulares (requerimiento de colesterol), también en la producción de hormonas sexuales, transporte de electrones (por el grupo hemo A y las ubiquinonas), biosíntesis de glicoproteínas (dolicol hace parte del RE), modificación de tRNAs (isopentenil adenina) y vías de señalización celular (pequeñas GTPasas que son requeridas para la prenilación de proteínas de membrana). Por lo tanto, la función que ejerce la FPPS es un prerrequisito crucial para el propio funcionamiento de estos procesos (Park *et al.,* 2021).

Por consiguiente, esta enzima al ser responsable de la biosíntesis de metabolitos tan importantes para el funcionamiento de varios procesos celulares, ha provocado gran interés farmacológico. Así, se ha logrado establecer muy bien el mecanismo de inhibición de la enzima FPPS por un grupo de fármacos nitrogenados llamados bisfosfonatos (N-BPs) (**Figura 8**). Estas moléculas han sido utilizadas como tratamiento frente a enfermedades relacionadas con la resorción ósea por los osteoclastos (por ejemplo, osteoporosis). Más recientemente, el interés se ha direccionado hacia los efectos de inhibición de la FPPS frente al cáncer y desordenes neurodegenerativos (Park *et al*., 2014; Waller *et al*., 2019). La enzima FPPS también es de gran importancia para la biosíntesis de isoprenoides en organismos patogénicos como *Toxoplasma gondii* y *Tripanosoma cruzi*. Por lo tanto, se ha propuesto como blanco de nuevos bisfosfonatos la FPPS de este grupo de parásitos (Misini *et al*., 2014; Szajnman *et al*., 2008; Galaka *et al*., 2019).

7.1 Función la enzima FPPS humana (hFPPS) en la MVA

La biosíntesis de todos los isoprenoides inicia con la entrada de la enzima HMGCR a la MVA (**Figura 6 A**). Esta enzima es el blanco molecular de fármacos comunes como las estatinas, utilizados para bajar los niveles de colesterol y tratar enfermedades cardiovasculares

(Weber *et al*., 2004; Endo *et al*., 2010). Después de varios pasos en la MVA, se obtiene la molécula isopentil pirofosfato (IPP), y ésta se transforma por acción de la enzima isopentil pirofosfato isomerasa (IPP-isomerasa) en dimetilalilo pirofosfato (DMAPP). Estas dos últimas moléculas son los "ladrillos de construcción" de los isoprenoides. Luego la enzima FPPS cataliza una condensación secuencial de DMAPP con IPP y este es el primer punto de ramificación en la MVA donde la FPPS ejerce su acción**.** Como producto de esta reacción se obtiene la molécula geranil pirofosfato (GPP), nuevamente la FPPS cataliza otro paso en la reacción con un IPP, y eventualmente se produce el isoprenoide farnesil pirofosfato (FPP) de 15-carbonos (**Figura 6 B**).

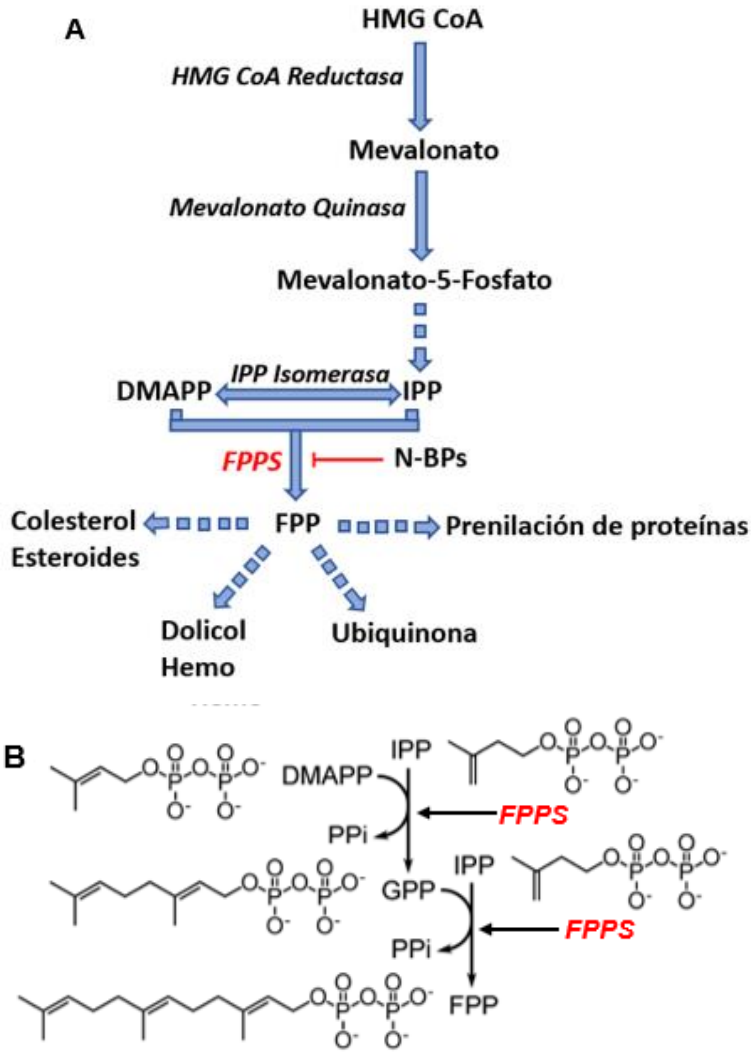


Figura 6. Representación gráfica de la ruta del mevalonato y los metabolitos generados. A) Vista general de la ruta MVA mevalonato y los metabolitos sintetizados, las flechas punteadas representan múltiples pasos enzimáticos. Sitio de inhibición de la enzima FPPS por los N-BPs (indicado en color rojo). B) Pasos catalíticos de la enzima FPPS humana.

Esta última molécula sirve como un precursor rio abajo para empezar un número de procesos biosintéticos que dan origen a los metabolitos anteriormente mencionados. Con la acción de la enzima escualeno sintetasa (SS), el FPP se convierte en escualeno, y luego de dos pasos de ciclación del escualeno se obtiene el lanosterol. Finalmente, este último es convertido después de 19 reacciones adicionales en colesterol (Park *et al*., 2017). Alternativamente, se puede producir otra reacción de condensación catalizada por la enzima geranilgeranil pirofosfato sintetasa (GGPPS) para producir geranilgeranil pirofosfato (GGPP). FPP y GGPP funcionan como donores de lípidos a las proteínas que son preniladas. Esta modificación postraduccional es esencial para la correcta unión y localización de ciertas proteínas en la membrana celular, donde desempeñan un papel fundamental en la actividad funcional y de supervivencia para muchos tipos de células. También están involucradas en el tráfico de vesículas o la organización del citoesqueleto celular; por otro lado, la acumulación de GTPasas favorece el fenómeno de apoptosis (Olmos *et al*., 2007).

Las proteínas preniladas constituyen hasta el 2 % del proteoma de los mamíferos y el grupo que mejor las representa son las pequeñas proteínas de señalización GTPasas (McTaggart *et al*., 2006). La prenilación promueve la unión de estas proteínas a membranas internas celulares por medio del anclaje a lípidos. La modificación postraduccional y la activación de proteínas de unión a GTPasas, como Ras, Rho, Rac, Rab y Rap, juegan un papel importante en muchas cascadas de señalización dentro de la célula (Bonetti *et al*., 2003). Por todo lo mencionado anteriormente, esta vía metabólica es crucial para una plétora de procesos biológicos incluidos aquellos que mantienen la integridad de las membranas celulares.

7.2 La FPPS como blanco terapéutico

La muerte celular de los osteoclastos por la inhibición de la función de la hFPPS, así como la prenilación de las pequeñas GTPasas ha sido un mecanismo de acción bien establecido para la potente actividad antirresortiva de los bisfosfonatos que contienen nitrógeno (N-BPs). Las pequeñas GTPasas, miembros de la familia de proto-oncogenes Ras están implicadas en una gran cantidad de cánceres. Su actividad transformadora requiere de la prenilación, por lo tanto, se piensa que, inhibir este proceso es una estrategia terapéutica prometedora (Berndt *et al*., 2011). Se han realizado una gran cantidad de estudios preclínicos y la evidencia indica que los N-BPs tienen propiedades anticancerígenas debido a la inhibición de la proliferación, motilidad y viabilidad de las células tumorales; así como también actúan en sinergia con otros agentes antineoplásicos (Koul *et al*., 2012).

Como se mencionó en la sección anterior, esta enzima también ha sido reportada como un excelente blanco drogable contra tripanosomátidos (Buckner *et al*., 2012; Lepesheva *et al*., 2012). Independientemente de las diferencias en la estructura y diversidad funcional, todos los isoprenoides tienen un precursor común (IPP y DMAPP). En los parásitos *T. cruzi* opera la MVA, pero requiere colesterol del mamífero hospedador para la biosíntesis de *novo* de los esteroles requeridos en todos los estados de su ciclo de vida. Además, es muy susceptible a los inhibidores de la biosíntesis de esteroles (Galaka *et al*., 2019). *T. gondii* carece de MVA, pero emplea una biosíntesis tipo procariota. Asimismo, esta vía no sintetiza colesterol por lo tanto debe ser tomado del hospedador. Por lo tanto, estos parásitos son muy susceptibles a inhibidores de la FPPS, ya sea directamente sobre la enzima del hospedador o de las enzimas homologas de la MVA (Nair *et al*., 2012; Moreno *at al*., 2008).

En estudios relacionados con la acción antiviral del factor celular viperina (VIP), en el modelo de virus influenza determinaron que la sobreexpresión de esta proteína celular altera la fluidez de la membrana plasmática. Este efecto se logra ya que VIP inhibe a FPPS, quien cataliza la formación del isoprenoide FPP (Dhar *et al*., 2013). En consecuencia, la inhibición de la FPPS afecta el ensamble de los microdominios de membrana necesarios para completar exitosamente el ciclo de replicación de varios virus envueltos (Wang *et al*., 2007; Nayak *et al*., 2009). Además de los virus envueltos (virus influenza, HIV, VSV, virus de la rabia), algunos virus no envueltos (adenovirus, parvovirus) utilizan estos microdominios de membrana (*lipid rafts)* para la entrada, el ensamble y brotación (Nayak *et al*., 2009; Ono & Freed, 2005). Por ejemplo, Tan *et al*., (2014), investigaron la eficacia del pamidronato para inhibir la enzima FPPS contra la infección con virus influenza *in vitro* e *in vivo*.

8. Inhibidores de la enzima FPPS: Bisfosfonatos

Los bisfosfonatos (BPs) son moléculas químicamente estables y análogos estructurales del pirofosfato inorgánico (PPi). Los PPi en los que el oxígeno central (P-O-P) se ha sustituido por un átomo de carbono (P-C-P) son encontrados ampliamente en la naturaleza (**Figura 7**). La estabilidad y la resistencia a la acción enzimática de las fosfatasas y la hidrólisis ácida la confiere el átomo de carbono, que evita la degradación biológica de la sustancia (Russell, 2007).

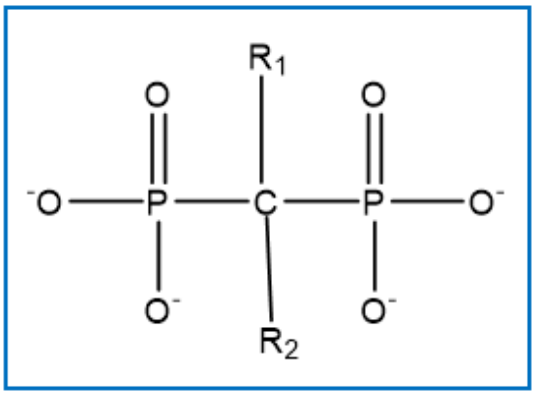


Figura 7: Estructura química general de los bisfosfonatos.

En la práctica clínica no fue posible aplicar los BPs debido a que eran rápidamente hidrolizados en el intestino, cuando se administraban por vía oral o se inactivaban. Por ello, se iniciaron estudios con análogos del PPi que fueran resistentes a la hidrólisis, lo que llevó finalmente a la utilización de los BPs modificados. De la misma manera que los PPi, los BPs presentan una alta afinidad por el mineral óseo, y son capaces de inhibir la formación de cristales de hidroxiapatita, permitiendo prevenir la aparición de calcificaciones patológicas (Fleisch, 2000; Russell, 2007).

8.1 Bisfosfonatos que contienen nitrógeno (N-BPs)

Desde el punto de vista estructural, los BPs se dividen en dos grandes grupos: los BPs simples y los nitrogenados. Los BPs simples como el etidronato y clodronato poseen un grupo metilo o un átomo de cloro, respectivamente en la cadena R2. Los N-BPs, poseen átomos de nitrógeno en esa cadena (R2) (pamidronato, alendronato, ibandronato, risedronato y zoledronato), (Russell *et al*., 2008).

En algunos de ellos, el átomo de nitrógeno se encuentra en la cadena hidrocarbonada (N-BPs alquílicos, como el alendronato, el pamidronato y el ibandronato), en los otros, se encuentran anillos heterocíclicos (risedronato, zoledronato), confiriéndole mayor estabilidad a la molécula (**Figura 8**).

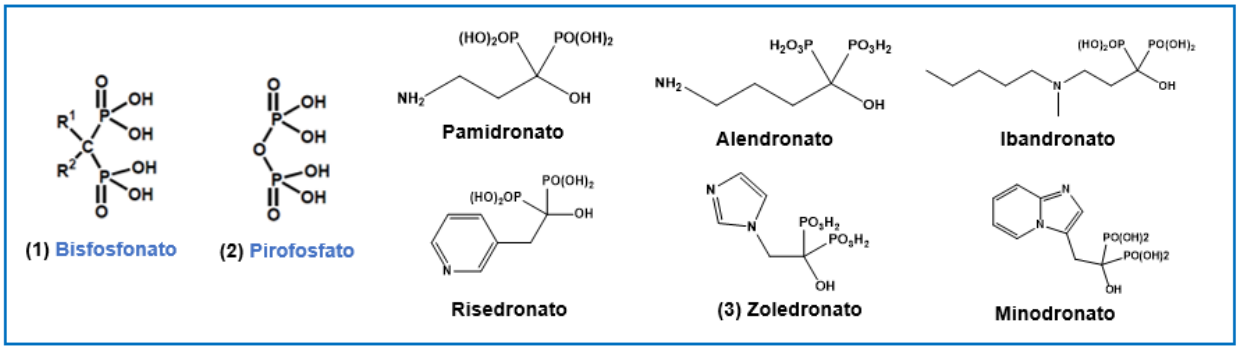


Figura 8: Estructura química de los bisfosfonatos inhibidores de la hFPPS. Usados en la clínica y aprobados por la FDA (Food and Drugs Administration, de los E.E.U.U.) para tratar enfermedades relacionadas con la absorción del calcio en el hueso y otros trastornos óseos.

9. Mecanismo de inhibición de los bisfosfonatos frente a la función de hFPPS

La capacidad de los N-BPs para inhibir la FPPS está determinada por su grupo R2. En estudios cristalográficos se ha señalado que la FPPS presenta una especie de «bolsillo» en el que debe introducirse el BP para poder ejercer su acción (Kavanagh *et al.,* 2006). El acoplamiento del BP en este bolsillo debe tener lugar en forma muy específica, para que la inhibición de la enzima sea adecuada. El grupo P-C-P, común en todos los BPs, es el encargado de la unión de estos compuestos a una región de la enzima rica en aspartato y a través de iones Mg^{2+}.

Por otro lado, el enlace de hidrógeno que se establece entre el átomo de nitrógeno del grupo R2 y los grupos hidroxilo de la treonina (T201) y carboxilo de la lisina (K200) (enlace N-H-O) determina el anclaje y la estabilidad del BP en el «bolsillo» de la enzima. Para que la unión sea óptima, es preciso que la distancia entre el nitrógeno de los BPs y los átomos de oxígeno de la enzima sea de alrededor de 3 A° (Mao *et al*., 2006; Dunford *et al.,* 2008).

Los BPs además de presentar diferencias estructurales, también actúan por vías diferentes. Los N-BPs lo hacen a través de la MVA, que conduce a la síntesis de colesterol (**Figura 6**), inhibiendo así a la actividad de la enzima FPPS, necesaria para la síntesis de FPP y de su derivado el GGPP (Dunford *et al*., 2006; Coxon *et al*., 2006). Ambos metabolitos isoprenoides se transfieren al extremo carboxilo de las «pequeñas proteínas» que se unen a GTPasas y que pertenecen a la superfamilia Ras (Rho, Rac, Rab), (Dunford *et al*., 2006).

Los efectos de los N-BP en el mecanismo de acción de la FPPS se confirman cuando se adicionan los metabolitos (Reszka A., 2004). Asimismo, otros productos que alteran esta misma vía pueden tener efectos similares a los N-BPs. Este es el caso de las estatinas las

cuales inhiben la enzima HMGCR, y cuya acción también se revierte cuando se normalizan los valores de GGPP (Russell *et al*., 2008).

En otros estudios donde evaluaron el efecto de diferentes inhibidores de la FPPS sobre líneas de células cancerosas, determinaron de manera indirecta el efecto sobre la FPPS por medio de la detección de la expresión de proteínas GTPasas como la Ras, a menudo este tipo de ensayos es usado para evaluar la inhibición de FPPS. Además, para revertir la inhibición de la enzima adicionaron análogos de la MVA para FPP y GPP como farnesol (FOH) y gernilgeraniol (GGOH) restableciendo de forma rápida la prenilación de proteínas (Qingzhu *et al*., 2019).

10. Bisfosfonatos y uso clínico

El etidronato fue el primer BPs que se utilizó en la práctica clínica, empleado como agente inhibidor de la calcificación en el tratamiento de trastornos de calcificación, y también en la enfermedad de Paget. Durante la década de los años 1980, los BPs comenzaron a utilizarse como agentes terapéuticos en oncología, fundamentalmente para tratar la hipercalcemia tumoral. Actualmente se utilizan en personas que padecen mielomas, cáncer de mama, cáncer de próstata y osteoporosis (Gordon, 2005; Olmos & Gonzales, 2007; Owens *et al*., 2007).

Al inhibir la enzima FPPS y la consecuente prenilación de proteínas, conlleva a que las pequeñas GTPasas oncogénicas sean incapaces de cumplir su función, perdiendo su capacidad transformadora (Berndt *et al*., 2011). Además, la inhibición de FPPS induce la acumulación de IPP, provocando indirectamente la muerte de células tumorales por la activación de células T gamma delta (γδ) (Rogers *et al*., 2011).

En suma, la información actual sobre la función de FPPS en distintos sistemas celulares y la disponibilidad de inhibidores efectivos de su actividad lo hacen un blanco interesante de abordar. En los que respecta a este trabajo los BPs podrían ser empleados como una herramienta para intervenir la MVA y provocar la disminución en el colesterol, esencial para la formación de microdominios de membrana. En células infectadas con JUNV esto podría afectar la maduración, el ensamble, la brotación y liberación de partículas virales.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar vías metabólicas celulares relacionadas al metabolismo lipídico y utilizarlas como un posible blanco antiviral para la intervención del ciclo de replicación de JUNV; en la búsqueda de un agente quimioterapéutico específico.

Hipótesis

La actividad de la enzima celular farnesil pirofosfato sintetasa (FPPS) es necesaria durante la multiplicación viral, al inhibirla disminuyen la liberación de viriones infectivos de células infectadas con JUNV.

¿Tienen algún efecto los bisfosfonatos sobre la replicación del virus Junín?

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de distintos compuestos inhibidores de la FPPS sobre el ciclo de multiplicación de JUNV.
2. Estudiar la etapa del ciclo de multiplicación afectada por la acción de los compuestos que muestren relevante actividad antiviral.
3. Incorporar al estudio otros virus con genoma de RNA y establecer si el blanco de acción estudiado se amplía a otros virus de importancia sanitaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

Para producción de stock viral:

Línea celular C6/C36 HT (Cat.# CRL-1660, ATCC)

Proveniente de larvas de mosquito ***Aedes albopictus***, adaptada a crecer a 33°C y sin CO_2. Los cultivos se crecieron en medio L-15 (Leibovitz, GIBCO) suplementado con 0,3% de caldo triptosa fosfato; 0,02% de glutamina; 1% de solución de aminoácidos no esenciales en medio esencial de mantenimiento (MEM, GIBCO); 5% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO) inactivado y, 50 µg/ml de gentamicina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente luego de alcanzar la confluencia del 90%.

Línea celular BHK-21 (Cat.# CCL-10, ATCC)

Provenientes de riñón de hámster bebé fueron crecidas en MEM suplementado con L-glutamina 2 mM (GIBCO); 10% de SFB (GIBCO) inactivado y, 50µg/ml de gentamicina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente luego de alcanzar la confluencia. Los cultivos se mantuvieron en estufa con 4% de CO2.

Para realización de ensayos antivirales:

Línea celular Vero (Cat.# CCL-81, ATCC)

Esta línea celular es proveniente de riñón de mono verde africano (***Cercopithecus aethiops***). Para el mantenimiento, los cultivos se crecieron con MEM (GIBCO) suplementado con 5% de suero de ternera (ST, GIBCO) inactivado y, 50µg/ml de gentamicina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente y luego de alcanzar la confluencia deseada (aproximada del 90%) se mantuvieron con MEM suplementado con 1,5% de ST.

Línea celular A549 (Cat.# CCL-185, ATCC)

Proveniente de carcinoma de pulmón humano (***Homo sapiens***). Los cultivos fueron crecidos en MEM suplementado con 10% de SFB (GIBCO) inactivado y, 50 µg/ml de gentamicina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente y después de alcanzar la confluencia deseada se mantuvieron en MEM con 1,5% de SFB, los cultivos se incubaron en estufa con 4% de CO_2.

Línea celular Huh-7 (Cat.# JCRB0403)

Provenientes de carcinoma hepático humano (***Homo sapiens***). Los cultivos se crecieron en DMEM suplementado con 10 % de SFB inactivado, glutamina y 50µg/ml de gentamicina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente luego de alcanzar la confluencia. Los cultivos se mantuvieron en estufa con 4% de CO_2.

Línea celular CRFK (CCL-94, ATCC)

Provenientes de riñón de gato, para el mantenimiento, los cultivos se crecieron en DMEM suplementado al 10 % de SFB (Sigma-Aldrich) inactivado, 50µg/ml de gentamicina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente luego de alcanzar la confluencia. Los cultivos se mantuvieron en estufa con 4% de CO_2.

1. **Virus**

Virus Junín (JUNV)

Se utilizó la cepa atenuada IV4454 de JUNV aislada a partir de un caso leve de fiebre hemorrágica argentina (Contigiani & Sabatini, 1977). La semilla se amplificó en células BHK-21, infectadas con una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,1 unidades formadoras de placa (UFP)/célula. Después de 1 hora (h) de absorción en la estufa a 37°C, se incubó con MEM 1X suplementado con 1,5% de suero de ternera (ST) inactivado. Se cosecharon los sobrenadantes a partir del tercer día post infección (p.i.). Los stocks fueron titulados por el método de UFP en células Vero y posteriormente se almacenaron en alícuotas de 0,5 ml a -80°C.

Virus dengue (DENV)

Se utilizaron las siguientes cepas transferidas por el INEVH (Pergamino, Argentina): DENV-2 cepa NGC (New Guinea C) y DENV-2 cepa 16681.

Virus Zika (ZIKV)

Se utilizó un aislamiento de Argentina, cepa INEVH116141 (ZIKV-Ar) transferido por INEVH, Pergamino, Argentina.

Todas las semillas de las diferentes cepas de DENV y ZIKV se amplificaron en células C6/36. Para ello, se infectaron monocapas de células a una m.i. de 0,5 UFP/célula y el inoculo se dejó por 1 h a 33°C. Luego del tiempo de infección, se reemplazó el inóculo por medio L-15

suplementado con 2% de SFB. Los sobrenadantes se cosecharon y se alicuotaron a partir del segundo día para ZIKV y para las cepas de DENV al tercer día. Los sobrenadantes se titularon por el método de UFP y se almacenaron a -80°C hasta posterior uso.

Coronavirus canino (CCoV)

Se utilizó el coronavirus canino CCoV. Para amplificarlo en células CRFK, se infectaron monocapas de células a una m.i. de 0,1 UFP/célula, el inoculo se dejó durante 1 h a 37°. Después de la absorción, se incubó con MEM 1X suplementado con 1,5% de SFB inactivado. Los sobrenadantes se cosecharon y se titularon por el método de UFP y se almacenaron a -80°C.

Los ensayos experimentales de este trabajo se realizaron en laboratorios de nivel de bioseguridad tipo 2. El trabajo con agentes infecciosos cumple con la aprobación y regulación del servicio de Higiene y Seguridad de la Institución.

Los ensayos que involucraron el **virus Chikungunya** (CHIKV-11484) fueron llevados a cabo en el laboratorio con nivel de bioseguridad tipo 2 presente en el Laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque, Bogotá-Colombia en colaboración con la Dra. Eliana Calvo.

2. Titulación de la infectividad viral por el método de UFP

La cuantificación de la infectividad viral se realizó por el método de UFP. Las monocapas de células Vero fueron crecidas en microplacas de 24 pozos, se infectaron con un inóculo de 0,1 ml de diferentes diluciones seriadas al décimo de las suspensiones virales en MEM de la muestra a titular (cada dilución se tituló por duplicado). Luego de 1 h de incubación, se retiró el inóculo y las monocapas celulares se cubrieron con 1 ml de medio de plaqueo. El medio de plaqueo consistió en MEM doblemente concentrado, suplementado con 4% de SFB (Natocor) inactivado y 100 µg/mL de gentamicina, mezclado con igual volumen de metilcelulosa 2% (Sigma-Aldrich). Las microplacas se incubaron diferentes tiempos dependiendo del virus (3 días para CHIKV; 4 días para ZIKV y CCoV; 6 días para DENV-2; 7 días para JUNV). Posteriormente las placas formadas se revelaron fijando las células con formol al 10% durante 20 minutos. Luego de tres lavados con agua las células se colorearon con una solución de cristal violeta al 1% en etanol:agua durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después del tiempo de tinción las monocapas se lavaron con agua corriente retirando el exceso de colorante, se dejaron secar y se realizó el conteo de las placas en

aquellas diluciones que contenían entre 20 y 100 placas. Se determinó el título viral expresado en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml) de la siguiente forma:

$$Titulo\ viral\ \left(\frac{UFP}{ml}\right) = \frac{\Sigma\ de\ N^{\circ}\ de\ placas}{Volumen\ del\ inóculo\ (ml) * Factor\ de\ dilución} * 100$$

3. Determinación de la citotoxicidad

Ensayo por MTT

Para cuantificar el efecto citotóxico de los compuestos a ensayar, la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico de MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil bromuro de tetrazolio, Sigma-Aldrich). Este compuesto es procesado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa formando cristales de formazán (producto coloreado violeta), en cantidad proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Para estudiar el efecto de los compuestos sobre las células confluentes, las monocapas de células crecidas en microplacas de 96 cavidades (80% - 90% de confluencia), fueron tratadas con diluciones seriadas al medio de los compuestos y por sextuplicado durante 48 h a 37°C. Después de transcurrido este tiempo, se adicionó 5 µl de solución MTT (concentración final: 0,2mg/ml) en cada cavidad y se incubó a 37°C durante 2 h. Posteriormente, se descartaron los sobrenadantes y los cristales de formazán fueron disueltos con 200 µl de etanol al 96°. Se determinó la densidad óptica, utilizando un lector de microplacas a una longitud de onda de prueba de 570 nm y una longitud de referencia de 690 nm (lector multimodal de placa, modelo POLARstar OMEGA de BMGLABTECH). Se estableció el porcentaje de viabilidad celular relativizando los valores de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones respecto de los valores de las células no tratadas:

$$\%\ de\ Viabilidad\ celular = \frac{Absorbancia\ de\ células\ tratadas}{Absorbancia\ \Sigma\ de\ células\ no\ tratadas} * 100$$

Ensayo por resazurina

Alternativamente se utilizó el ensayo fluorométrico de resazurina, un indicador redox que permite detectar la viabilidad celular. El crecimiento celular crea un ambiente reducido

mientras que la inhibición del crecimiento mantiene un entorno oxidado. La reducción relacionada con el crecimiento causa que el indicador redox cambie de oxidado (no fluorescente, azul) a su forma reducida (fluorescente, roja). La fluorescencia generada del ensayo es proporcional al número de células vivas en la muestra. Después de 48 h del tratamiento sobre las células, se extrajo el medio de cultivo con tratamiento y se lavaron los pozos con PBS 1X. Posteriormente se adicionó 100 µl por pozo de medio DMEM sin suplementar y con resazurina al 10% v/v. Se incubó durante 2 h a 37ºC en estufa de CO_2 protegida de la luz. Cumplido el tiempo de incubación las placas fueron leídas a una longitud de onda de excitación 535nm y 595 nm de emisión en un lector TECAN. Cada tratamiento se realizó por sextuplicado para las concentraciones evaluadas, y tres réplicas para cada compuesto. De igual modo, se determinó el porcentaje de viabilidad celular relativizando los valores de fluorescencia obtenidos para las diferentes concentraciones respecto de los valores de las células no tratadas:

$$\%\ de\ Viabilidad\ celular = \frac{Fluorescencia\ de\ cada\ tratamiento}{Fluorescencia\ \Sigma\ de\ células\ no\ tratadas} * 100$$

Antes de las mediciones de viabilidad celular, se observó al microscopio la integridad de las monocapas celulares para cada tratamiento, constatando así la relación entre las concentraciones evaluadas y la integridad celular. Con los datos obtenidos ya sea por la absorbancia o la fluorescencia dependiendo en cada caso, los datos se procesaron y se obtuvo los porcentajes de viabilidad celular.

4. Ensayo de inhibición del rendimiento viral

Las células Vero y A549 crecidas en monocapa en microplacas de 24 pozos, se infectaron con 0,1mL/pozo de la dilución del stock de virus tal que la m.i. fuera 0,1 UFP/célula. Luego de 1h de incubación a 37°C en 4% de CO_2 se descartó el inóculo y los cultivos celulares se trataron con 500 µL de las distintas concentraciones de los compuestos diluido en MM. En el caso de las células Huh-7 se infectaron con una m.i. de 1 UFP/célula en un volumen de

0,2 ml en medio DMEM sin suero, se repitió el procedimiento anterior adicionando los compuestos en diluciones seriadas en DMEM suplementado al 1,5%.

Las células se incubaron por 24 y/o 48 h a 37°C en 4% de CO_2, momento en el cual se cosecharon los sobrenadantes y se cuantificó la infectividad viral (título de virus extracelular) por el método de UFP. Cada dilución corresponde a un tratamiento, y se realizó por duplicado. Se cuantifico el número de placas por pozo y se calculó el título viral. El porcentaje de inhibición se calculó con respecto a los controles infectados y sin tratar de la siguiente forma:

$$\%\ de\ Inhibición = 100 - \frac{Titulo\ de\ la\ muestra}{Titulo\ del\ control} * 100$$

Se graficaron las curvas de porcentaje (%) de inhibición para cada uno de los bisfosfonatos evaluados. Utilizando el software GraphPad, por medio de análisis de regresión no lineal se determinó la concentración efectiva 50 (CE_{50}), es decir la concentración del compuesto que produce el 50 % de inhibición de la producción viral. De igual modo, a partir de las curvas de citotoxicidad y mediante el mismo análisis de regresión no lineal, se determinaron las concentraciones citotóxicas 50 (CC_{50}), como las concentraciones del compuesto que reducen la viabilidad celular al 50 %. Con los datos obtenidos de la CC_{50} y la CE_{50} se determinó el índice de selectividad (IS) como el cociente entre CC_{50}/CE_{50} de cada bisfosfonato.

$$CE50 = conc.\ menor\ al\ 50\% + \frac{(50 - inhibición\ menor\ al\ 50\%) * (concen.mayor\ al\ 50\% - conc.menor\ al\ 50\%)}{inhibición\ mayor\ al\ 50\% - inhibición\ menor\ al\ 50\%}$$

Además, para determinar el efecto de los compuestos sobre la infectividad asociada a la célula, después de la cosecha de los sobrenadantes, se lavó tres veces con PBS 1X y se adicionó nuevamente 500 µL de MEM. Luego se realizó tres ciclos de congelado a -80°C durante 30 min, con intervalos de descongelado de 20 min, posteriormente se centrifugaron las suspensiones a 10.000 g por 10 min para separar los residuos celulares. Con los sobrenadantes obtenidos se tituló en monocapas de células Vero, como se indica en la sección correspondiente.

5. Bisfosfonatos empleados en el estudio

Bisfosfonato comercial:

Ácido zoledrónico (ZA) designado químicamente como monohidrato de ácido fosfónico (1-hodroxi-2imidazol-1-il-fosfonoetilo). Se adquirió directamente con el distribuidor comercial

de Blau farmacéutica, la presentación de ZA en polvo liofilizado para ser reconstituido en agua estéril.

Bisfosfonatos no comerciales: fueron sintetizados y provistos para este trabajo por el Dr. Sergio Szajnman del Departamento de Química Orgánica y UMYMFOR (CONICET-FCEyN), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

1. **(BP6):** ácido 1-hidroxiheptil-1,1-bisfosfónico
2. **(BP9):** ácido 1-aminohexil-1,1-bisfosfónico
3. **(BP13):** ácido 1-[(n-heptilamino) etil]-1,1-bisfosfónico
4. **(BP20):** ácido 1-[(n-heptilamino) etil]-1-fluoro-1,1-bisfosfónico
5. **(BP15):** ácido 1-[(n-octilamino) etil]-1-hidroxi-1,1-bisfosfónico
6. **(BP16):** ácido 1-[(n-heptiltio) etil]-1-bisfosfónico
7. **(BP17):** ácido 1-[(n-deciltio) etil]-1,1-bisfosfónico
8. **(BP18):** ácido 1- [(n-decil sulfonilo) etil]-1,1-bisfosfónico

Todos los compuestos fueron preparados en condiciones de esterilidad y diluidos en agua estéril, almacenados a 4°C para su posterior uso.

6. Ensayo de actividad virucida

Volúmenes iguales de la suspensión viral (con un título de $3{,}3 \times 10^5$ UFP/ml de JUNV) y concentraciones en base 2 del compuesto a ensayar (desde 5 µM hasta 20 µM) en MEM, fueron mezclados e incubados durante 1 h a 37°C. Después se realizaron diluciones al décimo de las distintas mezclas y se tituló por el método de plaqueo por UFP en células Vero. Como control viral (100% de infección), se mezcló la suspensión viral con igual volumen de MEM sin compuesto y se incubó en las mismas condiciones que el resto de las mezclas.

7. Efecto del tiempo de adición de los bisfosfonatos frente al rendimiento viral

Las células Vero fueron crecidas en microplacas de 24 pozos (1×10^5 células/pozo) por 12 horas. Luego fueron inoculadas con JUNV (cepa IV4454) a una m.i. de 0,1 UFP/célula con un inóculo de 0,1mL/pozo y se llevaron a incubación durante 1h. Se realizó una cinética durante 24 h p.i. para determinar la cantidad de partículas virales a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21 y 24 h p.i. Tomando como hora cero (0 h) el momento en el cual se retira el inóculo. Después de cosechar el sobrenadante en cada tiempo (2, 4, 6 hasta las 24 h p.i.) se adicionó el tratamiento (**BP 18**) hasta las 24 h p.i. para cada condición experimental. En todos los casos en los que se adicionó **BP18**, se cosechó el sobrenadante a las 24h. Para todos los

tiempos de tratamiento se realizó, además, un control sin tratamiento cosechando los sobrenadantes correspondientes a cada intervalo de tiempo (2 a 24 h p.i., 4 a 24 h p.i., 6 a 24 h p.i., etc) (**Figura 9**). Todos los sobrenadantes fueron titulados por el método de plaqueo por UFP. El ensayo se realizó por triplicado (n=3), los porcentajes relativos de infección de cada condición fueron calculados con respecto al control de infección (100%), monocapas infectadas a las cuales se les adicionó MEM a las 0h y se les recolectó el sobrenadante a las 24h.

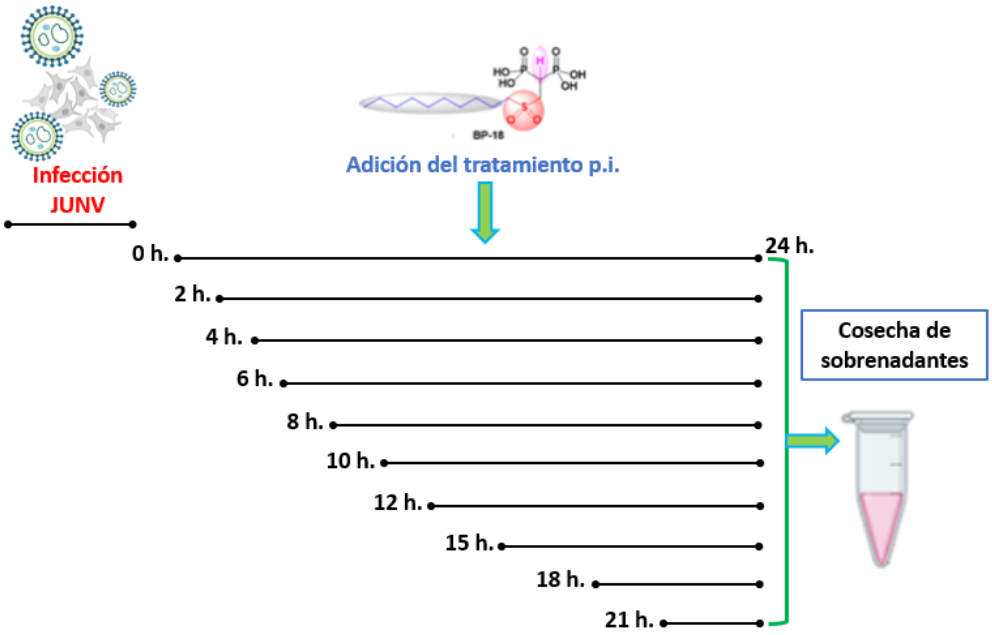


Figura 9: Esquema para secuencia de trabajo en los tiempos de adición del compuesto BPs.

8. Transfección con plásmidos

Se sembraron $2x10^5$ células Vero, sobre cubreobjetos estériles contenidos en una microplaca de 24 pozos**.** Se prepararon las mezclas para transfectar como se indica a continuación: mezcla (1) 1µg DNA: 1µg PEI (1:1) por pozo, se incubó durante 8 min a temperatura ambiente. Mezcla (2) PEI y OptiMEM (1µL/50µL/pozo) se incubó por 8 min; consecutivamente se mezcló en volúmenes iguales las dos preparaciones anteriores, y se incubaron durante 30 min. Se retiró el sobrenadante de las células, se realizaron 2 lavados con PBS, y se adicionó 300 µL de OptiMEM /pozo y luego 100 µL de la mezcla anterior por pozo, se llevó a incubación a 37°C por 24h. Finalizada la incubación, se adicionó 400 µL de OptiMEM que contenía la concentración de trabajo, se incubó durante 24h más y

posteriormente, las células se procesaron para IFI y/o para actividad fusogénica en presencia y/o ausencia de los compuestos.

Los vectores de expresión utilizados se listan en la **Tabla** 1.

Plásmido	Proteína (JUNV)
pcDNA3.1	GPC-Myc
pcDNA3.1	NP
pcDNA3.1	Z

Tabla 1. Vectores utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia indirecta y actividad fusogénica.

9. Ensayos de Inmunofluorescencia indirecta

Las células Vero y/o A549 fueron crecidas sobre un cubreobjetos en microplacas de 24 pozos, se infectaron con 0,15 ml de JUNV (IV4454) a una m.i de 0,1 UFP/célula o transfectadas para sobreexpresar proteínas virales de interés. Las células se incubaron durante 1 h a 37°C y luego de descartar el inóculo viral se adicionó MEM conteniendo el compuesto para ensayar a diferentes concentraciones del mismo. Posteriormente los cultivos se incubaron durante 24 y 48 h a 37°C en estufa 4% de CO_2. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS y, se fijaron con 300 µL de 4 % de paraformaldehido (PFA) durante 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el PFA, se lavó 3 veces con PBS y se adicionó 500 µl/pozo de 0,2 % de solución tritón X-100 para permeabilizar las células. Luego los preparados se lavaron con PBS y se dejaron secar y se guardaron a -20°C para posterior uso.

Los cubreobjetos se transfirieron a una cámara húmeda con Parafilm con 30 µl de la dilución de cada anticuerpo primario, las muestras se incubaron durante 1 h a 37°C en cámara húmeda y luego se realizaron 3 lavados con PBS en agitación por 5 min. Para la visualización de las proteínas, se utilizaron diluciones de anticuerpos secundarios incubados por 1 h a 37°C en cámara húmeda. Al finalizar la incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS. Para visualizar el citoplasma en algunos casos se utilizó la lectina WGA (Chazotte, 2014), los núcleos celulares fueron teñidos incubando las células con 30 µL de diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (1g/ml) por 5 min a temperatura ambiente, después de cada

incubación se efectuaron 3 lavados de 5 min con PBS. Finalmente, antes de montar los cubreobjetos, se realizó 2 lavados con agua para eliminar las sales del PBS.

Los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos utilizando 4 µL de una solución tamponada de 90% glicerol en PBS (pH 7,2) conteniendo 2,5% de 1,4-diazabiciclo (2,2,2) octano (DABCO, Sigma Aldrich) y fueron sellados con esmalte. Por último, los preparados se observaron por microscopio de fluorescencia (microscopio Olympus BX51) o microscopia confocal (microscopio Olympus FV300).

Los anticuerpos y sonda utilizados se listan en la **Tabla 2**.

Anticuerpos / Sonda	Organismo	Nro. Catalogo	Dilución
JUNV NP	Monoclonal, ratón	BEI, SA02-BG12	1:200
JUNV GPC/GP1	Monoclonal, ratón	BEI, QC03-BF11	1:300
JUNV Z	Policlonal, conejo	Hecho "in house"	1:50
IgG anti-conejo Alexa 488	cabra	Thermo Fisher A11008	1:200
IgG anti-ratón Alexa 488	burro	Thermo Fisher A21202	1:200
WGA-TRITC	-----	SIGMA L-5266	1:200

Tabla 2: Anticuerpos y sonda utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia indirecta.

10. Inmunodetección por Western Blot

Se cosecharon los sobrenadantes de las muestras transfectadas y tratadas con BPs o ZA y las no tratadas, luego las células fueron lisadas con PAGE 4X, cosechadas y guardadas hasta posterior uso. Después de ser procesadas se les adicionó 2 µl de agente reductor 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y se calentaron a 95°C en termobloque por 5 min. Luego de ser desnaturalizadas, las muestras se sembraron en geles de poliacrilamida 4-10% Bolt™ Bis-Tris Plus (Invitrogen, ThermoFisher) en una cuba con *buffer* de corrida MES SDS (Invitrogen, ThermoFisher). El volumen total de la muestra que se sembró fue de 20 µL, en el caso del marcador molecular se utilizó 5 µL (Kaleidoscope Prestained Standards SDS-PAGE-Bio-Rad). Se realizó la electroforesis a 150 volts por 60 minutos.

Después de la separación por SDS-PAGE, la electrotransferencia se realizó en equipo semihúmedo en membranas de PVDF (polyvinylidenedifluoride-PolyScreen, Amersham, GE). Se armó la estructura de transferencia y se realizó a corriente constante de 36 mA por 60 min. Concluida la transferencia, las membranas se sumergieron en solución de bloqueo (5% de leche descremada en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Luego,

las membranas se incubaron con el anticuerpo policlonal de conejo anti FLAG (Z-JUNV), 1:1000 (Sigma-Aldrich) en 5% de solución de bloqueo-PBS. La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C en agitación; al día siguiente, las membranas se lavaron 5 veces con PBS-Tween al 0,1% durante 5 min cada lavado. Luego se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa (HRP) 1:2000 (ThermoFisher) en solución de bloqueo-PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Concluida la incubación, se hicieron 5 lavados nuevamente de 5 min en agitación. Para el revelado de las proteínas, se utilizó el Kit Kalium ® y la exposición se realizó en el equipo Amersham Imager 600. Las intensidades de las bandas del *Wester Blot* fueron cuantificadas utilizando el software Fiji.

11.Ensayo de actividad fusogénica de la glicoproteína GP2 de JUNV

Monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 pozos, se infectaron con JUNV a una m.i. de 0,1 UFP/célula. Después de 1 h de infección a 37 °C en CO_2 4 %, se descartó el inoculo viral y se adicionó MEM con tratamiento, este se dejó durante 24 p.i. En paralelo, otras células fueron transfectadas con pcDNA 3.1 GPC-myc e incubadas durante 24 h post-transfección (p.t.). Después de este tiempo el MEM se reemplazó por MEM que contenía el tratamiento a la concentración de estudio y, se dejó incubando nuevamente durante 24 h. Al cabo de las 48 h p.t y a las 24 h p.i., se retiró el medio de cultivo y se adicionó 500 µL de MEM a pH 5 por pozo, se dejó incubando durante 30 min. Luego se reemplazó este medio y se adicionó MEM a pH 7 y se incubó nuevamente durante 5 h. Al terminar el último tiempo de incubación, las monocapas celulares fueron fijadas con 4 % de PFA. A continuación, se efectuó una IFI indirecta, tal como se indica en el ***ítem* 10**, cada condición se analizó por duplicado.

Los preparados se observaron en el microscopio de fluorescencia (microscopio Olympus BX51) y microscopio confocal (microscopio Olympus FV300). Se efectuó la cuantificación del número de sincicios en cada cubreobjeto considerando 18 campos al azar, tomando como control los preparados infectados o transfectados sin tratar con el compuesto.

12.Cuantificación de niveles de RNA

Extracción de RNA

Se sembraron células Vero ($8x10^5$ células/pozo) en microplacas de 6 pozos, luego de 12 h se infectó con JUNV a una m.i. de 0,1 UFP/célula. Después de 1 h de infección se retiró el inoculo y, se adicionó MEM con el tratamiento a la concentración de estudio y, se dejó

durante 24 y 48 h.p.i. Posteriormente, se cosecharon los sobrenadantes, las células fueron lavadas con PBS y se lisaron las monocapas celulares con 300 µL/pozo de buffer desnaturalizante Trizol® (Sigma-Aldrich). Las muestras se dejaron por 5 min incubando a temperatura ambiente, después se adicionó 120 µL de cloroformo a cada una, se agitaron vigorosamente por 30 segundos, se incubaron por 3 min a temperatura ambiente y, se centrifugaron a 12000 rpm por 20 min a 4°C. La fase acuosa superior se transfirió a tubos nuevos, se adicionó 1 volumen de isopropanol, seguido de agitación, se incubó a -80°C durante 1 h y se centrifugó nuevamente a 12000 rpm por 20 min. Luego, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en una dilución de acetato de sodio 85 mM en 70% de etanol. Se incubó durante 1 h a 80°C y se centrifugó a 12000 rpm por 20 min. Consecutivamente, se retiró el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 70% de etanol, luego se dejó secar. Finalmente, el *pellet* se disolvió en 30 µL de agua bidestilada estéril libre de RNAsas.

Síntesis de cDNA

Para la síntesis del DNA copia (cDNA) se realizó la siguiente preparación: 3 µg de cada una de las muestras de RNA se mezclaron con 0,5 µL de oligonucleótidos aleatorios (Biodynamics) y un volumen de agua bidestilada para aforar a 10 µL. Se incubó esta mezcla por 5 min a 70 °C y luego 5 min en hielo. A cada muestra se le adicionó 10 µL de mezcla de reacción: 1 µL de transcriptasa reversa M-MLV (100U/µL, Promega), 4 µL de buffer 5X, 1 µL de inhibidor de RNAsas (RNasin, Promega) y 1 µL de mezcla de desoxirribonucleótidos 10 mM (Promega) y, 3 µL agua bidestilada. Finalmente, la mezcla fue incubada a 42 °C durante 2 h.

PCR en tiempo real (RT-PCR)

Se utilizó una mezcla comercial para RT-PCR (Biodynamics) que posee Taq DNA polimerasa, desoxirribonucleótidos-trifosfatos, Mg^{2+}, buffer, y los fluoróforos SYBR Green, Texas Red, FAM. Por cada muestra a amplificar se usaron 12,5 µL de mezcla, 0,4 µL de oligonucleótidos sentido 50 µM, 0,4 µL de oligonucleótidos antisentido 50 µM, 8,7 µL de agua libre de nucleasas y 3 µL de cDNA. Los oligonucleótidos utilizados para esta reacción se detallan en la **Tabla 3**. Para todos los casos, se empleó un par de oligonucleótidos para la amplificación de actina como referencia.

Protocolo de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 2 min; 45 ciclos de 30 segundos (seg) a 95°C, 1 min a 58°C, 1 min a 72°C y 5 min a 72°C; 1 ciclo de 5 minutos a 55°C y uno de 7 seg a 55-95°C (curva de disociación o *melting curve*).

A través del programa BioRad iQ5, obtuvimos las curvas de amplificación, de disociación y los valores de CT que a su vez utilizamos para calcular los niveles de expresión relativos de los genes N y FPPS con base a las siguientes expresiones:

CT: número de ciclo para el cual se alcanza el umbral de fluorescencia definido.

ΔCT: diferencia entre el promedio de los valores de CT de las muestras utilizando oligonucleótidos para amplificar el gen de interés y los valores de CT utilizando oligonucleótidos para amplificar actina.

ΔΔCT: diferencia entre el valor de ΔCT en una condición estimulada (ej: células estimuladas con BPs) y el valor de ΔCT en una condición sin estímulo o de referencia (ej: células en MEM).

ΔCT = CT N ó FPPS– - CT actina

ΔΔCT = ΔCT (Condición con estímulo) - ΔCT (condición sin estímulo)

Tasa de incremento o expresión relativa = 2^-ΔΔCT

Primer	Orientación	Secuencia
NP	Sentido (F)	5'-CGCACAGTGGATCCTAGGC-3'
NP	Antisentido (R)	5'-GGCATCCTTCAGAACATC-3'
FPPS	Sentido (F)	5'-AGGAATTGATGGCGAGAAGG-3'
FPPS	Antisentido (R)	5'-CCCAAAGAGGTCAAGGTAATCA-3'
E1	Sentido (F)	5'-AAGCTYCGCGTCCTTTACCAAG-3'
E1	Antisentido (R)	5'-CCA AATTGTCCYGGTCTTCCT-3'
NSP4	Sentido (F)	5'-TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA-3'
NSP4	Antisentido (R)	5'-TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC-3'

Tabla 3: Secuencia de los oligonucleótidos usados en el trabajo.

Una expresión relativa igual a 1 significa que no hay diferencia entre el control y las muestras estudiadas. Para analizar los resultados presentados en este trabajo se tomaron puntos de corte de 0,5 y 2, que representan respectivamente el número de veces que la expresión del gen en estudio se encontró inhibida o aumentada respecto de la condición control.

13.Interacción molecular *"in silico"* de la enzima FPPS con los bisfosfonatos

Para estudiar las interacciones de la enzima FPPS humana (hFPPS) con los bisfosfonatos(ligandos) y para obtener las energías de unión y las conformaciones más estables de los complejos para cada ligando mediante docking molecular; se realizaron los siguientes pasos.

13.1 Preparación de los ligandos

Las estructuras tridimensionales de los ligandos bisfosfonatos utilizados en nuestro estudio, se dibujaron utilizando el software Avogadro para optimizar los enlaces y, los grupos funcionales fueron protonados a un pH de 7,4.

13.2 Preparación de la proteína FPPS humana

Se seleccionó la estructura cristalizada de la enzima hFPPS. Para esto se realizó una búsqueda en RCSB *Protein Data Bank* teniendo en cuenta parámetros como: la resolución, el método por el cual fue obtenido el cristal y la integridad de los dominios. La estructura del cristal se preparó eliminando manualmente las aguas y los cofactores propios del proceso de cristalización. Consecutivamente, con el programa AutoDockTools-1.5.6 se adicionaron los hidrógenos polares y las cargas de Gasteiger.

13.3 Docking Molecular

Se generó una caja en el sitio activo de la enzima y se crearon los mapas a partir de las coordenadas de la proteína utilizando AutoGrid4. Posteriormente, se realizaron las simulaciones de docking molecular con Autodock 4.2.6. Se generaron 100 poses para cada ligando utilizando el Algoritmo Genético (AG) Lamarckiano. Este último se utilizó bajo las siguientes condiciones: corridas del GA= 100, tamaño de población = 100, máximo número de evaluaciones = 5000000, máximo número de generaciones = 100000. Para validar el método, se realizó un re-docking del receptor co-cristalizado con el ligando. La conformación de los complejos fue visualizada con UCSF Chimera y, se utilizó el programa Ligplot para representar las interacciones de los aminoácidos de la enzima con los ligandos.

14.Gráficos, estadísticas e imágenes.

Los gráficos y el análisis estadístico de los datos se realizaron con el *software* GraphPad Prism versión 8.0. Los datos son presentados como el promedio de tres determinaciones ± desvió estándar (DE). Para el análisis de varianza se utilizó ANOVA de una vía y posterior pruebas post-hoc como test de Dunnett, Tukey. El t-test fue usado para comparar los datos

de las medias, en cada caso se detallan las pruebas realizadas. Las imágenes de microscopia de fluorescencia y confocal, así como los resultados por inmunodetección por WB se procesaron utilizando el programa Fiji, que está basado Image J, ambos *softwares* son libres y de disponibilidad en la Web con amplia utilización.

RESULTADOS

CAPITULO I. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA FPPS

CAPITULO I. Actividad antiviral de compuestos inhibidores de la enzima FPPS

El primer objetivo que se abordó fue la evaluación de distintos compuestos inhibidores de la FPPS para determinar las concentraciones de trabajo en los cultivos celulares, el potencial antiviral y el efecto sobre la expresión de las proteínas virales. Además, se realizó una evaluación *in silico* de los bisfosfonatos no comerciales utilizados.

1. Efecto del bisfosfonato comercial zoledronato sobre la viabilidad celular y la multiplicación de JUNV

En primer lugar, se evaluó el inhibidor específico de FPPS ácido zoledrónico o zoledronato (**ZA**), un bisfosfonato comercial ampliamente caracterizado. Con el fin de determinar las concentraciones óptimas para las líneas celulares de trabajo se determinó el efecto citotóxico de ZA. Para este ensayo se utilizaron las líneas celulares Vero y A549. Los cultivos de células se incubaron con diluciones seriadas al medio del compuesto ZA durante 48 h. La viabilidad celular se cuantificó mediante el método de MTT y se determinó la concentración citotóxica 50 (CC_{50}).

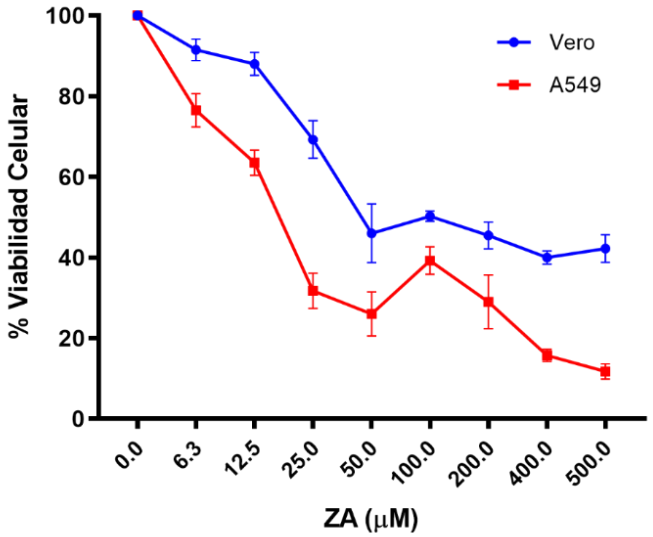


Figura 10. Efecto citotóxico del compuesto ZA en células Vero y A549. Las monocapas celulares fueron tratadas con concentraciones crecientes del compuesto y la viabilidad celular fue evaluada por el método de MTT a las 48 h. Las concentraciones se ensayaron en un rango de 6,7 a 500 µM y, los resultados fueron expresados como porcentaje (%) de viabilidad celular. Los resultados se analizaron mediante regresión no lineal, se estimó la CC_{50}= 49,68 µM en la línea celular Vero y la CC_{50}= 22,78 µM para la línea celular A549.

A partir de los valores de absorbancia obtenidos con esta técnica se calcularon los porcentajes (%) de viabilidad celular versus las concentraciones de **ZA**, después de un tratamiento de 48 h. Se graficó en la **Figura 10** y se halló que **ZA** reduce la viabilidad celular de ambos cultivos de manera dependiente de la dosis, en el rango ensayado. Por otro lado, las células A549 presentaron una sensibilidad mayor a la acción de este compuesto. Los valores de CC_{50} en las líneas celulares (Vero y A549) fueron diferentes reflejando los niveles variables en la sensibilidad hacia **ZA**. Las células A549 presentaron un valor de CC_{50} de 22,78 µM, en comparación con la CC_{50} de 49,68 µM que se obtuvo en las células Vero.

A continuación, se evaluó la actividad antiviral de **ZA** frente a JUNV mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral. Los cultivos celulares Vero se infectaron con una m.i. de 0,1 UFP/célula. Después de 1 h de incubación a 37ºC las células se trataron con diferentes concentraciones no tóxicas de **ZA** (0-25 µM). A las 48 h.p.i. se cuantificó la infectividad viral (título de virus extracelular) por el método de UFP (**Figura 11)**.

El compuesto **ZA** presentó actividad inhibitoria frente a JUNV en el rango de concentraciones ensayado. Los resultados mostraron una inhibición del 40% del título cuando la viabilidad se mantuvo por encima del 80%. Se obtuvo un valor de $CE_{50} > 25$ µM y un IS < 1,98.

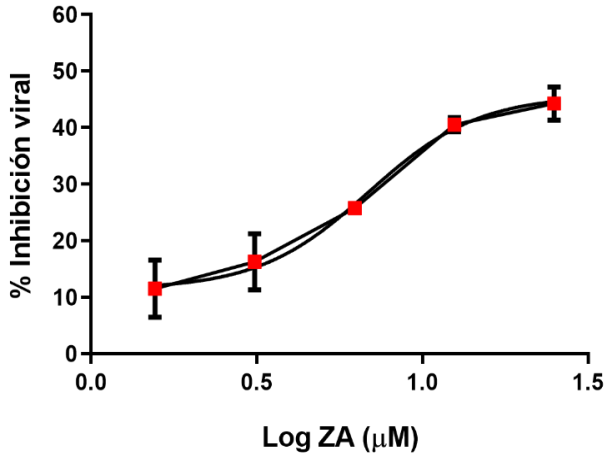


Figura 11. Actividad antiviral del compuesto ZA en células Vero. Las células Vero se infectaron con JUNV (m.i=0,1), después de 1 h de incubación a 37°C se trataron con concentraciones al medio del compuesto **ZA** 1,56 a 25 µM), se cosecharon los sobrenadantes a las 48 h.p.i. Se cuantificó la infectividad viral por el método UFP, y los resultados fueron expresados como porcentaje (%) de inhibición viral. Los resultados se analizaron mediante regresión no lineal, se estimó la $CE_{50} > 25$µM.

Por otro lado, y luego de cosechar los sobrenadantes, las células fueron fijadas y marcadas para analizar la expresión de antígenos virales (GPC/GP1 o NP) por inmunofluorescencia indirecta. En la **Figura 12 A** se observan imágenes representativas de este ensayo. La cuantificación se realizó sobre las imágenes obtenidas y mediante el conteo de al menos 300 células en cada muestra (20 campos elegidos al azar, aumento 600X). Los resultados fueron expresados como porcentaje (%) de células positivas para GPC/GP1 o NP. Como se observa en la **Figura 12 B** el % de células infectadas o positivas para los antígenos virales fue del 60% en los cultivos infectados sin tratamiento. En presencia de las distintas concentraciones de **ZA** utilizadas, el % de positividad disminuye alcanzando se valores del

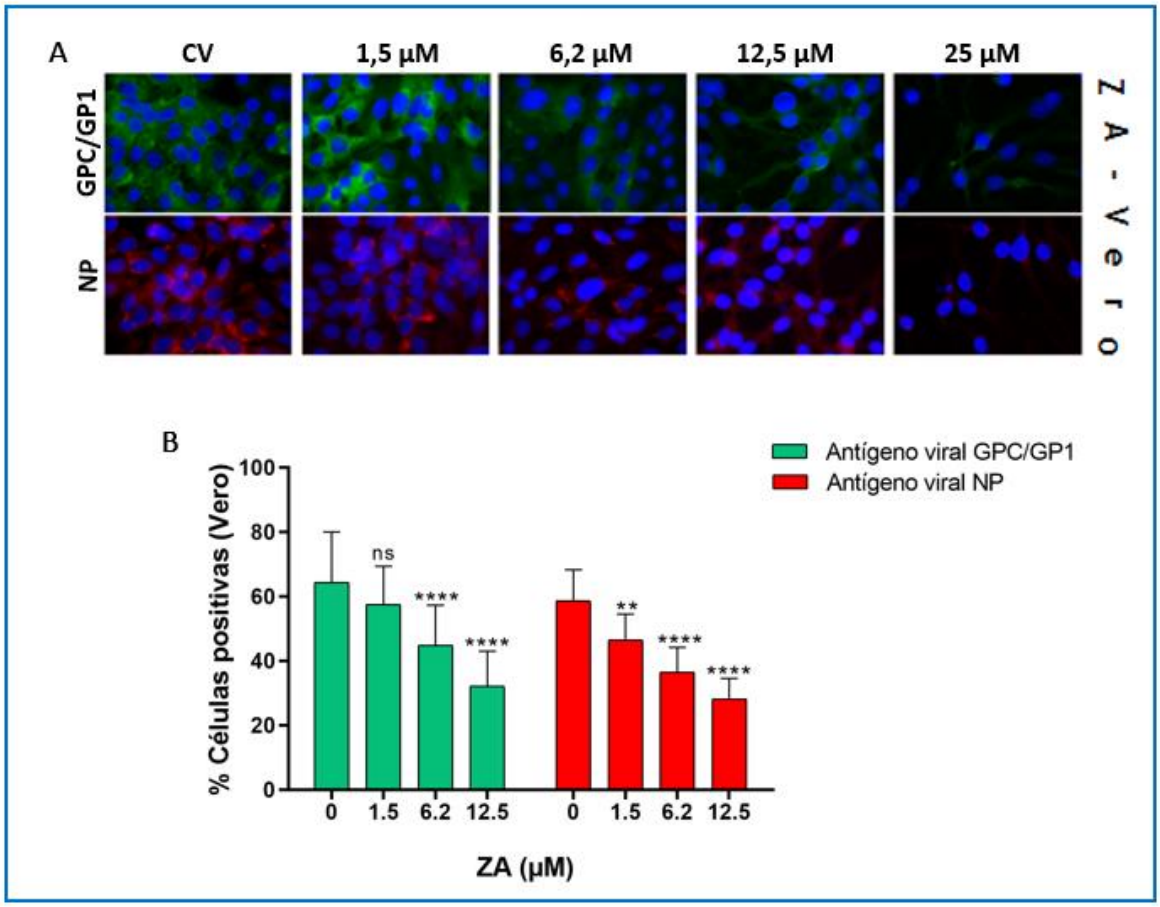


Figura 12. Expresión de antígenos de JUNV en células Vero tratadas con el compuesto ZA. Las células se infectaron con JUNV (m.i=0,1), después de 1 hora de incubación a 37°C se trataron con concentraciones al medio del compuesto ZA (1,56 a 25 µM). Para cuantificar los niveles de infección a través de IFI, se analizó mediante la expresión de antígeno viral GPC/GP1 (verde), NP (rojo), los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (1000µg/mL), (A). Aumento: 600X. Las IFI se analizaron mediante ANOVA y posterior test de Dunnett (**P<0,01; ****P<0,0001), (B).

30% respecto del control. Esto se observa tanto para la marcación de GPC/GP1 como con NP.

A continuación, se evaluó el efecto de **ZA** sobre cultivos A549 infectados con JUNV. En la **Figura 13** se observa la actividad antiviral en función de la concentración de **ZA**. En esta línea celular se alcanzó una inhibición del título del 67%, a la menor concentración ensayada (1,5 µM) y cuando la viabilidad se mantuvo por encima del 90%. A concentraciones mayores la inhibición del título se incrementa hasta un 90%, sin embargo, no puede adjudicarse un efecto antiviral debido a la toxicidad determinada en la **Figura 10**. De esta forma para la línea celular A549 se obtuvo una CE_{50} < 1,5 µM y un IS de 14,6.

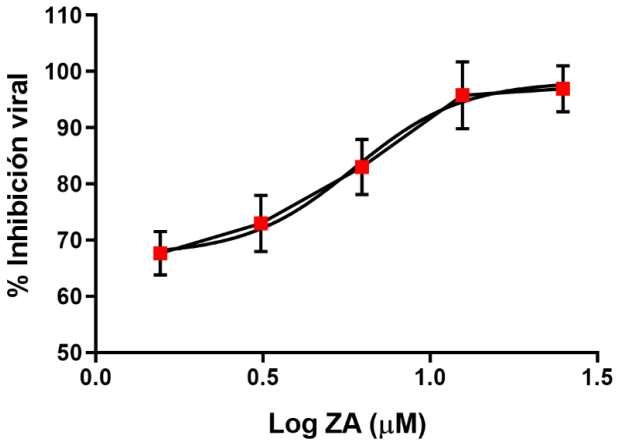


Figura 13. Actividad antiviral de ZA en células A549. Las células se infectaron con JUNV (m.i=0,1), después de 1 h de incubación a 37°C se trataron con concentraciones crecientes del compuesto ZA (1,5 a 25 µM), se cosecharon los sobrenadantes a las 48 h.p.i. Se cuantificó la infectividad viral por el método de UFP, y los resultados fueron expresados como porcentaje (%) de inhibición viral. Los resultados se analizaron mediante regresión no lineal, se estimó la CE_{50} < 1,5 µM.

Seguido de esto, se analizó la positividad de las células infectadas para los antígenos virales de forma similar a la **Figura 12**. La **Figura 14 A** muestra imágenes representativas de la IFI realizada, observándose una disminución progresiva en el número de células infectadas. Cuando se cuantificó el efecto de **ZA** en base a las imágenes se excluyó de este análisis la concentración 25 µM debido a su alta citotoxicidad (**Figura 14 B)**. Para el rango de concentraciones cuantificado se observó una disminución de la positividad para los antígenos virales cercana al 40% a la concentración máxima analizada (12,5 µM).

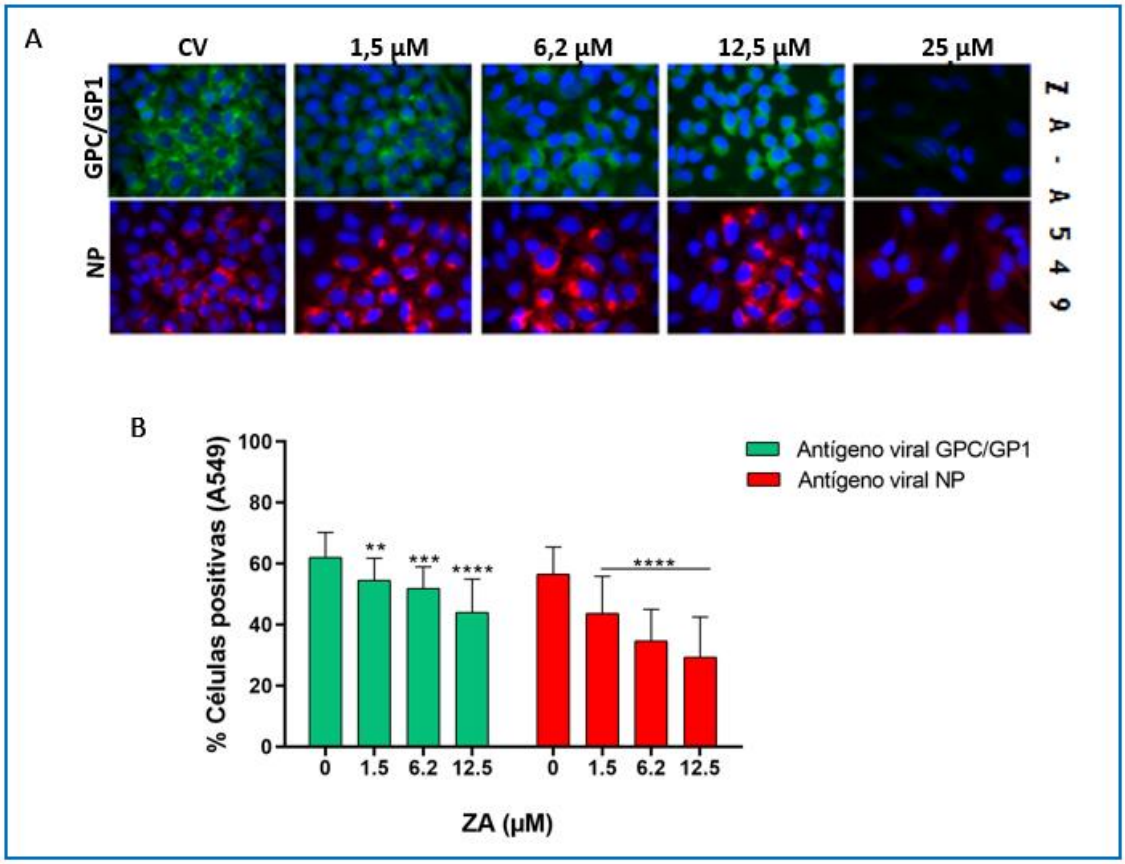


Figura 14. Expresión de antígenos de JUNV en células A549 tratadas con el compuesto ZA. Las células se infectaron con JUNV (m.i=0,1), después de 1 h de incubación a 37°C se trataron con concentraciones crecientes del compuesto ZA (1,5 a 25 µM), se cosecharon los sobrenadantes a las 48 h.p.i. Para cuantificar los niveles de infección a través de IFI, se analizó mediante la expresión de antígeno viral GPC/GP1 (verde), NP (rojo), los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (1000µg/mL), (A). Aumento: 600X. las IFI se analizaron mediante ANOVA y posterior test de Dunnett (**P<0,01; ***P<0,001); ****P<0,0001 (B).

Los resultados obtenidos de la actividad antiviral de **ZA** en las dos líneas celulares, mostraron que en el rango de concentraciones evaluado la CE_{50} fue menor en el caso de las células A549 y mayor para la línea Vero. Para estimar la CE_{50} se analizaron los resultados mediante regresión no lineal. Se estimó para la línea celular Vero CE_{50} = 6,87µM y para las células A549 una CE_{50} = 0,71µM. Los resultados del ensayo de inmunofluorescencia indican que a la concentración de 25 µM hay una reducción de 50% de positividad para los antígenos virales GPC/GP1 y NP de JUNV respecto del control en la línea celular Vero, lo que correlaciona con los valores de CE_{50} > 25 µM **(Figura 12 B).**

De manera resumida se muestran en la **Tabla 4** los resultados para ambas líneas. El compuesto **ZA** exhibió una mayor actividad inhibitoria frente al virus en las células A549 con

IS de 14,6 y en comparación a la línea Vero (IS < 1,98). Sin embargo, el rango de concentraciones no citotóxicas de **ZA** en la línea A549 resultó ser más acotado que el determinado para la línea Vero.

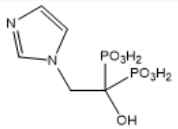
Compuesto	Formula Química	PM	Estructura		
ZA	$C_5H_{10}N_2O_7P_2$	272,09			
Línea celular Vero			Línea celular A549		
CC_{50} (µM)	CE_{50} (µM)	IS	CC_{50} (µM)	CE_{50} (µM)	IS
49,68 ± 1,2	>25	< 1,98	22,78 ± 1,2	<1,56	>14,6

Tabla 4: Efecto citotóxico y actividad antiviral frente a JUNV del bisfosfonato comercial ZA. CC_{50}: concentración citotóxica 50, CE_{50}: concentración efectiva 50, IS: índice de selectividad. Los datos se expresan como el promedio de tres determinaciones ± desvió estándar (DE).

2. Evaluación de bisfosfonatos no comerciales sobre la viabilidad celular y la multiplicación de JUNV

Después de la evaluación de la citotoxicidad y la actividad antiviral de **ZA** frente a JUNV en los cultivos celulares mencionados anteriormente, decidimos ampliar el estudio ensayando compuestos bisfosfonatos no comerciales. En la **Figura 15** se observan las estructuras químicas de cada uno de ellos y sus grupos funcionales. Los BPs no comerciales fueron denominados arbitrariamente **BP 6**, **BP 9**, **BP 20**, **BP 13**, **BP 15**, **BP 16**, **BP 17** y **BP 18** según se indica en la misma figura**.** Como primer paso se estableció el efecto citotóxico de los BPs utilizando la línea celular Vero. Los cultivos de células se incubaron con diluciones seriadas al medio de los BPs durante 48 h y la viabilidad celular se cuantificó mediante el método de MTT, determinando la CC_{50}.

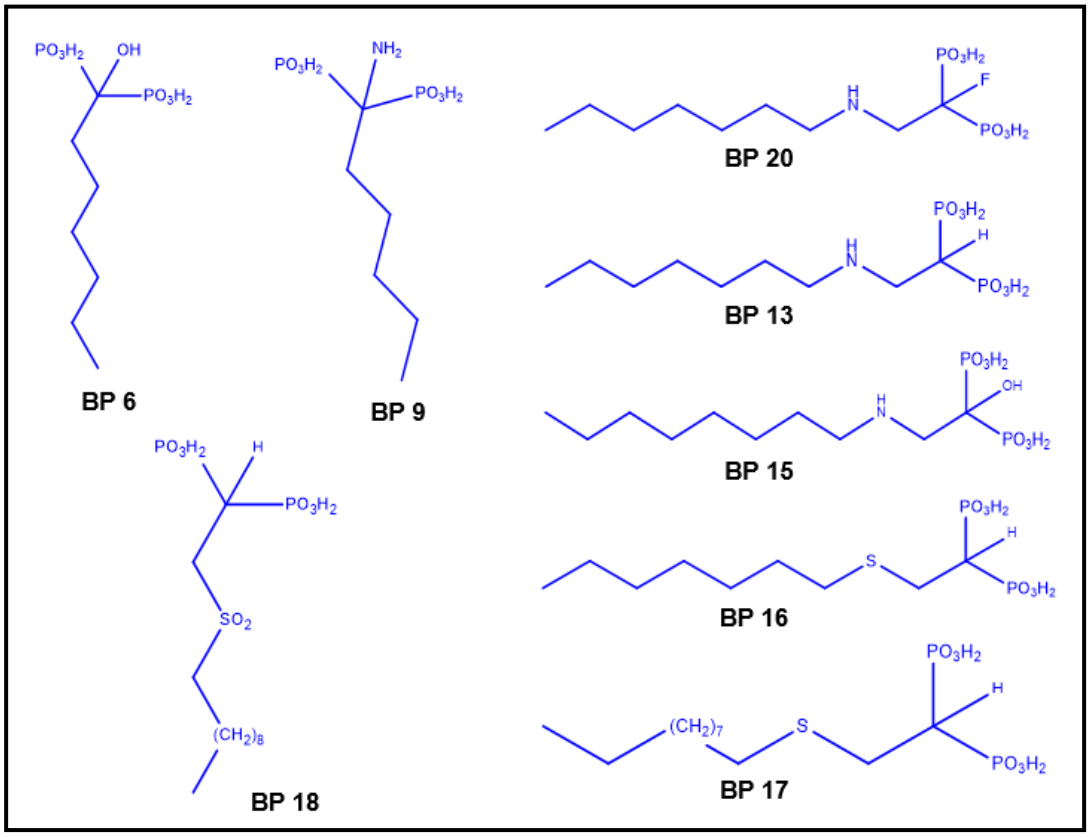


Figura 15. Estructuras de los bisfosfonatos no comerciales. Moléculas sintetizadas por el Dr. Sergio H. Szajnman (QO, FCEN, UBA) empleadas para la evaluación de la citotoxicidad y actividad antiviral.

En paralelo, se evaluó la actividad antiviral de los BPs no comerciales frente a JUNV y mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral. Los cultivos celulares se infectaron con una m.i. de 0,1 UFP/célula y después de 1 h de incubación a 37ºC las células se trataron con diferentes concentraciones (3,12; 6,25; 12,5; 25 y 50 µM). A las 48 h.p.i. se cuantificó la infectividad (título de virus extracelular) por el método de UFP. Los resultados son expresados en gráficas como porcentaje (%) de inhibición viral vs. Log de la concentración junto con los resultados de la determinación de la viabilidad celular (**Figura 16-17**). Finalmente se determinó la CE_{50} y se calculó el IS (**Tabla 5**).

El efecto de la actividad antiviral frente a JUNV por los BPs no comerciales mostró los siguientes resultados: los compuestos **BP 6** y **BP 15** (**Figura 16 A-B**) presentaron un porcentaje de inhibición alrededor del 20% en la máxima concentración ensayada. Estos compuestos además exhibieron una CC_{50} de 112,9 y 55,54 µM respectivamente. **BP 16**

mostró un efecto inhibitorio alrededor del 55 % en la mayor concentración cuando su viabilidad celular fue del 80%. El porcentaje de inhibición de **BP 20** fue del 70 % en la concentración 50 µM. En resumen, debido al poco efecto de estas moléculas frente a la inhibición de JUNV decidimos descartarlas y no continuar los ensayos.

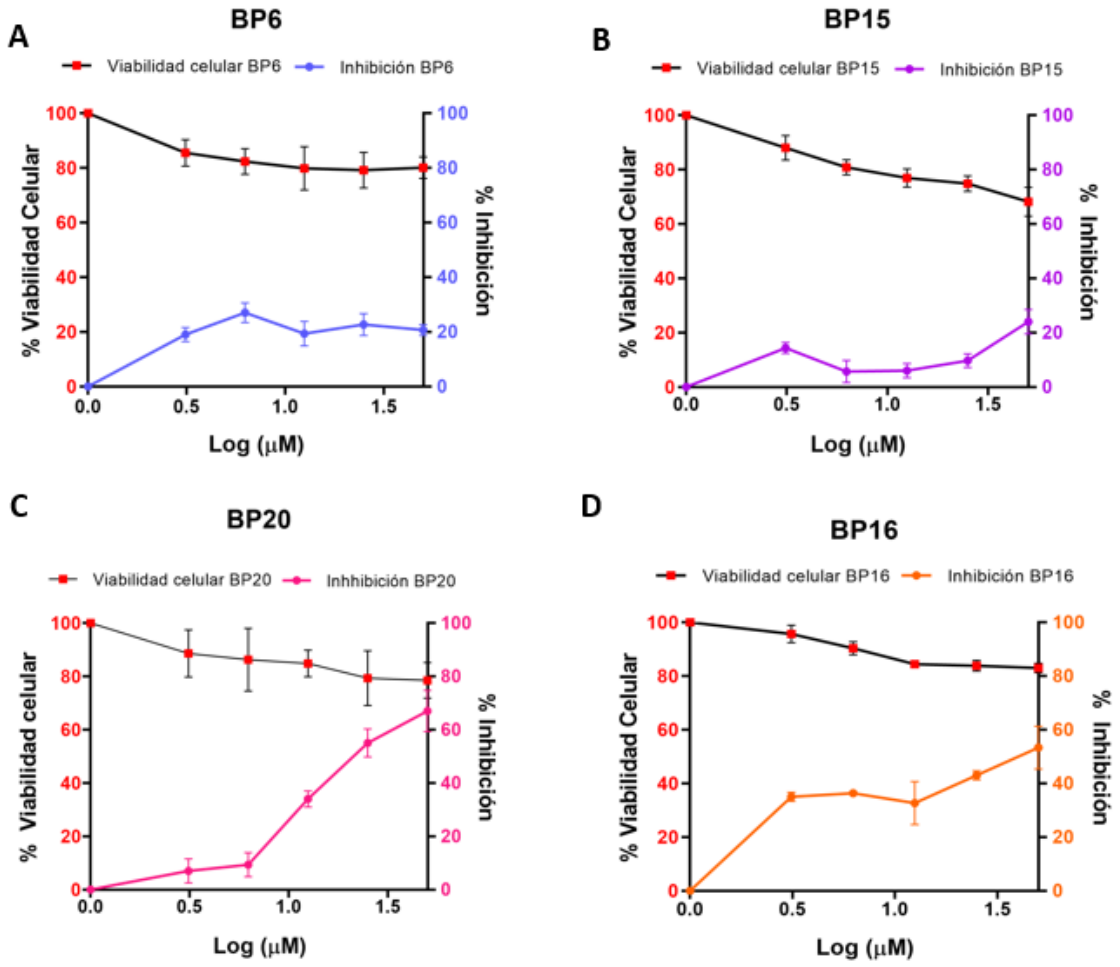


Figura 16. Ensayo de actividad antiviral vs. la viabilidad celular de bisfosfonatos no comerciales en células Vero. Los bisfosfonatos **BP 6** y **BP 15** inhibieron el 20 % de la replicación viral en la máxima concentración ensayada **(A-B)**; **BP 16** presentó una inhibición viral del 50 % en la máxima concentración (50 µM) ensayada **(D)**, algo similar sucedió con **BP 20** que tuvo una inhibición del 70 % a esta concentración **(C)**. Los datos se expresan como el promedio de tres determinaciones ± *DE*.

Sin embargo, de los ocho compuestos evaluados, cuatro de los BPs obtuvieron porcentajes de inhibición por encima del 80%. El porcentaje de inhibición para **BP 13** fue de 93%, cuando la viabilidad celular fue del 80%. **BP 9** exhibió un porcentaje de inhibición del 90% contra JUNV con un valor de CE_{50} de 4,55 µM. (**Figura 17 A - B**). **BP 17** provocó una inhibición del 90% con una CE_{50} de 8,34 µM cuando la viabilidad celular fue del 90% (**Figura 17 C**). Por último, **BP18** fue el compuesto que presentó el mayor porcentaje de inhibición frente a JUNV con 97%, cuando la viabilidad celular se mantuvo por encima del 80% (**Figura 17 D**).

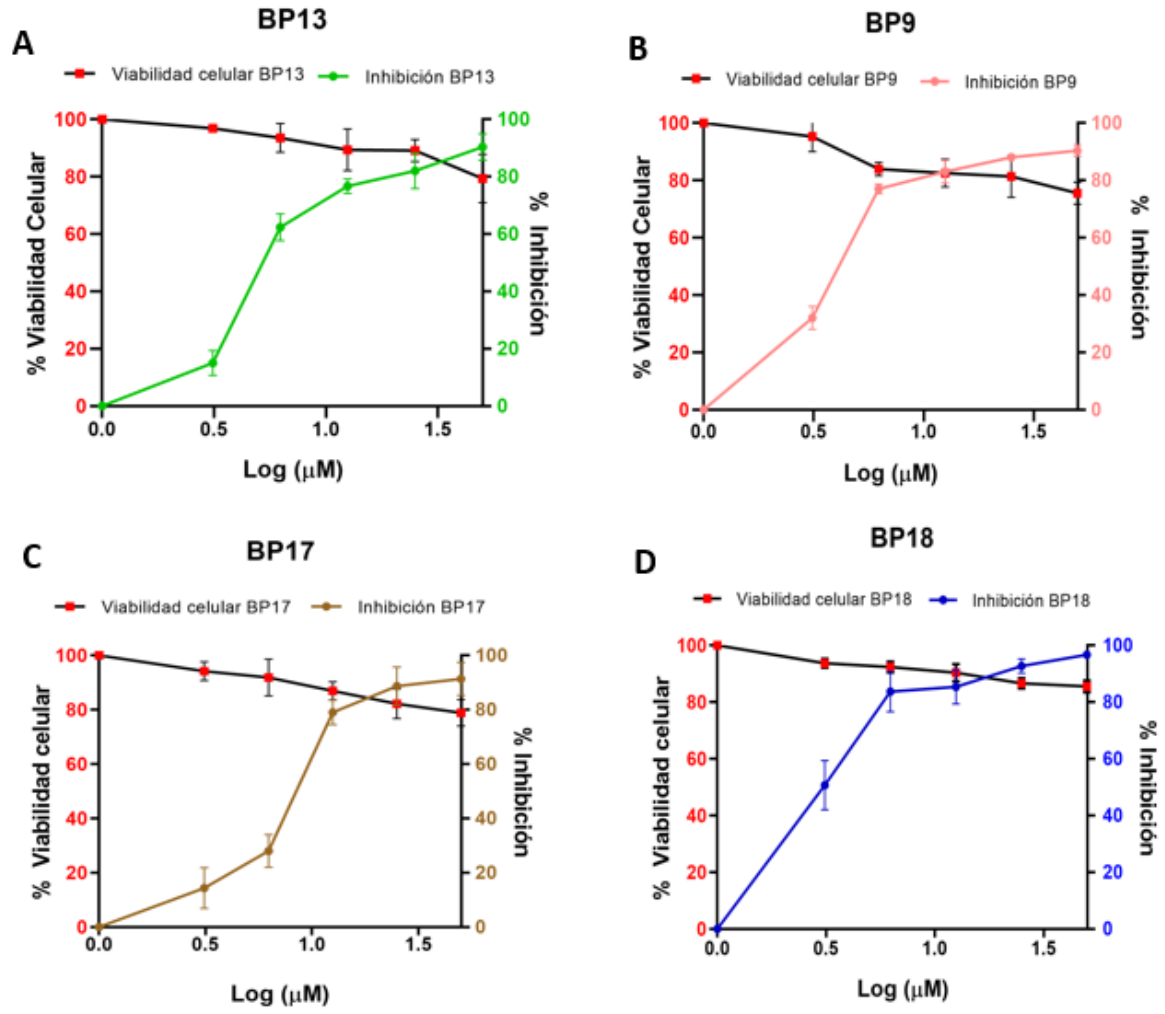


Figura 17. Ensayo de actividad antiviral vs. la viabilidad celular de bisfosfonatos no comerciales en células Vero. Los bisfosfonatos BP 13, BP 9, BP 17 y BP 18 (A, B, C y D), presentaron una inhibición de la multiplicación de JUNV mayor al 90 % en concentraciones donde la viabilidad celular fue mayor al 80%. Los datos se expresan como el promedio de tres determinaciones ± *DE*.

En la **Tabla 5** se resumen todos los resultados obtenidos para la CC_{50}, CE_{50} y IS. Se observa que **BP 18** resultó ser el mejor candidato no comercial con IS=42,88.

Línea celular Vero					
Compuesto	**Formula Química**	**PM**	**CC_{50} (µM)**	**CE_{50} (µM)**	**IS**
BP 6	$C_7H_{18}O_7P_2$	276,16	112,9 ± 0,9	> 500	< 0,22
BP 9	$C_6H_{17}NO_6P_2$	261,15	85,31 ± 1,1	4,55 ± 1,2	18,72
BP 20	$C_9H_{22}FNO_6P_2$	321,22	89,19 ± 1,0	43,16 ± 1,0	2,06
BP 13	$C_9H_{23}NO_6P_2$	303,23	120,7 ± 1,2	6,06 ± 1,3	19,91
BP 15	$C_{10}H_{25}NO_7P_2$	333,26	55,54 ± 1,1	523,5 ± 0,3	0,10
BP 16	$C_9H_{22}O_6P_2S$	320,28	118,6 ± 1,1	64,54 ± 0,6	1,83
BP 17	$C_{12}H_{28}O_6P_2S$	362,36	94,25 ± 1,2	8,34 ± 1,4	11,29
BP 18	$C_{12}H_{28}O_8P_2S$	394,36	152,6 ± 1,2	3,55 ± 1,2	42,88

Tabla 5. Efecto citotóxico y actividad antiviral frente a JUNV de los bisfosfonatos no-comerciales en células Vero. Se evaluó la citotoxicidad por el método de MTT a las 48hs, CC_{50}: concentración citotóxica 50, CE_{50}: concentración efectiva 50, IS: índice de selectividad. Los datos se expresan como el promedio de tres determinaciones ± *DE*.

En la **Tabla 6** se muestran extraídos los resultados obtenidos de la relación entre CC_{50} y CE_{50} para cuatro de los ocho BPs evaluados y considerados los candidatos más prometedores. Considerando los valores de IS su efecto de inhibición demuestra ser selectivo frente al virus JUNV, más no citotóxico hacia la célula. El bisfosfonato **BP18** (**Figura 17 D**) fue uno de los compuestos más promisorios para continuar estudiando el mecanismo de acción de los BPs no comerciales frente a la inhibición de JUNV.

Compuesto	Índice de selectividad (IS)
BP 18	42,88
BP 13	19,91
BP 9	18,72
BP 17	11,29

Tabla 6. Valores del Indice de selectividad para los bisfosfonatos más prometedores. Relación del cociente entre CC_{50} y CE_{50}.

2.3 Evaluación del efecto inactivante de los bisfosfonatos sobre JUNV

A fin de determinar si los compuestos **ZA** y los BPs no comerciales que tuvieron los mayores porcentajes de inhibición viral, podrían provocar la disminución de la infectividad por acción directa sobre los viriones de JUNV, evaluamos si estos compuestos presentaban actividad virucida. Para llevar a cabo este experimento, alícuotas del stock de JUNV se incubaron con diferentes concentraciones (5, 10, 20 y 50 µM) de **ZA**, **BP 13**, **BP 9**, **BP 17** y **BP 18** durante 1 h a 37ºC y luego se determinó el % de infectividad remanente mediante el método de UFP.

Como se observa en la **Figura 18** ninguno de los compuestos produjo la inactivación directa de las partículas virales de JUNV dado que el % infectividad remanente de las suspensiones virales incubadas con las diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos no presentaron diferencias significativas respecto al control viral sin tratar. Esto nos permite establecer que la actividad antiviral de **ZA** y los BPs no comerciales ensayados, no está asociada con una interacción directa del compuesto sobre la partícula viral.

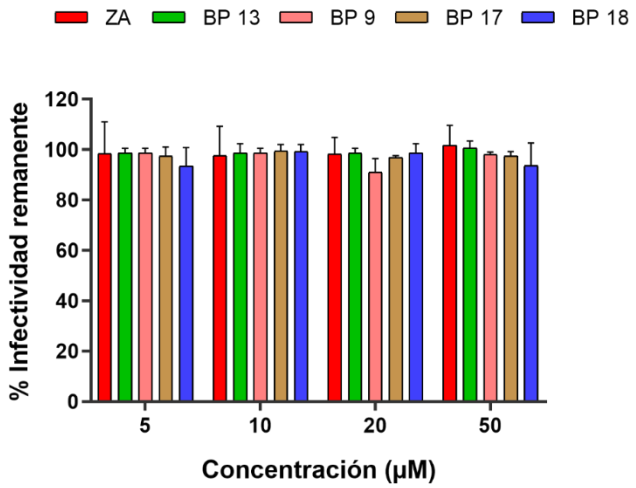


Figura 18. Actividad virucida del compuesto ZA y los bisfosfonatos no-comerciales. Para evaluar si **ZA**, **BP 9**, **BP 13**, **BP 17** y **BP 18** tienen alguna interacción con JUNV se incubo con concentraciones de cada compuesto (5,10,20 y 50 µM), durante 1 hora a 37°C. Posteriormente la infectividad remanente se determinó por medio del ensayo de formación de placas (UFP). Los resultados se analizaron mediante ANOVA y posterior test de Dunnett, pero no presentaron una diferencia significativa para ninguna de las concentraciones ensayadas, los resultados se expresan como valor promedio del (%) porcentaje de la infectividad remanente obtenido a partir de tres determinaciones ± *DE*.

3. Estudio *in silico* con bisfosfonatos no-comerciales

Teniendo presente los resultados obtenidos en la evaluación *in vitro*, realizamos un estudio teórico para predecir la afinidad de los BPs no comerciales por la enzima hFPPS. Para llevar a cabo este análisis *in silico*, primero se realizó una búsqueda en la base de datos de proteínas RCSB PDB para la enzima hFPPS. La estructura seleccionada (PDB ID: 4NFI), fue cristalizada por rayos X con una resolución de 1.85 Å y se co-cristalizó con un nuevo bisfosfonato fenilaminopiridina (PNP-BPs), por Park *et al*., (2017).

La selección de este cristal se hizo teniendo en cuenta los siguientes criterios: el método de obtención del cristal, la resolución y la integridad de los dominios. Luego de explorar el sitio activo, se estableció el tamaño de la caja y, se realizó un re-docking con el ligando co-cristalizado. Este paso previo fue necesario para validar la metodología utilizada para el estudio de interacción molecular de los ligandos BPs no comerciales con la hFPPS mediante el docking molecular.

Los resultados mostraron que las poses de los ligandos (cristalizado y dockeado) adoptaron una conformación muy similar **(Figura 19 A)**, exponiendo un valor de desviación cuadrática

media de las coordenadas (RMSD) menor a 2 Å. Este valor indica que el método empleado posee un error mínimo, por lo tanto, apoya el método para ser empleado con los ligandos BPs. Adicionalmente, mediante la observación de las estructuras tridimensionales de los complejos en el programa UCS Chimera, se determinó que las interacciones del ligando con los aminoácidos en el sitio activo de la hFPPS y los grupos fosfato se ubican de la misma forma e interaccionan con los iones Mg^{2+} **(Figura 19 B)**. Los resultados del ligando co-cristalizado (PNP-BPs) para esta evaluación tuvo una energía de unión de -11,57 kcal/mol, este resultado está dentro del rango reportado para la energía de unión del complejo co-cristalizado por Park *et al*., (2017), (**Tabla 7**).

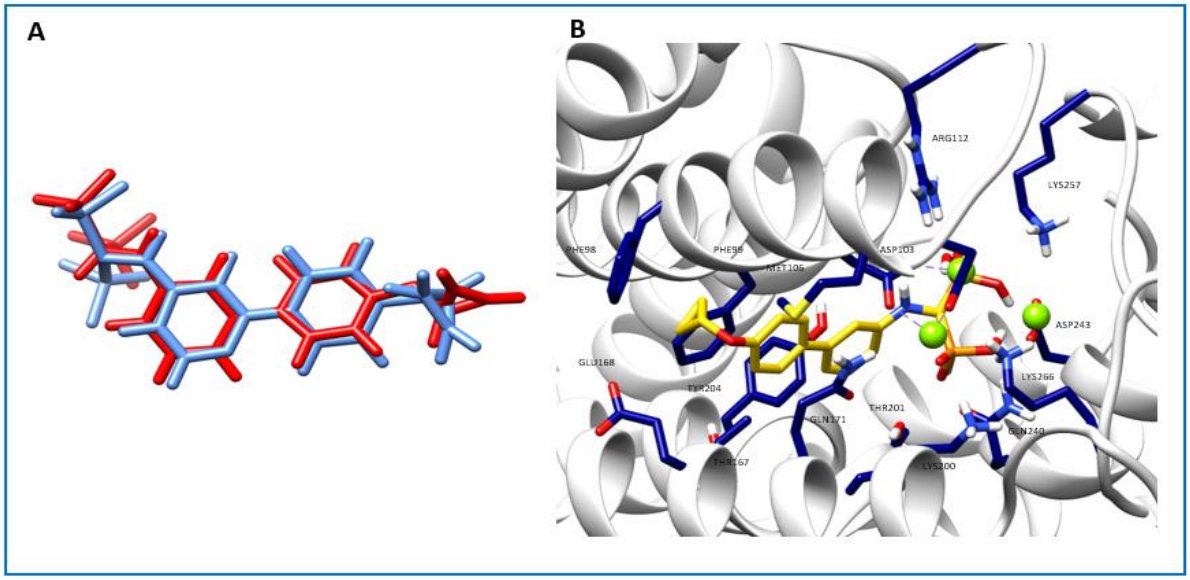


Figura 19. Validación de los parámetros del docking molecular para el análisis *in silico* de la enzima hFPPS co-cristralizada. Se validaron los parámetros establecidos de las simulaciones de docking molecular realizando una superposición de poses del ligando cristalizado (rojo) y dockeado (azul); el RMSD calculado fue menor a 2. (A) Superposición de los ligandos. (B) Estructura 3D del complejo más estable de la enzima hFPPS (PDB ID: 4NFI) con los bisfosfonatos establecido por docking molecular. Ligando (amarillo), aminoácidos que están interactuando con el ligando (azul), iones de Mg^{2+} (esferas de color verde). Las estructuras de los ligandos y los complejos fueron visualizadas utilizando el programa UCSF Chimera.

Las estructuras tridimensionales de los ligandos BPs no comerciales se dibujaron y se optimizaron utilizando el programa Avogadro (**Figura 17**). Posteriormente, se evaluaron las afinidades de unión de estos ligandos por la enzima hFPPS.

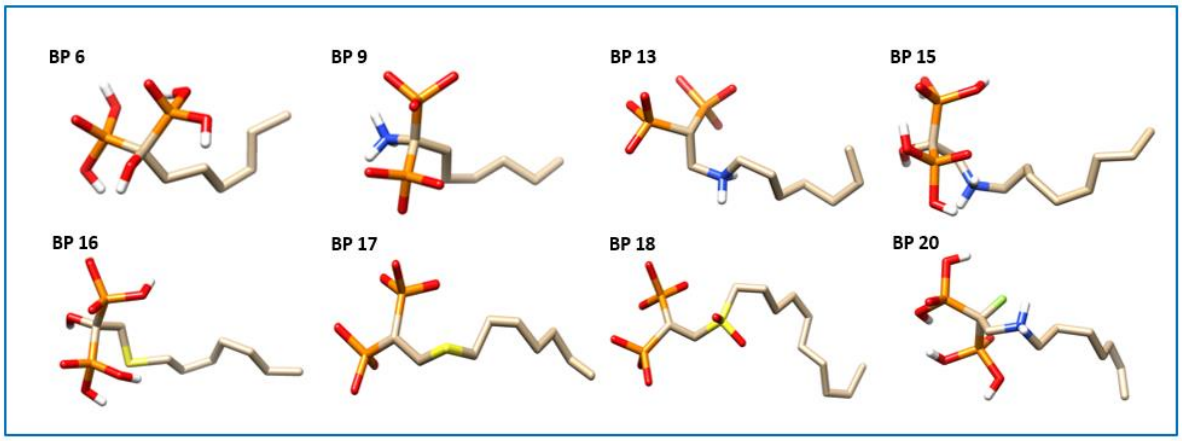


Figura 20. Bisfosfonatos inhibidores de la hFPPS. Estructuras tridimensionales de los ligandos BPs dibujadas y optimizadas con Avogadro. Los valores de CE_{50} son reportados en el *ítem* 1.4 (Resultados-**Tabla 6**).

Los resultados del docking molecular determinaron que los ligandos **BP 18**, como principal, seguido de **BP 17**, y en menor medida **BP 13** mostraron afinidades altas por hFPPS, exhibiendo energías de unión de -11,27; -10,23 y -8,73 kcal/mol, respectivamente. Adicionalmente, se evaluó la afinidad de **ZA** por la hFPPS, esta interacción presentó una energía de unión de -7,59 kcal/mol (**Tabla 7**).

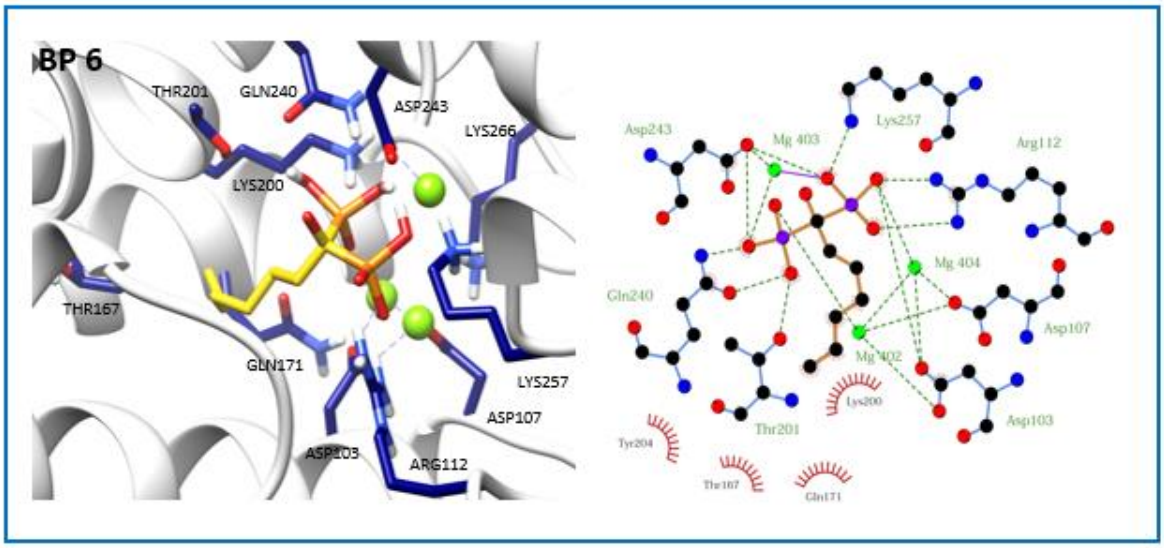
Las estructuras 3D de los complejos formados por la hFPPS y cada uno de los ligandos BPs no comerciales, se observa que se posicionan en el sitio catalítico de la enzima. La cavidad catalítica de la enzima está delimitada por motivos ricos en ácido aspártico (^{103}DDIMD^{107} y ^{243}DDYLD^{247}), estos motivos son esenciales para la unión del sustrato (ej: DMAPP y IPP), además están conservados a través de todos los homólogos de la FPPS. La unión del sustrato requiere la presencia de iones Mg^{2+} los cuales van a mediar las interacciones electrostáticas entre los grupos cargados negativamente (Asp243, Asp103, Asp107, Asp105). Los residuos cargados positivamente Asp112, Lys200 y Lys257, también son conservados y participan directamente en la unión formando puentes de sal con el sustrato pirofosfato (**Figura 16** y **18**).

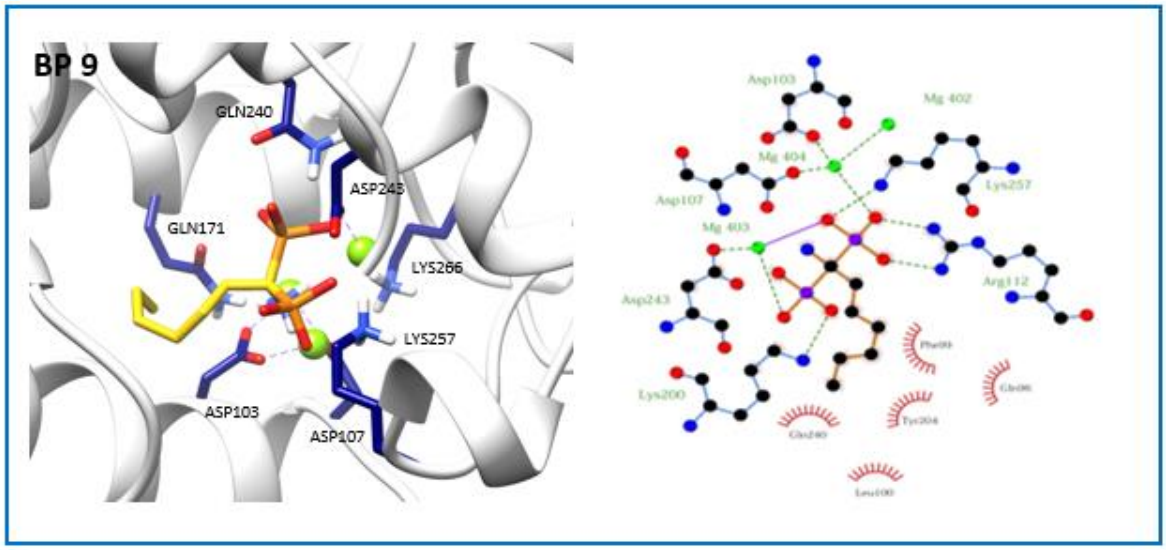
Complejos		Energía de unión (Kcal/mol)
	Ligando co-cristalizado (re-docking)	**-11,57**
	Ácido zoledrónico (Inhibidor comercial)	-7,59
	BP 6	-7,72
	BP 9	-8,17
	BP 13	**-8,73**
	BP 15	-6,65
	BP 16	-8,61
	BP 17	**-10,23**
	BP 18	**-11,27**
	BP 20	-8,21

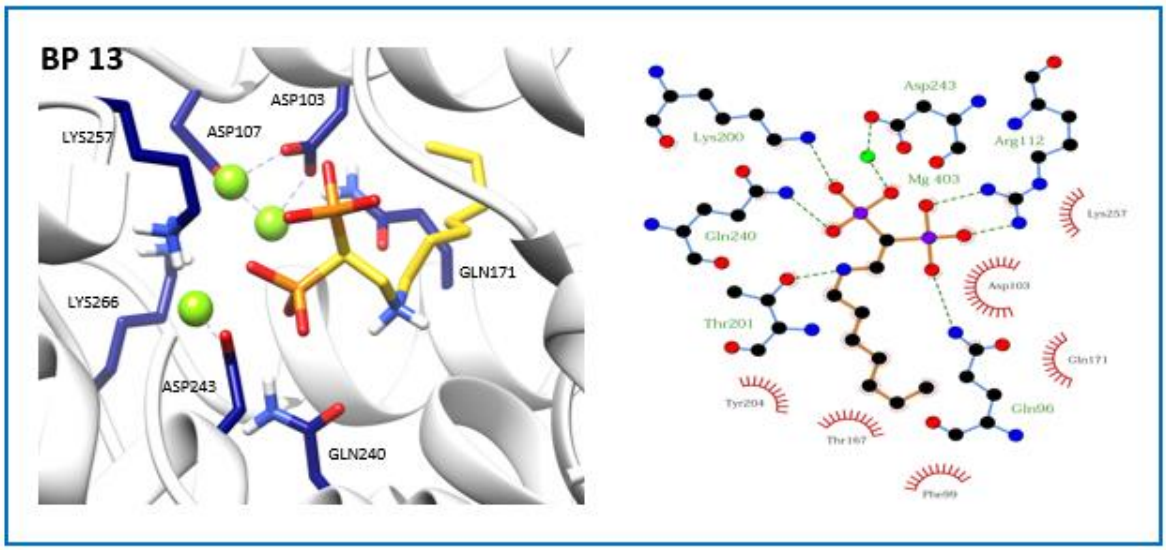
Tabla 7. Energía de unión de la enzima hFPPS con los BPs no comerciales (receptor-ligando).

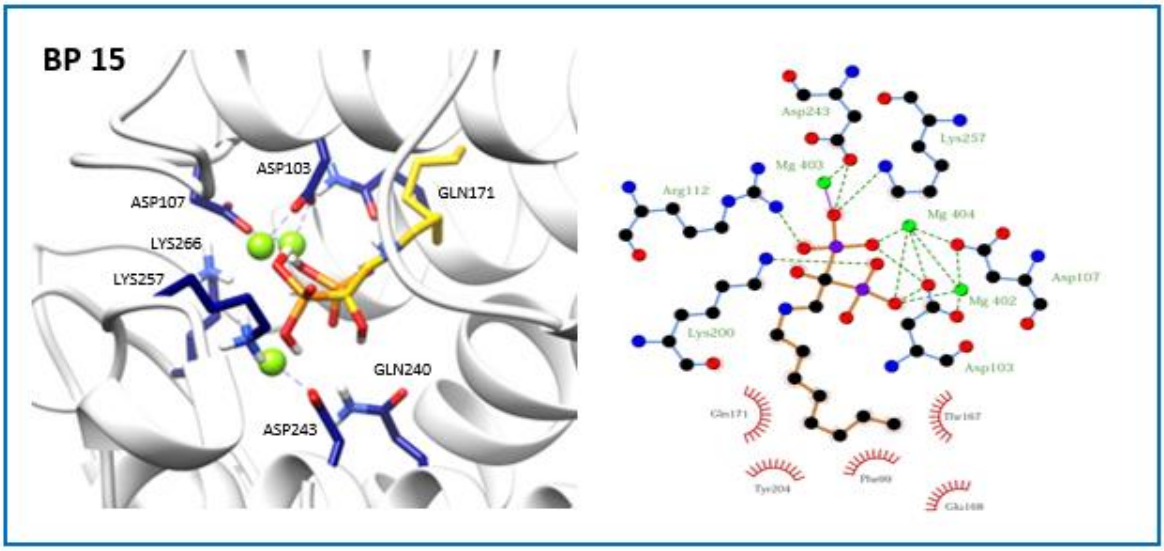
Las interacciones de los ligandos BPs no comerciales que presentaron mayores energías de unión a la enzima hFPPS a través de los grupos fosfato son: el ligando **BP 13** que interacciona principalmente a través de puentes de hidrógeno con Gln 96, Arg 112, Lys 200, Gln240 y el grupo R2 interacciona con Thr 201. El grupo R2 y el grupo fosfato de **BP 17** interacciona con Arg 60, Arg 112, Asp 243 y Gln 96 mediante puentes de hidrógeno. Por otro lado, el grupo R2 de **BP 18** interactúa con Lys 257, Gln 240, Asp243, Lys 200 y Arg 112 mediante puentes de hidrógeno (**Figura 19**).

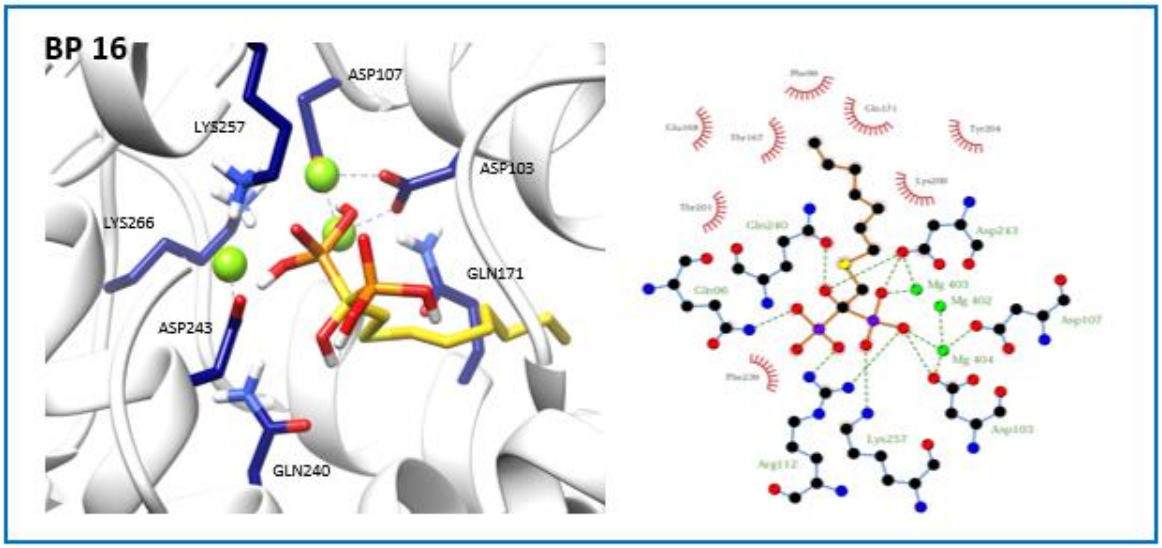
El otro tipo de interacciones de los ligandos con en el centro catalítico de la hFPPS se detallan en el pie de la **Figura 19**. Para resaltar, estos BPs no son como los BPs tradicionales que contiene átomos de nitrógenos (N) en el C1, sino que han sido modificados para observar si los cambios generados en la estructura podrían mejorar las condiciones de afinidad hacia la hFPPS. Por otro lado, **BP 17** y **BP 18** tienen un átomo de azufre (S) en el C3, y sólo **BP 13** tiene un átomo de N en el C3. Por lo tanto, se puede concluir que estos cambios estructurales resultaron fundamentales para aumentar la afinidad de estos ligandos hacia a enzima hFPPS. Además, estos resultados son congruentes con los resultados de la evaluación biológica frente a la infección con el arenavirus JUNV, debido a que estos BPs son los que tuvieron mayor actividad antiviral contra JUNV.

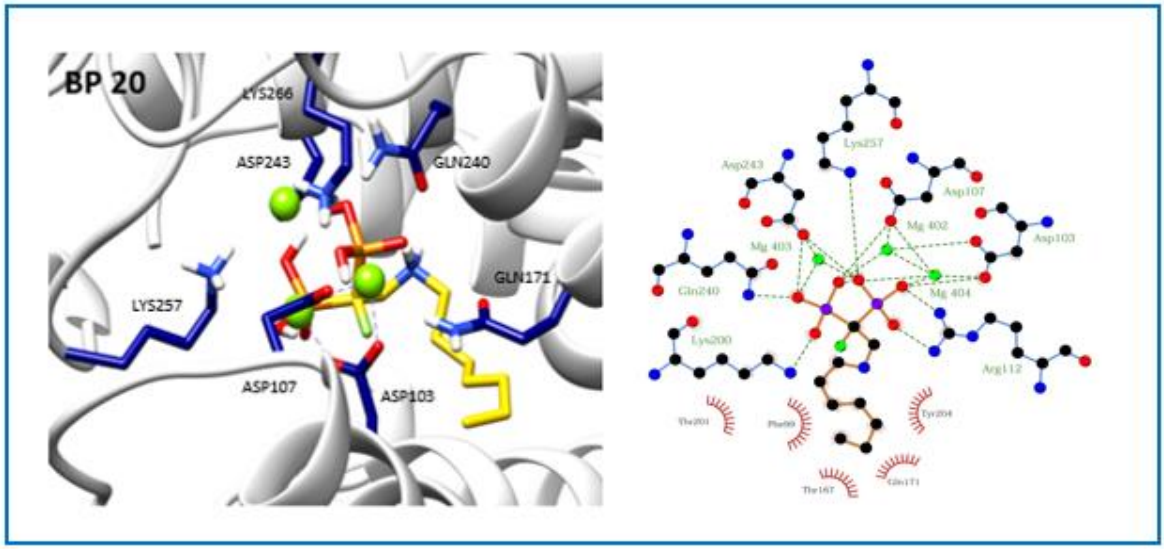

BP 6
THR201
GLN240
ASP243
LYS266
LYS200
THR167
GLN171
LYS257
ASP107
ASP103
ARG112
Asp243
Mg 403
Lys257
Arg112
Mg 404
Gln240
Asp107
Mg 402
Lys200
Thr201
Asp103
Tyr204
Thr167
Gln171


BP 9
GLN240
ASP243
GLN171
LYS266
LYS257
ASP103
ASP107
Asp103
Mg 402
Mg 404
Lys257
Asp107
Mg 403
Arg112
Asp243
Lys200


BP 13
ASP103
ASP107
LYS257
GLN171
LYS266
ASP243
GLN240
Asp243
Lys200
Arg112
Mg 403
Lys257
Gln240
Asp103
Thr201
Gln171
Tyr204
Gln96
Thr167
Phe99


BP 15
ASP103
ASP107
GLN171
LYS266
LYS257
GLN240
ASP243
Asp243
Lys257
Mg 403
Arg112
Mg 404
Asp107
Mg 402
Lys200
Asp103
Gln171
Thr167
Tyr204
Phe99
Glu168


BP 16
ASP107
LYS257
ASP103
LYS266
GLN171
ASP243
GLN240
Mg 403
Mg 402
Mg 404
Asp107
Asp103
Lys257
Arg112


BP 20
LYS266
ASP243
GLN240
GLN171
LYS257
ASP107
ASP103
Lys257
Asp243
Asp107
Mg 402
Asp103
Mg 403
Gln240
Mg 404
Lys200
Arg112
Tyr204
Phe99
Thr167
Gln171

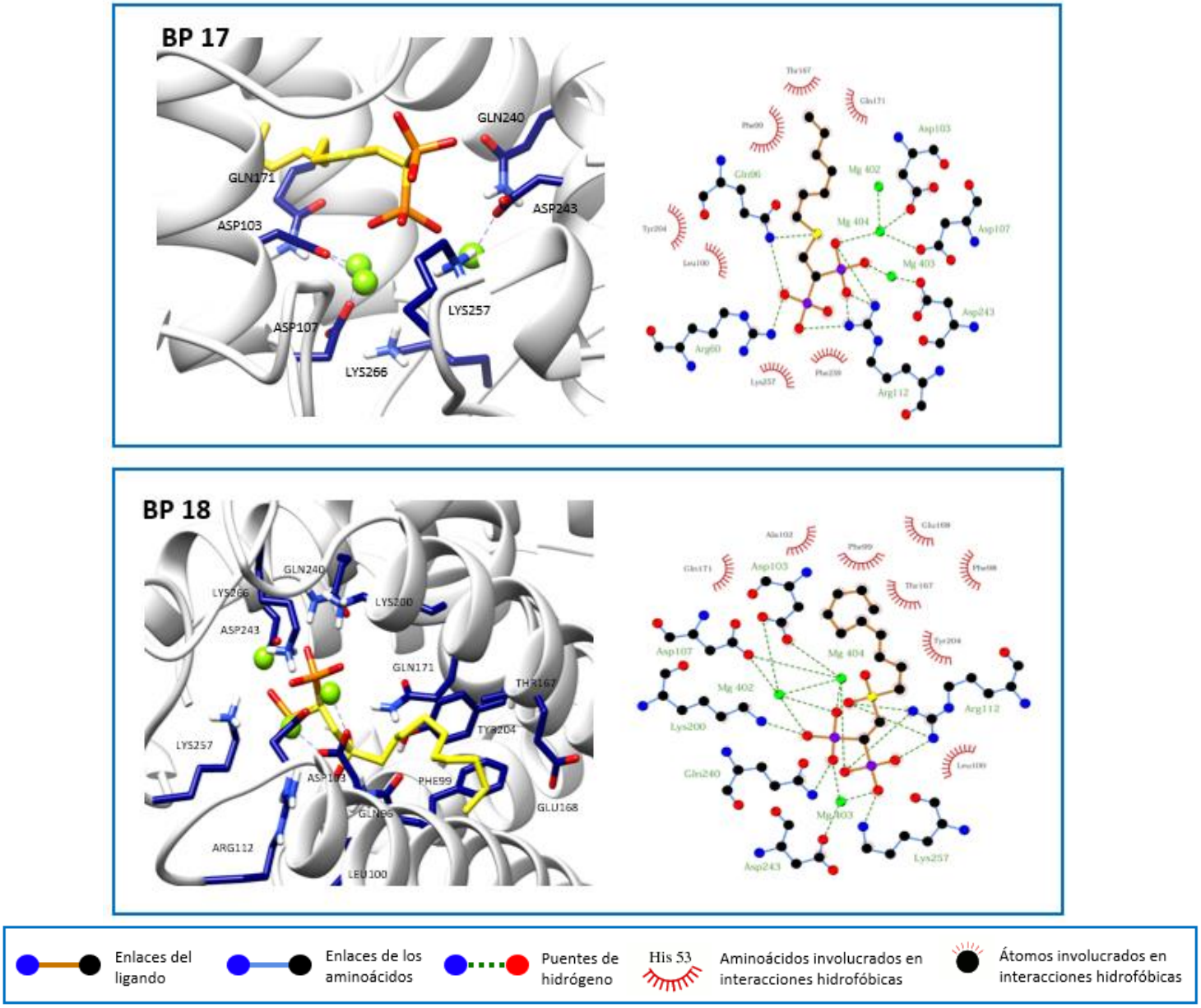


Figura 21. Interacciones moleculares entre la enzima hFPPS y los ligandos bisfosfonatos. La conformación de los complejos a través de docking molecular de hFPPS **(PDB ID: 4NFI)** y los ligandos bisfosfonatos están representados por las figuras 3D y 2D en cada recuadro (azul). Molécula **BP 6**; molécula **BP 9**; molécula **BP 13**; molécula **BP 15**; molécula **BP 16**; molécula **BP 20;** molécula **BP 17** y molécula **BP 18**. La proteína se encuentra representada en forma de cintas color gris, los residuos que interactúan con los ligandos en color azul, y los iones de Mg^{2+} como esferas verdes. Se utilizó UCSF Chimera para visualizar las figuras 3D y LigPlot para visualizar las figuras 2D. Al final de las figuras, la representación de todos los tipos de enlace que están mediando la interacción entre la proteína hFPPS y los ligandos (referencias de LigPlot).

CAPITULO I. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El metabolismo lipídico representa un eje biosintético de gran importancia para la célula. La síntesis de los lípidos que conforman la membrana celular se regula a través de la vía MVA. Como se mencionó en la *Introducción* en esta vía la enzima **FPPS** es clave en dos pasos catalíticos y, es blanco de inhibidores bien caracterizados y empleados en la clínica para tratar ciertas enfermedades relacionadas con la resorción del calcio en los huesos.

Los BPs son inhibidores de la **FPPS**, y han tenido aplicaciones terapéuticas para enfermedades asociadas con la reabsorción del calcio y varios tipos de cáncer. La mayoría de lo BPs tienen un efecto directo sobre la **hFPPS**, otros tienen como blanco enzimas **FPPS** homólogas en otros organismos tales como parásitos protozoarios e insectos. Los BPs son análogos químicamente estables de fosfatos y pirofosfatos, que actúan emulando a los sustratos que intervienen en la vía del MVA y contienen restos de pirofosfatos.

En primer lugar, se analizó el efecto del bisfosfonato comercial **ZA** sobre células Vero y A549. Las células Vero son derivadas de riñón de mono verde africano, y han sido usadas principalmente como una línea celular modelo para la caracterización de toxicidad a una amplia variedad de compuestos incluyendo veneno de serpientes, micotoxinas y oxalato de calcio (Romero *et al*., 2004; Girón *et al*., 2018; Ruíz *et al*., 2011; Xin-Yuan *et al*., 2015; Xin-Yuan *et al*., 2017). Esta línea es también utilizada en la producción de vacunas y principalmente se utiliza en estudios de replicación vírica (Jinghua *et al*., 2022). Las células A549 son derivadas de cáncer de pulmón humano, y son usadas especialmente para estudiar la función de los alveolos pulmonares, infecciones virales y evaluación preclínica de medicamentos (Ozturk *et al*., 2007). En los resultados del ensayo de MTT se refleja un efecto citotóxico dependiente de la dosis de **ZA**, con una CC_{50} = 49,68 y 22,78 µM en las células Vero y A549 respectivamente. Las diferencias tanto de origen celular como de especie podrían atribuirse a su variación en la sensibilidad hacia **ZA**.

Por otro lado, Singureesu *et al*., (2018) reportaron valores de CC_{50} para **ZA** en la línea Vero de 7,41 µM en ensayos de viabilidad celular durante 24 h. Ozturk *et al*., (2007) reportaron 50 % de citotoxicidad a una concentración de 100 µM de **ZA** en la línea celular A549 durante 72 h. Si comparamos estos resultados de CC_{50} con los valores que se obtuvieron en nuestro trabajo, observamos que no son valores similares. Estas diferencias podrían deberse al tiempo de tratamiento en cada caso y otros factores sensibles como la confluencia celular.

El tratamiento con **ZA** presentó actividad antiviral frente JUNV con una concentración CE_{50} >25 µM en la línea celular Vero; mientras que el efecto antiviral de **ZA** en células A549 presentó una CE_{50} <1,5 µM. Teniendo en cuenta estos resultados, este bisfosfonato fue

mucho más efectivo en las células A549, aunque como se mencionó el rango no-citotóxico resultó ser acotado. En otros reportes **ZA** también presentó un efecto antiviral frente al virus de la hepatitis C (HCV) (Agrati *et al*., 2006), virus del Nilo Occidental (WNV) (Agrati *et al*., 2016), y virus influenza A (IAV) con una CE_{50} de 54,88 µM (Hue *et al.,* 2015).

Se observaron diferencias significativas cuando se comparó el (%) porcentaje de células positivas (GPC/GP1 y NP) en el control viral (células infectadas sin tratar) respecto al tratamiento con **ZA** (células infectadas y tratadas). Este experimento se realizó con el objetivo de observar el efecto del bisfosfonato **ZA** sobre el número de células expresando antígenos virales (GPC/GP1 y NP). De acuerdo a este análisis se observó una disminución significativa del número de células infectadas en presencia de **ZA**. Estos resultados se correlacionan con los resultados obtenidos de inhibición del rendimiento de JUNV por parte de **ZA** (**Figura 12-14**).

Los N-BPs, como el **ZA,** tienen como blanco de acción a la proteína **FPPS**. Al inhibir la función enzimática se inhibe la prenilación de proteínas GTPasa y a su vez la acumulación de IPP intracelular funciona como un fosfoantígeno que activa células T gamma-delta (γδ) que pueden a su vez desencadenar apoptosis en células tumorales (Morita *et al*., 2007; Li *et al*., 2009; Wang *et al*., 2011). Por lo tanto, la activación de células T γδ por los N-BPs se correlaciona especialmente con la inhibición de la enzima **FPPS** humana provocando apoptosis (Zhang *et al*., 2010). Este mecanismo ha sido ampliamente estudiado como terapia en pacientes con mieloma múltiple (Kunzmann *et al*., 1999); cáncer de próstata (Naoe *et al*., 2010); en un modelo animal para cáncer de mama (Benzaïd *et al*., 2012); también como mecanismo de inhibición viral frente a HCV (Agrati *et al*., 2006), HIV (Poccia *et al*., 1999); virus influenza (Zheng *et al*., 2015).

En este capítulo determinamos que el rango de concentraciones no citotóxicas para **ZA** fue acotado y su toxicidad en A549 particularmente alta. Podríamos atribuir este efecto, como se mencionó en el párrafo anterior, a la inducción de apoptosis por parte de **ZA** en las dos líneas celulares y teniendo en cuenta el mecanismo de los N-BPs en otros modelos celulares, como las células del sistema inmune. Sin embargo, estos resultados nos demostraron que el blanco estudiado era relevante para el ciclo de multiplicación de JUNV y nos alentó a continuar con otros BPs disponibles.

Los BPs son compuestos que presentan una formula general **(Figura 8-1)** y están relacionados estructuralmente a pirofosfato inorgánico **(Figura 8-2),** con la particularidad de que el oxígeno puente entre los átomos de fósforo está reemplazado por un grupo

metilo. Este reemplazo les confiere a los BPs una gran estabilidad metabólica ya que no son hidrolizados por pirofosfatasas y son estables a la hidrólisis en medio ácido. Los BPs empleados en la clínica como tratamiento para trastornos óseos, también han sido estudiados como inhibidores de la proliferación de parásitos intracelulares como *Tripanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii* en ensayos *in vitro* e *in vivo* sin toxicidad para las células hospedadora de estos parásitos. Los N-BPs como pamidronato, risedronato o zoledronato inhiben la actividad enzimática de **FPPS** en plantas (Cromartie *et al*., 1999). Estudios de modelado molecular sugieren que los N-BPs actuarían como análogos carbocatiónicos del estado de transición en la biosíntesis de isoprenoides (Martin *et al*., 1999).

Debido a las propiedades que le confiere el átomo de nitrógeno a los BPs, los investigadores del laboratorio de Química Orgánica-FCEN-UBA, liderado por el Dr. Sergio Szajnman sintetizaron una serie de ácidos bisfosfónicos que no poseían átomos de nitrógeno en su estructura. Esta síntesis se propuso con la intención de estudiar la influencia del átomo de nitrógeno en la actividad biológica, y fue realizada, a partir de ácidos grasos comerciales como productos de partida asequibles e interesantes porque imitarían las cadenas isoprénicas. La estructura química de estos BPs se confirmó principalmente por resonancia magnética nuclear (RMN), (Szajnman *et al*. 2001; Galaka *et al*., 2019). También evaluaron su actividad biológica contra el crecimiento de *T. cruzi* y *T. gondii;* conforme a los resultados promisorios por parte de este grupo, y por la forma en que opera la MVA en estos parásitos intracelulares, nosotros decidimos evaluar un grupo de moléculas BPs no comerciales frente a JUNV y comparamos su eficacia con el bisfosfonato comercial **ZA**.

Al evaluar la citotoxicidad de ocho BPs no comerciales frente a la línea celular Vero, observamos resultados muy similares (**Tabla 5**). La viabilidad celular estuvo alrededor del 70%- 90% en la concentración 50 µM para este grupo de BPs. La viabilidad en células Vero después de las 48 h de tratamiento con los BPs no comerciales, presentó valores de CC_{50} que estuvieron entre 55,54 µM para el **BP 15** y 152,6 µM para **BP 18** (**Tabla 5**). Sin embargo, las células Vero no tuvieron cambios en su morfología al momento de las observaciones al microscopio a las 48 h y antes de realizar el ensayo de MTT. La citotoxicidad de los BPs no comerciales fue evaluada por Recher *et al*., (2013), en células humanas TERT en un rango de concentraciones de 1,56 a 25 µM. No encontraron evidencia de citotoxicidad en las células incluso en la concentración más alta evaluada (25 µM), durante 72 y 96 h. Por otro lado, la citotoxicidad de estos BPs no comerciales también fue evaluada sobre células Vero. Bajo las mismas condiciones experimentales antes dichas de tratamiento, estos BPs no

presentaron citotoxicidad en ninguna de las concentraciones ensayadas (Galaka *et al*., 2019).

Teniendo presente los resultados de viabilidad celular en la línea Vero en presencia de los BPs no comerciales, se decidió evaluar la capacidad inhibitoria de este grupo de BPs frente a JUNV (**Figura 16 y 17**). El efecto frente a JUNV durante 48 h de tratamiento con **BP 9** fue del 90 % de inhibición en la concentración de 50 µM, con un IS de 18,72. Otra de las moléculas con un efecto eficaz fue **BP 13** con una inhibición de 90,3% y un IS de 19,91. Asimismo, la inhibición viral obtenida luego del tratamiento con **BP 17** fue del 91,3%, con un IS de 11,29, cuando la viabilidad celular fue del 71%; por lo que este compuesto fue menos selectivo que **BP 13**. Por último, **BP 18** tuvo la capacidad de inhibir la replicación viral en un 97 % cuando la vialidad de las células Vero se mantuvo por encima del 80%, teniendo entonces un IS de 42,88. Por consiguiente, esta molécula presentó el mayor efecto antiviral comparado con el resto de los BPs no comerciales. Los resultados obtenidos por parte de estas moléculas respecto a su capacidad antiparasitaria contra *T. cruzi* y *T. gondii* fueron los siguientes: **BP9** fue eficaz contra *T. cruzi* con una CE_{50} de 77 µM; por el contrario, **BP 13** fue un inhibidor potente contra la actividad enzimática y contra *T. cruzi* con una CE_{50} de 10 µM y para *T. gondii* una $CE_{50} \geq 50$ µM (Szajnman *et al*., 2012). Cerrando la discusión con el grupo de los bisfosfonatos, **BP 17** es parte de los BPs lineales que contienen azufre en su estructura. Esta molécula al igual que **BP 16** presentó un efecto anti-toxoplasma con CE_{50} de 1,8 µM. Al evaluar el efecto de esta misma molécula para *T. cruzi* se estimó una $CE_{50} \geq 20$ µM (Recher *et al*., 2013). De los derivados que contienen azufre, **BP 18** exhibió una potente actividad *in vitro* contra *T. gondii* ($CE_{50} = 0,1$ µM); este compuesto también tuvo una eficaz actividad antiparasitaria *in vivo* con una dosis efectiva 50 (DE_{50}) de 0,02 mg/kg en ratones infectados con toxoplasmosis con una cepa hipervirulenta RH de *T. gondii* (Szajnman *et al*., 2017). Cabe mencionar que **BP 18** no mostró ser un inhibidor eficaz frente a *T. cruzi* (Galaka *et al*., 2019). De este modo, diversos autores demostraron que estos bisfosfonatos no comerciales mostraron en la mayoría de los casos ser inhibidores efectivos frente a la actividad de parásitos intracelulares, entre ellos *T. cruzi* y *T. gondii*. Además, de ser potentes inhibidores de la actividad enzimática frente a las enzimas blanco de TcFFPS y TgFPPS de estos parásitos.

Hasta aquí, en este capítulo se demuestra la actividad antiviral *in vitro* de los BPs no comerciales y **ZA** contra JUNV. Uno de los criterios más usados para considerar la efectividad de un antiviral, es la obtención de un valor de índice de selectividad igual o mayor a 10. En este caso **BP 9**, **BP 13**, **BP 17** y **BP 18** presentaron valores mayores (**Tabla**

6). Teniendo presente estos resultados y el mecanismo de inhibición de los BPs antes descripto, se confirmó que estas moléculas carecen de un efecto inactivante directo frente a las partículas de JUNV (**Figura 18**). Por lo cual, esto nos indica que la acción que ejercen los BPs no comerciales y **ZA**, es sobre alguna etapa del ciclo de multiplicación viral y no sobre la partícula viral.

Muchos estudios de modelado molecular sugieren que los N-BPs actuarían como análogos carbocatiónicos del estado de transición en la biosíntesis de isoprenoides (Martin *et al*., 1999). Los grupos bisfosfonatos fueron originalmente diseñados para simular la estructura química de los pirofosfatos, y requieren de la coordinación con los átomos de Mg^{2+} presentes en el sitio activo de la enzima. Mientras que el átomo de nitrógeno cargado actuaría mimetizando al carbocatión en el estado de transición. La evaluación *in silico* desarrollada en este capítulo nos permitió de forma teórica predecir las energías de unión de los BPs no comerciales en el sitio activo de la enzima **hFPPS**. Los valores calculados con este abordaje están en consonancia con las mayores actividades antivirales anti-JUNV encontradas (**BP18**). Por otro lado, estos análisis predictivos demuestran ser una herramienta útil para abordar posibles candidatos en estudios *in vitro* de nuevas moléculas con características estructurales que puedan actuar inhibiendo la función de factores celulares importantes para la replicación de muchos virus.

Estos datos promisorios nos llevaron a estudiar la etapa del ciclo de multiplicación donde estos compuestos ejercerían su acción antiviral.

CAPITULO II. EFECTO DE LOS BISFOSFONATOS SOBRE EL CICLO DE MULTIPLICACIÓN VIRAL

CAPITULO II. Efecto de los bisfosfonatos sobre el ciclo de replicación viral

Con el objetivo de profundizar sobre la etapa en la que estos compuestos estarían afectando la multiplicación de JUNV, se realizaron ensayos para evaluar la expresión de proteínas virales en presencia de tratamiento, el impacto sobre la función fusogénica de la proteína GP2 de JUNV, la eficiencia de brotación de partículas similares a virus (VLPs) en presencia de compuesto y, el efecto de la adición de compuesto en diferentes tiempos p.i.

1. Expresión de proteínas virales

Con la finalidad de investigar con mayor profundidad el modo de acción antiviral de los BPs no comerciales, se decidió continuar los estudios sólo con el compuesto que exhibió mayor eficacia. Con un 97 % de inhibición viral y IS de 42,88 se continuó los ensayos experimentales con el compuesto **BP 18.**

1.1 Expresión del antígeno GPC/GP1 de JUNV en presencia de BP 18 en células infectadas.

Se estudió el efecto del **BP 18** durante la multiplicación de JUNV analizando las monocapas infectadas y tratadas mediante inmunofluorescencia**.** Se determinó el número de células positivas para GPC/GP1 en células Vero infectadas (m.i. = 0,1) y tratadas con **BP 18** (50 µM) durante 24 h.p.i. Las células se fijaron luego del tratamiento, se procesaron para IFI y se tomaron imágenes de microscopia confocal para la cuantificación.

Las imágenes representativas de la expresión del antígeno GPC/GP1 de JUNV en células infectadas, tratadas y sin tratar, se observan en la **Figura 22 A**. Adicionalmente a la marcación del antígeno viral se utilizó DAPI, para identificar los núcleos, y la lectina WGA para delinear la estructura celular. Como se puede observar el patrón de proteína viral es tanto citoplasmático como asociado a membrana y es comparable en ambas condiciones. También se observan las células positivas en grupos o focos de infección. En algunas células infectadas y tratadas con **BP 18** observamos un patrón más intenso en membrana, formando zonas o parches.

A continuación, se cuantificaron las células positivas para GPC/GP1 cada 1000 núcleos (DAPI) y se analizó como se indica en *Materiales y Métodos*. El número de células expresando antígeno viral JUNV (en este caso GPC/GP1) es representativo del número de células infectadas. Como se muestra en la **Figura 22 B**, hay un 49 $\pm$ 13 % de células positivas

en el control, mientras que en presencia de **BP 18** el número de células GPC/GP1 (+) es del 13 ± 9 %. Esto significa una disminución del 73,5 % al relativizar al grupo control (sin **BP 18**).

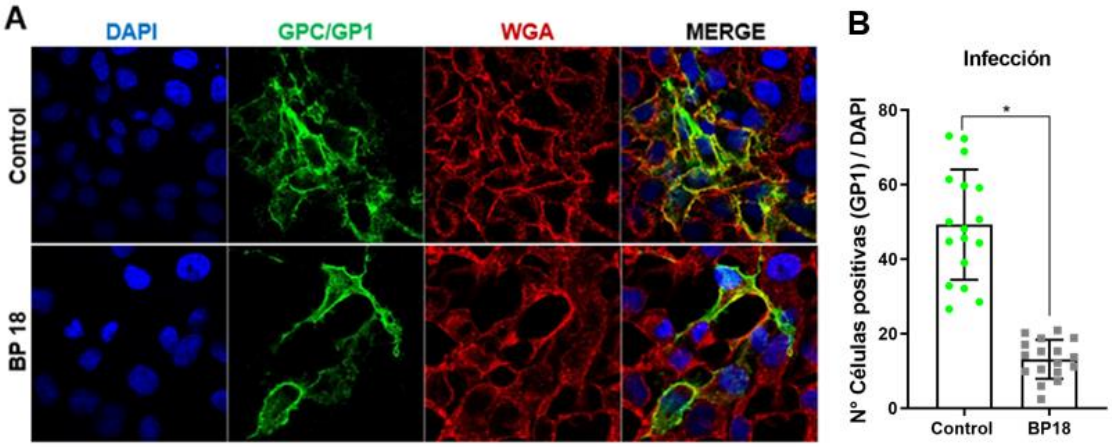


Figura 22. Cuantificación del número de células positivas para GPC/GP1 en células infectadas y tratadas con BP18. Monocapas de células Vero fueron infectadas con JUNV (m.i. = 0,1). Se analizó por IFI la expresión del antígeno GPC/GP1 en cultivos tratados con BP 18 y no tratado (A). Se analizaron 18 campos al azar para los dos experimentos y las cuantificaciones se relativizaron a 1000 núcleos. (B) Los datos presentan una distribución normal con un test *Shapiro-Wilk*, se utilizó un *t-test* para datos no pareados (*P<0,05). Los valores se reportan como la media ± *DE* y los asteriscos (*) indican diferencias significativas.

1.2 Expresión del antígeno viral Z de JUNV en presencia de BP 18 en células infectadas.

Continuando con el estudio del efecto de **BP 18** sobre la expresión de antígenos virales, estudiamos la expresión del antígeno Z en células infectadas con JUNV y tratadas con el bisfosfonato **BP 18.** En la **Figura 23 A** se muestran las imágenes de microscopia y se observa, en ambas condiciones, una localización cortical típica de Z y a lo largo de la cara interna de la membrana plasmática, tal como ha sido descrito en bibliografía (Borio *et al*., 2012). Sin embargo, también se puede observar que las células infectadas y tratadas con **BP 18** presentan extensiones membranosas positivas para Z y con morfologías esféricas, similares a burbujas. Cuando se cuantificó en número de células Z (+) cada 1000 núcleos (DAPI), se observó que el control presenta un 17 ± 5 % de positividad mientras que en presencia de **BP 18** es de 11 ± 3 %. Esto representaría una disminución del 36 % en las células tratadas con **BP 18**, comparado con células infectadas que no recibieron el tratamiento (**Figura 23 B**).

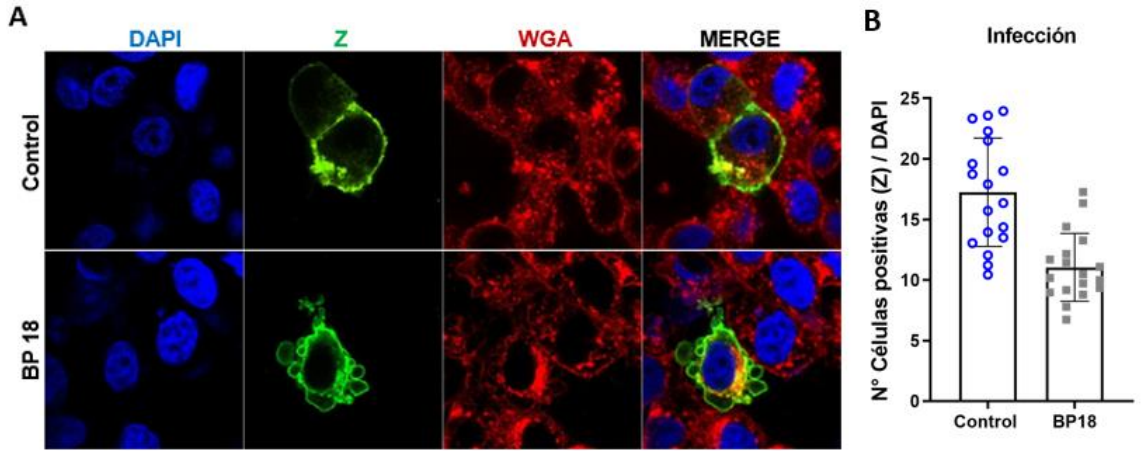


Figura 23. Cuantificación del número de células positivas para Z en células infectadas y tratadas con BP18. Monocapas de células Vero fueron infectadas con JUNV (m.i. = 0,1). Se analizó por IFI la expresión del antígeno Z en cultivos tratados con BP 18 y no tratados (A). Se analizaron 18 campos al azar para los dos experimentos y las cuantificaciones se relativizaron a 1000 núcleos. (B) Los datos presentan una distribución normal con un test *Shapiro-Wilk*, se utilizó un *t-test* para datos no pareados (no hay diferencias significativas). Los valores se reportan como la media ± *DE*.

1.3 Expresión del antígeno viral NP de JUNV en presencia de BP 18 en células infectadas.

Otro de los antígenos virales en el que nos enfocamos para evaluar el efecto del bisfosfonato **BP 18** fue la NP de JUNV. La **Figura 24 A** muestra imágenes de la marcación con anticuerpos específicos para NP y los canales de DAPI y WGA, como se realizó anteriormente. Como se observa en la **Figura 24 B,** el número de células NP (+) en células infectadas (cada 1000 núcleos) fue de 128 ± 12 % mientras que en presencia de **BP 18** el número de células NP (+) es de 97 ± 15 %. Esto nos indica un 23,4 % de disminución de positividad en presencia de **BP 18**.

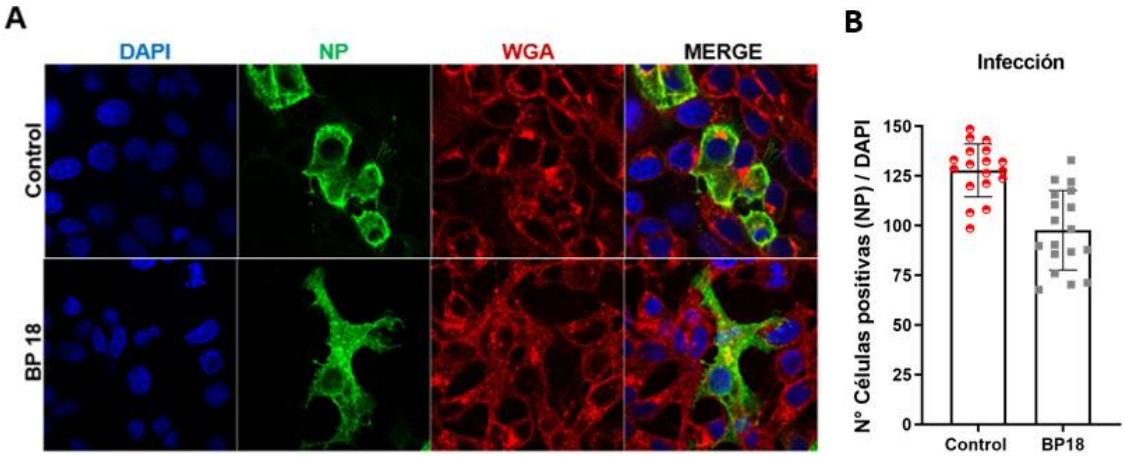


Figura 24. Cuantificación del número de células positivas para la expresión de la proteína viral NP de JUNV en células infectadas. Monocapas de células Vero fueron infectadas con JUNV (m.i. = 0,1). Se analizó por IFI la expresión del antígeno NP en cultivos tratados con BP 18 y no tratados (A). Se analizaron 18 campos al azar para los dos experimentos y las cuantificaciones se relativizaron a 1000 núcleos. (B) Los datos presentan una distribución normal con un test *Shapiro-Wilk*, se utilizó un *t-test* para datos no pareados (no hay diferencias significativas). Los valores se reportan como la media ± *DE*.

1.4 Expresión del antígeno GPC/GP1 de JUNV en presencia de BP1 8 en células transfectadas.

A continuación se estudio el efecto del **BP 18** sobre la expresión de las proteinas virales expresadas individualmente. Para ello las celulas células Vero se transfectaron con el plásmido pcDNA 3.1 GPC-myc, capaz de expresar el precursor glicoproteico de JUNV. Las monocapas transfectadas y tratadas con **BP 18** (50 µM) durante 24 h.p.t., se fijaron y procesaron para IFI. Se utilizó el mismo anticuerpo utilzado para marcar GPC/GP1 en los experimentos con células infectadas. De igual forma que en la **Figura 22** se marcaron los núcleos con DAPI y el cuerpo celular con WGA. En la **Figura 25 A** se muestran imágenes de microscopia confocal correspondientes a este ensayo y se observa un patrón similar de marcación en ambas condiciones. Con base a las imágenes se cuantificaron las células positivas por campo, se relativizaron a 1000 DAPI, se graficaron y se muestran a la derecha de las imágenes (**Figura 25 B**). El número de células GPC/GP1 (+) en células transfectadas (cada 1000 núcleos) fue 67 ± 13 % mientras que en presencia de **BP 18** fue 38 ± 9 %. Esto nos indica un 41 % de disminución de positividad en presencia de **BP 18**.

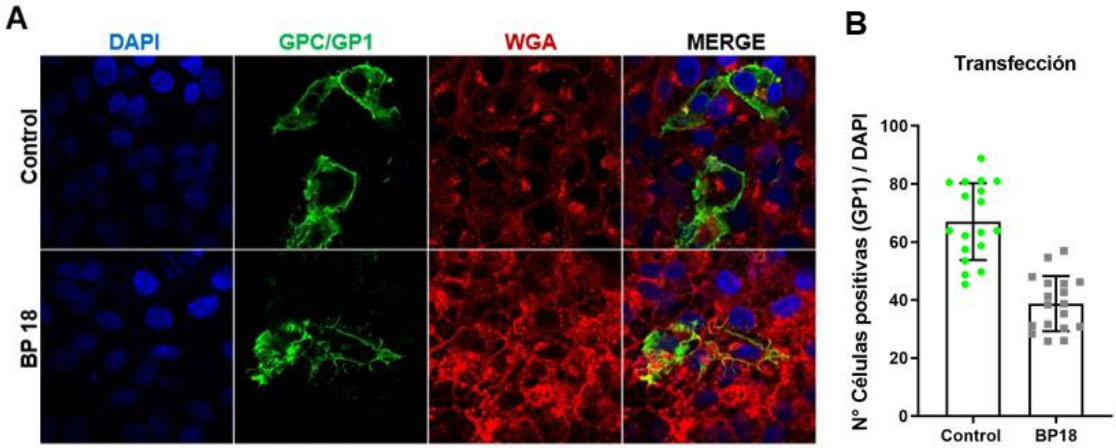


Figura 25. Cuantificación del número de células positivas para la expresión de la proteína viral GPC/GP1 de JUNV en células transfectadas. Monocapas de células Vero fueron transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1 GPC-myc. Se analizó por IFI la expresión del antígeno GPC/GP1 en cultivos tratados con BP 18 y no

tratados (A). Se analizaron 18 campos al azar para los dos experimentos y las cuantificaciones se relativizaron a 1000 núcleos. (B) Los datos presentan una distribución normal con un test *Shapiro-Wilk*, se utilizó un *t-test* para datos no pareados (no hay diferencias significativas). Los valores se reportan como la media ± *DE*.

1.5 Expresión del antígeno Z de JUNV en presencia de BP 18 en células transfectadas.

Se analizaron células transfectadas para la expresión de la proteína Z en presencia o ausencia (control) de **BP 18.** Se realizaron inmunofluorescencias utilizando los mismos anticuerpos de la **Figura 23.** Se fijaron las células, se marcaron y observaron al microscopio confocal. Se muestran en la **Figura 26 A** imágenes representativas de este ensayo y puede observarse en ambas condiciones la expresión de membrana típica de Z, así como también deformaciones esféricas. En este caso este patrón no fue tan pronunciado como en las células infectadas y marcadas con Z (**Figura 23 A).** En la **Figura 26 B** se muestra la cuantificación de células Z (+). En los cultivos transfectados se observó número de células Z (+), cada 1000 núcleos, de 17 ± 3 %. En presencia de **BP 18** fue 12 ± 3 %. Esto nos indica un 28 % de disminución de positividad en presencia de **BP 18**.

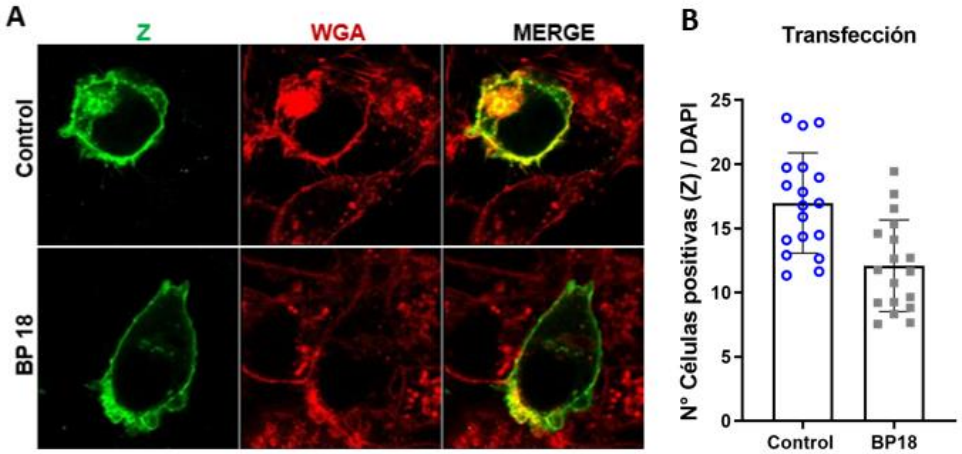


Figura 26. Cuantificación del número de células positivas para la expresión de la proteína Z de JUNV en células transfectadas. Monocapas de células Vero fueron transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1 Z. Se analizó la expresión del antígeno Z en células tratadas BP 18 y sin tratamiento, por IFI en 18 campos al azar para los dos experimentos (A), las cuantificaciones se relativizaron a 1000 núcleos. (B) Los datos presentan una distribución normal con un test *Shapiro-Wilk*, se utilizó un *t-test* para datos no pareados (no hay diferencias significativas). Los valores se reportan como la media ± *DE*.

1.6 Expresión del antígeno NP de JUNV en presencia de BP 18 en células transfectadas.

Se analizó la expresion individual de NP en celulas tratadas con **BP 18** y en células control. Se marcó con anticuepos específicos y se observó al microscopio confocal. Se pueden ver en la **Figuara 27 A** imágenes representativas de ambas condiciones. El número de células NP (+) en células transfectadas (cada 1000 núcleos) fue 15 ± 1,7 % mientras que en presencia de **BP 18** fue 10 ± 2 %. Esto nos indica un 33 % de disminución de positividad en presencia de **BP 18**.

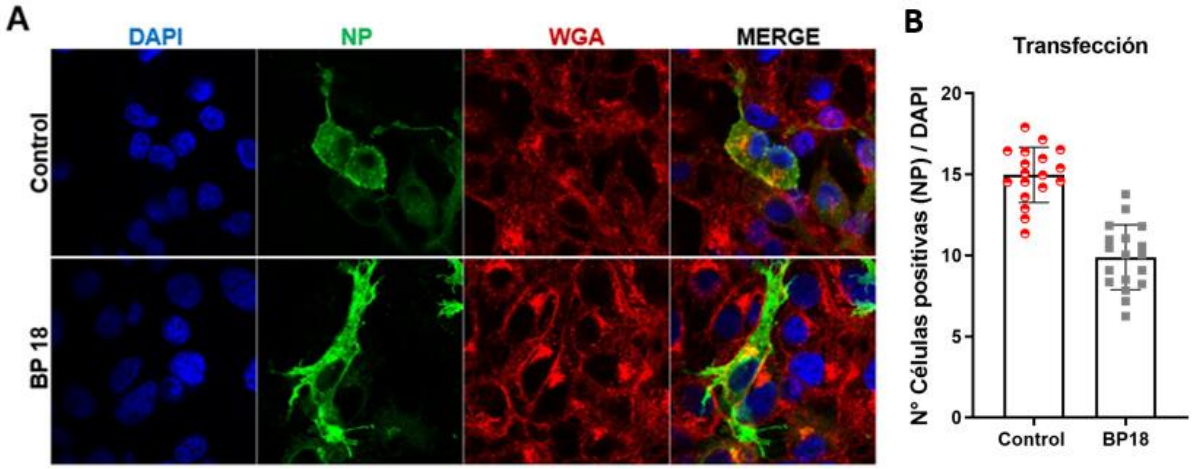


Figura 27. Cuantificación del número de células positivas para la expresión de la proteína NP de JUNV en células transfectadas. Monocapas de células Vero fueron transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1 NP (foto). Se analizó la expresión del antígeno NP en presencia y ausencia (control) del bisfosfonato BP 18 por IFI citoplasmática en 18 campos al azar para los dos experimentos (A), las cuantificaciones se relativizaron a 1000 DAPIs. (B) Los datos presentan una distribución normal con un test *Shapiro-Wilk*, se utilizó un *t-test* para datos no pareados (no hay diferencias significativas). Los valores se reportan como la media ± *DE*.

2. Evaluación de la funcionalidad de las proteínas virales

2.1 Evaluación de la actividad fusogénica de la proteína viral GP2 en presencia de BP 18.

Como se mencionó en el ítem 3.3.1 de la *Introducción*, el complejo glicoproteíco maduro de JUNV inserto en la envoltura viral posee capacidad fusogénica. En las células infectadas este complejo también se localiza en la membrana plasmática. Experimentalmente la función fusogénica puede evidenciarse induciendo, a bajo pH, cambios estructurales en el complejo glicoproteíco. GP1 se disocia de GP2 y se expone un péptido de fusión activo que fusiona

con otras membranas celulares adyacentes. A fin de evaluar si en presencia de **BP 18** se alteran las propiedades fusogénicas de GP2, se realizaron ensayos de fusión de membranas por disminución del pH. Para ello, se utilizaron monocapas de células Vero transfectadas con pcDNA 3.1 GPC-myc durante 24 h y tratadas con **BP 18** (50 µM) durante 24 h. Las células se sometieron a una incubación corta con medio de cultivo a pH 5 y después de este tratamiento los cultivos celulares se incubaron con medio MEM a pH 7 durante 5 h. Se fijó y se procesó para IFI.

En la **Figura 28** se observan microfotografías de bajo aumento y representativas de este ensayo de actividad fusogénica. Como se puede observar, no hay eventos de fusión a pH 7 independientemente de si los cultivos fueron (fotografía **D**, **E**, **F**) o no fueron tratados con **BP 18** (fotografías **A**, **B**, **C**). Cuando los cultivos fueron transfectados con pcDNA 3.1 GPC-myc y sometidos a un pulso de pH 5 se puede observar la formación de grupos de células fusionados y multinucleados (fotografía **G**, **H**, **I**). En presencia de **BP 18** estos sincicios están notablemente disminuidos (fotografía **J**, **K**, **L**).

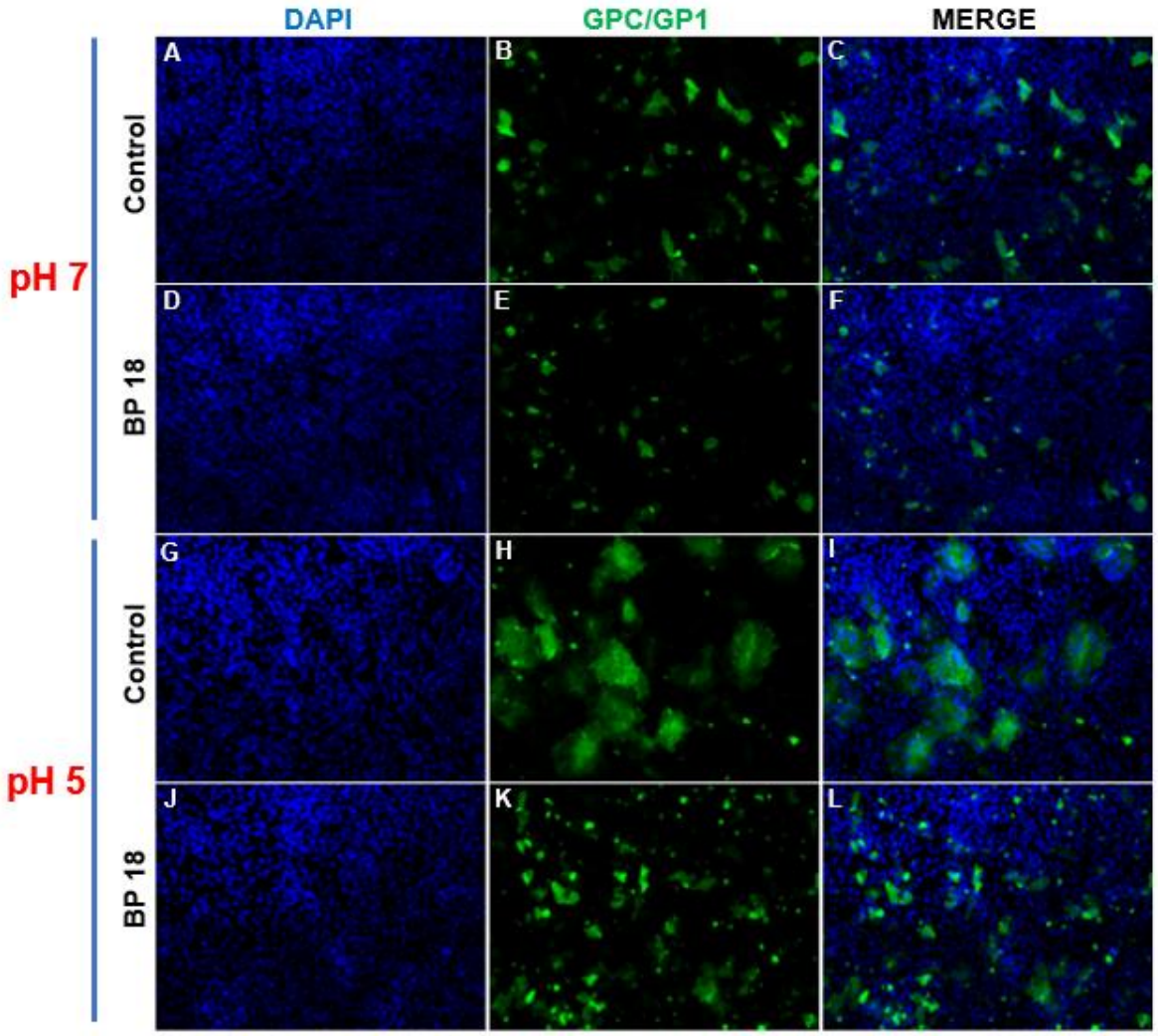


Figura 28. Microfotografías representativas de la actividad fusogénica de GP2 a pH 5 y pH 7. Las monocapas de células Vero fueron transfectadas con pcDNA 3.1 GPC-myc y tratadas con **BP 18** durante 24 h, se realizaron controles a pH 7 de células sin tratamiento (control, imagen **A**, **B**, **C**), y células tratadas con **BP 18** a pH 7 (imagen **D**, **E**, **F**). Se analizó la capacidad fusogénica de GP2 por medio de la formación de sincicios a pH 5 por IFI citoplasmática. Para diferenciación de los núcleos celulares se realizó la tinción con DAPI (fotografía **A**, **D**, **G**, **J**), se detectó la proteína GPC/GP1 con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488, Aumento: 100X.

Para mejor visualización y detalle se utilizó en el siguiente panel de microfotografías (**Figura 29)** se observa en un aumento de 600x la actividad fusogénica de GP2. También en esta figura se muestra de forma comparativa cultivos de células infectadas con JUNV (**fotografía A-H**) y cultivos transfectados pcDNA 3.1 GPC-myc (**fotografías I-P**). Todas las imágenes corresponden a pH 5, sin tratamiento (**fotografía A-D y I-L**) o en presencia de **BP 18** (**fotografía E-H y M-P**). Nuevamente se observa que la fusión de células esta disminuida

en presencia de **BP 18**, independientemente de si las células están infectadas (**B** vs. **F**) o transfectadas (**J** vs. **N**).

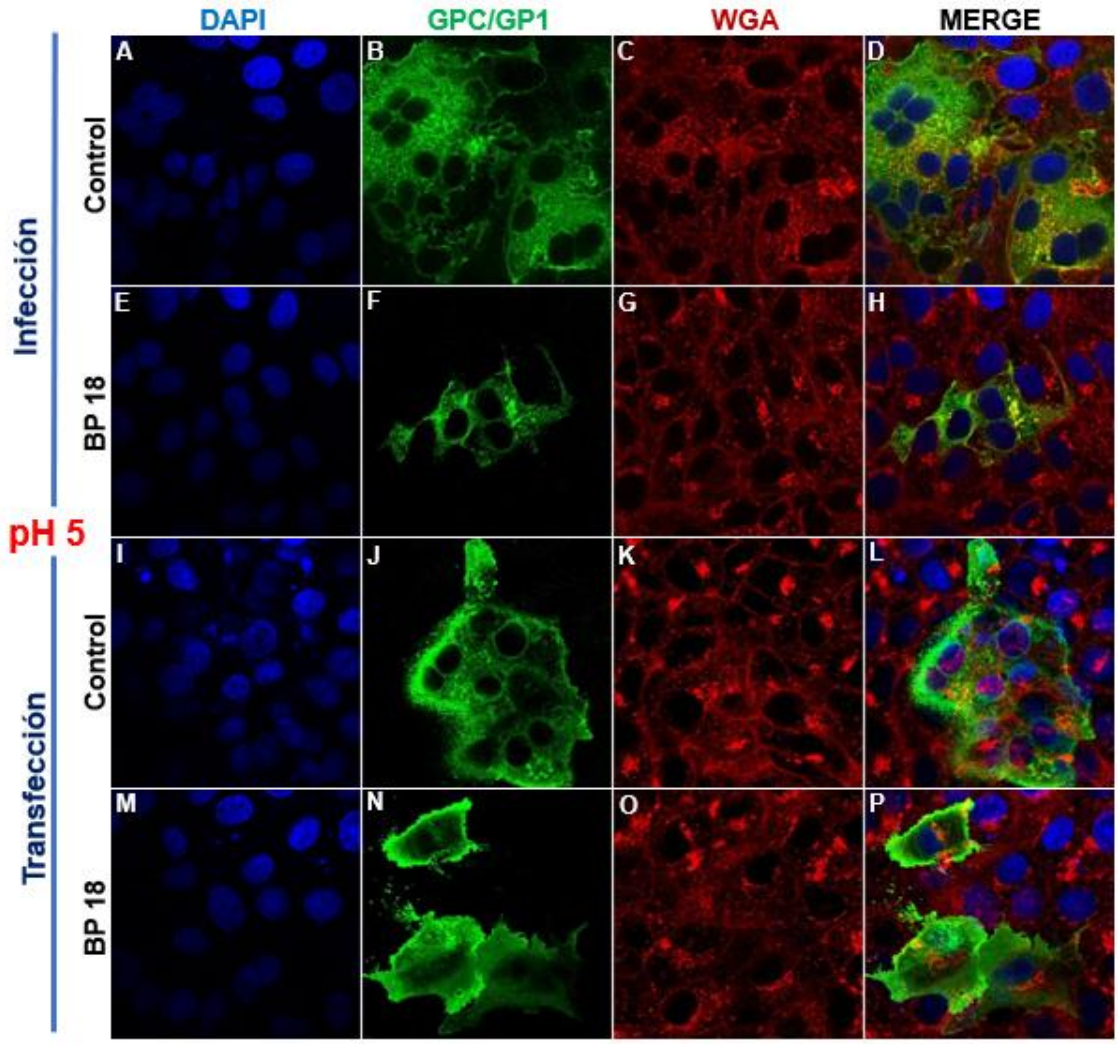


Figura 29. Microfotografías representativas de la actividad fusogénica de GP2 por microscopia confocal. Monocapas de células Vero fueron infectadas con JUNV (m.i. = 0,1) (A, B, C, D, E, F, G, H) o transfectadas con pcDNA 3.1 GPC-myc (I, J, K, L, M, N, O, P) y tratadas con BP 18 durante 24 h.p.i. o h.p.t. Se indujo la actividad fusogénica de GP2 a pH 5 durante 30 min. La presencia de sincicios se analizó por IFI citoplasmática con tinción de los núcleos con DAPI (A, E, I, M), GPC/GP2 con (B, F, J, N). Para perfilar la célula se utilizó la lectina WGA (marca azucares de organelas membranosas), (C, G, K, O). Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488. Aumento: 600 X.

Con las fotografías obtenidas por microscopia de fluorescencia y de células transfectadas, se realizaron diferentes cuantificaciones que nos permitieran determinar el efecto del bisfosfonato **BP 18** sobre la capacidad fusogénica de la proteína GP2 de JUNV.

Las imágenes mostradas anteriormente fueron analizadas en detalle utilizando el *software imageJ*. Se determinó el número de núcleos celulares por sincicio por campo (**Figura 30 A**), el número de sincicios por campo (**Figura 30 B**), y el porcentaje de células no fusionadas en presencia y ausencia del tratamiento a pH 5 (**Figura 32**), en los siguientes *ítems* se desarrollarán estos resultados.

En la **Figura 30 A** se muestra la cuantificación del tamaño de sincicios por campo analizado. Este parámetro se define por el número de núcleos asociados a cada grupo celular fusionado. Por otro lado, en el panel **B** de la misma figura se grafica el número de sincicios por campo. Las gráficas muestran que en condiciones control los cultivos que expresan GPC/GP1 fusionan de manera muy eficiente cuando se disminuye el pH del medio. El tamaño de los sincicios es variable con valores de entre 100 a 300 núcleos (**Figura 30 A)**. Al mismo tiempo y de forma concordante el número de sincicios por campo en los controles es bajo **(Figura 30 B)** debido a que la mayoría de las células fusionaron entre sí, formando sincicios grandes. En presencia de **BP 18** se observa una relación inversa de estos parámetros. Los sincicios reducen su tamaño: involucran menos células, menos núcleos **(Figura 30 A)** por lo que al cuantificar el número de sincicios por campo se observa que éste aumenta **(Figura 30 B)** respecto de los controles sin **BP 18**.

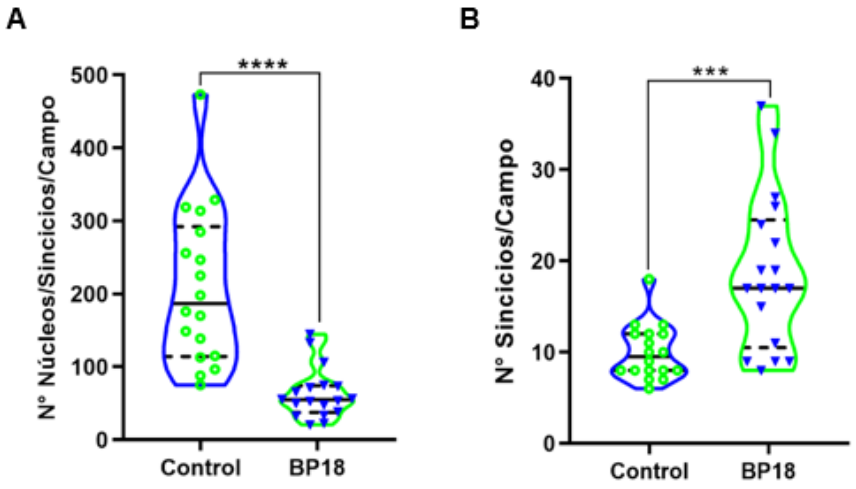


Figura 30. Cuantificación del número de sincicios en cultivos de células Vero transfectadas con pcDNA 3.1 GPC-myc. Después de someter las células al tratamiento con BP 18 y cambiar el pH, para inducir la capacidad fusogénica de GP2 se realizó IFI citoplasmática. (A), Cuantificación del número de núcleos por sincicio por campo en el control (sin tratamiento) y en presencia de BP 18 (tratamiento). (B), Cuantificación del número de sincicios por campo en el control (sin tratamiento) y en presencia de BP 18 (tratamiento). Las cuantificaciones se realizaron tomando 18 campos a azar, los resultados se analizaron

mediante diferentes test teniendo presente la normalidad de los datos; para el gráfico **(A)** se utilizó un test de *Mann-Whitney* (****P<0,0001) y para el grafico **(B)** los datos se analizaron mediante un t-test para datos no pareados (***P<0.0002).

En la **Figura 31** se representan los datos de la **Figura 30** de forma simultánea. Se observa el tamaño de los sincicios en función del número de sincicios. En azul se grafican los datos del grupo control y en verde los del grupo tratado con **BP 18.** Observamos que los datos se agrupan de forma separada y teniendo en cuenta que la eficiencia de fusión de GP2 es máxima a pH 5 en las condiciones control, se confirma que los eventos de fusión se ven afectados en el tratamiento con **BP 18.**

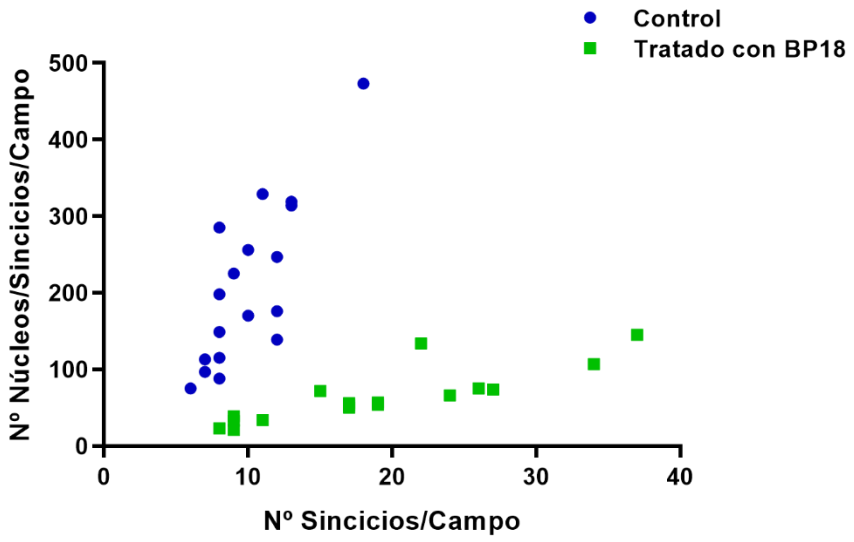


Figura 31. Cuantificación del número de núcleos por sincicio por campo respecto al número de sincicios por campo. En este grafico se resumen los datos presentados en la **Figura 30** (**A**-**B**), para el control (sin **BP 18**) y para las células tratadas con **BP 18** después de la transfección con el plásmido pcDNA 3.1 GPC en células Vero. Las nubes de los datos no se contraponen, por lo tanto, el tamaño de los sincicios es diferente en ausencia de **BP 18** respecto a la cantidad de sincicios en presencia de **BP 18**.

Como se mostró en la **Figura 25**, en presencia de **BP 18** hay una disminución (41%) de células que expresan GPC/GP1. Quisimos entonces determinar su efecto sobre la cuantificación de sincicios ya que a menor cantidad de células transfectadas podría esperarse menor cantidad de eventos de fusion. A continuacion se realizó una cuantificacion de las celulas positivas para GPC/GP1 pero no fusionadas, en cada una de las

condiciones. Luego se calculó un % en base al número total de núcleos contados en los campos analizados. En la **Figura 32**, se observa que el porcentaje de células no fusionadas para la condicion control (sin **BP 18**) es del 3,2 %. Nuevamente estos datos reflejan que en la condición control la fusión es muy eficiente e involucra casi a la totalidad de células positivas para GPC/GP1.

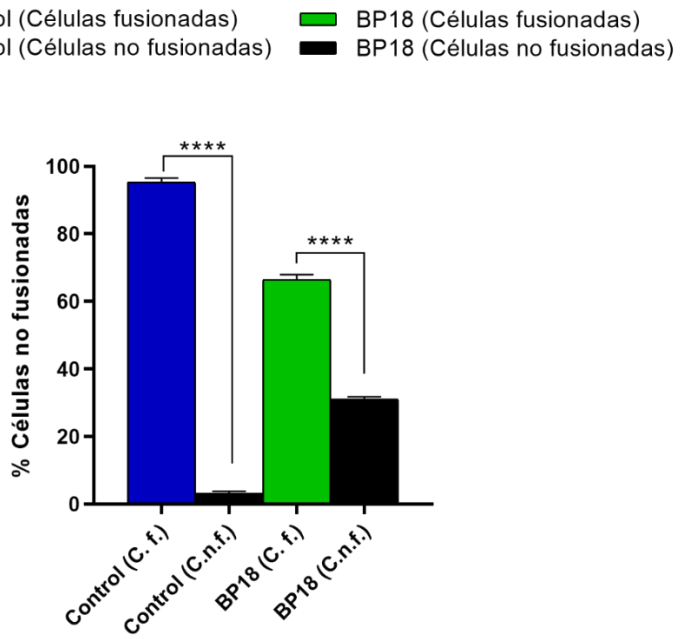


Figura 32. Cuantificación del porcentaje (%) de células fusionadas y sin fusionar. Cuantificación del % de células no fusionadas respecto de las células fusionadas en el control y en presencia de **BP 18** a pH 5. C.f. (Células fusionadas), C.n.f. (Células no fusionadas). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una sola vía y posterior test de *Tukey* (****P<0,0001), los valores se reportan como la media ± *DE* y los asteriscos (*) indican diferencias significativas.

El análisis de los datos muestra que la relación entre células fusionadas vs. no fusionadas cambia en presencia de **BP 18**. El 30% de las células GPC/GP1 positivas no se fusionaron en presencia de **BP 18** con el cambio de pH 5 del medio. Los resultados se analizaron con el test estadístico *Tukey* y se observan diferencias significativas para todas las condiciones del estudio.

2.2 Efecto del bisfosfonato BP 18 sobre la formación de VLPs de JUNV.

En ausencia de otras proteínas virales y del RNA genómico, Z ha mostrado que inicia la auto-brotación dando como resultado la producción de partículas parecidas a virus (VLPs). Z entonces se considera como el factor mínimo de brotación para el virus (Hoenen *et al.,*

2007; Ziegler *et al*., 2016), siendo entonces la principal responsable del ensamblaje y la brotación de las partículas virales. Para esta función Z se localiza en la membrana plasmática celular e interacciona con el resto de componentes virales durante la infección. Para la producción de VLPs o virus infeccioso se ha visto que principalmente Z interactúa con GPC.

Con el objetivo de explorar la funcionalidad de la proteína Z de JUNV durante el tratamiento con **BP 18**, se transfectaron células y mediante inmunodetección se estudió la formación de Z-VLPs. Tanto en sobrenadantes de las células transfectadas, así como en los lisados celulares se determinó la presencia de Z. La **Figura 33** muestra los WB resultantes de estos ensayos, en presencia o ausencia de **BP 18**. En este ensayo decidimos además utilizar en paralelo **ZA**. La presencia de Z fue confirmada en todos los lisados celulares transfectados. La cuantificación indicó que en presencia de inhibidores de **FPPS** la proteína Z es más abundante dentro de las células (**Figura 33 A**). Cuando se analizaron los sobrenadantes correspondientes a los tratamientos se observó una notable disminución de Z-VLPs. Las diferencias en la intensidad de las bandas cuando las células recibieron **BP 18** o **ZA** respecto al control sin tratamiento se observan en el panel **B** de la **Figura 33**.

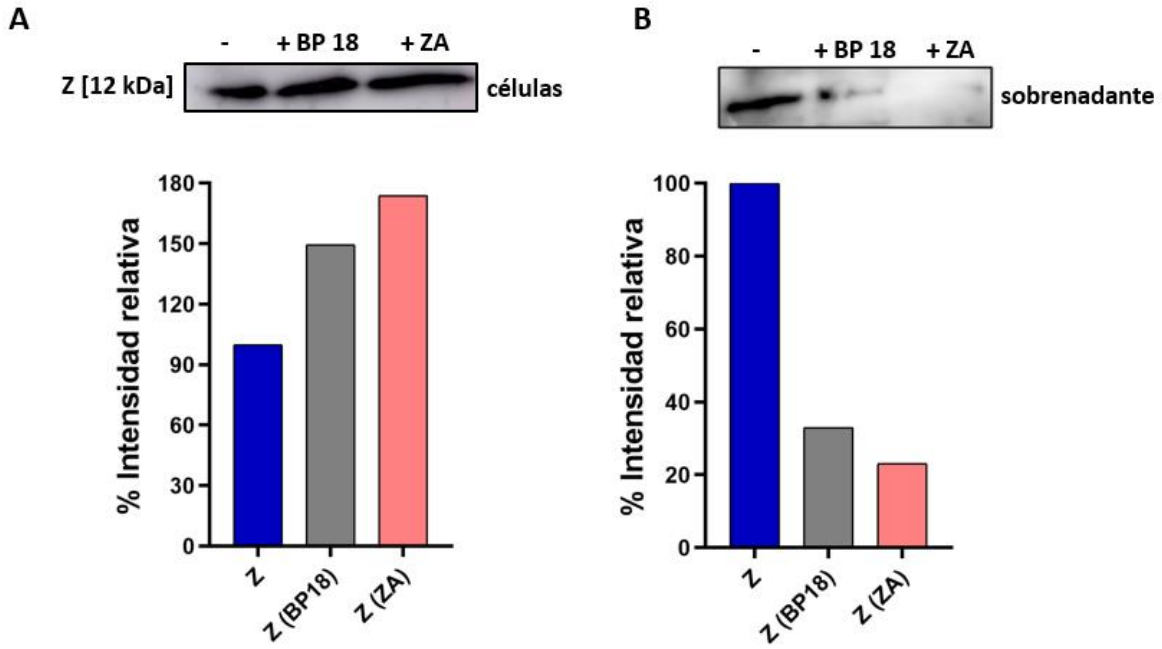


Figura 33. Efecto del bisfosfonato BP 18 y ZA frente a la formación de VLPs de JUNV. (A) Cultivos de células transfectadas y tratadas BP 18 (50 µM) y ZA (25 µM) durante 24 h.p.t. (B) Sobrenadantes de células Vero transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1 Z y tratadas durante 24 h.p.t. con BP 18 y ZA en iguales concentraciones del tratamiento anterior. Se cuantificó el porcentaje (%) para la intensidad relativa de las

bandas en presencia de BP 18 y ZA de la proteína Z proveniente del lisado celular y de la proteína Z proveniente de VLPs en los sobrenadantes de células transfectadas respecto al control sin tratamiento.

Con este resultado observamos que a nivel celular los bisfosfonatos no estarían afectando la síntesis de la proteína Z, pero podría estar siendo afectada su salida debido a que la intensidad de las bandas para la proteína Z es mayor cuando la célula estuvo tratada con **BP 18** y **ZA (Figura 33 A)**. Por otro lado, al realizar la inmunodetección de Z-VLPs en los sobrenadantes de células transfectadas se observó una reducción significativa de los niveles de Z-VLPs en presencia de **BP 18** y **ZA.** En conjunto**,** estos resultados indicaron que la funcionalidad de Z, al menos la formación y brotación de Z-VLPs, estaría siendo afectada por **BP 18** y **ZA**.

3. Efecto de BP 18 en los niveles de RNA de JUNV

Por otro lado, quisimos explorar el impacto del tratamiento con **BP 18 y ZA** a nivel de RNA de JUNV. De igual modo**,** se analizaron los niveles de mRNA para la enzima **FPPS**, blanco de los bisfosfonatos (**Figura 34).** Para ello se utilizaron cultivos sin infectar (CC) o infectados con JUNV (CV). Se compararon los niveles de RNA de estas condiciones en presencia o ausencia de **BP 18** o **ZA**.

Los cultivos se infectaron y las monocapas se cosecharon con *buffer* desnaturalizante. Se realizó la extracción de RNA, se sintetizó el DNA copia utilizando *primers* aleatorios y luego llevamos a cabo la RT-PCR como se detalla en el *item* 12 (*Materiales y Métodos*). Para analizar los niveles de expresión utilizamos el método ΔΔCt, normalizando el Ct de cada gen con el Ct de actina y luego se normalizó a los controles.

Los niveles de expresión del mRNA **FPPS** se muestran en la **Figura 34 A.** Para los cultivos sin infectar, a las 24 h la cantidad relativa del mRNA de **FPPS** en las células tratadas con **BP 18** es mayor al control de células sin tratar (CC). Se observa un aumento de 8 veces, indicado por una flecha. Luego para el tratamiento de 48 h el mRNA de **FPPS** disminuye a los valores observados en el control. Asimismo, cuando las células estuvieron en presencia del bisfosfonato comercial **ZA**, se observó a las 24 h un incremento en la cantidad relativa de mRNA de **FPPS** de 5 veces comparado con el control celular sin tratamiento. Nuevamente a las 48 h los valores de mRNA de **FPPS** son comparables al control al mismo tiempo analizado. El efecto de **ZA** es similar al observado en presencia de **BP 18**, aunque en términos absolutos los incrementos son más pronunciados con este último tratamiento.

Para el caso de las células que fueron infectadas con JUNV y tratadas con **BP 18** (**Figura 34 B,** lado derecho de la gráfica), no se observaron diferencias en las cantidades relativas de mRNA de **FPPS** a las 24 h y para ninguno de los dos tratamientos. A las 48 h sólo los cultivos infectados y tratados con **BP 18** mostraron un incremento de 3 veces en el mRNA de **FPPS** y comparado con los cultivos celulares infectados control (CV).

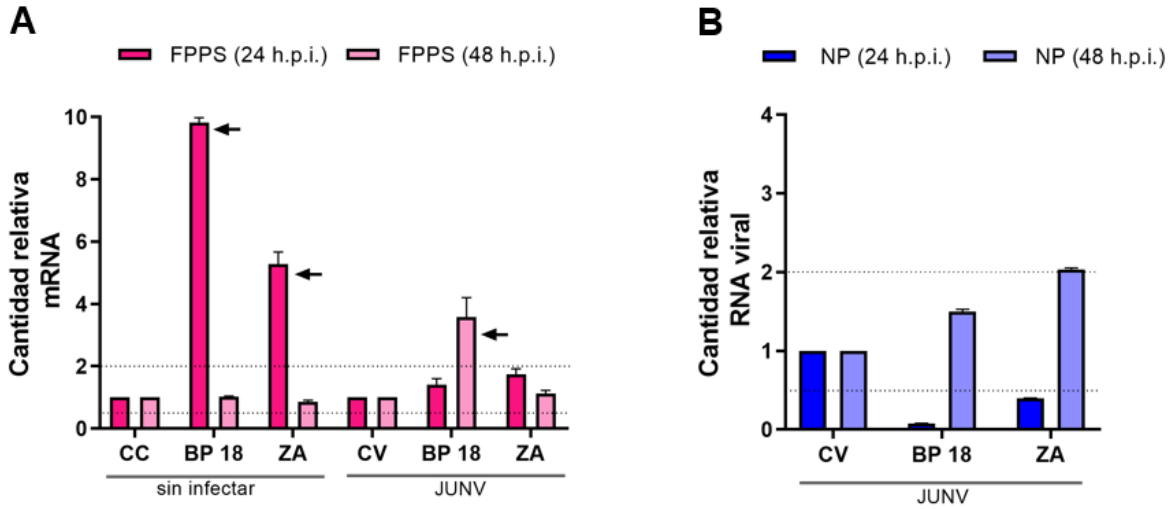


Figura 34. Cuantificación por RT-PCR de RNAs en células tratadas con BP 18 y ZA. (A), Cantidad relativa del mRNA de FPPS en cultivos de células infectados y sin infectar, tratados y no tratados, durante 24 h.p.i. y 48 h.p.i. (B), Cuantificación del RNA viral (NP-JUNV) en cultivos de células tratadas y sin tratar con BP 18 y ZA, en los mismos periodos de tiempo. CC, control celular. CV, control viral. NP, nucleoproteína. FPPS, farnesil pirofosfato sintetasa.

En la **Figura 34 B** se muestran las cantidades relativas de RNA viral. Cuando comparamos los valores de los grupos tratados con **BP 18** o **ZA** durante 24 h, se observa que hay diferencias respecto al grupo control infectado (CV). Los resultados de 48 h de tratamiento e infección no evidencian diferencias con los controles sin tratamiento.

4. Evaluación del tiempo de adición de bisfosfonatos durante la multiplicación viral.

De acuerdo con la curva de producción viral previamente reportada (Coto *et al*., 1969; Da Di *et al*., 2022) se asume que para JUNV un ciclo de multiplicación ocurre en el rango de 8-10 h.p.i, siendo a las 24 h.p.i. el primer pico de producción viral relevante en cultivos de células in vitro. A fin de ubicar temporalmente el efecto inhibitorio de **BP 18**, se diagramaron

tratamientos a distintos tiempos p.i., en el lapso de las primeras 24 h de infección. Por este motivo primeramente se determinó la producción de UFP en el sobrenadante de los cultivos de células Vero control y a distintos tiempos p.i., según se indica en la **Figura 35 A**. Cultivos de células Vero se infectaron durante 1 h con m.i. 0,1 UFP/célula con JUNV, se retiró el inóculo y luego se cosechó el sobrenadante para cuantificar la cantidad de virus infectivo producido y acumulado durante los siguientes lapsos de tiempo p.i.: 0-2, 0-4, 0-6, 0-8, 0-10, 0-12, 0-15, 0-18, 0-21 y 0-24 h.p.i.

Se puede observar que a las 8 h.p.i. comienza la producción de partículas infecciosas con un título modesto de 2 x10 ^{3} UFP/ml (**Figura 35 A**). Los niveles de producción viral permanecen relativamente constantes hasta las 18 h.p.i. donde vuelve a observarse un aumento en las UFP que duplica (4 x10 ^{3} UFP/ml) lo producido durante los tiempos anteriores. Finalmente, en el último lapso de tiempo evaluado la producción alcanza un título de 6 x10^{3} UFP/ml. El resultado de esta cuantificación viral nos permitió conocer la cantidad de virus infectivo a lo largo de una infección de 24 h. y antes de los tiempos a los cuales se iba a adicionar **BP 18**.

Para evaluar entonces el efecto del tiempo de adición de los BPs sobre la producción viral los cultivos infectados fueron tratados con el compuesto **BP 18** a una concentración de 50 µM adicionándolo a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21 h.p.i.) y cosechando los sobrenadantes de todos los tratamientos a las 24 h.p.i. Se cuantificó el virus extracelular de todos los tratamientos mencionados por medio del método UFP y los resultados fueron expresados como título viral versus tiempo de adición de **BP 18** (**Figura 35 B**).

En la **Figura 35 B** se observa la producción de UFPs en cultivos tratados con **BP18** (barras verdes) durante intervalos de tiempo decrecientes, ya que como se mencionó el compuesto se agregó a distintos tiempos p.i. pero siempre se evalúo a tiempo final (24 h.p.i.). En barras azules se grafica el valor de partículas infectivas acumuladas, en ausencia de bisfosfonato, en los mismos intervalos de tiempo del tratamiento. Como se puede observar todas las barras correspondientes al control muestran una producción viral comparable. Las barras verdes muestran que el tratamiento con **BP 18** produce una inhibición significativa del 90-95% en la producción viral para todos los intervalos de tratamiento. Por lo tanto, el efecto que ejerce **BP 18** a intervalos de tratamiento cortos, por ejemplo, de 21 a 24 h.p.i., es el mismo que se produce dejando el tratamiento durante mayor tiempo (2-24 h.p.i.). Teniendo en cuenta estos resultados se acotó entonces el intervalo de tratamiento a las ultimas horas

de infección. Se realizó un experimento de adición, similar al anterior y se incluyó el compuesto comercial **ZA,** con el fin de determinar su potencial antiviral en tiempos más cortos de exposición.

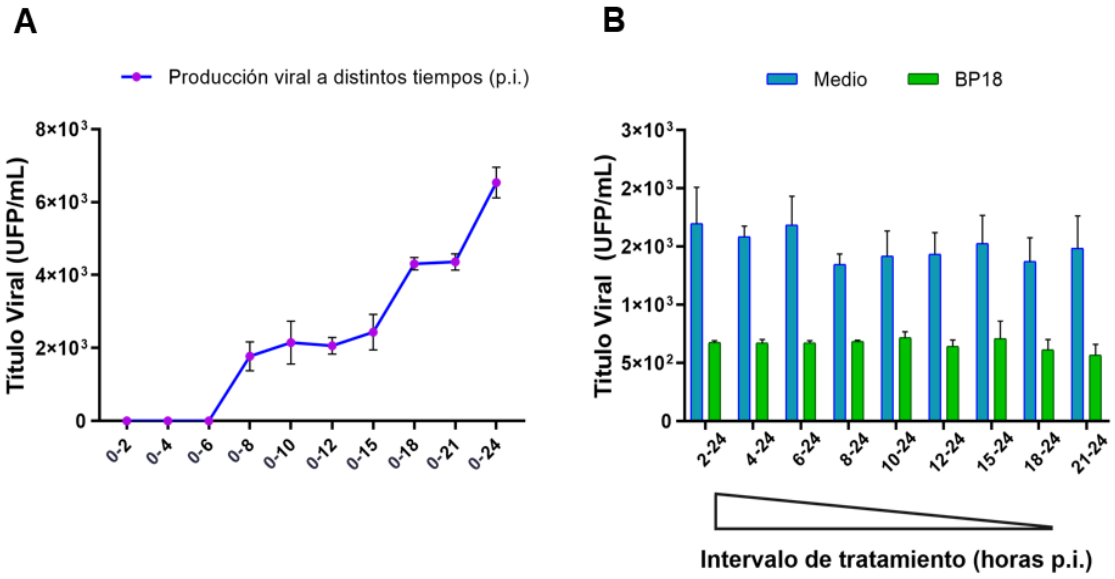


Figura 35. (A), Producción viral a distintos tiempos. A partir de la infección de células Vero con JUNV (m.i.=0,1), se cuantificó la producción viral a distintos tiempos (0-2, 0-4, 0-6, 0-8, 0-10, 0-12, 0-15, 0-18, 0-21 y 0-24 h p.i.). (B), Efecto del tiempo de adición de BP18 sobre la multiplicación de JUNV. Se adicionó a distintos tiempos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21 h.p.i.) el bisfosfonato BP 18, con su respetivo control (sin tratamiento para los mismos tiempos). A las 24 h.p.i. se cuantificó el virus extracelular a partir de los sobrenadantes. Los resultados se expresan como título viral (UFP/mL) respecto al control sin BP 18. Los datos representan un valor promedio del título viral obtenido a partir de tres determinaciones ± *DE.*

En la **Figura 36** se observa el esquema de tratamiento sobre el panel izquierdo. En rosa se representa el período de tiempo donde el medio estuvo libre de compuesto. En verde se muestran los intervalos de tratamiento con **BP 18** (**Figura 36 A**) y en amarillo el intervalo de tratamiento para **ZA** (**Figura 36 B**). Como control se realizó en paralelo el tratamiento de 24h.

Se infectaron células Vero y se adicionó **ZA** o **BP 18** a las 18, 19, 20 y 21 h.p.i., cosechándose en todos los casos a las 24 h.p.i. En la **Figura 36 A**, panel derecho, se grafica el porcentaje (%) de inhibición viral calculado en base al control infectado y sin tratar. Se observan valores similares de inhibición para los distintos intervalos de tratamiento con **BP 18.** A partir de las 18 h.p.i. con un tratamiento total de 6 h (18 a 24 h.p.i.), se observan inhibiciones del 90 %. De manera similar se observa para intervalos menores de tratamiento (5, 4 y 3 h) inhibiciones del 90%.

Cuando se realizó el mismo ensayo para el compuesto **ZA** observamos un efecto comparable al de **BP 18**. Intervalos de tratamiento cortos (3 h) producen valores de inhibición comparables a los obtenidos con intervalos de tratamientos de 24 h (**Figura 36 B**).

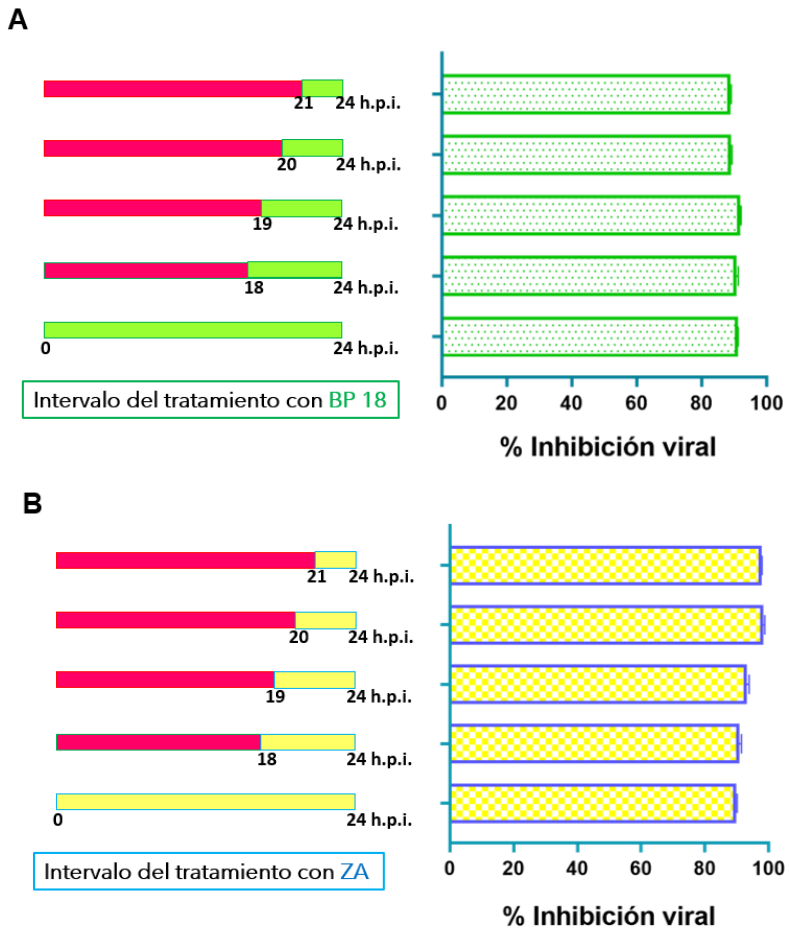


Figura 36. Evaluación de la inhibición viral a intervalos de tratamiento más cortos con el bisfosfonato BP 18 y ZA. Se infectaron células Vero con JUNV (m.i.=0,1) y se adicionó medio. A los tiempos indicados en el esquema de la izquierda (18, 19, 20 y 21 h.p.i.) se adicionó BP 18 (A) o ZA (B). A las 24 h.p.i. se cuantificó el virus extracelular a partir de los sobrenadantes. Los resultados se expresan como porcentaje (%) de inhibición viral respecto al control sin BP 18 y ZA en cada intervalo de tratamiento.

Nuestros resultados muestran que el bisfosfonato **ZA** resultó ser más efectivo para inhibir la multiplicación de JUNV (**Figura 36 B**), cuando los intervalos de tratamiento fueron más cortos y comparado con el efecto de inhibición viral durante 24 h.p.i. antes observado. Teniendo en cuenta la citotoxicidad de **ZA** en tratamientos prolongados (48 h), resulta

interesante observar que con intervalos de tratamientos iguales o menores a 6 h se obtienen valores de inhibición viral significativos.

CAPITULO II. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Dado que en **Capítulo I** establecimos la acción antiviral del compuesto no comercial **BP 18**, quisimos caracterizar este efecto en el modelo celular Vero. Como primer paso analizamos por inmunomarcación de las células infectadas y tratadas. Observamos que el número de células GPC/GP1 (+) se encuentra disminuido en un 66% cuando los cultivos se trataron durante 24 h.p.i. y respecto del control sin tratar. En estas condiciones los títulos virales disminuyen en hasta un 90% por lo que una menor cantidad de células infectadas podría explicar ambos resultados. El análisis de positividad para los antígenos virales NP y Z mostró también una disminución en el número de células marcadas en presencia de **BP 18**, aunque las diferencias no fueron tan pronunciadas (23,4 y 36 % respectivamente).

El análisis de proteínas virales en los cultivos transfectados individualmente con cada una de las proteínas mostró disminución en la eficiencia de transfección para los tres casos, sugiriendo tal vez un efecto tóxico no deseado. Si bien las concentraciones de trabajo para estos ensayos presentaban viabilidades por encima del 80%, este valor podría verse afectado por los reactivos de transfección en combinación con **BP 18**.

Observamos de manera interesante que el patrón de expresión de GPC y Z sufre algunas alteraciones en presencia del bisfosfonato **BP 18**. Los cúmulos intensos de fluorescencia en membrana observados para GPC y las deformaciones esféricas para el caso de Z sugieren defectos de expresión localizados y en zonas bien definidas de la membrana plasmática. Estas observaciones podrían explicarse teniendo en cuenta la función enzimática de **FPPS** y su relevancia en producción de lípidos importantes para la membrana celular.

Habiendo establecido un número disminuido de células infectadas como resultado del tratamiento con **BP 18**, quisimos determinar si alguna función viral estaba negativamente afectada en estas condiciones. Por lo tanto, se evaluó si el compuesto **BP 18** podría afectar la función fusogénica de la proteína GP2 de JUNV. A través de los ensayos de fusión de membranas por disminución de pH, se comprobó que la actividad fusogénica de GP2 es alterada en presencia de **BP 18**, en células infectadas y transfectadas. Los resultados indicaron diferencias significativas entre el tamaño y el número de células multinucleadas presentes, bajo condiciones de tratamiento respecto al control a pH ácido. Estos datos refuerzan la hipótesis de que la actividad de **FPPS** es necesaria para la correcta expresión y funcionalidad del complejo GPC, afectando particularmente la función fusogénica de GP2 (**Figura 30**).

En el caso de la inmunomarcación de la proteína Z, en células tratadas con **BP 18**, se observaron membranas alteradas en forma similar a “burbujas”. La proteína Z es

considerada una proteína clave para los procesos de morfogénesis de los mammarenavirus. Por ejemplo, el empaquetado del genoma es direccionado por Z al reclutar a NP hacia los sitios de brotación en las células infectadas. Además, Z se considera la proteína que tiene la fuerza impulsora para formar las partículas VLPs. Cuando analizamos la abundancia de VLPs en cultivos tratados vs. control, encontramos que **BP 18** reduce el número de VLPs en los cultivos transfectados con Z. Por lo tanto, su función de matriz está afectada negativamente. El sitio preciso de la membrana en el que Z se inserta no se ha descripto. Sin embargo, Urata & Yasuda (2012) han demostrado que (al menos para LASV) la producción de VLPs mediada por Z es modulada por colesterol en células Vero, aunque no en otras líneas como Huh-7 y 293T. Nuevamente nuestras observaciones demuestran la importancia de **FPPS** y la vía del mevalonato en el ciclo de multiplicación de los mammarenavirus.

En la **Figura 34 B** se realizó un análisis de abundancia de genoma viral en presencia de **BP 18** o **ZA**. Nuestros resultados mostraron que la replicación/transcripción del genoma viral es afectada por los tratamientos, aunque esto podría deberse al efecto de los BPs sobre la propagación y no sobre la replicación específicamente.

Al analizar la abundancia del mRNA de **FPPS** en células sin infectar, pero tratadas obtuvimos resultados interesantes. Tanto **BP 18** como **ZA** causaron un aumento inicial en el número de copias del mRNA de la enzima, en las células que habían sido tratadas durante 24 h. Este resultado podría indicar la activación de un mecanismo celular que tienda a compensar la falta de actividad de **FPPS**, por parte de los BPs, induciendo así a la célula a sintetizar más mRNA para contrarrestar este fenómeno. Este aumento no se observa a las 48 h postratamiento. Si bien no se hicieron ensayos para determinarlo directamente, es posible que el efecto del compuesto no sea estable durante períodos muy prolongados, y no se encuentre disponible luego de 48 h.

La función de la enzima no sólo es requerida para la prenilación de proteínas de unión a membrana plasmática. Sino que, además, es necesaria para la síntesis de colesterol de otras membranas internas entre otras funciones celulares. Das *et al*., (2014) observaron que bisfosfonatos nitrogenados como **ZA** presentaron una regulación positiva en la expresión de la **FPPS** en células HeLa en respuesta a un tratamiento (2 a 50 µM).

Por otro lado, los niveles en la expresión de los mRNA de **FPPS** en cultivos de células infectadas con JUNV y tratadas con **BP 18** y **ZA,** no presentaron la misma respuesta por parte de la célula. Solo se observó un aumento de la abundancia del mRNA de **FPPS** a las 48

h y en presencia de **BP 18**. Esto parece indicar que la célula infectada no es capaz de activar el mecanismo compensatorio de **FPPS** que está presente en la célula sin infectar. De esta forma podemos sugerir que la modulación celular por parte de JUNV, incluye la enzima **FPPS** y sus mensajeros.

Por último, en este Capítulo definimos el mínimo periodo de tiempo en el cual los bifosfonatos presentan su mayor rango de acción. Se logró establecer que la adición de **BP 18** a partir de las 18 h.p.i. en células Vero, inhibe la multiplicación del virus con diferencias significativas cuando se comparó el título viral respecto al control viral (sin tratamiento). Obtuvimos diferencias significativas al comparar entre los tiempos de adición de cada tratamiento, por lo tanto, **BP 18** ejerce su acción en etapas tardías en la multiplicación de JUNV con un rango de tiempo eficaz que está entre 3 y 6 h. Por último, es importante resaltar que el compuesto **BP 18** provocó una disminución del título viral de ~1 Log respecto al control viral durante este corto tratamiento.

En conjunto, los resultados de este Capítulo demuestran que la síntesis de proteínas virales no estaría siendo directamente afectada por los compuestos en estudio. Sin embargo, si afectaría su funcionalidad dentro del ciclo de multiplicación de JUNV, afectando principalmente la morfogénesis viral; y como consecuencia la propagación viral a células vecinas y la disminución de todas las macromoléculas virales.

CAPITULO III. EFECTO DE LOS BISFOSFONATOS SOBRE OTROS MODELOS VIRALES

CAPITULO III. Efecto de los bisfosfonatos sobre otros virus envueltos con genoma de RNA

Teniendo en cuenta la actividad antiviral exhibida por **ZA** y los bisfosfonatos no comerciales frente a la multiplicación de JUNV, se decidió evaluar el efecto de estos compuestos sobre la multiplicación de otros modelos virales. Por un lado, evaluamos la actividad antiviral de los BPs no comerciales frente a coronavirus canino (CCoV), utilizado como modelo subrogado de SARS-CoV2. Además, debido a la importancia sanitaria en nuestra región; nos enfocamos en los arbovirus ZIKV, DENV y CHIKV.

1. Evaluación de la citotoxicidad y actividad antiviral de BPs no comerciales sobre la multiplicación de CCoV.

En el contexto de la pandemia COVID-19, el CCoV fue seleccionado como virus modelo subrogado de SARS-CoV-2, para la evaluación de los bisfosfonatos no comerciales. El virus CCoV pertenece a la familia *Coronaviridae,* y es un virus envuelto con genoma de RNA de simple cadena.

Primero determinamos las concentraciones óptimas sobre la linea celular CRFK, que representa un óptimo modelo celular por ser una línea permisiva para la replicacion de este virus. Los cultivos de células CRFK se incubaron con diluciones seriadas al medio de los compuestos **BP 13, BP 9, BP 17** y **BP 18** durante 48 h. La viabilidad celular (**Figura 37**) se cuantificó mediante el método MTT y se determinó la CC_{50}.

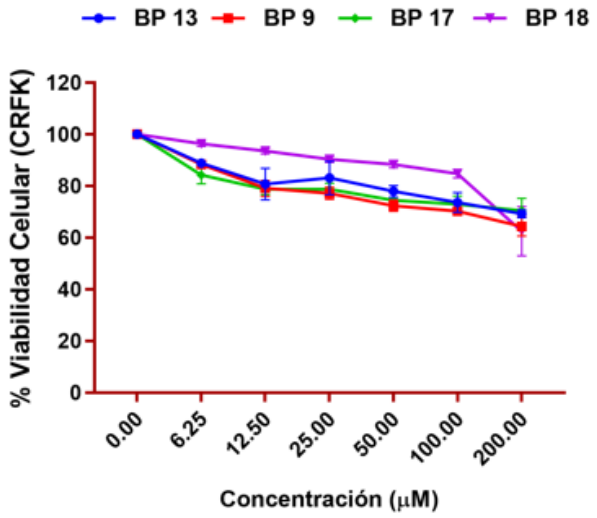


Figura 37. Efecto citotóxico de los bisfosfonatos no comerciales en células CRFK. Las monocapas celulares CRFK fueron tratadas con los compuestos **BP 13**, **BP 9, BP 17 y BP 18** (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 µM) y la viabilidad celular fue evaluada por el método MTT a las 48 h. Los resultados fueron graficados como porcentaje (%) de viabilidad celular y fueron analizados mediante regresión no lineal. Se estimó la CC_{50} > 200 µM para **BP 13**, **BP 9**, **BP 17** y **BP 18** en la línea celular CRFK.

Los resultados obtenidos en el ensayo de actividad citotóxica de los bisfosfonatos **BP 13, BP 9, BP 17** y **BP 18** expusieron una disminución de la viabilidad celular en las mayores concentraciones estudiadas. Los resultados fueron expresados en gráficas como porcentaje de viabilidad celular en función de la concentración indicados en la **Figura 37**. Los datos mostraron que, en el rango de concentraciones evaluado, **BP 18** mostró el mayor efecto citotóxico en la linea celular CRFK, cuando las células fueron tratadas con 200 µM, donde la viabilidad celular fue entre el 50 % y 55 %. El efecto de los BPs (**BP 13**, **BP 9**, **BP 17**) restantes sobre este sistema celular obtuvieron una viabilidad entre el 65 % y 70% en la mayor concentración (200 µM).

A continuación, se evaluó la actividad antiviral de **BP 13, BP 9, BP 17** y **BP 18** frente a CCoV en células CRFK mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral (**Figura 38**). Los cultivos celulares se infectaron con m.i. de 0,1 UFP/célula, después de 1 h de incubación a 37ºC las células se trataron durante 48 h.p.i. con un rango de concentraciones de 3,1 µM hasta 50 µM para **BP 13**, **BP 9**, **BP 17** y **BP 18** respectivamente. Se cuantificó el título viral (virus extracelular) por el método de UFP.

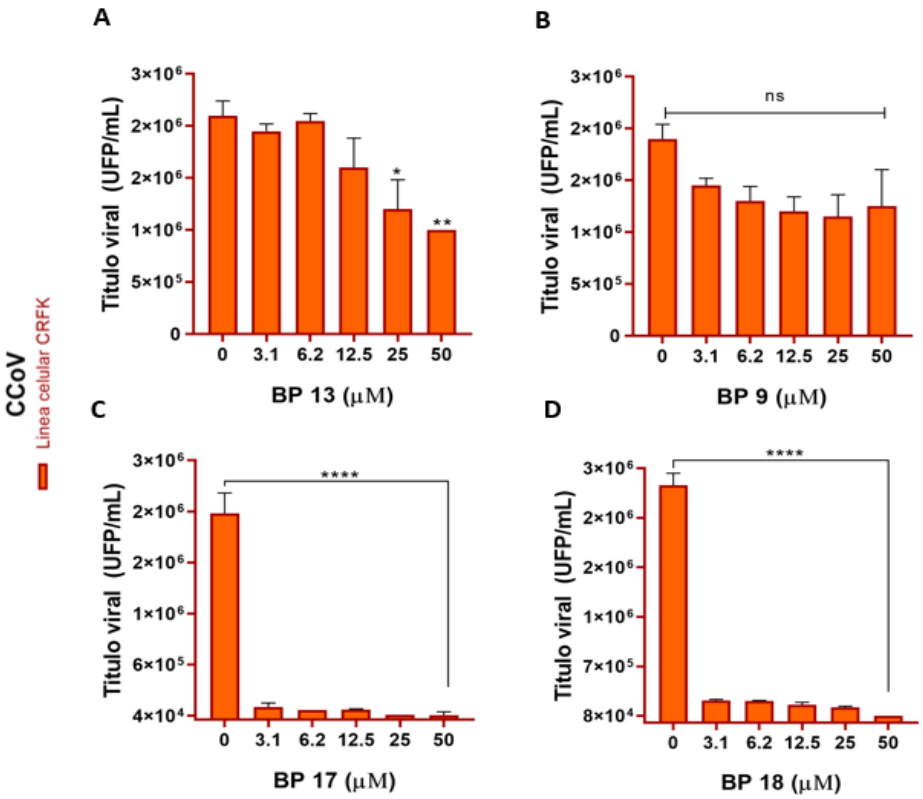


Figura 38. Actividad antiviral de los bisfosfonatos no comerciales en células CRFK. Las monocapas celulares fueron infectadas con CCoV y tratadas con 3,1; 6,2; 12,5; 25 y 50 µM durante 48 h.p.i. La cuantificación de la infectividad viral se realizó por medio del método UFP. Los resultados se analizaron mediante ANOVA de una vía y posterior test de Dunnett (*P<0,05; **P<0,01; ****P<0.0001). Los valores se reportan como la media ± *DE* y los asteriscos (*) indican diferencias significativas, ns: no hay diferencias significativas.

En la **Figura 38 C-D** se muestra el efecto de los bisfosfonatos **BP 17** y **BP 18** frente a la replicación viral de CCoV en la línea celular CRFK. Puede observarse una redución del título viral cuando el periodo de tratamiento fue 48 h p.i.. El porcentaje de inhibición viral para las concentraciones evaluadas redujo la infectividad entre el 90 % y 97 % de CCoV. Los resultados obtenidos por el efecto de **BP 13** y **BP 9** no presentaron la misma tendencia que **BP 17** y **BP 18** (**Figura 38 A-B**). En este caso se obtuvo sólo la redución de la infectividad de CCoV del 54 % y 39 % en las concentraciones ensayadas. Estos resultados reflejan que CCoV fue más susceptible a **BP 17** y **BP 18** y en menor medida a **BP 13** y **BP 9** a concentraciones donde la viabilidad celular estaba entre el 75 % y 80 %. En la **Tabla 8** se muestra el resumen de los resultados (expresados en % de inhibición) y la CE_{50}.

Línea celular CRFK					
	(µM)	**% Inhibición viral (CCoV)**	**CE_{50} (µM)**	**CC_{50} (µM)**	**IS**
BP 13	3,12	12,63 ± 1,0	42,06 ± 1,3	> 200	> 4,75
	6,25	11,52 ± 2,4			
	12,5	24,20 ± 6,0			
	25	39,11 ± 2,7			
	50	54,01 ± 0,5			
BP 9	3,12	23,33 ± 6,6	> 50	> 200	< 4
	6,25	31,66 ± 1,6			
	12,5	36,38 ± 8,1			
	25	39,72 ± 4,7			
	50	34,72 ± 9,7			
BP 17	3,12	93,10 ± 0,05	< 3,12	> 200	> 64
	6,25	94,40 ± 1,2			
	12,5	94,71 ± 0,5			
	25	97,59 ± 0,2			
	50	97,72 ± 1,4			
BP 18	3,12	90,06 ± 1,3	< 3,12	> 200	> 64
	6,25	90,27 ± 1,1			
	12,5	91,93 ± 1,5			
	25	93,11 ± 1,0			
	50	96,96 ± 0,2			

Tabla 8. Porcentaje de Inhibición obtenido al evaluar los bisfosfonatos BP 13, BP 9, BP 17 y BP 18 frente a CCoV. Los resultados de la actividad antiviral de los BPs no comerciales se procesaron como porcentaje (%) de inhibición viral en células CRFK. En la tabla se ilustran los valores de CE_{50}: concentración efectiva 50. CC_{50}: concentración citotóxica 50. IS: índice de selectividad. Los datos se expresan como el promedio de dos determinaciones ± desvió estándar (DE).

Los valores indican que los bisfosfonatos **BP 17 y BP 18** presentaron el efecto más potente frente a CCoV en la línea CRFK, ya que a concentraciones menores a 3,12 µM mostraron entre el 90 % y 93 % de inhibición de las partículas infectivas de CCoV. Además, los valores de índice de selectividad (**Tabla 8**) reflejan que **BP 17** y **BP 18** podrían ser buenos candidatos para posteriores evaluaciones.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antiviral del bisfosfonato comercial **ZA** frente a la multiplicación de JUNV, decidimos ampliar la evaluación de la eficacia de **ZA** en otros modelos virales con genoma de RNA de relevancia sanitaria en nuestra región, como lo son los arbovirus ZIKV, DENV y CHIKV.

2. Actividad antiviral del bisfosfonato ZA sobre la multiplicación de ZIKV

Para realizar estos ensayos, se infectaron células Vero y A549 con ZIKV (m.i. 0,1 UFP/célula) durante 1 h, y luego las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de **ZA** (1,2; 2,5; 5; 10; 20 µM) durante 48 h.p.i. Se cuantificó la producción de virus extracelular por medio del método de UFP y los resultados fueron expresados como título viral (UFP/mL), (**Figura 39**) y porcentaje (%) de inhibición viral por **ZA** en la **Tabla (9)**.

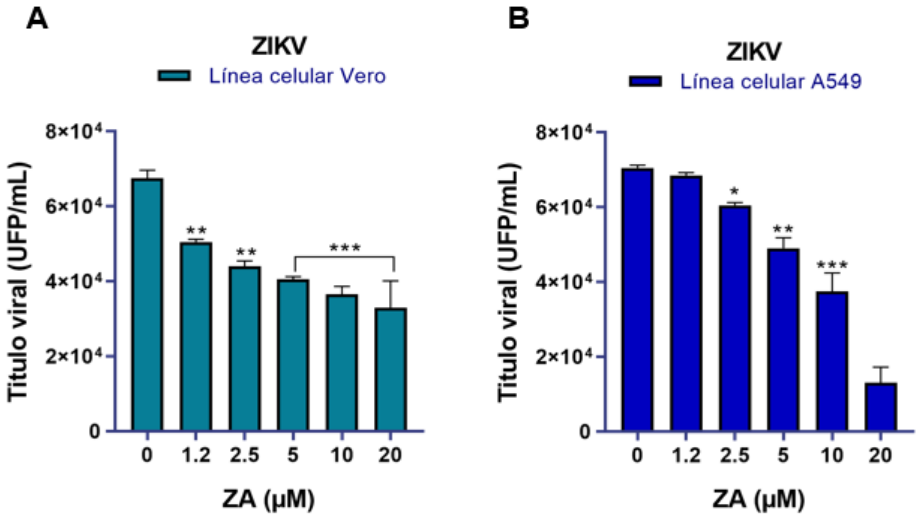


Figura 39. Actividad antiviral del bisfosfonato ZA frente a ZIKV. Las células Vero (A) y A549 (B) se infectaron con ZIKV (m.i=0,1), después de 1 h de incubación a 37°C se trataron las células con concentraciones crecientes del compuesto ZA (1,2 a 20 µM) durante 48 h.p.i. La cuantificación de la infectividad viral se realizó por medio del método UFP. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes y fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía y posterior test de Dunnett (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001).

El compuesto **ZA** presentó actividad inhibitoria frente a ZIKV a las 48 h.p.i. En ambas líneas se observó un efecto dependiente de la dosis, con valores de CE_{50} de 15,78 y 10 µM y un IS de 3,14 y 2,27 para la línea celular Vero (**Figura 39 A**) y A549 (**Figura 39 B**), respectivamente. Los resultados de la actividad antiviral de **ZA** en la línea Vero muestran una inhibición del 50% del título viral cuando la viabilidad se mantuvo por encima del 80% como lo observamos en el CAPÍTULO I, para la mayor concentración evaluada. Por otro lado, la actividad antiviral de **ZA** en las células A549 presentó un 80% de inhibición frente a ZIKV para la misma concentración, cuando la viabilidad celular fue del 55 %, por lo tanto, este efecto se debió principalmente a la citotoxicidad de **ZA** sobre las células A549.

Línea celular Vero				Línea celular A549		
ZA (µM)	% Inhibición viral (ZIKV)	CE_{50} (µM)	IS	% Inhibición viral (ZIKV)	CE_{50} (µM)	IS
1,2	25,2 ± 0,92	15,78 ± 1,06	3,14	2,8 ± 0,02	> 10	< 2,27
2,5	34,7 ± 2,93			14,2 ± 1,32		
5	40,0 ± 0,59			30,5 ± 3,33		
10	45,9 ± 1,02			46,8 ± 5,34		
20	51,5 ± 6,32			81,5 ± 4,39		

Tabla 9. Porcentaje de Inhibición viral obtenido al evaluar el bisfosfonato ZA frente a ZIKV. Los resultados de la actividad antiviral de ZA se procesaron como porcentaje (%) de Inhibición viral en células Vero y A549. En la tabla se ilustran los valores de CE_{50}: concentración efectiva 50. IS: índice de selectividad. Los datos se expresan como el promedio de dos determinaciones ± desviación estándar (DE).

En la **Tabla 9** se muestra el resumen de los resultados para la CE_{50} con valores que indican que el bisfosfonato **ZA** fue más potente en la línea Vero, ya que a concentraciones menores a 16 µM mostró un 50 % de inhibición de las partículas infectivas de ZIKV.

3. Actividad antiviral de ZA sobre la multiplicación de DENV-2

El siguiente modelo viral que se abordó fue DENV-2. Para ello, evaluamos la actividad antiviral de **ZA** en células Vero y A549. Se infectaron las líneas celulares con DENV-2 (m.i. 0,1 UFP/célula) durante 1 h, y luego las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de **ZA** (1,2; 2,5; 5; 10; 20 µM) durante 48 h.p.i. Se cuantificó la producción de virus extracelular por medio del método de UFP y los resultados fueron graficados como título viral (UFP/mL), (**Figura 3**). Finalmente, a partir de estos datos se calcularon los porcentajes de inhibición viral por **ZA** (**Tabla 10**).

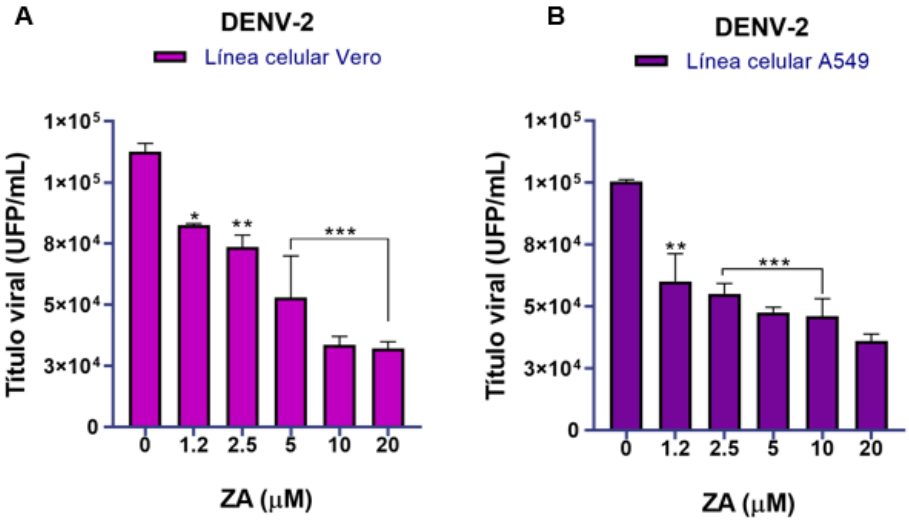


Figura 40. Actividad antiviral del bisfosfonato ZA frente a DENV-2. Las células Vero (A) y A549 (B) se infectaron con DENV-2 (m.i=0,1), después de 1 h de incubación a 37°C se trataron las células con concentraciones crecientes del compuesto ZA (1,2 a 20 µM) durante 48 h.p.i. La cuantificación de la infectividad viral se realizó por medio método UFP. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes y fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía y posterior test de Dunnett (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001).

El análisis de los datos indicó efectos similares de **ZA** frente a DENV-2 en las dos líneas celulares. Se obtuvo, una CE_{50} de 4,57 µM en células Vero. Cabe destacar que a partir de la concentración 5 µM y hasta 20 µM se observaron diferencias significativas, cuando la viabilidad celular en la línea Vero fue mayor al 80%, y según lo que observamos en el CAPÍTULO I. Con valores de % inhibición de la producción viral que estuvieron en el rango de 26,6% a 71,5% respectivamente. El valor de CE_{50} en las células A549 fue de 4,2 µM, observándose una reducción del 40,2 % del título de DENV-2 a la concentración más baja

evaluada, y de un 64,2 % de inhibición del rendimiento viral en el tratamiento con la máxima concentración ensayada.

Línea celular Vero				Línea celular A549		
ZA (µM)	% Inhibición viral (DENV-2)	CE50 (µM)	IS	% Inhibición viral (DENV-2)	CE50 (µM)	IS
1,2	26,6 ± 1,18	4,57 ± 1,28	10,9	40,2 ± 8,25	4,20 ± 1,01	5,41
2,5	34,7 ± 1,66			45,2 ± 3,25		
5	53,1 ± 9,62			52,7 ± 1,72		
10	70,2 ± 1,56			54,2 ± 4,74		
20	71,5 ± 2,41			64,2 ± 2,16		

Tabla 10. Porcentaje de Inhibición obtenido al evaluar el bisfosfonato ZA frente a DENV-2. Los resultados de la actividad antiviral de ZA se procesaron como porcentaje (%) de Inhibición viral en células Vero y A549. En la tabla se ilustran los valores de CE_{50}: concentración efectiva 50. IS: índice de selectividad. Los datos se expresan como el promedio de dos determinaciones ± desvió estándar (DE).

En resumen, este compuesto tuvo una acción antiviral en las dos líneas celulares ensayadas con una reducción del título de DENV-2. Observándose que a concentraciones entre 5 a 10 µM de **ZA** el porcentaje de inhibición es del 70%. Los valores de índice de selectividad (**Tabla 10**) reflejan que **ZA** podría ser un buen candidato para posteriores evaluaciones, en células Vero.

4.Evaluación de la citotoxicidad y actividad antiviral de ZA y BP 9 sobre la multiplicación de CHIKV en células Huh-7

Durante la realización de mi trabajo de Tesis se desató un brote importante de CHIKV en Sudamérica (enero-abril/2023), por lo que se propuso extender el estudio del efecto antiviral de los bisfosfonatos en este modelo viral. Para ello, realicé una estancia en el Laboratorio de Virologia de la Universidad El bosque en Bogotá, Colombia.

Para continuar con la evalución de bisfosfonatos sobre otros virus de interés decidimos ensayar el efecto de **ZA** sobre CHIKV. Además, en este caso y de forma comparativa, incluímos el **BP 9**. Primero determinamos las concentraciones óptimas sobre la linea celular Huh-7, que representa un óptimo modelo celular por ser una línea permisiva para la

multiplicación de este virus. Los cultivos de células Huh-7 se incubaron con diluciones seriadas al medio del compuesto **ZA** y **BP 9** durante 48 h. La viabilidad celular (**Figura 41 A**) se cuantificó mediante el método fluorimétrico de resazurina y se determinó la CC_{50}. De igual modo, se evaluó la actividad antiviral de **ZA** y **BP 9** frente a CHIKV (cepa 11484) en células Huh-7 y mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral (**Figura 41 B**). Los cultivos celulares se infectaron con m.i. de 1 UFP/célula, después de 1 h de incubación a 37ºC las células se trataron durante 24 h.p.i. con 25 µM y 50 µM de **ZA** y **BP 9**, respectivamente. Se cuantificó el título viral (virus extracelular) por el método de UFP. También se cuantificó por RT-PCR los niveles de RNA viral.

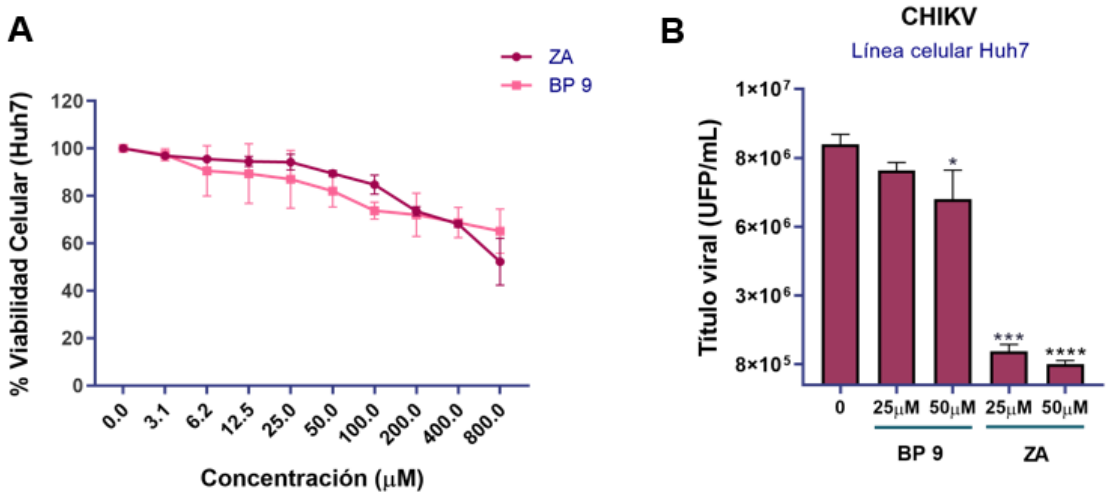


Figura 41. Efecto citotóxico y actividad antiviral en células Huh-7 tratadas p.i. con ZA y BP 9 frente a CHIKV. Las monocapas celulares Huh-7 fueron tratadas con concentraciones crecientes del compuesto ZA y BP 9 (3,1; 6,2; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800 µM), la viabilidad celular fue evaluada por el método fluorimétrico de resazurina a las 48 h. Los resultados fueron graficados como porcentaje (%) de viabilidad celular (A), y fueron analizados mediante regresión no lineal. Se estimó la CC_{50} < 800 µM para ZA y BP 9 en células Huh-7. Para evaluar el efecto antiviral de ZA y BP 9 frente CHIKV en células Huh-7, las monocapas celulares fueron infectadas con CHIKV (cepa 11484) con (m.i. = 1), después de 1 h de incubación a 37°C las células se trataron con 25 µM y 50 µM de ZA y BP 9 durante 24 h.p.i. (B). La cuantificación de la infectividad viral se realizó por medio del método UFP. Los resultados se analizaron mediante ANOVA de una vía y posterior test de Dunnett (*P<0,05; ***P<0,001; ****P<0.0004). Los valores se reportan como la media ± DE y los asteriscos (*) indican diferencias significativas. El título viral por parte de CHIKV es el promedio de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos en el ensayo de actividad citotóxica de los bisfosfonatos **ZA** y **BP 9** demostraron una disminución importante de la viabilidad celular de la línea Huh-7 a partir de 100 µM y en las mayores concentraciones estudiadas. Los resultados expresados en gráficas como porcentaje de viabilidad en función de la concentración indicados en la **Figura**

41 A mostraron que, cuando las células fueron tratadas con 800 µM, la viabilidad celular fue del 70 % (**BP 9**) o menor (**ZA**).

Cuando se ensayó el potencial antiviral se observó que el efecto del bisfosfonato **ZA** frente a la replicación viral de CHIKV en la línea celular Huh-7, provocó una reducción del título viral durante el periodo de tratamiento de 24 h p.i. (**Figura 41 B**). El porcentaje de inhibición viral para las concentraciones evaluadas fue entre el 86 % y 91 %. Los resultados obtenidos para **BP 9** no mostraron la misma tendencia que **ZA**. En este caso se obtuvo sólo la reducción de la infectividad de CHIKV del 11 % y 23 % en las concentraciones ensayadas. Estos resultados reflejan que CHIKV fue más sensible a **ZA** y en menor medida a **BP 9** a concentraciones donde la viabilidad celular estaba por encima del 80 %.

4.1 Efecto de ZA y BP 9 en los niveles de RNA de CHIKV en células Huh-7

Con los resultados obtenidos frente a la actividad antiviral de los bisfosfonatos **ZA** y **BP 9**, se realizó la cuantificación de los niveles de RNA virales correspondientes a los fragmentos codificantes para la proteína estructural E1 y la proteína no estructural NSP4 de CHIKV. En cultivos de células Huh-7 infectadas y tratadas con estos compuestos durante 24 h.p.i.

La proteína estructural E1 media la entrada a la célula por vía endocitosis, además de permitir el proceso de salida del virus, mientras que la proteína no estructural NSP4 es una RNA polimerasa dependiente de RNA. Para realizar este estudio, las monocapas de células Huh-7 se infectaron con CHIKV (m.i.=1 UFP/célula), después de infectar durante 1 h a 37°C las monocapas celulares se trataron con 25 µM y 50 µM de **ZA** y **BP 9**. El tratamiento se realizó durante 24 h.p.i., los sobrenadantes se cosecharon y se procesaron para obtener el RNA viral total, el cDNA y posterior PCR cuantitativa. Los valores de los niveles de RNA viral obtenidos de los sobrenadantes, se extrapolaron a una curva de calibración para obtener así el número de copias (**Figura 42 A**). Asimismo, se cosecharon los extractos celulares. Se utilizó actina como gen constitutivo para relativizar los datos obtenidos. Por último con los datos de la RT-PCR se calcularon los valores de ΔΔCt (**Figura 42 B**).

Los niveles de RNA virales obtenidos en el sobrenadante (**Figura 42 A**) de los ensayos de qPCR presentaron una tendencia de inhibición, en presencia de los bisfosfonatos **BP 9** y **ZA** respecto del control sin tratar. Cuando las células infectadas con CHIKV fueron tratadas durante 24 h.p.i. Al observar los valores del número de copias para los segmentos

codificantes para E1 y NSP4 durante el tratamiento con **BP 9** a la concentracion de 50 µM, pudimos evidenciar que número de copias genómicas disminuyó, principalmente al amplificar con *primers* para NSP4 respecto de los valores obtenidos en el control viral.

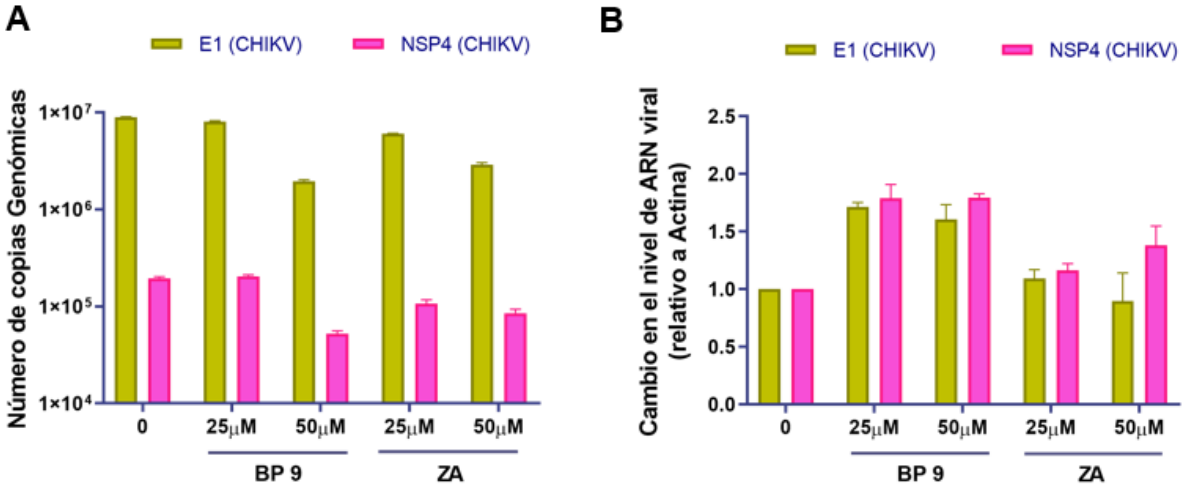


Figura 42. Cuantificación por RT-PCR de los niveles de expresión de los genes virales E1 y NSP4 en células Huh-7 tratadas p.i. con ZA y BP 9. (A), Se cuantificó el número de copias de RNA viral por RT-PCR (E1 y NSP4 de CHIKV) proveniente de sobrenadantes de cultivos celulares Huh-7 infectados y tratados con ZA y BP 9 (25µM y 50 µM), durante 24 h.p.i. (B), Con los lisados celulares de Huh-7 infectados y tratados de igual modo, se cuantificó el cambio en los niveles de RNA viral (E1 y NSP4). Los valores se reportan como la media ± DE.

Los resultados alcanzados después del tratamiento por 24 h.p.i. con **ZA** mostraron una tendencia, similar al efecto observado por **BP 9** a la misma concentración del compuesto. Debemos tener presente que estos valores son el resultado del RNA viral total, y a partir de ellos no podemos definir si provienen de particulas virales infectivas. Los resultados del número de copias obtenidos en la concentración de 25 µM del compuesto **ZA** mostraron un efecto inhibitorio respecto del control sin tratar. El número de copias correspondiente al fragmento de NSP4 no se vió alterado en los tratamientos realizados con las dos concentraciones de **ZA** ensayadas. Sin embargo se evidenciaron cambios en los valores obtenidos del número de copias cuando se amplificó el RNA viral con *primers* especificos para E1.

Por otro lado, cuando evaluamos la cantidad relativa de RNA viral amplificando fragmentos codificantes para E1 y NSP4 proveniente de los lisados celulares de Huh-7 infectados y tratados con **BP9** y **ZA** durante 24 h.p.i., observamos que el tratamiento con el bisfosfonato **BP 9** causó un aumento en los niveles de RNA, tanto en la concentración 25 µM como 50

µM, respecto a la cantidad relativa de RNA en el control viral (concentracion 0) (**Figura 42 B**).

Asimismo, cuando las células Huh-7 infectadas fueron tratadas con 25 y 50 µM de **ZA** se detectó un aumento en los niveles de RNA viral al amplificar con *primers* para NSP4. También, cuando se analizaron los niveles de RNA amplificados con *primers* para E1 se detectaron niveles similares de RNA viral en la máxima concentración ensayada (50 µM), y niveles aumentados en la menor concentración (25 µM), respecto al control (**Figura 42 B**).

Al observar los resultados del título viral (virus infectivo) en la **Figura 41 (B),** se puede observar que el rendimiento viral de CHIKV en presencia de **BP 9** para las dos concentraciones ensayadas disminuyó, mientras que el resultado de la determinación de los niveles de RNA viral mostraron un aumento (**Figura 42 B**). En conjunto, estos resultados podrían sugerir que la síntesis de macromoléculas virales no estaría inhibida en presencia de los compuestos, pero si la morfogénesis o ensamblado viral.

Para extenter el estudio de la actividad antiviral de los bisfosfonatos **ZA** y **BP 9** frente a CHIKV y conociendo además la respuesta ya estudiada para la actividad antiviral contra JUNV de los bisfosfonatos **ZA** y los **BPs** no comerciales en la linea celular Vero, realizamos los ensayos en esta línea celular.

4.2 Evaluación de la citotoxicidad y actividad antiviral de ZA y BP 9 sobre la multiplicación de CHIKV en la línea celular Vero

Para realizar la evalución de la viabilidad celular y la actividad antiviral de **ZA** y **BP 9** frente a CHIKV, decidimos ensayar únicamente la mayor concentración de estos compuestos (50 µM). Para ello, monocapas de células Vero se incubaron durante 48 h con los compuestos **ZA** y **BP 9**, respectivamente, y la viabilidad celular (**Figura 43 A**) se cuantificó mediante el método fluorimétrico de resazurina para determinar la CC_{50}. De igual modo, se evaluó la actividad antiviral de **ZA** y **BP 9** frente a CHIKV en células Vero mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral (**Figura 43 B**). Los cultivos celulares se infectaron con m.i. de 1 UFP/célula, después de 1 h de incubación a 37ºC las células se trataron durante 24 h con 50 µM de **ZA** y **BP 9**, respectivamente y finalmente se cuantificaron los títulos virales (virus extracelular) por el método de UFP.

Los porcentajes de viabilidad celular indicaron que la CC_{50} para **ZA** fue de 477 µM (**Figura 43 A**), mientras que para **BP 9**, la CC_{50} fue mayor a la máxima concentración evaluada (>800 µM). Cabe mencionar que los valores de CC_{50} ya habian sido obtenidos para los bisfosfonatos **ZA** y **BP 9** por el método de MTT para esta misma línea celular, con CC_{50} diferentes a los valores obtenidos por el método fluorimétrico de resazurina. Estas diferencias podrían deberse a que en estos se utilizó un lote comercial distinto de **ZA**.

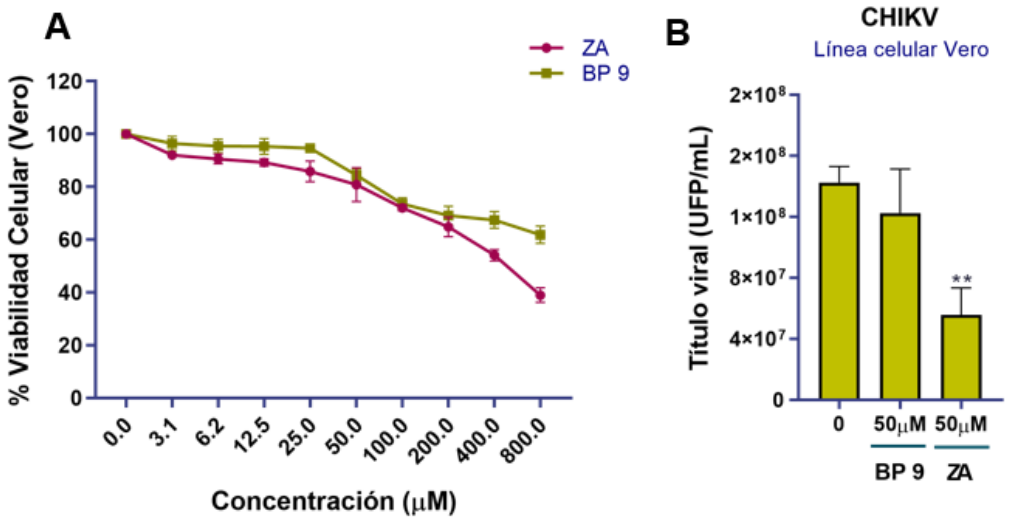


Figura 43. Evaluación citotóxica y Actividad antiviral en células Vero tratadas p.i. con ZA y BP 9 frente a CHIKV. Las monocapas celulares de Vero fueron tratadas con concentraciones crecientes del compuesto ZA y BP 9 (3,1; 6,2; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800 µM), la viabilidad celular fue evaluada por el método fluorométrico de resazurina a las 48 h. Los resultados fueron graficados como porcentaje (%) de viabilidad celular (A), y fueron analizados mediante regresión no lineal. Se estimó la CC_{50} = 477 µM para ZA y la CC_{50} = 800 µM para BP 9 en células Vero. Para evaluar el efecto antiviral de ZA y BP 9 frente CHIKV en células Vero, las monocapas celulares fueron infectadas con CHIKV (cepa 11484) con (m.i. = 1), después de 1 h de incubación a 37°C las células se trataron con 50 µM de ZA y BP 9 durante 24 h.p.i. (B). La cuantificación de la infectividad viral se realizó por medio del ensayo de formación de placas (UFP). Los resultados se analizaron mediante ANOVA de 1 vía y posterior test de Dunnett (**P<0,01). Los valores se reportan como la media ± *DE* y los asteriscos (*) indican diferencias significativas.

Cuando se evaluó el efecto antiviral de ambos compuestos, el porcentaje de inhibición viral para la concentracion evaluada de **BP 9** fue de 14 % (**Figura 43 B**). Por otro lado, los resultados del efecto de **ZA** mostraron una reducción del 60% en el título viral de CHIKV, respecto al control viral (concentración 0).

4.3 Efecto de ZA y BP 9 en los niveles de RNA de CHIKV en células Vero

Para este experimento, monocapas de células Vero se infectaron con CHIKV (m.i. = 1 UFP/célula), después de infectar durante 1 h a 37°C las monocapas celulares se trataron p.i. con 50 µM de **ZA** y **BP 9**. El tratamiento se realizó durante 24 h p.i., los sobrenadantes se cosecharon y se procesaron para obtener el RNA viral total, cDNA y posterior qPCR absoluta. Los valores del RNA viral obtenido de los sobrenadantes, se extrapolaron a una curva de calibración y para obtener así el número de copias absoluto (**Figura 44 A**). Por otro lado, a partir de los lisados celulares también se realizaron las mismas cuantificaciones, utilizando *primers* especificos para actina para relativizar los datos obtenidos (**Figura 44 B**).
Los resultados evidenciaron que los niveles de RNA viral determinados en el sobrenadante de los cultivos infectados, mediante amplificación con *primers* específicos para NSP4 fue menor respeto al control viral (concentración 0) (**Figura 44 A**).

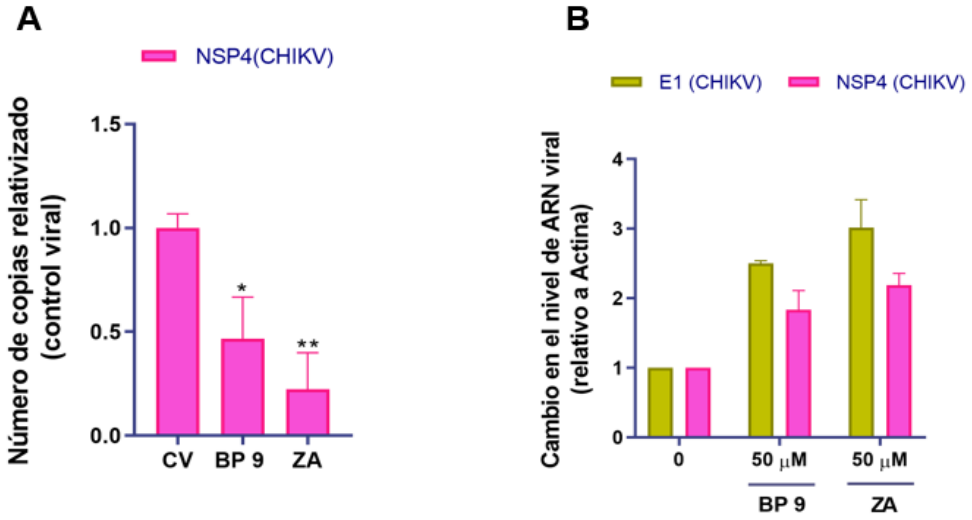


Figura 44. Cuantificación por RT-PCR de los niveles de expresión de los RNA virales (E1 y NSP4) en células Vero tratadas p.i. con ZA y BP 9 frente a CHIKV. (A), Se cuantificó el número de copias de RNA viral por RT-PCR (NSP4) de CHIKV proveniente de sobrenadantes de cultivos celulares de Vero infectados y tratados con ZA y BP 9 (50 µM), durante 24 h.p.i. (B), Con los lisados celulares de Vero infectados y tratados de igual modo, se cuantificó el cambio en los niveles de RNA viral (E1 y NSP4). Los valores se reportan como la media ± *DE.*

Al cuantificar la cantidad relativa de RNA viral mediante *primers* especificos para E1 y NSP4 en los lisados celulares, se observó que el tratamiento **ZA** aumentó los niveles de RNA viral respecto a la cantidad relativa en el control viral (concentracion 0) (**Figura 44 B**). Asimismo, cuando se determinaron los niveles de RNA viral en las células infectadas y tratadas con **BP**

9 también se detectó un aumento en los niveles de RNA viral para las dos amplificaciones realizadas (E1 y NSP4), respecto al control sin tratamiento. Cabe mencionar que este efecto fue mayor cuando los cultivos infectados fueron tratados con **ZA**.

Nuevamente estos resultados indican que los niveles intracelulares de RNA viral están aumentados, mientras que la cantidad de partículas virales extracelulares está disminuida luego de los tratamientos con **ZA** y **BP 9**. Estos datos en conjunto, sugieren nuevamente que la morfogénesis o ensamble del virus está afectado.

CAPITULO III. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este Capítulo analizamos el efecto de los BPs sobre el coronavirus CCoV. Al momento de atravesar la pandemia, decidimos explorar el uso de los bisfosfonatos en modelos de virus respiratorios subrogados, como el CCoV. Pudimos demostrar que los bisfosfonatos no comerciales **BP 17** y **BP 18** fueron potentes inhibidores de CCoV llegando a valores del 90% y 97% de reducción en el título viral respectivamente, en la línea felina CRFK. Asimismo, en este capítulo estudiamos la posibilidad de aplicar los BPs a otros modelos virales de interés.

Las enfermedades producidas por arbovirus son un problema muy grave a nivel mundial. Debido a que su vigilancia y prevención implica también la vigilancia de sus vectores, es muy difícil su control y casi imposible evitar su expansión a cualquier país tropical y subtropical, e incluso algunas regiones templadas. En 1967 la WHO los describió como un grupo de virus que existen en la naturaleza principalmente, debido a la transmisión biológica entre vertebrados susceptibles por artrópodos hematófagos. Además del virus de la fiebre amarilla, los principales arbovirus en nuestra región son: DENV, CHIKV y ZIKV.

Encontramos que todos los flavivirus ensayados fueron susceptibles a la acción de los inhibidores de **FPPS**. El efecto antiviral encontrado varió con la línea celular y el inhibidor utilizado. Para el caso de ZIKV la inhibición con el bifosfonato comercial **ZA** solo llegó al 50% en células Vero mientras que en la línea celular A549 fue del 80%. DENV-2 mostró una sensibilidad menor a **ZA,** con una efectividad opuesta: se alcanzaron mayores valores de inhibición en el sistema Vero (70%) que en A549 (64%).

Notablemente **ZA** inhibió en ~1 log la producción viral de CHIKV en el cultivo Huh-7. En este mismo sistema **BP 9** fue muy poco efectivo logrando solo un 23% de inhibición. Cuando se analizó la abundancia de RNA viral se observó que las células tratadas contenían mayor cantidad de RNA viral que las sin tratar, sugiriendo una acumulación intracelular y por tanto un defecto en el proceso de salida.

Muchos esfuerzos están abocados al diseño y caracterización de blancos antivirales novedosos para el grupo de los de arbovirus. Un estudio con el flavivirus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) mostró que la inhibición de la **FPPS** por el bisfosfonato ibandronato no afectó la replicación viral (Upadhyay *et al*., 2014). Por otro lado, Agrati *et al*., (2016) también estudiaron la capacidad antiviral del bisfosfonato **ZA** contra WNV. La activación de células Tγδ por tratamientos con **ZA** fue capaz de inhibir la replicación de WNV a través de la liberación de factores solubles como IFN-γ. Estos y otros autores (Beetz *et al*., 2008) propusieron que cuando la **FPPS** es inhibida, los metabolitos rio debajo (IPP y Apppi) de la MVA se acumulan, y actúan como fosfoantígenos conllevando a la activación de las

células Tγδ que tienen propiedades inmunomoduladoras para activar la muerte celular por apoptosis.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Una variedad de estudios sobre las interacciones virus-célula presentados en la *Introducción* de este trabajo, han identificado una serie de factores implicados en la infección por JUNV. Estos hallazgos han contribuido ampliamente a un mejor entendimiento de los mecanismos subyacentes en las diferentes etapas del ciclo de multiplicación de JUNV, que abarcan los procesos de entrada, replicación, ensamble y brotación.

La membrana plasmática posee diversas y novedosas características estructurales y funcionales, que la establecen como un modelo dinámico que incluye la presencia de heterogeneidades denominadas microdominios de membrana o balsas lipídicas (*lipid rafts)*. Estos microdominios ricos en colesterol representan plataformas estructurales lípido-proteicas que propician la eficiente modulación de procesos fisiológicos asociados a ella. Además, estos dominios juegan un papel crítico en diferentes aspectos biológicos del ciclo de replicación de muchos virus y bacterias (Barenholz, 2004). En particular el colesterol es crucial para el ciclo de multiplicación de los virus. Al inhibir la síntesis de colesterol, ácidos grasos y la biosíntesis de esfingolípidos, se inhibe la replicación, maduración y brotación viral (Syed *et al*., 2009; Waheed *et al*., 2009; Li *et al*., 2022).

En estos sitios particulares de las membranas es donde se concentran glicoesfingolípidos y colesterol, provocando que sean menos fluido que el resto de la membrana (Barman & Nayak, 2007). El empaquetamiento compacto de los esfingolípidos es mantenido por la presencia de colesterol, el mayor constituyente de estas balsas lipídicas y muchas proteínas que forman parte de estos dominios de membrana (Imhoff *et al*., 2007). La extracción del colesterol desmantela este orden, lo que conlleva a la desorganización de los microdominios lipídicos y a la disociación de proteínas unidas a los microdominios (Meza *et al.,* 2010).

Muchos reportes indican que el efecto del colesterol sobre la infectividad viral (Lee *et al*., 2008; Medigeshi *et al.,* 2008; Rothwell *et al*., 2009; Wang *et al*., 2009; Li *et al*., 2022); ya sea participando en el ensamble o en la brotación de las partículas virales. Los microdominios lipídicos participan de tres formas: ordenando, marcando y entregando los componentes virales al sitio de ensamble a través de las vías exocíticas. Además, constituyen el sitio de brotación en la membrana plasmática y facilitan el proceso de liberación de las partículas víricas (Nayak & Barman, 2002; Li *et al*., 2022).

La biosíntesis de los lípidos que conforman los microdominios de membrana se regula a través de MVA; en esta vía la enzima **FPPS** es clave en dos pasos catalíticos y, es blanco de inhibidores conocidos como BPs. Estos compuestos son bien caracterizados y empleados en

la clínica para tratar ciertas enfermedades relacionadas con la resorción del calcio en los huesos.

Al bloquear la enzima **FPPS** se impide la prenilación de las GTPasas que son requeridas no sólo para la función de anclaje de proteínas a membrana celular, sino que además al estar bloqueada la función por BPs en este caso, se impide la función de GTPasas como Rab que es necesaria para el transporte por la vía secretora de endomembranas de células eucariotas a través del RE y Golgi, para el transporte de proteínas y lípidos en los diferentes compartimientos de membrana. Si los virus envueltos requieren el anclaje y el transporte a través de RE-Golgi por Rab para su traslado de proteínas virales a la membrana celular y maduración (Martinez *et al*., 2009; Borches *et al*., 2021). Por otro lado, al inhibir la función de la **FPPS**, es alterada la síntesis de colesterol necesario para la formación de las regiones más densas en las membranas celulares, necesarias a su vez para el anclaje de proteínas virales y el correcto ensamble de la partícula vial. En consecuencia, a las partículas víricas que dependen de estas regiones densas se les dificultará la salida impidiendo de esta forma la infección de las células vecinas, por lo tanto, la propagación viral se vería afectada (Wang *et al*., 2007; Nayak *et al*., 2009; Cordo *et al*., 2013; Ketter *et al*., 2019).

El caso más estudiado en este aspecto es el del virus Influenza. En un reporte de Tan Sen *et al*. (2014) se investigó la eficacia del bisfosfonato comercial inhibidor de la **FPPS**, pamidronato contra el virus influenza A (H1N1) *in vitro* e *in vivo*. Las células HeLa fueron tratadas con pamidronato para determinar su efecto en la replicación del virus influenza. El tratamiento con el inhibidor de la **FPPS** *in vitro* redujo efectivamente el título viral en ~1 log y la formación de los microdominios de membrana fueron afectados sin toxicidad celular. Sin embargo, el pamidronato careció de eficacia *in vivo* y fue asociado con un mayor daño pulmonar debido a la complejidad de la interacción entre el fármaco y el hospedador utilizado (modelo murino).

Este mismo bisfosfonato fue usado para inhibir la replicación del otro virus influenza A (H7N9) en ratones humanizados. En este estudio evaluaron el potencial del pamidronato como un fármaco que actúa inhibiendo la **FPPS** y provocando la acumulación de metabolitos como IPP, actuando como un fosfoantígeno induciendo la activación de las células Tγδ. Los resultados obtenidos mostraron que las inmunizaciones intraperitoneales de pamidronato disminuyen fuertemente la mortalidad y la morbilidad de los ratones infectados con H7N9 a través del control de la infección de la replicación viral y la inflamación de los pulmones infectados. Además, observaron que el tratamiento con pamidronato aún después de tres

días de la infección mejoró significativamente las posibilidades de supervivencia. Hace más de dos décadas que el pamidronato es utilizado como tratamiento frente a la osteoporosis, por lo tanto, lo recomendaron como una buena alternativa en ensayos clínicos para tratar la infección por H7N9 (Zheng *et al*., 2015).

Teniendo en cuenta la relevancia del colesterol en la replicación de JUNV decidimos entonces estudiar la modulación de la enzima **FPPS** en células infectadas y su efecto sobre la multiplicación viral.

Por lo tanto, en este trabajo de Tesis se abordó por primera vez el posible uso de la enzima **FPPS** como blanco antiviral frente a una infección *in vitro* con JUNV, causante de la FHA. Además, estudiamos el efecto de los BPs sobre la multiplicación de arbovirus como ZIKV, DENV y CHIKV, así como el virus modelo de SARS-CoV-2, el coronavirus canino CCoV. Estos virus tienen en común un genoma de RNA, y necesitan de los factores celulares como los diferentes tipos de membranas celulares para la síntesis, maduración y traslado, ya sea de sus proteínas hacia la membrana celular y posterior ensamble y brotación, como también utilizar las membranas del RE (retículo endoplásmico) y Golgi, para su maduración y transporte hacia el citoplasma celular y continuar con su maduración y salida de la célula.

Nuestros principales hallazgos fueron:

- El bisfosfonato comercial **ZA** presentó un efecto antiviral sobre la multiplicación de JUNV en las líneas celulares A549 y Vero, aunque el rango de concentraciones efectivo resultó acotado.
- En el *screening* de los BPs no comerciales para la actividad antiviral frente a JUNV, se observó que cuatro de los BPs no comerciales fueron potentes inhibidores, con índice de selectividad > 10.
- La estimación *"in silico"* de las afinidades de unión de los BPs no comerciales a la enzima **FPPS**, arrojó que tres de los BPs no comerciales coinciden con los BPs que obtuvieron el mejor efecto antiviral frente a JUNV evaluados *"in vitro"*. Además, se observó que **ZA** presentó menor afinidad de unión frente a esa enzima humana.
- La expresión de los antígenos virales de JUNV por medio del análisis de las imágenes de microscopia, indica que hay diferencias significativas principalmente en la expresión para GPC/GP1 en presencia de **BP 18,** el efecto no fue tan pronunciado respecto a las células positivas para Z y NP.
- Se comprobó que la actividad fusogénica de GP2 esta disminuida en presencia del bisfosfonato **BP 18** en células transfectadas.

- **BP 18** reduce la producción de VLPs en cultivos transfectados con Z. Por lo tanto, su función está afectada negativamente después de un tratamiento con los bisfosfonatos **ZA** y **BP 18**.
- El bisfosfonato **BP 18** ejerció su acción antiviral (90 % de inhibición) en las etapas tardías del ciclo de multiplicación de JUNV.
- **ZA** presentó un efecto antiviral comparable al 90 % de inhibición ejercido por **BP 18** en las etapas tardías de JUNV.
- Los bisfosfonatos no comerciales **BP 18 y BP 17** ejercieron la mayor acción antiviral contra el modelo subrogado de SARS-CoV-2, el CCoV.
- Los flavivirus ZIKV y DENV-2 fueron susceptibles a la actividad antiviral del bisfosfonato comercial **ZA,** en concentraciones donde la viabilidad celular fue mayor al 80 %.
- La acción antiviral de **ZA** frente a CHIKV fue más potente respecto a **BP 9** en ensayos de rendimiento viral.
- La síntesis de macromoléculas virales (CHIKV) no fue inhibida en presencia de estos bisfosfonatos, pero si la morfogénesis o el ensamblado viral en las lineas celulares Huh-7 y Vero.

Explorar alternativas que permitan el reposicionamiento de compuestos o drogas ya usados en la clínica con blancos bien caracterizados, es una herramienta útil para abordar modelos virales de importancia sanitaria para la salud humana. En particular el uso de BPs comerciales y no comerciales demostró ser eficiente para la inhibición de la multiplicación de varios modelos virales.

En conclusión, en este trabajo de Tesis hemos demostrado por primera vez que **BPs** no comerciales poseen excelentes perspectivas como inhibidores de amplio espectro frente a virus envueltos con genoma de RNA. En futuros estudios evaluaremos esta capacidad antiviral en modelos *in vivo*

REFERENCIAS

Acciani M, Alston JT, Zhao G, Reynolds H, Ali AM, Xu B, Brindley MA. (2017). Mutational Analysis of Lassa Virus Glycoprotein Highlights Regions Required for Alpha-Dystroglycan Utilization. J Virol. Aug 24;91(18): e00574-17.

Agrati C, Castilletti C, Cimini E, et al. (2016). Antiviral activity of human Vδ2 T-cells against WNV includes both cytolytic and non-cytolytic mechanisms. New Micro. 39, 2, 139-142.

Agrati, C, Alonzi, T, De Santis, R., Castilletti, C, Abbate, I, Capobianchi, M.R., D'Offizi, G., Siepi, F., Fimia, G.M., Tripodi, M., Poccia, F., (2006). Activation of Vgamma9Vdelta2 T cells by non-peptidic antigens induces the inhibition of subgenomic HCV replication. Int. Immunol. 18, 11–18.

Agrati, C.; Castilletti, C.; Cimini, E.; Romanelli, A.; Lapa, D.; Quartu, S.; *et al*. (2016). Antiviral activity of human Vδ2T-cells against WNV includes both cytolytic and non-cytolytic mechanisms. New Micro. 39,2,139-142.

Ambrosio A, Saavedra M, Mariani M, Gamboa G, Maiza A. (2011). Argentine haemorrhagic fever vaccines. *Hum Vaccine*; 7(6):694-700.

At Home with *Mastomys* and *Rattus*: Human-Rodent Interactions and Potential for Primary Transmission of Lassa Virus in Domestic Spaces. Am J Trop Med Hyg. Apr;96(4):935-943.

Baird NL, York J, Nunberg JH. (2012). Arenavirus infection induces discrete cytosolic structures for RNA replication. J Virol 86: 11301-10.

Barenholz Y. (2004). Sphingomyelin and cholesterol: from membrane biophysics and rafts to potential medical applications. *Subcell Biochem*. 37: 167-215.

Barman, S. & Nayak, D. P. (2007). Lipid raft disruption by cholesterol depletion enhances influenza A virus budding from MDCK cells. J Virol 81, 12169–12178.

Bartolotta S, García CC, Candurra NA, Damonte EB. (2001). Effect of fatty acids on arenavirus replication: inhibition of virus production by lauric acid. Arch Virol. 146(4):777-90.

Beetz S, Wesch D, Marischen L, Welte S, Oberg HH, Kabelitz D. (2008). Innate immune functions of human gammadelta T cells. Immunobiology; 213:173–82.

Bell TM, Bunton TE, Shaia CI, Raymond JW, Honnold SP, Donnelly GC, Shamblin JD, Wilkinson ER, Cashman KA. (2016). Pathogenesis of Bolivian Hemorrhagic Fever in Guinea Pigs. Vet Pathol. Jan;53(1):190-9.

Berndt, N., Hamilton, A. D. & Sebti, S. M. (2011). Targeting protein prenylation for cancer therapy. Nat. Rev. Cancer 11, 775–791.

Benzaïd I, MönkkönenH, Bonnelye E, Mönkkönen J, Clézardin P. (2012). *In Vivo* phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors trigger Vy9V2T-cell antitumor cytotoxicity throught ICAM-1 engagement. Clin Cancer Res; 18 (22).

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

Blaising, J. & Pe´ cheur, E.-I. (2013). Lipids: a key for hepatitis C virus entry and a potential target for antiviral strategies. Biochimie 95, 96–102.

Bonetti PO, Lerman LO, Napoli C, Lerman A. (2003). Statin effects beyond lipid lowering – are they clinically relevant? Eur Heart J;24(3):225–48.

Bonjardim, C.A. (2017). Viral exploitation of the MEK/ERK pathway—A tale of vaccinia virus and other viruses. Virology, 507,267–275.

Bonwitt J, Sáez AM, Lamin J, Ansumana R, Dawson M, Buanie J, Lamin J, Sondufu D, Borchert M, Sahr F, Fichet-Calvet E, Brown H. (2017).

Borio C.S., Bilen M.M., Argüelles M.H., Goñi S.E., Iserte J.A., Glikmann G., Lozano M.E. (2012). Antigen vehiculization particles based on the Z protein of Junin virus. *BMC Biotechnology*, 12:80.

Borchers, A.C.; Langemeyer, L.; Ungermann, C. (2021). Who's in control? Principles of Rab GTPase activation in endolysosomalmembrane trafficking and beyond. J. Cell Biol. 220, e202105120.

Busch M, Miño M, Dadon J, Hodara K. (2000). Habitat selection by *Calomys musculinus* (Muridae, Sigmodontinae) in crop areas of the pampean region, Argentina. Ecología Austral 2000; 10: 15-26.

Briggiler A, Sinchi A, Coronel F, Sánchez Z, Levis S, Taylor J, *et al*. (2015). Los nuevos escenarios de transmisión de la fiebre hemorrágica argentina desde la introducción de la vacuna a virus Junín vivo atenuado (candid#1): una experiencia en trabajadores golondrinas. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 32(1):165-71.

Brunetti, J.E.; Foscaldi, S.; Quintana, V.M.; Scolaro, L.A.; López, N.; Castilla, V. (2018). Role of the ERK1/2 Signaling Pathway in the Replication of Junín and Tacaribe Viruses. Viruses, 10, 199.

Buchmeier, M.J.; Bowen, M.D.; Peters, C.J. (2007). Arenaviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology*, Knipe, H.P., Howley, P.M., Ed.; Wolter Kluwer Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA; pp. 1791–1827.

Buckner FS, Urbina JA. (2012). Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for chagas disease. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2:236–242.

Casabona JC, Levingston Macleod JM, Loureiro ME, Gomez GA, Lopez N. (2009). The RING domain and the L79 residue of Z protein are involved in both the rescue of nucleocapsids and the incorporation of glycoproteins into infectious chimeric arenavirus-like particles. J Virol 83: 7029-7039.
Colina R, Costa-Mattioli M, Dowling RJ, Jaramillo M, Tai LH, Breitbach CJ, Martineau Y, Larsson O, Rong L, Svitkin YV, Makrigiannis AP, Bell JC, Sonenberg N. (2008). Translational control of the innate immune response through IRF-7. Nature; 452(7185): 323-328. Commun 430(3): 912-7.

Contigiani MS, S. SM. (1977). Virulence differentiation of Junín virus strains by biological markers in mice and guinea pigs. Medicina (B Aires);37(3):244-251.

Cordo SM, Valko A, Martinez GM, Candurra NA. (2013). Membrane localization of Junín virus glycoproteins requires cholesterol and cholesterol rich membranes. Biochem Biophys Res.

Coto CE, de Vombergar MD. (1969). The effect of 5-iododeoxyuridine and actinomycin D on the multiplication of Junín virus. Arch Gesamte Virusforsch. 27(2):307-16.

Coxon FP, Thompson K, Rogers MJ. (2006). Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. Curr Opin Pharmacol. 6:307-12.

Cromartie, T. H.; Fisher, K. J.; Grossman, J. N. (1999). The Discovery of a Novel Site of Action for Herbicidal Bisphosphonates. *Pest. Biochem. Physiol. 63*, 114–126.

Chazotte B. (2014). Labeling Membrane Glycoproteins or Glycolipids with Fluorescent Wheat Germ Agglutinin. Cold Spring Harbor Protocols.

Chiappero MB, Piacenza MF, Provensal MC, Calderón GE, Gardenal CN, Polop JJ. (2018). Effective Population Size Differences in *Calomys musculinus*, the Host of Junín Virus: Their Relationship with the Epidemiological History of Argentine Hemorrhagic Fever. Am J Trop Med Hyg. Aug;99(2):445-450.

Da Di, Huang Q, Ly H, Liang Y. (2022). Evaluating the Biological Role of Lassa Viral Z Protein-Mediated RIG-I inhibition using a replication-competent trisegmented Pichinde Virus system in an inducible RIG-IN expression cell line. Journal of Viology Vol. 96-16.

Das S, Edwards PA, Crockett JC; Rogers MJ. (2014). Upregulation of endogenous farnesyl diphosphate synthase overcomes the inhibitory effect of bisphosphonate on protein prenylation in Hela cells. Biochimica et Biophysica Acta 1841-569-573.

de la Torre JC (2005). Arenavirus extinction through lethal mutagenesis. Virus Res 107: 207-214.

Dunford JE, Kwaasi AA, Rogers MJ, Barnett BL, Ebetino FH, Russell RGG, et al. (2008). Structure- actictity relationships among the nitrogen containing bisphosphonates in clinical use and other analogues: time-dependent inhibition of human farnesyl pyrophosphate synthase. J Med Chem. 51:2187-95.

Dunford JE, Rogers MJ, Ebetino FH, Phipps RJ, Coxon FP. (2006). Inhibition of protein prenilation by bisphosphonates causes sustained activation of Rac, Cdc42, and Rho GTPases. J Bone Miner Res.21:684-94.

Dunham, E.C.; Leske, A.; Shifflett, K.; Watt, A.; Feldmann, H.; Hoenen, T.; Groseth, A. (2018). Lifecycle modelling systems support inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) as a pro-viral factor and antiviral target for New World arenaviruses. Antivir. Res. 157, 140–150.

DuShane, J.K.; Maginnis, M.S. (2019). Human DNA Virus Exploitation of the MAPK-ERK Cascade. Int. J. Mol. Sci. 20, 3427.

Dhar MK, Koul A, Kaul S. (2013). Farnesyl pyrophosphate synthase: a key enzyme in isoprenoid biosynthetic pathway and potential molecular target for drug development. N Biotechnol. Jan 25;30(2):114-23.

Eichler R, Lenz O, Strecker T, Eickmann M, Klenk HD, Garten W. (2003). Identification of Lassa virus glycoprotein signal peptide as a trans-acting maturation factor. EMBO Rep. Nov;4(11):1084-8.

Endo, A. (2010). A historical perspective on the discovery of statins. Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci. 86, 484–493.

Enria DA, Briggiler AM, Fernandez NJ, Levis SC, Maiztegui JI. (1984). Importance of dose of neutralising antibodies in treatment of Argentine haemorrhagic fever with immune plasma. Lancet. Aug 4;2(8397):255-6.

Fehling SK, Lennartz F, Strecker T. (2012). Multifunctional nature of the arenavirus RING finger protein Z. Viruses. Nov 9;4(11):2973-3011.

Ferron F, Weber F, de la Torre JC, Reguera J. (2017). Transcription and replication mechanisms of Bunyaviridae and Arenaviridae L proteins. Virus Res. Apr 15; 234:118-134.

Ferrer-Casal M, Li C, Galizzi M, et al. (2014). New insights into molecular recognition of 1,1-bisphosphonic acids by farnesyl diphosphate synthase. *Bioorg Med Chem.* 22:398–405.
Fleisch HA. (2000). Bisphosphonates in bone disease. From the laboratory to the patient. 4th ed. New York: Academic Press.

Forni D, Pontremoli C, Pozzoli U, Clerici M, Cagliani R, Sironi M. (2018). Ancient Evolution of Mammarenaviruses: Adaptation via Changes in the L Protein and No Evidence for Host-Virus Codivergence. Genome Biol Evol. Mar 1;10(3):863-874.

Galaka T. Falcone BN. Li C. Szajnman SH, Moreno SNJ. Docampo R. Rodriguez JB. (2019). Synthesis and biological evaluation of 1-alkylaminomethyl-1-1-bisphosphonic acids against *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*. Bioorganic & Medical Chemistry. 27-3663-3673.

Gallo GL, López N, Loureiro ME. (2022). The Virus-Host Interplay in Junín Mammarenavirus Infection. Viruses. May 24;14(6):1134.

Gaudin R & Barteneva NS. (2015). Sorting of small infectious virus particles by flow virometry reveals distinct infectivity profiles. Nat Commun 6: 6022.

Girón M.E, Aguilar I, Romero L, Sánchez EE, Pérez JC, Rodriguez-Acosta A, A S.S.N.R. Singireesu et al. *Life Sciences 203 (2018) 305–314*313 low-cost method to test cytotoxic effects of Crotalus vegrandis (Serpentes: Viperidae) venom on kidney cell cultures, Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 47 (3) 2005; 147–152.

Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. Nature 343, 425–430.

Gómez RM, Jaquenod de Giusti C, Sanchez Vallduvi MM, Frik J, Ferrer MF, Schattner M. (2011). Junín virus. A XXI century update. Microbes Infect. Apr;13(4):303-11.

Goñi SE, Borio CS, Romano FB, Rota RP, Pilloff MG, Iserte JA, Tortorici MA, Stephan BI, Bilen MF, Ghiringhelli PD, Lozano ME. (2010). Expression and purification of Z protein from Junin virus. J Biomed Biotechnol: 970491.

Gordon DH. (2005). Efficacy and safety of intravenous bisphosphonates for patients with breast cancer metastatic to bone: a review of randomised, double-blind, phase III trials. Clin Breast Cancer. 6:125-31.

Groseth A, Wolff S, Strecker T, Hoenen T, Becker S. (2010). Efficient budding of the tacaribe virus matrix protein z requires the nucleoprotein. J Virol. Apr;84(7):3603-11.

Gupta SD, Mehan RS, Tansey TR, Chen HT, Goping G, Goldberg I, Shechter I. (1999). Differential binding of proteins to peroxisomes in rat hepatoma cells: unique association of enzymes involved in isoprenoid metabolism. J Lipid Res. Sep;40(9):1572-84. PMID: 10484604.

Hallam SJ, Koma T, Maruyama J, Paessler S. (2018). Review of *Mammarenavirus* Biology and Replication. Front Microbiol. Aug 3; 9:1751.

Hallam SJ, Manning JT, Maruyama J, et al. (2020). A single mutation (V64G) within the RING Domain of Z attenuates Junin virus. *PLOS Negl Trop Dis*. 14(9): e0008555.

Hass M, Gölnitz U, Müller S, Becker-Ziaja B, Günther S. (2004). Replicon system for Lassa virus. J Virol 78: 13793–13803.

Hawkins JL, Robbins MD, Warren LC, Xia D, Petras SF, Valentine JJ, Varghese AH, Wang IK, Subashi TA, Shelly LD, Hay BA, Landschulz KT, Geoghegan KF, Harwood HJ., Jr. (2008). Pharmacologic inhibition of site 1 protease activity inhibits sterol regulatory element-binding protein processing and reduces lipogenic enzyme gene expression and lipid synthesis in cultured cells and experimental animals. *J Pharmacol Exp Ther.* 326(3):801–8.

Helguera G, Jemielity S, Abraham J, Cordo SM, Martinez MG, Rodríguez JA, Bregni C, Wang JJ, Farzan M, Penichet ML, Candurra NA, Choe H. (2012). An antibody recognizing the apical domain of human transferrin receptor 1 efficiently inhibits the entry of all new world hemorrhagic Fever arenaviruses. J Virol. Apr;86(7):4024-8.

Hemmat, N.; Asadzadeh, Z.; Ahangar, N.K.; Alemohammad, H.; Najafzadeh, B.; Derakhshani, A.; Baghbanzadeh, A.; Baghi, H.B.; Javadrashid, D.; Najafi, S.; et al. (2021). The roles of signaling pathways in SARS-CoV-2 infection; lessons learned from SARS-CoV and MERS-CoV. Arch. Virol. 166, 675–696.

Hepojoki J, Salmenpera P, Sironen T, Hetzel U, Korzyukov Y, Kipar A, Vapalahti O: (2015). Arenavirus coinfections are common in snakes with boid inclusion body disease. J Virol, 89: 8657-8660.

Hedstrom, L. IMP. (2009). dehydrogenase: Structure, mechanism, and inhibition. Chem. Rev. 109, 2903–2928.

Hidalgo J, Guy AR, Silesky-Jiménez JI, Baker T, Amin P. (2017). Viral hemorrhagic fever in the tropics: Report from the task forcé on tropical diseases bye the World Federetion of Societies of Intensive and Critical Care Medicine. J. of Critical Care 42: 366-372.

Hoenen, T., Kolesnikova, L., and Becker, S. (2007). Recent advances in filovirusand arenavirus-like particles. Future Virol. 2, 193–203. doi: 10.2217/17460794. 2.2.193.

Hui KPY, Sara DITK, Li H-S, Mandy MTN, Bui CHT, Peiris JSM, Chan RWY, Chan MCW. (2015). Modulation of sterol biosynthesis regulates viral replication and cytokine production in influenza A virus infected human alveolar epithelial cells. *Antiviral Research* 119-1-7.

Imhoff, H., von Messling, V., Herrler, G. & Haas, L. (2007). Canine distemper virus infection requires cholesterol in the viral envelope. J Virol 81, 4158–4165.

Iwasaki M, Ngo N, Cubitt B, de la Torre JC. (2015). Efficient Interaction between Arenavirus Nucleoprotein (NP) and RNA-Dependent RNA Polymerase (L) Is Mediated by the Virus Nucleocapsid (NP-RNA) Template. J Virol. May;89(10):5734-8.

Jemielity S, Wang JJ, Chan YK, Ahmed AA, Li W, Monahan S, Bu X, Farzan M, Freeman GJ, Umetsu DT, Dekruyff RH, Choe H. (2013). TIM-family proteins promote infection of multiple enveloped viruses through virion-associated phosphatidylserine. PLoS Pathog. Mar;9(3): e1003232.

Jinghua Cheng, Jie T, Bengiang L, et al. (2022). Swine influenza virus triggers ferroptosis in A549 cells to enhance virus replication. Virology Journal. 19:104.

Kavanagh KL, Guo K, Dunford JE, *et al*: (2006). The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates antiosteoporosis drugs. Proc Natl Acad Sci USA 103: 7829-7834.

Kavanagh KL, Guo K, Dunford JE, Wu X, Knapp S, Ebetino FH, et al. (2006). The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. Proc Natl Acad Sci USA. 103:7829-34.

Kerber R, Reindl S, Romanowski V, Gómez RM, Ogbaini-Emovon E, Günther S, ter Meulen J. (2015). Research efforts to control highly pathogenic arenaviruses: a summary of the progress and gaps. J Clin Virol. Mar; 64:120-7.

Ketter E, Randall G. (2019). Virus Impact on Lipids and Membranes. Annu Rev Virol. Sep 29;6(1):319-340.

Koma T, Huang C, Coscia A, et al. (2021). Glycoprotein N-linked glycans play a critical role in arenavirus pathogenicity. *PLoS Pathog*. 17(3): e1009356.

Kranzusch PJ, Whelan SP. (2011). Arenavirus Z protein controls viral RNA synthesis by locking a polymerase-promoter complex. Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 6;108(49):19743-8.

Kumar N, Wang J, Lan S, Danzy S, McLay Schelde L, Seladi-Schulman J, Ly H, Liang Y. (2012). Characterization of virulence-associated determinants in the envelope glycoprotein of Pichinde virus. Virology. Nov 10;433(1):97-103.

Kunzmann V, Bauer E, Wilhelm M. ((1999). Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. N Engl J Med. 340:737–8.

Lan S, Shieh WJ, Huang Q, Zaki SR, Liang Y, Ly H. (2020). Virulent infection of outbred Hartley guinea pigs with recombinant Pichinde virus as a surrogate small animal model for human Lassa fever. Virulence. Dec;11(1):1131-1141.

Lee, C.J. *et al*. (2008). Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. J. Virol. 82, 6470–6480.

Lepesheva GI, Villalta F, Waterman MR. (2011). Targeting *Trypanosoma cruzi* sterol 14α-demethylase (CYP51). *Adv Parasitol.* 75: 66–87.

Li Z-H, Li C, Szajnman SH, Rodriguez JB, Moreno SNJ. (2017). Synergistic activity between statins and bisphosphonates against acute experimental toxoplasmosis. Antimicrob Agents Chemother 61: e02628-16.

Li Y-J, Chen C-Y, Yang J-H and Chiu Y-F. (2022). Modulating cholesterol-rich lipid rafts to disrupt influenza A virus infection.
Front. Immunol. 13:982264.

Ling Y, Li ZH, Miranda K, Oldfield E, Moreno SNJ. (2007). The farnesyl-diphosphate/geranylgeranyl-diphosphate synthase of *Toxoplasma gondii* is a bifunctional enzyme and a molecular target of bisphosphonates. *J Biol Chem.* 282:30804–30816.

López N, Jácamo R, Franze-Fernández MT. (2001). Transcription and RNA replication of tacaribe virus genome and antigenome analogs require N and L proteins: Z protein is an inhibitor of these processes. J Virol. Dec;75(24):12241-51.

Lopez NM & Franze-Fernandez MT. (2007). A single stem-loop structure in Tacaribe arenavirus intergenic region is essential for transcription termination but is not required for a correct initiation of transcription and replication. Virus Res 124: 237-244.

Lu, Y. *et al*., (2008). Lipid rafts are involved in SARS-CoV entry into Vero E6 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 369, 344–349.

Maes P, Alkhovsky SV, Bao Y, Beer M, Birkhead M, Briese T, Buchmeier MJ, Calisher CH, Charrel RN, Choi IR et al. (2018). Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update. Arch Virol, 163:2295-2310.

Maes, P.; Adkins, S.; Alkhovsky, S.V.; Avsic-Zupanc, T.; Ballinger, M.J.; Bente, D.A.; Beer, M.; Bergeron, E.; Blair, C.D.; Briese, T.; et al. (2019). Taxonomy of the order bunyavirales: Second update 2018. *Arch. Virol. 164*,927–941.

Manoj KD, Archana K, Sanjana K. (2013). Farnesyl pyrophosphate synthase: a key enzyme in isoprenoid biosynthetic pathway and potential molecular target for drug development. New Biotechnology, Vol. 30, Num. 2.

Martín D, Piulachs MD, Cunillera N, Ferrer A, Bellés X. (2007). Mitochondrial target of farnesil diphosphate synthase is a widespread phenomenon in eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773-419-426.

Maiztegui JI, McKee KT Jr, Barrera Oro JG, Harrison LH, Gibbs PH, Feuillade MR, Enria DA, Briggiler AM, Levis SC, Ambrosio AM, Halsey NA, Peters CJ. (1998). Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine hemorrhagic fever. AHF Study Group. J Infect Dis. Feb;177(2):277-83.

Marta R, Enria D, Molinas F. (2000). Relationship between hematopoietic growth factors levels and haematological parameters in Argentine haemorrhagic fever. *Am J Hematol*. 64(1):1-6.

Martin, M. B.; Arnold, W.; Heath III, H. T.; Urbina, J. A.; Oldfield, E. (1999). Nitrogen-Containing Bisphosphonates as Carbocation Transition State Analogs for Isoprenoid Biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 263*, 754–758.

Martinez, M.G.; Cordo, S.M.; Candurra, N.A. (2007). Characterization of Junin arenavirus cell entry. J. Gen. Virol. 88, 1776–1784.

Martinez, M.G.; Forlenza, M.B.; Candurra, N.A. (2009). Involvement of cellular proteins in Junin arenavirus entry. Biotechnol. J. 4,866–870.

Masini, T., and Hirsch, A. K. (2014). Development of inhibitors of the 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway enzymes as potential anti-infective agents. J. Med. Chem. 57, 9740–9763.

McElroy AK, Akondy RS, Harmon JR, Ellebedy AH, Cannon D, Klena JD, Sidney J, Sette A, Mehta AK, Kraft CS, Lyon MG, Varkey JB, Ribner BS, Nichol ST, Spiropoulou CF. (2017). A Case of Human Lassa Virus Infection with Robust Acute T-Cell Activation and Long-Term Virus-Specific T-Cell Responses. J Infect Dis. Jun 15;215(12):1862-1872.

McTaggart, S. J. (2006). Isoprenylated proteins. Cell Mol. Life Sci. 63, 255–267.

Medigeshi, G.R. *et al.* (2008). West Nile virus entry requires cholesterol-rich membrane microdomains and is independent of alphavbeta3 integrin. J. Virol. 82, 5212–5219.

Meyer BJ, de la Torre JC, Southern PJ. (2002). Arenaviruses: genomic RNAs, transcription, and replication. Curr Top Microbiol Immunol. 262:139-57.

Moraz ML, Kunz S. (2011). Pathogenesis of arenavirus hemorrhagic fevers. Expert Rev Anti Infect Ther. Jan;9(1):49-59.

Morin B, Coutard B, Lelke M, Ferron F, Kerber R, Jamal S, Frangeul A, Baronti C, Charrel R, de Lamballerie X, Vonrhein C, Lescar J, Bricogne G, Günther S, Canard B. (2010). The N-terminal domain of the arenavirus L protein is an RNA endonuclease essential in mRNA transcription. PLoS Pathog. Sep 16;6(9): e1001038.

Moreno SNJ, Li Z. *(*2008). Targeting the isoprenoid pathway of *Toxoplasma gondii*. *Expert Opin Ther Targets* 12:253–264.

Nair SC, Brooks CF, Goodman CD, et al. (2011). Apicoplast isoprenoid precursor synthesis and the molecular basis of fosmidomycin resistance in *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med.* 208:1547–1559.

Nayah, D.P. & Barman, S. (2002). Role of lipid rafts in virus assembly and budding. J. Virol 58, 0065-3527/02.

Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH and Barman S: (2009). Influenza virus morphogenesis and budding. Virus Res 143: 147-161.

Nguyen THV, Yekwa E, Selisko B, Canard B, Alvarez K, Ferron F. (2022). Inhibition of *Arenaviridae* nucleoprotein exonuclease by bisphosphonate. IUCrJ. May 28;9(Pt 4):468-479.

Olmos JM, González Macías J. (2007). Osteoporosis tras la curación tumoral. Med Clin (Barc). 129:669-76.

Ono A, Freed EO. (2005). Role of lipid rafts in virus replication. Adv Virus Res 64: 311-358.

Owens G, Jackson R, Lewiecki M. (2007). An integrated approach: bisphosphonate management for the treatment of osteoporosis. Am J Manag Care. 13: S290-S308.

Ozturk OH, Bozcuk H, et al. (2007). Cisplatin cytotoxicity is enhanced with zoledronic acid A549 lung cancer cell line: Preliminary results of an *in vitro* study. Cell Biology International. 31,1069-1071.

Park J, Pandya VR, Ezekiel SJ and Berghuis AM. (2021). Phosphonate and Bisphosphonate Inhibitors of Farnesyl Pyrophosphate Synthases: A Structure-Guided Perspective. Front. Chem. 8:612728.

Park J, Rodionov D, De Schutter JW, Lin Y-S, Tsantrizos YS, Berghuis AM. (2017). Crystallographic and thermodynamic characterization of phenylaminopyridine bisphosphonates binding to human farnesyl pyrophosphate synthase. PLoS ONE 12(10): e0186447.
Park, J, Zielinski M, Magder A, Tsantrizos YS, Berghuis AM. (2017). Human farnesyl pyrophosphate synthase is allosterically inhibited by its own producto. *Nat. Commun*. 8,14132.

Park, J., Matralis, A. N., Berghuis, A. M., and Tsantrizos, Y. S. (2014). Human isoprenoid synthase enzymes as therapeutic targets. Front. Chem. 2:50.

Parodi A.S., Greenway D.J., Rugiere H.R., Rivero E., Frigerio M.J., Mettier N.E., Garzón F., Boxaca M., Guerrero L.B. de and Nota N.R. (1958). Sobre la etiología del brote epidémico en Junín. Día Médico. 30, 2300-2302.

Pasquato A, Cendron L, Kunz S. Cleavage of the Glycoprotein of Arenaviruses. (2018). Activation of Viruses by Host Proteases. Feb 16:47–70.

Pasquato A, Rochat C, Burri DJ, Pasqual G, de la Torre JC, Kunz S. (2012). Evaluation of the anti-arenaviral activity of the subtilisin kexin isozyme-1/site-1 protease inhibitor PF-429242. Virology. Feb 5;423(1):14-22.

Piacenza M.F., Calderón G.E., Enría D., Provensal M.C., Polop J.J. (2018). Spatial difference in the incidence of Argentine Hemorrhagic Fever and composition and abundance of rodents in the assemblage. Rev Chilena Infectol 35 (4): 386-394.

Poccia F., Battistini L., Cipriani B., Mancino G., Martini F., Gougeon M.L., Colizzi V. (1999). Phosphoantigen-reactive Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes suppress in vitro human immunodeficiency virus type 1 replication by cell-released antiviral factors including CC chemokines. *J. Infect. Dis.* 180, 858-861.

Pleschka, S. (2008). RNA viruses and the mitogenic Raf/MEK/ERK signal transduction cascade. Biol. Chem. 389, 1273–1282.

Plotnikov, E.; Zehorai, S.; Procaccia, R. Seger. (2011). The MAPK cascades: Signalling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. Biochim. Biophys. Acta 1813, 1619–1633.

Pyle JD, Whelan SPJ. (2021). Isolation of Reconstructed Functional Ribonucleoprotein Complexes of Machupo Virus. J Virol. Oct 27;95(22): e0105421.

Quirin K, Eschli B, Scheu I, Poort L, Kartenbeck J, Helenius A. (2008). Lymphocytic choriomeningitis virus uses a novel endocytic pathway for infectious entry via late endosomes. Virology. Aug 15;378(1):21-33.

Q. Liu, Y. Miao, X. Wang, G. Lv, Y. Peng, K. Li, M. Li, L. Qiu, J. Lin. (2019). Structurebased virtual screening and biological evaluation of novel non-bisphosphonate farnesyl pyrophosphate synthase inhibitors, *European Journal of Medicinal Chemistry*.

Raaben, M., Jae, L. T., Herbert, A. S., Kuehne, A. I., Stubbs, S. H., Chou, Y. Y., et al. (2017). NRP2 and CD63 are host factors for Lujo virus cell entry. Cell Host Microbe 22, 688.e5–696.e5.

Radoshitzky SR, Abraham J, Spiropoulou CF, Kuhn JH, Nguyen D, Li W, Nagel J, Schmidt PJ, Nunberg JH, Andrews NC, Farzan M, Choe H. (2007). Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. Nature 446: 92-96.

Radoshitzky SR, Bào Y, Buchmeier MJ, Charrel RN, Clawson AN, Clegg CS, DeRisi JL, Emonet S, Gonzalez JP, Kuhn JH, Lukashevich IS, Peters CJ, Romanowski V, Salvato MS, Stenglein MD, de la Torre JC (2015). Past, present, and future of arenavirus taxonomy. Arch Virol 160(7): 1851-74.

Radoshitzky, S. R., Abraham, J., Spiropoulou, C. F., Kuhn, J. H., Nguyen, D., Li, W., et al. (2007). Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. Nature 446, 92–96. doi: 10.1038/nature 05539.

Radoshitzky, S.R. y de la Torre, J.C. (2020). Human Pathogenic Arenaviruses. Reference module in Life Sciences.

Recher M. Barboza AP. Li ZH. Galizzi M. Ferrel-Casal M. Szajnman SH. Docampo R. Moreno SNJ. Rodriguez JB. European Journal of Medicinal Chemistry 60 (2013) 431-440.

Reguera J, Gerlach P, Rosenthal M, Gaudon S, Coscia F, Günther S, Cusack S. (2016). Comparative Structural and Functional Analysis of Bunyavirus and Arenavirus Cap-Snatching Endonucleases. PLoS Pathog. Jun 15;12(6): e1005636.

Reszka AA. (2004). Mecanismo de acción de los bisfosfonatos. En: Riancho JA, González Macías J. Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. Madrid: Jarpyo; p. 175-81.

Rodríguez, M.E.; Brunetti, J.E.;Wachsman, M.B.; Scolaro, L.A.; Castilla, V. (2014). Raf/MEK/ERK pathway activation is required for Junín virus replication. J. Gen. Virol. 95, 799–805.

Rogers, M. J., Crockett, J. C., Coxon, F. P. & Monkkonen, J. (2011). Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. Bone 49, 34–41.

Romero D, Gómez-Zapata M, Luna A, García-Fernández A.J. (2004). Morphological characterization of renal cell lines (BGM and VERO) exposed to low doses of lead nitrate, Histol. Histopathol. 19 (1), 69–76.

Rothwell, C. *et al*. (2009) Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication. Virology 389, 8–19.

Russell RGG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. (2008). Mechanism of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. Osteoporos Int. 19:733-59. 23.

Ruiz MJ, P. Macáková, A. Juan-García, G. Font. (2011). Cytotoxic effects of mycotoxin combinations in mammalian kidney cells, Food Chem. Toxicol. 49 (10), 2718–2724.

Sanchez A, Pifat DY, Kenyon RH, Peters CJ, McCormick JB, Kiley MP. (1989). Junin virus monoclonal antibodies: characterization and cross-reactivity with other arenaviruses. J Gen Virol. May;70 (Pt 5):1125-32.

Schattner M, Rivadeneyra L, Pozner RG, Gómez RM. (2013). Pathogenic mechanisms involved in the haematological alterations of arenavirus-induced haemorrhagic fevers. *Viruses*.5(1): 340-351.

Schlie K, Maisa A, Lennartz F, Ströher U, Garten W, Strecker T. (2010). Characterization of Lassa virus glycoprotein oligomerization and influence of cholesterol on virus replication. J Virol. Jan;84(2):983-92.

Seo, J.-Y., and Cresswell, P. (2013). Viperin regulates cellular lipid metabolism during human cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog.* 9, e1003497.

Singureesu SSNR, Mondal SK, Yerramsetty S, Misra S. (2018). Zoledronic acid induces micronuclei formation, mitochondrial-mediated apoptosis and cytostasis in kidney cells. Life Sciences 203-305-314.

Shao J, Huang Q, Liu X, Di D, Liang Y, Ly H. (2018). Arenaviral Nucleoproteins Suppress PACT-Induced Augmentation of RIG-I Function to Inhibit Type I Interferon Production. J Virol. Jun 13;92(13): e00482-18.

Shi, M.; Lin, X.D.; Chen, X.; Tian, J.H.; Chen, L.J.; Li, K.; Wang, W.; Eden, J.S.; Shen, J.J.; Liu, L.; et al. (2018). The evolutionary history of vertebrate rna viruses. *Nature*, *556*, 197–202.

Shtanko O, Imai M, Goto H, Lukashevich IS, Neumann G, Watanabe T, Kawaoka Y. (2010). A role for the C terminus of Mopeia virus nucleoprotein in its incorporation into Z protein-induced virus-like particles. J Virol 84(10): 5415–5422.

Simons K and Ehehalt R: (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. J Clin Invest 110: 597-603.

Soares MM, King SW, Thorpe PE. (2008). Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases. Nat Med. Dec;14(12):1357-62.

Solomon T. (2003). Viral hemorrhagic fevers. En: Cook G, Zumla A, editors. Manson's Tropical Diseases. 21st ed, London: Elsevier Science: 773-793.

Southern PJ, Singh MK, Riviere Y, Jacoby DR, Buchmeier MJ, Oldstone MB. (1987). Molecular characterization of the genomic S RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. Virology 157: 145-155.

Spiropoulou, C. F., Kunz, S., Rollin, P. E., Campbell, K. P., and Oldstone, M. B. (2002). New World arenavirus clade C, but not clade A and B viruses, utilizes a-dystroglycan as its major receptor. J. Virol. 76, 5140–5146. doi: 10.1128/JVI. 76.10.5140-5146.

Strecker T, Eichler R, Meulen J, Weissenhorn W, Dieter Klenk H, Garten W, Lenz O. (2003). Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected] J Virol 77: 10700–10705.

Syed, G.H. *et al*., (2009). Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. Trends Endocrinol. Metab. 21, 33–40.

Szajnman SH, Bailey BN, Docampo R, Rodriguez JB. (2001). Bisphosphonates Derived from Fatty Acids are Potent Growth Inhibitors of *Trypanosoma cruzi.* Bioorg. Med. Chem. Lett. 11-789-792.

Szajnman SH, García LGE, Zhu-Hong L, Jiang C, Galizzi M, Bontempi EJ, Ferella M, Moreno SNJ, Docampo R, Rodriguez JB. (2008). Synthesis and biological evaluation of 2-alkylaminoethyl-1,1-bisphosphonic acids against *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* targeting farnesil diphosphate synthase. Bio. & Med. Chemistry 16-3283-3290.

Szajnman SH, Rosso VS, Malayil L, et al. (2012). 1-(Fluoroalkylidene)-1,1-bisphosphonic acids are potent and selective inhibitors of the enzymatic activity of *Toxoplasma gondii* farnesyl pyrophosphate synthase. *Org Biomol Chem.* 10:1424–1433.

Szajnman SH, Galaka T, Li Z-H, et al. (2017). In vitro and in vivo activities of sulfur-containing linear bisphosphonates against apicomplexan parasites. *Antimicrob Agents Chemother.* 61: e01590–16.

Tan KS, Wai Chii NG, Seet JE, *et al*. (2014). Engelward, B., Chow, V.T.K. Investigating the efficacy of pamidronato, a chemical inhibitor of farnesyl pyrophosphate synthase, in the inhibition of influenza virus infection *in vitro* and *in vivo*. *Molecular M. R*. 9:51-56.

Tan, S.K., Chiing W., Seet, JE., Olfat, F., Engelward, B., Chow, V.T.K. (2014). Investigating the efficacy of pamidronato, a chemical inhibitor of farnesyl pyrophosphate synthase, in the inhibition of influenza virus infection *in vitro* and *in vivo*. *Molecular M. R*. 9:51-56.

Tong, X.; Smith, J.; Bukreyeva, N.; Koma, T.; Manning, J.T.; Kalkeri, R.; Kwong, A.D.; Paessler, S. (2018). Merimepodib, an IMPDH inhibitor, suppresses replication of Zika virus and other emerging viral pathogens. Antivir. Res. 149, 34–40.

Tortorici MA, Albariño CG, Posik DM, Ghiringhelli PD, Lozano ME, Rivera Pomar R, Romanowski V. (2001). Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity *in vivo*. Virus Res 73: 41-55.

Tortorici MA, Ghiringhelli PD, Lozano ME, Albarino CG, Romanowski V (2001b). Zinc-binding properties of Junin virus nucleocapsid protein. J Gen Virol 82: 121-128.

Upadhyay, A. S., Vonderstein, K., Pichlmair, A., Stehling, O., Bennett, K. L., Dobler, G., Guo, J. T., Superti-Furga, G., Lill, R., Överby, A. K., and Weber, F. (2014). Viperin is an iron-sulfur protein that inhibits genome synthesis of tick-borne encephalitis virus via radicalSAMdomain activity. *Cell. Microbiol.* 16, 834–848.

Urata S, Noda T, Kawaoka Y, Yokosawa H, Yasuda J. (2006). Cellular factors required for Lassa virus budding. J Virol 80: 4191-4195.

Urata, S. & Yasuda, J. (2012). Molecular Mechanism of Arenavirus Assembly and Budding. Viruses 4, 2049–2079.

Urata S, Yun N, Pasquato A, Paessler S, Kunz S, de la Torre JC. (2011). Antiviral activity of a small-molecule inhibitor of arenavirus glycoprotein processing by the cellular site 1 protease. *J Virol.* 85(2):795–803.

Veliziotis, I.; Roman, A.; Martiny, D.; Schuldt, G.; Claus, M.; Dauby, N.; Van den Wijngaert, S.; Martin, C.; Nasreddine, R.; Perandones, C.; et al. (2020). Clinical management of Argentine Hemorrhagic Fever using ribavirin and favipiravir, Belgium, 2020. Emerg. Infect. Dis. 26, 1562–1566.
Vieth S, Torda AE, Asper M, Schmitz H, Gunther S. (2004). Sequence analysis of L RNA of Lassa virus. *Virology.* 318, 153-68.

Vogel D, Rosenthal M, Gogrefe N, Reindl S, Günther S. (2019). Biochemical characterization of the Lassa virus L protein. J Biol Chem. May 17;294(20):8088-8100.

Volpon L, Osborne MJ, Capul AA, de la Torre JC, Borden KL. (2010). Structural characterization of the Z RING-eIF4E complex reveals a distinct mode of control for eIF4E. Proc Natl Acad Sci U S A. Mar 23;107(12):5441-6.

Waheed, A.A. & Freed, E.O. (2009). Lipids and membrane microdomains in HIV-1 replication. Virus Res. 143, 162–176.

Waller, D. D., Park, J., and Tsantrizos, Y. S. (2019). Inhibition of farnesyl pyrophosphate (FPP) and/or geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) biosynthesis and its implication in the treatment of cancers. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 54, 41–60.

Wang, W. et al., (2009). Lipid rafts play an important role in the vesicular stomatitis virus life cycle. Arch. Virol. 154, 595–600.

Wang T. (2011). Role of gammadelta T cells in West Nile virus-induced encephalitis: friend or foe *J. Neuroimmunol.* 240-241**,** 22-27.

Wang, X., Hinson, E. R., and Cresswell, P. (2007). The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell. Host. Microbe*. 2, 96–105.

Weber LW, Boll M, Stampfl A. (2004). Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. World J Gastroenterol;10(21):3081–7.

Westover JB, Sefing EJ, Bailey KW, et al. (2016). Low-dose ribavirin potentiates the antiviral of favipiravir against haemorrhagic fever. *Antivir* Res. 126:62-68.

Wilda M, Lopez N, Casabona JC, Franze-Fernandez MT. (2008). Mapping of the tacaribe arenavirus Z-protein binding sites on the L protein identified both amino acids within the putative polymerase domain and a region at the N terminus of L that are critically involved in binding. J Virol 82: 11454–11460.

Wolf MC, Freiberg AN, Zhang T, Akyol-Ataman Z, Grock A, Hong PW, Li J, Watson NF, Fang AQ, Aguilar HC, et al. (2010). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 107:3157–3162.

World Health Organization. List of Blueprint Priority Diseases 2022. Available online: https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts (accessed on 25 April 2022).

Xing J, Ly H, Liang Y. (2015). The Z proteins of pathogenic but not nonpathogenic arenaviruses inhibit RIG-I-like receptor-dependent interferon production. J Virol. Mar;89(5):2944-55.

Xin-Yuan Sun, ab Jian-Ming Ouyang, ab Wen-Yu Zhu, ab Yu-Bao Liab, Qiong-Zhi Ganab. (2015). Size-dependent toxicity and interactions of calcium oxalate dihydrate crystals on Vero renal epithelial cells, J. Mater. Chem. B3;1864–1878.

Xin-Yuan Sun, J.-M. Ouyang, K. Yu. (2017). Shape-dependent cellular toxicity on renal epithelial cells and stone risk of calcium oxalate dihydrate crystals, Sci. Rep. 7; 7250.

Yang, S.H.; Sharrocks, A.D.; Whitmarsh, A.J. (2013). MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. Gene, 513, 1–13.

York J, Nunberg JH. (2016). Myristoylation of the Arenavirus Envelope Glycoprotein Stable Signal Peptide Is Critical for Membrane Fusion but Dispensable for Virion Morphogenesis. J Virol. Aug 26;90(18):8341-50.

York, J., Romanowski, V., Lu, M., Nunberg, J. H., (2004). The signal peptide of the Junin arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex. J Virol 78, 10783-92.

Zeitlin L, Geisbert JB, Deer DJ, Fenton KA, Bohorov O, Bohorova N, Goodman C, Kim D, Hiatt A, Pauly MH, Velasco J, Whaley KJ, Altmann F, Gruber C, Steinkellner H, Honko AN, Kuehne AI, Aman MJ, Sahandi S, Enterlein S, Zhan X, Enria D, Geisbert TW. (2016). Monoclonal antibody therapy for Junin virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A. Apr 19;113(16):4458-63.

Zheng J, Wu W-L, Liu Y, Xiang Z, Liu M, Chan K-H, et al. (2015). The Therapeutic Effect of Pamidronate on Lethal Avian Influenza A H7N9 Virus Infected Humanized Mice. PLoS ONE 10. (8): e0135999.

Ziegler CM, Bruce EA, Kelly JA, King BR, Botten JW. (2018). The use of novel epitope-tagged arenaviruses reveals that Rab5c-positive endosomal membranes are targeted by the LCMV matrix protein. J Gen Virol. Feb;99(2):187-193.

Ziegler CM, Eisenhauer P, Bruce EA, Beganovic V, King BR, Weir ME, Ballif BA, Botten J. (2016). A novel phosphoserine motif in the LCMV matrix protein Z regulates the release of infectious virus and defective interfering particles. J Gen Virol. Sep;97(9):2084-2089.

Ziegler, C. M., Eisenhauer, P., Bruce, E. A., Weir, M. E., King, B. R., Klaus, J. P., et al. (2016). The lymphocytic choriomeningitis virus matrix protein PPXY late domain drives the production of defective interfering particles. PLoS Pathog. 12: e1005501.