

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
Departamento de Ciencias Biológicas



Biblioteca Central  
Fac. Cs. Exactas  
U.N.L.P.

**Caracterización molecular de arenavirus del área  
endémica de la fiebre hemorrágica argentina:  
aislamientos de pacientes con diferentes patrones  
clínicos de FHA y nuevos arenavirus**

*TESIS  
No 1065*

Diego Manuel Posik

Tesis Doctoral  
La Plata, 2004

RECIBIDO .....  
Fecha: 07-04-05 .....  
Inv. N.º ..... Inv. N.º 57391



Biblioteca Central  
Fac. Cs. Exactas  
U.N.L.P.

TESIS  
No 1065

El presente trabajo de Tesis, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, del Departamento de Ciencias Biológicas, de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Profesor Dr. Víctor Romanowski y la codirección del Profesor Dr. P. Daniel Ghiringhelli.

DEHACION.....  
\*.....  
Fecha 07-04-05.....  
Inv. #..... Inv..... # 57391

A mis padres

A Laura y Paloma

## **Mi Reconocimiento**

A la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme permitido realizar el Doctorado en el marco de su institución, brindándome el espacio físico, las instalaciones y los equipos necesarios para el desarrollo de este trabajo.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por las becas de Iniciación y Perfeccionamiento y a la Universidad Nacional de La Plata por la beca de Formación Superior, que me permitieron dedicarme de forma exclusiva a la investigación.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) de Pergamino y a su personal, por la colaboración prestada y el suministro de muestras clínicas y de los aislamientos a partir de ratones.

## **Mi agradecimiento**

A Víctor Romanowski, quien me abrió las puertas de su laboratorio y me introdujo en el mundo de la virología molecular. Le agradezco la formación científica y académica que obtuve trabajando bajo su dirección, su confianza, su paciencia, sus valiosos consejos y comentarios, fruto de su singular combinación de sabiduría y experiencia.

A Daniel Ghiringhelli, quien con paciencia infinita y permanente generosidad, se esmeró en transmitirme (o al menos intentarlo) gran parte de sus conocimientos. Siempre tuvo un sabio y desinteresado consejo para brindar, tanto en lo científico como en lo personal, indicándome sabiamente los pasos a seguir para lograr mis metas.

A César Albariño, quien me ayudó con absoluta disposición en los primeros tiempos en el laboratorio. Con él hemos compartido parte del trabajo, algunos años de docencia y muchas horas de charla en el tren. Entre otras cosas, me enseñó a conducirme con gran libertad y me mostró la necesidad de una permanente superación. Le agradezco también su colaboración en la realización del capítulo 7 y la lectura crítica de esta tesis.

A Mario Lozano, por su colaboración en mis primeros tiempos en el laboratorio y por su generoso aporte en la realización del capítulo 8.

A los compañeros más antiguos del laboratorio de Virus Animales (en esa época Virus Junín): Alicia, Alejo, Alejandra Tortorici, Alejandra Manzán, María Julia, Eloísa, Christina y Alina. Gracias por los momentos compartidos con todos y cada uno de ellos, tanto en lo laboral como en la vida personal. A los más nuevos y no tanto: Marina, Agustín, Laura C., Leticia, Fernanda Zanka, Ricardo Gómez, Fernanda Vrdoljak, Ricardo Salvador, Silvina, Soledad y Hugo. Gracias a ellos la etapa de escritura de la tesis ha sido llevadera y divertida. Les pido perdón por haber ocupado la computadora tanto tiempo. Gracias, también, a aquellos que pasaron fugazmente por el laboratorio: Mariana, Verónica, Ramiro, Claudia y algunos otros.

Al resto de los integrantes del IBBM:

A los "virus verdes": María Laura, Oscar, Silvia, María Eugenia, Liliana, Martín, Ricardo, Selma, Gonzalo, Leandro, Jorge, Germán, Verónica EM., César S., Cecilia Z., Laura D., Eduardo y Carina. A los rhizobiólogos y "afines": Tony, Daniela H., Anibal, Florencia, Claudio, el Picho, Mariano, Pity, Federico, Julieta F., Laura B., Tirso, Fave, Mario, Daniel, Pacho, Omar, Verónica L., Cecilia M., Juan

Carlos, Katy, Pablo, Eitel, Luciano, Mónica, Pedro, Walter, Nacho, Elías, Julieta P.J., Julia, Laura M., Daniela B., Sofía, Cecilia C., Mauricio y Emilia. Y probablemente me esté olvidando de alguno...

A Rubencito y Caty por su constante apoyo técnico. A Carlitos por su permanente colaboración y su asesoramiento técnico. Por sus mates y las charlas de la vida.

A Graciela Zanassi, por disponer siempre de un momento para escuchar. Por su permanente apoyo.

A la SAAIBBM y sus miembros, por sus tan particulares y anheladas reuniones.

A los compañeros de las cátedras: a los de la UNQ, a los de Exactas y a los de Medicina (disculpen que no los nombre a todos pero, en tantos años, la lista se ha vuelto extensa). Les agradezco su apoyo y su cooperación que, de alguna forma o de otra, ha contribuido en la materialización de esta tesis.

A mis alumnos, por permitirme desempeñarme como docente; algo que me agrada, me brinda satisfacciones y me da la oportunidad de seguir aprendiendo. Espero haber podido cumplir con sus expectativas y haberles transmitido mi permanente asombro frente al fascinante mundo de la biología.

A mis entrañables amigos del Museo: a Guillermo (el Mosquito), Claudio, el Tolo y Aylén. Por su amistad, por su permanente presencia y constante estímulo durante todos estos años, que fueron muchos...

A mis viejos amigos: Fabio, Gonzalo, Guillermo, Gabriel y sus familias; les pido disculpas por algunas ausencias.

A mi familia y a la familia de Laura (que es lo mismo), por el cariño brindado, por su interés en el progreso de este trabajo. Por tanta ayuda recibida, de todo tipo... Todos ellos han contribuido, cada uno desde su lugar, alentándome constantemente.

A Paloma que, tan llena de vida, me sorprende y me alegra día a día. Y me hace ver la realidad de que lo esencial va por otro lado...

A Laura, que con mucho amor me acompaña desde mis primeras PCRs. Por su apoyo incondicional, su paciencia, su colaboración, su confianza. Ella fue mi principal impulsora y sin su estímulo este trabajo no habría llegado a término.

Y para todos los que de alguna forma han colaborado en este proyecto... mi más profundo agradecimiento.

## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| Índice  | I         |
| Abreviaturas y siglas   | V         |
| <b>I- INTRODUCCIÓN</b>  |           |
| <b>CAPÍTULO 1 - VIRUS CON GENOMA DE RNA Y VIRUS EMERGENTES</b>      | <b>1</b>  |
| <i>La diversidad viral</i>  | 1         |
| <i>Origen de la diversidad en Virus de RNA</i>                      | 1         |
| Incorporación de nucleótidos incorrectos                            | 1         |
| Reasociación de segmentos   | 2         |
| Recombinación viral   | 2         |
| Producción de RNAs defectivos interferentes por recombinación viral | 3         |
| Edición de RNA  | 3         |
| <i>Virus emergentes</i>   | 3         |
| <b>CAPÍTULO 2 - ARENAVIRUS</b>                                      | <b>5</b>  |
| <i>Historia y Taxonomía</i>   | 5         |
| <i>Ecología y Epidemiología de arenavirus</i>                       | 7         |
| <b>CAPÍTULO 3 - BIOLOGÍA DE LOS ARENAVIRUS</b>                      | <b>9</b>  |
| <i>Características de los viriones</i>                              | 9         |
| Ultraestructura   | 9         |
| Estructura de las nucleocápsides                                    | 10        |
| Estructura molecular  | 10        |
| <i>Estructura y propiedades del genoma</i>                          | 12        |
| Genoma viral  | 12        |
| Estrategia de codificación  | 13        |
| Mecánica de la transcripción/replicación                            | 15        |
| <i>Proteínas virales</i>  | 17        |
| Proteína de la nucleocápside (N)                                    | 17        |
| Precursor de las glicoproteínas (GPC)                               | 19        |
| RNA polimerasa viral (L)  | 20        |
| Proteína Z  | 20        |
| <i>Patogénesis viral</i>  | 21        |
| Infección   | 21        |
| Partículas defectivas e interferencia viral                         | 22        |
| Infecciones persistentes  | 23        |
| Efectos de la infección a nivel celular. Citopagenicidad            | 24        |
| <b>CAPÍTULO 4 - VIRUS JUNÍN</b>                                     | <b>26</b> |
| <i>El virus Junín y la fiebre hemorrágica argentina</i>             | 26        |
| Epidemiología de la fiebre hemorrágica argentina                    | 26        |
| Fisiopatología de la infección por virus Junín                      | 28        |
| Diagnóstico y tratamiento   | 29        |
| Características clínicas  | 29        |
| Diagnóstico clínico   | 32        |
| Diagnóstico etiológico  | 32        |
| Terapéutica y prevención  | 34        |

|   |    |
|---|----|
| <i>Formas clínicas de fiebre hemorrágica argentina</i>  | 35 |
| Diferentes aislamientos: Ledesma, Espíndola y Romero  | 35 |
| <i>Variabilidad genética en el virus Junín</i>  | 36 |
| <b>II- OBJETIVOS</b>  |    |
| <i>Objetivos del trabajo de tesis</i>   | 38 |
| <b>III- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>  |    |
| <b>CAPÍTULO 5 - CLONADO, SECUENCIACIÓN E INFORMACIÓN MOLECULAR DE LOS RNA S DE DIFERENTES AISLAMIENTOS CLÍNICOS DEL VIRUS JUNÍN (LEDESMA, ESPÍNDOLA Y ROMERO)</b> | 39 |
| <i>Origen de las cepas del virus Junín que producen diferentes patrones clínicos</i>  | 39 |
| <i>Diseño de oligonucleótidos</i>   | 39 |
| <i>Purificación de RNA viral</i>  | 40 |
| <i>Síntesis de cDNA y amplificación por PCR</i>   | 40 |
| <i>Clonado y secuenciación del cDNA</i>   | 41 |
| <i>Secuencia nucleotídica del RNA S de Espíndola, Romero y Ledesma</i>  | 42 |
| <i>Regiones codificantes</i>  | 43 |
| Gen del precursor de las glicoproteínas (GPC)   | 43 |
| Gen de la proteína de la nucleocápside (N)  | 44 |
| <i>Regiones no codificantes</i>   | 44 |
| Región intergénica  | 44 |
| Extremos 5' y 3' del genoma viral   | 46 |
| <i>Abundancia relativa de oligonucleótidos</i>  | 48 |
| Análisis global   | 48 |
| <i>Análisis diferencial por regiones</i>  | 49 |
| <i>Análisis diferencial de trinucleótidos</i>   | 52 |
| <i>Discusión</i>  | 52 |
| Regiones no codificantes  | 53 |
| Abundancia relativa de oligonucleótidos   | 55 |
| <b>CAPÍTULO 6 - INFORMACIÓN MOLECULAR - PROTEÍNAS - CEPAS</b>   | 58 |
| <i>Glicoproteínas virales</i>   | 58 |
| Estructura primaria del precursor de las glicoproteínas   | 58 |
| Estructura del péptido señal  | 58 |
| Estructura de las glicoproteínas G1 y G2  | 59 |
| <i>Proteína de la nucleocápside</i>   | 61 |
| <i>Búsqueda de regiones potencialmente responsables del comportamiento biológico de los diferentes aislamientos clínicos</i>                                      | 63 |
| <i>Polimorfismos de conformación de simple cadena (SSCP)</i>  | 69 |
| <i>SSCP de cepas del virus Junín</i>  | 69 |
| <i>Análisis de muestras de pacientes</i>  | 72 |
| <i>Discusión</i>  | 74 |
| Introducción  | 74 |
| Glicoproteínas virales  | 74 |
| Análisis de regiones variables  | 77 |
| Evaluación de candidatos responsables de las diferencias fenotípicas  | 79 |
| <b>CAPÍTULO 7 - DESARROLLO DE UN MÉTODO DE TIPIFICACIÓN GENÉTICA BASADO EN RT-PCR-RFLP</b>  | 81 |
| <i>Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)</i>  | 81 |

|   |            |
|---|------------|
| <i>Diseño de primers generalizados para arenavirus</i>                          | 81         |
| <i>Caracterización de arenavirus por RT-PCR-RFLP</i>                            | 83         |
| <i>Identificación de arenavirus por RT-PCR-RFLP</i>                             | 84         |
| Caracterización de un nuevo aislamiento (Pampa)                                 | 87         |
| Caracterización de un segundo aislamiento (Río Carcarañá)                       | 87         |
| <i>Análisis Filogenético</i>  | 88         |
| <i>Discusión</i>  | 92         |
| Tipificación genética basada en RT-PCR-RFLP                                     | 92         |
| Análisis Filogenético   | 96         |
| <b>CAPÍTULO 8 - CARACTERIZACIÓN DEL RNA S DE RÍO CARCARAÑÁ</b>                  | <b>101</b> |
| <i>Recombinación viral</i>  | 101        |
| <i>Clonado y secuenciación del RNA S viral</i>                                  | 102        |
| <i>Perfil filogenético</i>  | 106        |
| <i>Mecanismos de recombinación</i>  | 107        |
| <i>Discusión</i>  | 110        |
| <b>IV- MATERIALES Y METODOS</b>   |            |
| <b>CAPÍTULO 9 - MATERIALES Y MÉTODOS</b>  | <b>116</b> |
| <i>Productos químicos y enzimas</i>   | 116        |
| <i>Material radiactivo</i>  | 116        |
| <i>Bacterias y Plásmidos</i>  | 116        |
| <i>Células y virus</i>  | 117        |
| <i>Soluciones para la purificación y análisis de ácidos nucleicos</i>           | 118        |
| <i>Preservación de muestras de sangre con tiocianato de guanidinio</i>          | 119        |
| <i>Extracción de RNA a partir de células infectadas</i>                         | 119        |
| <i>Síntesis de cDNA y amplificación por PCR</i>                                 | 119        |
| <i>Análisis de ácidos nucleicos mediante electroforesis en geles de agarosa</i> | 121        |
| <i>Técnicas de clonado de DNA</i>   | 122        |
| Digestión con enzimas de restricción  | 122        |
| Ligación de productos de la digestión   | 122        |
| Preparación de bacterias competentes  | 123        |
| Transformación por shock térmico  | 123        |
| preparación de bacterias electrocompetentes                                     | 123        |
| Electroporación   | 124        |
| Medios de selección de recombinantes  | 124        |
| Extracción de DNA plasmídico por el método de la lisis alcalina                 | 126        |
| Método de lisis alcalina y precipitación con PEG                                | 126        |
| <i>Secuenciación de DNA</i>   | 127        |
| Secuenciación con Sequenasa   | 127        |
| Secuenciación automática  | 128        |
| <i>Técnica de SSCP</i>  | 129        |
| Síntesis de cDNA a partir de muestras de pacientes                              | 130        |
| Tinción de geles de acrilamida con plata  | 131        |
| <i>Métodos computacionales</i>  | 132        |
| Perfiles de hidrofobicidad  | 132        |
| Gráficos cartesianos de homología   | 132        |
| Búsqueda de regiones codificantes   | 132        |
| Abundancia relativa de oligonucleótidos   | 133        |
| Análisis comparativo de estructuras secundarias de RNA                          | 133        |

|  |            |
|--|------------|
| Perfil filogenético  | 134        |
| Detección de puntos potenciales de recombinación   | 134        |
| <b>V- CONCLUSIONES GENERALES</b>   |            |
| <i>Conclusiones generales</i>  | <b>136</b> |
| <b>VI- BIBLIOGRAFÍA</b>  |            |
| <i>Bibliografía</i>  | <b>139</b> |
| <b>VII- APÉNDICES</b>  |            |
| <b>APÉNDICE 1</b> <i>Alineamiento de los RNAs S de las cepas Espíndola, Romero y Ledesma del virus Junín</i>                       | 161        |
| <b>APÉNDICE 2</b> <i>Alineamiento múltiple de los RNAs S de arenavirus</i>   | 164        |
| <b>APÉNDICE 3</b> <i>Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de la proteína GPC de diferentes cepas del virus Junín</i> | 168        |
| <b>APÉNDICE 4</b> <i>Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de la proteína N de diferentes cepas del virus Junín</i>   | 169        |
| <b>APÉNDICE 5</b> <i>Primers conservados para el RNA S de Arenavirus</i>   | 170        |

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

|                        |  |
|------------------------|--|
| $\Omega$               | ohm  |
| $\mu\text{g}$          | microgramo   |
| $\mu\text{l}$          | microlitro   |
| $\mu\text{m}$          | micromolar   |
| AMA                    | virus Amapari  |
| AMV                    | virus de la mieloblastosis aviana ( <i>avian myeloblastosis virus</i> )                |
| bisacrilamida          | N,N'-metilénbisacrilamida  |
| BSA                    | seroalbúmina bovina  |
| ATP                    | adenosina 5'-trifosfato  |
| $\text{CaCl}_2$        | cloruro de calcio  |
| CD1                    | cepa Candid #1 del virus Junín   |
| cDNA                   | DNA copia  |
| $\text{Cl}_2\text{Mn}$ | cloruro de magnesio  |
| dNTPs                  | desoxinucleótidos trifosfato   |
| DO                     | densidad óptica  |
| dpi                    | días post infección  |
| DNA                    | ácido 2' desoxirribonucleico   |
| ddNTPs                 | 2',3'-deoxirribonucleósidos 5'-trifosfato  |
| ELISA                  | ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima ( <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> ) |
| g                      | gramo(s)   |
| h                      | hora(s)  |
| KAc                    | acetato de potasio   |
| DTT                    | ditiotreitól   |
| EDTA                   | ácido etilendiaminotetraacético  |
| FLE                    | virus Flexal   |
| GTO                    | virus Guanarito  |
| HCl                    | ácido clorhídrico  |
| ICTV                   | International Committee for the Taxonomy of Viruses                                    |
| INEVH                  | Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas                                     |
| IPPY                   | virus Ippy   |
| IPTG                   | isopropil-tio- $\beta$ -D-galactósido  |
| JUN                    | virus Junín  |
| KAc                    | acetato de potasio   |
| KCl                    | cloruro de potasio   |
| kcal                   | kilocalorías   |
| kDa                    | kilodaltons  |
| $\text{km}^2$          | kilómetros cuadrados   |
| kV                     | kilovoltio   |
| L                      | litro  |
| LAS                    | virus Lassa  |
| LAT                    | virus Latino   |
| LB                     | <i>Luria Broth</i> (medio de cultivo para bacterias)                                   |
| M                      | molar  |
| MC2                    | cepa MC2 del virus Junín   |
| MAC                    | virus Machupo  |
| mdi                    | multiplicidad de infección   |
| mg                     | miligramo  |
| $\text{MgCl}_2$        | cloruro de magnesio  |
| ml                     | mililitro  |

|                     |   |
|---------------------|---|
| mM                  | milimolar   |
| MOB                 | virus Mobala  |
| MOP                 | virus Mopeia  |
| NaAc                | acetato de sodio  |
| Nt                  | nucleótido(s)   |
| N x g               | número multiplicado por la aceleración de la gravedad   |
| °C                  | grados Celsius  |
| OLV                 | virus Oliveros  |
| PAL                 | poliacrilamida lineal   |
| PAM                 | virus Pampa   |
| PAR                 | virus Paraná  |
| PCR                 | reacción en cadena de la polimerasa ( <i>polymerase chain reaction</i> )                                  |
| PEG <sub>8000</sub> | polietilenglicol 8000   |
| PH                  | potencial hidrógeno   |
| pfu                 | unidades formadoras de placas ( <i>plaque forming units</i> )   |
| <i>Pfu</i>          | polimerasa termoestable de <i>Pyrococcus furiosus</i>   |
| PIC                 | virus Pichindé  |
| PIR                 | virus Pirital   |
| RCÑ                 | virus Río Carcaraña   |
| RNA                 | ácido ribonucleico  |
| RNasa               | ribonucleasa  |
| RNasin              | inhibidor de RNAsas pancreático ( <i>ribonuclease inhibitor</i> )   |
| RFLP                | polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción ( <i>restriction fragment length polymorphism</i> ) |
| rpm                 | revoluciones por minuto   |
| RT-PCR              | <i>reverse transcriptase - polymerase chain reaction</i>  |
| SDS                 | dodecil sulfato de sodio  |
| SNC                 | sistema nervioso central  |
| SSCP                | <i>polimorfismo conformacional de simple cadena (single-strand conformational polymorphism)</i>           |
| SAB                 | virus Sabiá   |
| s                   | segundo(s)  |
| TAE                 | tris-acetato-EDTA   |
| TAM                 | virus Tamiami   |
| <i>Taq</i>          | DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>  |
| TB                  | <i>Terrific Broth</i> , medio de cultivo de bacterias   |
| TCR                 | virus Tacaribe  |
| Tris                | tris-(hidroximetil)-aminometano   |
| ufp                 | unidad formadora de placa   |
| UV                  | ultravioleta  |
| v                   | voltio  |
| v/cm                | voltio por centímetro   |
| vol                 | volumen   |
| WWA                 | virus Whitewater Arroyo   |
| X-gal               | 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-galactósido   |
| μF                  | micro Faraday   |
| TEMED               | N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina   |

# PARTE I

## INTRODUCCIÓN

## CAPÍTULO 1

### VIRUS CON GENOMA DE RNA Y VIRUS EMERGENTES

*Ninguna cosa perdura, pero todas fluyen.  
Fragmento a fragmento persisten y así crecen  
hasta que las conocemos por su nombre.  
Entonces gradualmente cambian  
y no son más las cosas que conocemos.  
Lucrecio (94-50 AC)*

#### LA DIVERSIDAD VIRAL

La adaptación de los seres vivos a un ambiente cambiante se basa en un compromiso entre la variación genética y la selección fenotípica, generando a través de la evolución la gran diversidad existente hoy en día. Los virus a RNA merecen la reputación de ser los que más rápido evolucionan en la naturaleza. Sus altas tasas de mutación y replicación les permiten moverse a un paso evolutivo en el que sus hospedadores con genoma de DNA parecen congelados en el tiempo. En las últimas dos décadas ha quedado claro que muchos virus a RNA poseen, además, la capacidad de intercambiar material genético con otros virus y son capaces de adquirir genes de sus hospedadores con el fin de ampliar su repertorio genético. De esta forma, además de producir extraordinarias cantidades de mutaciones, materia prima de la evolución, estos virus poseen los mecanismos para eliminar de sus genomas los cambios deletéreos acumulados y crear y extender los cambios beneficiosos de manera eficiente (Worobey y Holmes, 1999).

#### ORIGEN DE LA DIVERSIDAD EN VIRUS DE RNA

##### INCORPORACIÓN DE NUCLEÓTIDOS INCORRECTOS

Todas las polimerasas de ácidos nucleicos generan errores durante la elongación de las cadenas, resultando en la inserción de nucleótidos incorrectos. Las DNA polimerasas DNA dependientes poseen la capacidad de corrección de errores (*proofreading activity*) gracias a su actividad exonucleasa que les permite corregir la mayor parte de los errores. Las RNA polimerasas RNA dependientes (replicasas) carecen de esta capacidad de corrección, resultando en frecuencias de error en la replicación del orden de 1 cada  $10^3$  a  $10^4$  nucleótidos incorporados, mientras que la tasa de error en la replicación del DNA es de cien a mil veces menor considerando solamente la actividad exonucleasa 5'→3' (sin contar los mecanismos de reparación). El efecto de los errores en la polimerización sobre los genomas virales es variable. Hay cambios que producen sustituciones de aminoácidos que pueden determinar o no la pérdida de infectividad de los virus. El reemplazo de nucleótidos en regiones no codificantes puede producir fenotipos alterados, mientras que algunas mutaciones pueden estar presentes en el genoma de viriones infectivos, sin presentar manifestaciones sobre el fenotipo.

Al analizar las poblaciones de virus con genoma a RNA se observó que en realidad éstas eran mezclas de diferentes secuencias genómicas a las que se denominó



*cuasiespecies*. Dado que los stocks virales son mezclas de virus genotípicamente diferentes, es posible aislar directamente a partir de ellos, mutantes virales. Por ejemplo, las cepas vacunales atenuadas de poliovirus son mutantes aislados a partir de un *stock* no mutagenizado de virus salvaje (Sabin *et al.*, 1954).

#### REASOCIACIÓN DE SEGMENTOS

En el caso de los virus con genomas segmentados pueden aparecer nuevas variantes como consecuencias de un proceso conocido como reasociación, que consiste en el intercambio de una o más moléculas discretas de RNA entre virus genéticamente relacionados o entre variantes del mismo virus. El cambio de antígeno del virus de Influenza A es el ejemplo clásico de este intercambio genético y sirve para demostrar el significado evolutivo potencial de estos eventos. En células coinfectadas con dos cepas diferentes de influenza, se replican los ocho segmentos genómicos de los dos virus. Cuando se ensambla la nueva progenie viral, se empaquetan los ocho segmentos de RNA sin importar cual es el origen parental. Dado que la reasociación involucra el simple intercambio de segmentos de RNA, la frecuencia con que se produce es alta. Por ejemplo, la reasociación entre cepas de influenza humanas y cepas animales produce la alta diversidad antigénica responsable de que cada año se produzcan nuevos brotes de la enfermedad (Li *et al.*, 2003).

#### RECOMBINACIÓN VIRAL

A diferencia de la reasociación, la recombinación, se produce cuando una secuencia nucleotídica donante es introducida en una molécula aceptora única y continua de RNA para producir un nuevo RNA que posee información de más de una fuente. La recombinación es una característica de muchos virus a RNA, es un mecanismo importante para la producción de nuevos genomas con ventajas selectivas de crecimiento y ha contribuido a la evolución de los virus a RNA por rearreglo de los genomas o por movimiento de partes funcionales de moléculas de RNA entre diferentes virus.

La recombinación en virus a RNA fue originalmente observada por Hirst (1962) y Ledinko (1963) en cultivos celulares infectados con poliovirus. Desde entonces la recombinación en virus a RNA ha sido ampliamente documentada tanto *in vitro* como *in vivo* en diferentes sistemas virales de cadenas positivas y negativas. La frecuencia de recombinación puede ser relativamente alta: se ha estimado que del 10 al 20% de los RNAs genómicos recombinan en un ciclo de crecimiento. Por ejemplo, es posible aislar del intestino de individuos vacunados, recombinantes entre los tres serotipos de poliovirus presentes en la vacuna Sabin a virus atenuados (Cuervo *et al.*, 2001). El significado de estos recombinantes es desconocido, pero se ha sugerido que estos virus han mejorado su capacidad de replicación en el tracto digestivo humano y por lo tanto poseen ventajas adaptativas al compararlos con los virus parentales.

Los mecanismos de recombinación pueden ser dependientes del apareamiento de bases como en el caso de los poliovirus, en el que la secuencia donante reemplaza

limpiamente a una región homóloga de la secuencia aceptora, dejando su estructura sin cambios. A este mecanismo se lo ha denominado *recombinación homóloga*, ya que involucra no sólo RNAs parentales con un alto porcentaje de identidad nucleotídica, sino que también se produce un entrecruzamiento entre sitios homólogos. En otros virus, la recombinación es independiente del apareamiento de bases y se produce entre secuencias nucleotídicas no relacionadas (*recombinación no homóloga*).

#### PRODUCCIÓN DE RNAs DEFECTIVOS INTERFERENTES POR RECOMBINACIÓN VIRAL

Es posible que las RNA polimerasas en procesos replicativos anormales omitan copiar partes de la secuencia y se generen secuencias virales con deleciones. Los RNAs subgenómicos resultantes pueden replicar si está presente la RNA polimerasa y si contienen las señales adecuadas para la iniciación de la síntesis de RNA.

Estos RNAs subgenómicos son más cortos, se replican más rápido y, por lo tanto, compiten por los componentes de la maquinaria viral necesarios para la síntesis de RNA, por eso es que son llamados RNAs defectivos interferentes. Estos RNAs carecen de uno o más de los genes virales, y son empaquetados en las partículas virales solo en presencia de virus que les proporcionen las proteínas virales faltantes.

Los virus defectivos interferentes se acumulan durante la replicación, tanto en virus de cadenas positivas como negativas. La producción de estos virus requiere de una alta multiplicidad de infección, condición que es fácil de alcanzar en un laboratorio pero difícil en la naturaleza. Aún no ha sido analizado en detalle el papel que juegan las partículas virales interferentes en la patogénesis (Huang y Baltimore, 1977; Valdovinos y Gómez, 2003).

#### EDICIÓN DE RNA

La diversidad de los genomas de RNA virales también se consigue por la edición de RNA. Los RNA mensajeros pueden ser editados, ya sea por inserción de nucleótidos sin molde durante la síntesis de RNA o por modificación de las bases posteriormente a la síntesis. Ejemplos de edición de RNA han sido documentados en por ejemplo en Paramyxoviridae y Filoviridae (Hausmann *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 1996; Volchkov *et al.*, 1995, 2001).

#### VIRUS EMERGENTES

Los virus emergentes han sido definidos como los causantes de enfermedades cuya incidencia en humanos se ha incrementado en las últimas décadas o que amenazan con incrementarse en un futuro cercano. Estas enfermedades incluyen nuevas infecciones que surgen por cambios o evolución de organismos existentes, infecciones conocidas que se extienden a nuevas áreas geográficas o poblaciones, infecciones previamente no reconocidas, que aparecen en áreas que están sufriendo una transformación ecológica o

viejas infecciones que reemergen como resultado de una resistencia a los agentes antimicrobianos o a un debilitamiento de las medidas de salud pública.

En la historia humana han emergido y reemergido numerosas enfermedades virales. En los últimos años han aparecido enfermedades virales emergentes o reemergentes causadas por filovirus, hantavirus, arenavirus, paramixovirus, flavivirus, coronavirus y otros (Lupi, 2003; Kuiken, 2003; Morens *et al.*, 2004).

Muchos de estos agentes son de origen zoonótico y son transmitidos desde los animales directamente al hombre o a través de vectores. El acercamiento humano a las especies reservorio naturales de los microorganismos facilita la superación de la barrera de especie permitiendo que se infecten algunos individuos. A partir de allí la enfermedad puede no avanzar y quedar probablemente sin ser detectada o puede llevar a la adaptación del microorganismo a este nuevo hospedador humano y, a partir de allí, originar una epidemia con capacidad de expansión tanto en el tiempo como en el espacio.

Las especies reservorio habitualmente son infectadas subclínica o asintóticamente y la distribución de la enfermedad normalmente refleja el rango y la dinámica de las poblaciones de las especies hospedadoras que funcionan como reservorios.

Varios factores contribuyen a la emergencia y reemergencia de enfermedades virales, pero la mayoría está ligada al incremento de la población y de los viajeros que se trasladan por todo el planeta. Entre los factores se pueden nombrar el sobrepoblamiento de las ciudades con pobres condiciones sanitarias y los cambios en la manipulación y el procesamiento de grandes cantidades de alimentos. También son importantes los cambios de hábitos de las especies reservorio y de los vectores (promovidos por factores como el cambio climático) que pueden facilitar su aproximación a poblaciones humanas con el consiguiente aumento progresivo del contacto con el hombre. Así mismo, también contribuyen el deterioro de la infraestructura de la salud pública, que es incapaz de contener las demandas de la población, y la aparición de resistencia a los agentes antimicrobianos ligados a su mal uso.

Muchos nuevos virus (o virus desconocidos anteriormente) han emergido, producto de cambios ecológicos, climáticos y socioculturales y, a su vez, han podido ser detectados de forma más eficiente gracias al perfeccionamiento de diversas técnicas, en particular de aquellas provistas por la biología molecular, que permiten la rápida caracterización e identificación de los diversos agentes patógenos. Una detección temprana es clave en el control de las epidemias. Por lo tanto, la vigilancia clínica y epidemiológica es a menudo la forma más efectiva de conseguir la identificación temprana de los agentes infectivos.

Desde 1992 la Organización Mundial de la Salud ha organizado un programa de supervisión y control de enfermedades denominado *Communicable Disease Surveillance and Response* (CSR) con el objeto de detectar rápidamente enfermedades reemergentes e identificar nuevas enfermedades infecciosas para así poder asegurar una respuesta efectiva y dentro de los márgenes de tiempo adecuados.

## CAPÍTULO 2

### ARENAVIRUS

#### HISTORIA Y TAXONOMÍA

La primera descripción de una infección humana producida por arenavirus fue realizada en 1925 por el médico sueco Arvid Wallgren, denominando a la enfermedad meningitis aséptica aguda. Posteriormente, se la conoció como coriomeningitis linfocitaria y recién en 1934 se aisló el primer virus asociado a esta enfermedad.

Varios grupos independientes realizaron el descubrimiento del virus casi simultáneamente. Armstrong & Lillie, publicaron la primera descripción en 1934. El virus denominado LCM, por virus de la coriomeningitis linfocitaria, fue aislado luego de repetidos pasajes en monos, a partir de un homogenado de cerebro humano de un aparente caso de encefalitis de Saint Louis. Nunca se pudo conocer con certeza el origen del inóculo viral, ya que éste podría haber estado presente en el homogenado de cerebro humano o en alguno de los monos utilizados. La naturaleza y procedencia de nuevos inóculos virales de LCM fueron descritas por Rivers & Scott en 1935 y por Traub, en el mismo año.

Entre 1956 y 1963, se aislaron, en el continente americano, tres virus, denominados Tacaribe (Trinidad), Junín (Argentina) y Machupo (Bolivia) que pronto demostraron compartir características serológicas y morfológicas entre sí (Mettler *et al.*, 1963).

Inicialmente, el criterio para la clasificación de estos virus dentro de un grupo fue únicamente epidemiológico. Debido al escaso conocimiento de la época y al origen de algunos de los aislamientos, inicialmente fueron ubicados dentro de los arbovirus. Este conjunto de virus, denominado así por *arthropod-borne-viruses*, incluye virus de varias familias (entre ellas las familias Reoviridae, Flaviviridae, Togaviridae, Bunyaviridae y Rabdoviridae) y se replican dentro de artrópodos hematófagos, transmitiéndose a sus hospedadores vertebrados mediante picaduras. No obstante, nunca pudo probarse que los ácaros fueran vectores de las enfermedades producidas por los virus antes mencionados y se supone que la detección inicial fue casual y debida a los hábitos hematófagos de los artrópodos ensayados.

La familia Arenaviridae se creó en 1970 en base a la caracterización serológica, bioquímica y morfológica de estos virus, con LCM como prototipo y los virus Tacaribe, Junín y Machupo conformando el complejo Tacaribe (Rowe *et al.*, 1970b; Johnson *et al.*, 1973; Pfau *et al.*, 1974).

Desde la descripción del virus LCM, se han ido descubriendo varios arenavirus, especialmente en América, en un promedio de aproximadamente uno cada tres o cuatro años, por lo que su número está en permanente aumento. Actualmente, la familia esta compuesta por 19 miembros reconocidos por el Comité Internacional para la Taxonomía Viral (ICTV, *International Committee for the Taxonomy of Viruses*; Clegg *et al.*, 2000).

El nombre de la familia (del latín *arenosus*) deriva del aspecto arenoso o granuloso que presentan los viriones al ser observados con el microscopio electrónico y esto está directamente asociado con los ribosomas presentes en el interior de los mismos.

Los arenavirus causan infecciones crónicas en roedores de Europa, África y América. Los animales con infecciones crónicas asintomáticas se mueven libremente en su hábitat natural y pueden invadir los ámbitos en donde el hombre puede llegar a entrar en contacto con los virus excretados e infectarse. Las infecciones de humanos con arenavirus son comunes, causando fiebres hemorrágicas, en algunos casos severas, mientras que otros son aparentemente no patógenos o raramente infectan al hombre.

En base al análisis filogenético del RNA viral, a la reactividad serológica cruzada y al sitio geográfico de aislamiento, los arenavirus fueron clasificados en dos grandes grupos. La división separa a los arenavirus del Viejo Mundo, aislados en Africa y Europa (complejo LCM-Lassa), de aquellos del Nuevo Mundo, aislados en el continente americano (complejo Tacaribe) (Wulff *et al.*, 1978; Buchmeier *et al.*, 1995). El criterio para esta agrupación fue confirmado a partir de los datos obtenidos con el uso de anticuerpos monoclonales (Ruo *et al.*, 1991) y de la biología molecular (Buchmeier y Oldstone, 1981; Compans *et al.*, 1981; Compans y Bishop, 1985; Ghiringhelli *et al.*, 1991; Clegg, 1993).

El grupo de los arenavirus del Viejo Mundo incluye al virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM), que es la especie prototipo de la familia, y a los virus Lassa (LAS), Ippy (IPPY), Mobala (MOB) y Mopeia (MOP) (Peters *et al.*, 1996, Clegg *et al.*, 2000) de los cuales sólo Lassa y LCM han sido aislados a partir de seres humanos. Por otra parte, el grupo de los arenavirus del Nuevo Mundo comprende a los virus Amapari (AMA), Flexal (FLE), Guanarito (GTO), Junín (JUN), Latino (LAT), Machupo (MAC), Oliveros (OLV), Paraná (PAR), Pichindé (PIC), Pirital (PIR), Sabiá (SAB), Tacaribe (TCR), Tamiami (TAM) y Whitewater Arroyo (WWA) (Clegg *et al.*, 2000). Más recientemente, los análisis filogenéticos realizados con un segmento de la proteína N (nucleocápside) han permitido agrupar a los arenavirus del Nuevo Mundo en tres linajes (Bowen *et al.*, 1997).

El virus LCM, detectado en ratones y en humanos (Lepine *et al.*, 1937; Rivers y Scott, 1937; Armstrong y Sweet, 1939), produce en el hombre infecciones inaparentes en la mayoría de los casos. Este virus ha sido una herramienta de suma importancia en el descubrimiento de los mecanismos inmunológicos relacionados con la infección por arenavirus (Oldstone, 1987a y 1987b).

Además de LCM, los virus Lassa, Machupo, Junín y Guanarito son patógenos para los humanos, produciendo la fiebre de Lassa, la fiebre hemorrágica boliviana (FHB), la fiebre hemorrágica Argentina (FHA) y la fiebre hemorrágica venezolana (FHV), respectivamente (Monath, 1975; Mackenzie, 1965; Peters *et al.* 1974; McCormick, 1990; Salas *et al.*, 1991). Todas ellas producen fiebres hemorrágicas severas, con características endemo-epidémicas. La fisiopatología de las enfermedades producidas por los virus Junín y Machupo son muy similares y, aunque aún no ha sido extensamente estudiada, la FHV también posee una sintomatología similar. El virus Sabiá también produce una fiebre hemorrágica en humanos, pero el número escaso de infecciones informadas no permite asociarlo con una enfermedad epidémica (Coimbra *et al.*, 1994; Barry *et al.*, 1995). Recientemente se ha involucrado al virus WWA como posible causa de una infección humana severa (CDC, 2000a).

El virus LCM es el único arenavirus de distribución cosmopolita, mientras que el resto de los arenavirus están restringidos geográficamente, donde constituyen endemias. De hecho, el virus LCM ha sido aislado también en el área endémica de la FHA (Maiztegui *et*

*al.*, 1972; Sabattini, 1977). Recientemente, en el área endémica de FHA se han realizado aislamientos de nuevos arenavirus. Uno de ellos, el virus Oliveros, ha sido caracterizado a nivel molecular en el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) de Atlanta, EE.UU. El virus Pampa (PAM), caracterizado parcialmente, es una especie tentativa dentro de la familia Arenaviridae, sin embargo aún no se ha descartado que sea una variedad del virus Oliveros. Un tercer aislamiento, denominado Río Carcarañá, ha sido caracterizado en nuestro laboratorio y en el presente trabajo se plantea la posibilidad de que sea un recombinante natural entre los virus Junín y Oliveros.

Fuera del área endémica de FHA, recientemente se ha descubierto en el Noreste del Perú al virus Allpahuayo, que infecta a las ratas arbóreas del arroz (*Oecomys spp.*), aunque aún no ha sido asignado oficialmente por el ICTV como un miembro de la familia (Moncayo *et al.*, 2001).

## ECOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DE ARENAVIRUS

Los arenavirus se mantienen en la naturaleza debido a su capacidad de establecer infecciones crónicas en sus hospedadores reservorio que, en casi todos los casos, son especies de roedores (Arata & Gratz, 1975). LCM se encuentra en *Mus* y los virus africanos, principalmente en roedores *Mastomys* y *Praomys*, en la subfamilia Murinae. Los virus del Nuevo Mundo se encuentran principalmente en los géneros de roedores *Calomys*, *Neacomys*, *Neotoma*, *Oryzomys* y *Sigmodon*, todos pertenecientes a la familia Cricetidae, subfamilia Sigmodontinae. Excepcionalmente, el virus Tacaribe fue aislado a partir de murciélagos frugívoros (*Artibeus spp.*), pero los intentos posteriores de recuperarlo a partir de murciélagos o de algún otro hospedador potencial fueron infructuosos. A pesar de aislamientos ocasionales de virus, no fue posible implicar a ningún artrópodo ni a ningún otro intermediario. La mayoría de los virus producen una infección persistente, frecuentemente asintomática en los hospedadores reservorios, que presentan una viremia y viruria crónica.

Es interesante notar que la distribución geográfica de los arenavirus se superpone total o parcialmente con las áreas de distribución de los hospedadores primarios y es probable que éste sea un factor determinante en la co-evolución de los mismos. Debido a esto, se supone que la diseminación de un arenavirus ocurriría en paralelo con la dispersión geográfica de su hospedador. Probablemente no existan límites precisos para las áreas endémicas, salvo debido a la existencia de barreras geográficas importantes que limiten la distribución del reservorio natural.

La epidemiología de las enfermedades producidas por los arenavirus depende de los factores de infección en los hospedadores reservorio y en los factores que conducen al hombre a entrar en contacto con los roedores que están liberando virus por orina, saliva, materia fecal, sangre, etc.

En los roedores infectados, el virus cumple un ciclo que asegura su mantenimiento en la naturaleza. En general, se encuentran altos títulos virales en casi todos los órganos y en los fluidos corporales como la sangre y, en particular, la saliva del animal. En la mayoría de los arenavirus, los roedores presentan infecciones crónicas inaparentes, con eliminación

persistente del virus al medio ambiente (Staneck *et al.*, 1972; Rawls *et al.*, 1981; Lehman Grube *et al.*, 1983). De esta manera, se contagian los roedores sanos y, ocasionalmente, se infecta el hombre.

La transmisión interhumana es rara, excepto para el virus Lassa. Se han registrado algunas dispersiones intrahospitalarias a través de aerosoles en los virus Lassa, Machupo y Junín. En algunos casos se piensa que puede existir transmisión viral a través del contacto sexual con individuos convalecientes (Frame *et al.*, 1970).

Infecciones agudas en animales de laboratorio inoculados (como cobayos o monos) pueden resultar en la liberación de virus en superficies mucosas, con riesgo para los trabajadores de laboratorio. Se han registrado infecciones severas en laboratorios con los virus LCM, LAS, JUN, MAC, SAB y FLE. Debido a esto, los virus que producen fiebres hemorrágicas han sido definidos por el CDC como patógenos de clase A, han sido listados como patógenos de nivel de bioseguridad 4 y deben ser manipulados en laboratorios *BSL4* (*Biosafety Level 4*) (CDC, 2000). También se han informado infecciones asintomáticas con el virus Pichindé.

Las infecciones experimentales en animales de laboratorio (ratón, hámster, cobayo, ratas, monos rhesus y tití) varían con las especies animales y los virus. En general, los virus del Nuevo Mundo son patógenos para los ratones lactantes pero no para los destetados. LCM y LAS producen el efecto contrario. Los virus crecen moderadamente bien en muchos tipos celulares de mamíferos en cultivo.

El modo de transmisión del virus dentro de la población de hospedadores ha sido estudiado por muchos autores en distintos sistemas animales, principalmente, con los arenavirus LCM, Lassa, Junín, Pichindé y Machupo.

En este último virus, se han identificado dos tipos diferentes de respuesta a la infección por parte del roedor (dependientes de diferencias genotípicas), lo cual hace que en la población de roedores coexistan tres estados, roedores no infectados, roedores de tipo A (con viremia crónica y con fertilidad reducida) y roedores de tipo B (inmunocompetentes y con fertilidad normal). También se ha comprobado que la transmisión viral entre individuos de la población puede realizarse tanto de forma horizontal como vertical.

La densidad de las poblaciones de *Calomys* fluctúa cíclicamente en función de la proporción de virus que exista en el medio ambiente y que favorecen la generación de roedores de tipo A o tipo B. La relativa infertilidad de los roedores de tipo A infectados crónicamente se traduce en una progresiva disminución de este genotipo en la población y, consecuentemente, de la proporción de virus existente en el medio ambiente. Probablemente, los *Calomys* de tipo A poseen alguna ventaja competitiva sobre los de tipo B en ausencia del virus Machupo, lo cual lleva a la recuperación de la población con este genotipo y posibilita el comienzo de un nuevo ciclo (Johnson *et al.*, 1965; Justines y Johnson, 1969; Johnson *et al.*, 1973; Peters *et al.*, 1974; Webb *et al.*, 1975; Murphy y Walker, 1975; Peters *et al.*, 1987; Childs y Peters, 1993).

El ejemplo descrito anteriormente es, probablemente, una de las razones de los ciclos de epidemia que se observan en casi todos los arenavirus endémicos que afectan al ser humano.

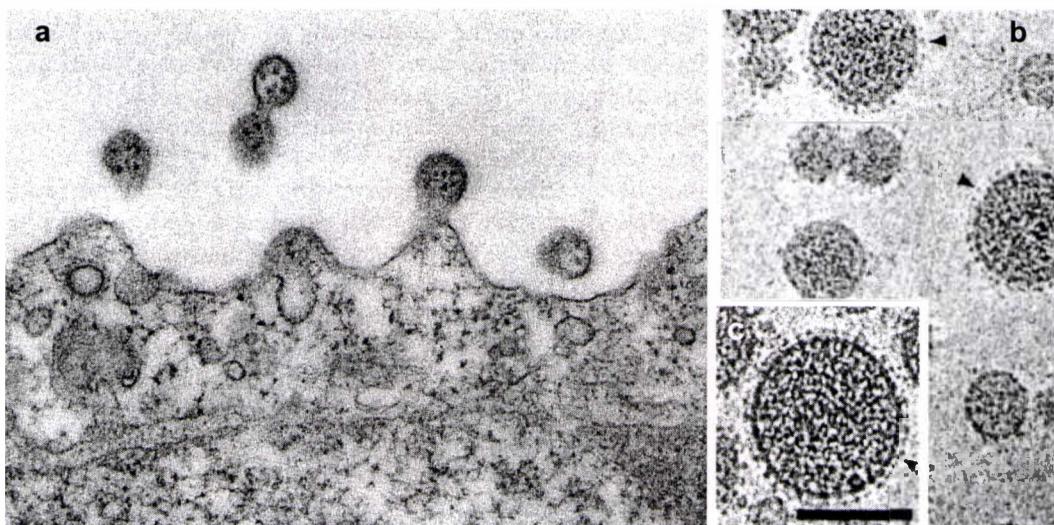
## CAPÍTULO 3

### BIOLÓGIA DE LOS ARENAVIRUS

#### CARACTERÍSTICAS DE LOS VIRIONES

##### ULTRAESTRUCTURA

Los arenavirus son virus envueltos con genoma segmentado. Las partículas virales son de forma variable, con un diámetro aproximado de 50 a los 300 nm (Figura 3.1), siendo las de pequeño y mediano tamaño generalmente esféricas, mientras que las más grandes son pleomórficas (Dalton *et al.*, 1968; Murphy *et al.*, 1970; Rowe *et al.*, 1970b). En el caso del virus Junín, los viriones son redondos u ovals con un diámetro promedio de 110-130 nm (Lascano & Berría, 1970 y 1974). A partir de datos obtenidos mediante experimentos de ultracentrifugación se ha calculado un coeficiente de sedimentación de aproximadamente 500 S para la partícula viral de varios arenavirus.



**Figura 3.1**  
**Micrografía electrónica de Arenavirus.**

**a)** Sección mostrando viriones de LCM brotando en la superficie de células BHK-21. Se observan partículas virales de 110 nm de diámetro conteniendo numerosos gránulos electrodensos de 20 nm de diámetro. **b)** y **c)** Detalles de los viriones. Las flechas señalan a las glicoproteínas de membrana en forma de espículas. (El aumento en b es de 167.100X y en c de 232.750X, la barra representa 100 nm). Tomado de Burns & Buchmeier, 1993.

Para el virus Junín suficientemente purificado, la densidad de flotación en CsCl fue calculada en 1,20 g/ml (Romanowski, 1981). Otros autores han obtenido valores ligeramente diferentes, dependiendo del estado de purificación de los viriones y de la composición de la solución utilizada durante la centrifugación (Martínez Segovia y Díaz, 1968; Help *et al.*, 1970).

En las microfotografías electrónicas, los viriones se observan recubiertos por una unidad de membrana electrodensa que contiene proyecciones externas en su superficie.

Estas proyecciones o espículas aparecen dispuestas de manera dispersa en la envoltura membranosa y, cuando se observan preparaciones por tinción negativa, tienen estructura claviforme (Murphy *et al.*, 1970).

El interior de los viriones aparece constituido por una materia amorfa compuesta principalmente por citoplasma celular y ribosomas, que están presentes en cantidad variable, como gránulos electrodensos de 20-25 nm de diámetro (Figura 3.1). Su origen celular fue demostrado tanto por métodos genéticos como bioquímicos (Pedersen, 1970, 1971 y 1973; Pedersen y Konigshofer, 1976; Carter *et al.*, 1973; Farber y Rawls, 1975; Añón *et al.*, 1976; Vezza *et al.*, 1977, 1978) y su funcionalidad fue demostrada en sistemas de traducción *in vitro* (Chinault *et al.*, 1981; Giménez y Compans, 1980; Buchmeier *et al.*, 1981).

El significado y la posible función de los ribosomas en las partículas virales es desconocida. Ha sido posible preparar partículas infectivas que carecen de ribosomas detectables (Vezza *et al.*, 1978) y se realizaron estudios en los que se emplearon ribosomas sensibles a la temperatura, mostrando que los virus propagados en estas células crecen igualmente bien a altas o bajas temperaturas (Leung and Rawls, 1977). Por lo tanto, es posible que los ribosomas no sean componentes esenciales de los arenavirus y que probablemente sean incorporados dentro de los viriones durante la brotación debido a la falta de especificidad en el proceso.

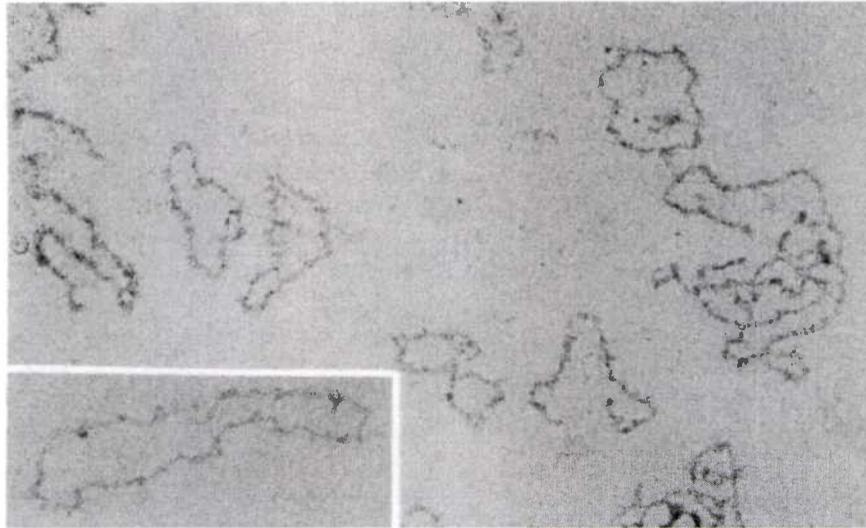
#### ESTRUCTURA DE LAS NUCLEOCÁPSIDES

Además de la presencia de los ribosomas, es muy difícil observar otros detalles estructurales internos en las partículas virales intactas. Sin embargo, con el tratamiento de los viriones con detergentes no iónicos se logra la ruptura de la envoltura viral y se pueden liberar las nucleocápsides. Éstas son complejos de ribonucleoproteínas y están compuestas principalmente por la proteína N asociada a las moléculas de RNA genómicos S y L, lo que explica los dos tamaños predominantes (Compans, 1993). Los RNAs virales se encuentran asociados también con las proteínas L y Z, aunque en menor proporción que con la proteína N.

Las nucleocápsides purificadas por centrifugación en gradientes de CsCl pueden ser observadas por microscopía electrónica (Young y Howard, 1983). En estas preparaciones, aparecen como estructuras circulares cerradas de dos tamaños predominantes, aproximadamente 640 nm y 1300 nm de longitud que se correlacionarían con los tamaños de ambos RNA virales (Vezza *et al.*, 1977; Figura 3.2). Las formas circulares aparentes que adoptan las nucleocápsides se atribuyen a la presencia de secuencias complementarias en los extremos 5' y 3' de ambos RNA genómicos (Young y Howard, 1983; Auperin *et al.*, 1984b; Romanowski *et al.*, 1985; Bishop y Auperin, 1987).

#### ESTRUCTURA MOLECULAR

La partícula viral posee una envoltura lipoproteica de origen celular adquirida durante la brotación de las células infectadas, arrastrando parte del citoplasma adyacente.

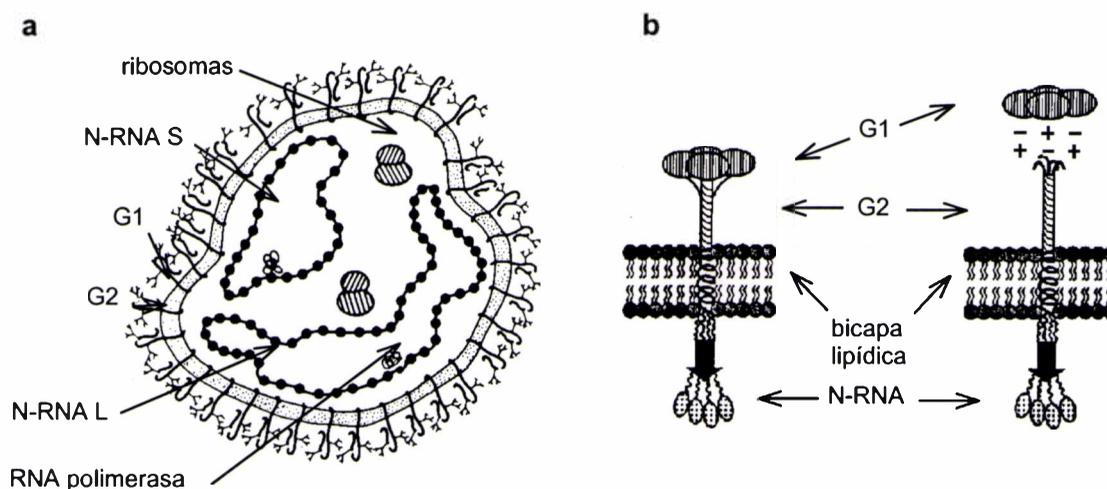


**Figura 3.2**  
**Nucleocápsides del virus Tacaribe.**

Micrografía electrónica obtenida a partir de nucleocápsides purificadas en un gradiente de CsCl (Palmer *et al.*, 1977). En el recuadro se muestra una de las estructuras circulares cerradas (110.000X).

Las espículas de la envoltura viral están formadas por los polipéptidos G1 y G2, originados por el clivaje proteolítico del precursor de las glicoproteínas de la envoltura, GPC (De Mitri y Martínez Segovia, 1985). Las moléculas del polipéptido G1 forman tetrámeros globulares en el exterior del virión mientras que los tetrámeros del polipéptido G2 atraviesan la bicapa lipídica (Figura 3.3a y b). El dominio N-terminal de G2 se encuentra en el exterior del virión y el C-terminal en su interior. Además, esta proteína tetramérica transmembrana (G2) se conecta en el exterior del virión por enlaces no covalentes con los tetrámeros globulares (G1) y en el interior con las nucleocápsides virales (Figura 3.3b). De esta manera, G1 y G2 constituirían las típicas espículas observadas por microscopía electrónica en la cubierta viral.

Localizadas en el interior del virión se encuentran las otras proteínas del arenavirus. La proteína mayoritaria N, está asociada a los RNAs virales y forma las nucleocápsides (Martínez Segovia y de Mitri, 1977; Gard *et al.*, 1977; Grau *et al.*, 1981; Romanowski, 1981; González *et al.*, 1983; Clegg y Lloyd, 1983). Además, se encuentran, en cantidades minoritarias, otras dos proteínas, la RNA polimerasa (replicasa), llamada proteína L y una proteína pequeña denominada Z por contener motivos estructurales del tipo *RING finger*. Junto con estas proteínas, son encapsidadas dentro de la partícula viral algunas ribonucleoproteínas celulares como los ribosomas antes mencionados.



**Figura 3.3**  
**Esquema de una partícula viral de arenavirus.**

**a)** Las partículas de los arenavirus son pleomórficas, envueltas en una bicapa lipoproteica, con las glicoproteínas virales (G1 y G2) asociadas a la misma y componentes internos que incluyen dos nucleocápsides circulares de aspecto de cuentas de collar y ribosomas. Las nucleocápsides están constituidas por RNA (S o L) y proteínas, una mayoritaria (N) y otras minoritarias (L y Z) (Bishop, 1990). **b)** Modelo de la interacción entre los componentes mayoritarios del virión. G2 forma un complejo tetramérico, que posee tres dominios. El dominio transmembrana de unos 18 aminoácidos, conecta el dominio C-terminal interno (asociado con la nucleocápside) con el dominio N-terminal externo que forma un bastón asociado con un complejo tetramérico de G1 mediante interacciones iónicas (Burns & Buchmeier, 1993).

## ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DEL GENOMA

### GENOMA VIRAL

Los Arenavirus poseen un genoma segmentado, formado por dos tipos de RNA de cadena simple. Estas especies de RNA presentan tamaños diferentes. El RNA menor (denominado S, *small*), tiene unos 3400 nucleótidos de longitud y un coeficiente de sedimentación de 22 a 25 S, mientras que el mayor (denominado L, *large*) posee unos 7200 nucleótidos, con un coeficiente de 31 a 37 S. Por lo tanto, la capacidad génica codificante potencial es de unos 11.000 nucleótidos (Martínez Segovia y Grazioli, 1969; Añón *et al.*, 1976; Riviere *et al.*, 1985a).

Hasta el momento, Tacaribe, LCM, Pichindé y Lassa son los representantes de la familia Arenaviridae cuyo genoma ha sido totalmente secuenciado (Auperin *et al.*, 1984a y b; Romanowski *et al.*, 1985; Romanowski y Bishop, 1985; Bishop y Auperin, 1987; Franze-Fernández *et al.*, 1987, Iapalucci *et al.*, 1989a, 1989b; Salvato *et al.*, 1989; Salvato y Shimomaye, 1989; Zhang *et al.*, 2001; Vieth *et al.*, 2004). La secuencia nucleotídica completa del RNA S fue determinada, además, para los virus Junín (Ghiringhelli *et al.*, 1989; Ghiringhelli *et al.*, 1991; Ghiringhelli *et al.*, 1997), Mopeia (Wilson *et al.*, 1991) Oliveros (Bowen, *et al.*, 1996a), Allpahuayo (Moncayo *et al.*, 2001), Machupo, Sabiá, Guanarito, Cupixi, Amapari, Whitewater Arroyo, Tamiami, Bear Canyon, Pirital, Flexal, Paraná y Latino (Charrel *et al.* 2002).

En todos los arenavirus estudiados, se ha observado que los RNAs no se hallan en cantidades equimolares, encontrándose un exceso relativo de moléculas de RNA S con respecto a la del RNA L. Sin embargo, para ser infectivas, las partículas virales deben poseer al menos una molécula de cada tipo de RNA. Esta diferencia en las cantidades relativas podría deberse a un mecanismo de empaquetamiento poco preciso que permite empaquetar en los viriones un número variable de ribosomas, como también permite la formación de partículas genéticamente diploides, al menos para el RNA S (Romanowski y Bishop, 1983).

Además de los RNA genómicos, se han encontrado dentro de los viriones otras moléculas de RNA con coeficientes de sedimentación de 4-6S, 18S y 28S. Se ha demostrado que estos RNAs tienen un origen celular y provienen de los ribosomas presentes en el virión (Abelson *et al.*, 1969; Pedersen, 1970; Carter *et al.*, 1973; Añón *et al.*, 1976; Vezza *et al.*, 1977; Ramsingh *et al.*, 1980; Dutko *et al.*, 1981).

Como ya se ha dicho, estos ribosomas no parecen tener función alguna en el ciclo replicativo viral y su presencia dentro de los virus podría deberse a un sistema de encapsidación y brotación poco específico. Efectivamente, los arenavirus son capaces de encapsidar también algunas de las especies de RNAs utilizadas como intermediarios en la replicación viral, tales como la forma antigenómica del RNA S, aunque su proporción no supera al 5% de la masa del RNA S genómico. Además, en algunas preparaciones de Pichindé, se ha detectado por *Northern Blot* un RNA 15S, que según algunos autores (Farber y Rawls, 1975; Dutko *et al.*, 1976; Auperin *et al.*, 1984a; Bishop, 1990), sería el mRNA de la proteína N, aunque esto no ha sido comprobado experimentalmente. También, se ha descrito la presencia de un RNA de bajo peso molecular en preparaciones de viriones de los virus Tacaribe y LCM, en cantidades molares comparables al RNA S viral. La caracterización del mismo permitió comprobar que corresponde al mRNA transcrito del gen Z. Es probable que este RNA se encuentre asociado a los ribosomas en la partícula viral y pueda ser traducido en una etapa muy temprana de la replicación del virus en una célula infectada (Iapalucci *et al.*, 1989a; Salvato y Shimomaye, 1989).

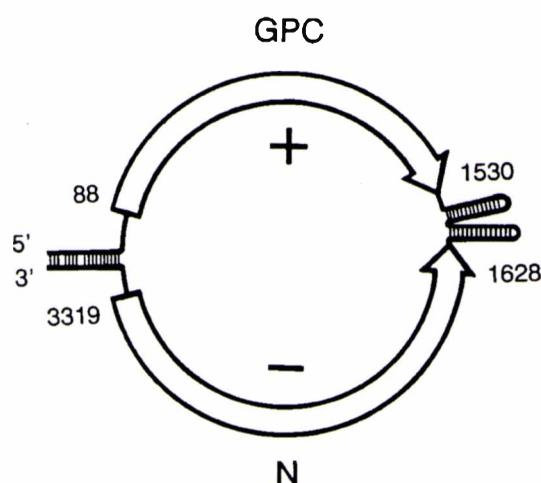
A partir de los datos de secuencia de los RNA virales se han podido identificar en cada RNA dos marcos abiertos de lectura con capacidad de codificar proteínas. En ambos casos, los mismos están en sentidos opuestos, lo que resulta en una doble polaridad del RNA. Por ello, Auperin *et al.* (1984b) propusieron el nombre de *ambisense* para diferenciar esta estrategia de las conocidas para otros genomas de RNA de cadena simple (*negative* y *positive sense*). La doble polaridad es una estrategia de codificación que también presentan algunos géneros de bunyavirus, una familia muy relacionada en este aspecto con los arenavirus (Elliot, 1990).

#### ESTRATEGIA DE CODIFICACIÓN

Cada uno de los RNAs genómicos S y L, posee dos marcos de lectura no solapados, con orientaciones opuestas, que codifican para distintas proteínas (Vezza *et al.*, 1978; Leung *et al.*, 1979 y 1981; Harnish *et al.*, 1983). El RNA S codifica para la proteína de la nucleocápside, N (polaridad antigenómica) y el precursor de las glicoproteínas externas, GPC (polaridad genómica), que es procesado proteolíticamente durante el ciclo replicativo

viral, para producir las dos glicoproteínas de la envoltura del virión, G1 y G2 (Auperin *et al.*, 1984b; Romanowski *et al.*, 1985; Auperin *et al.*, 1986; Franze-Fernández *et al.*, 1987; Wilson y Clegg, 1991; Ghiringhelli *et al.*, 1991). El RNA L contiene la información para la RNA polimerasa (replicasa) viral, L (polaridad antigenómica, lapalucci *et al.*, 1989a; Salvato *et al.*, 1989) y una proteína denominada Z por contener estructuras del tipo *RING finger* sin función biológica asignada hasta el momento (polaridad genómica, lapalucci *et al.*, 1989b; Salvato y Shimomaye, 1989). Los genes se hallan separados por una región no codificante que contiene secuencias autocomplementarias (Figura 3.4). Esta característica les confiere la potencialidad de formar una estructura secundaria muy estable, compuesta por una o dos horquillas, según el virus, denominadas *stem-loops* (Romanowski, 1993; Salvato, 1993). De esta manera, casi toda la capacidad codificante de los RNAs virales está aprovechada, presentando solamente secuencias no codificantes relativamente cortas en los extremos 3' y 5' y en la región intergénica (Figura 3.4).

Los extremos 3' de los RNAs genómicos S y L presentan una corta secuencia de 19 nucleótidos muy conservada en toda la familia viral (3' GCGUGUCACCUAGGAUCCG 5', Auperin *et al.*, 1982a y 1982b). Se supone que esta secuencia podría tener alguna importancia en el reconocimiento del molde por parte de la RNA polimerasa en el inicio de la replicación. Esta característica es conocida dentro de los togavirus (Ou *et al.*, 1981), paramyxovirus (Blumberg *et al.*, 1981) y bunyavirus (Elliot, 1990) y, aparentemente, en los filovirus (Kiley *et al.*, 1986; Feldman *et al.*, 1993). Sin embargo, se han publicado datos sobre la heterogeneidad de esta secuencia en el virus LCM, en aparente contradicción con la hipótesis anterior (Meyer y Southern, 1994).



**Figura 3.4**

**Organización molecular en el RNA S del virus Junín.**

El esquema resume las predicciones obtenidas a partir de los datos de secuencia. El RNA S se muestra en forma circular cerrada (*panhandle*) con los extremos 5' y 3' apareados. Con flechas abiertas, se indican los marcos de lectura de los genes GPC (sentido positivo) y N (sentido negativo). En la región intergénica se muestran las estructuras en horquilla. Las estructuras no están dibujadas en escala (Romanowski, 1993).

Otra característica común importante con respecto a esta secuencia, es que en el extremo 5' viral de los RNAs se encuentra una secuencia complementaria a la misma e invertida. Así, cuando se analiza la complementariedad en los extremos de los RNAs

genómicos, es posible formar complejos intramoleculares de tipo *panhandle* (Salvato *et al.*, 1989) que son consistentes con la conformación circular que presentan las nucleocápsides observadas por microscopía electrónica (Young *et al.*, 1983). Cuando se analizan secuencias particulares, se observa que la complementariedad entre los extremos 5' y 3' de los RNAs S y L se extiende más allá de la secuencia consenso en todos los arnavirus y, de acuerdo a las energías libres calculadas, su formación es altamente probable. La formación de esta estructura durante la replicación del virus en la célula infectada podría ser la señal que marca el comienzo de la encapsidación viral.

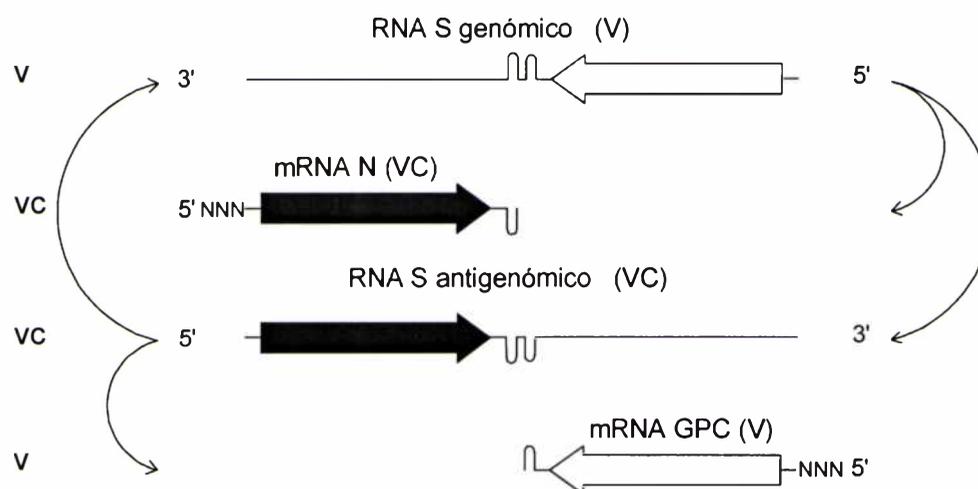
#### MECÁNICA DE LA TRANSCRIPCIÓN/REPLICACIÓN

Utilizando agentes lisosomotrópicos, se ha demostrado que los virus Pichindé, Lassa y Mopeia penetran en la célula mediante lisosomas ácidos (Glushakova y Lukashevich, 1989; Harnish *et al.*, 1993).

Si bien no se conocen con precisión los eventos moleculares que ocurren una vez que el virus ha entrado a la célula, hay una serie de eventos en el citoplasma celular que necesariamente deberán producirse durante la infección, entre los que se incluyen: la replicación del genoma viral, la transcripción y traducción de las proteínas virales, el ensamblado de las nucleocápsides y, finalmente, la brotación de la partícula viral. Por otra parte, la interacción del virus con la célula hospedadora puede derivar en una infección persistente o lítica, dependiendo de la línea celular (Iapalucci, 1994).

Los mRNAs de las proteínas N y L son transcritos utilizando como molde la región 3' de los RNAs virales S o L respectivamente (de polaridad negativa). En cambio, dado que la región 5' viral es de polaridad positiva, los mRNAs de GPC y Z son transcritos utilizando como molde la región 3' del RNA viral complementario (antigenómico) S o L, respectivamente. El RNA viral complementario (antigenómico) de longitud completa es un intermediario obligado en la replicación (Figura 3.5). Hasta el presente no se ha podido demostrar que los genes codificados en la región 5' de los RNAs virales, genómicos o antigenómicos de longitud completa, se traduzcan a partir de estas formas directamente, lo que hace suponer que el reconocimiento por los ribosomas incluye otros factores diferentes a las secuencias codificadas.

La región intergénica no codificante tiene como característica la capacidad de formar una estructura secundaria muy estable en forma de horquilla (*stem loop*) cuya función sería la de actuar como terminador de la transcripción (Romanowski *et al.*, 1985; Franze Fernández *et al.*, 1987; Salvato y Shimomaye, 1989; Ghiringhelli *et al.*, 1991; Iapalucci *et al.*, 1991; Rivera Pomar, 1991; Tortorici *et al.*, 2001). Esta estructura es simple en el RNA S de Pichindé, LCM y Lassa y doble en Junín, Tacaribe y Mopeia (Southern, 1996). Los mecanismos de transcripción y replicación viral que se encuentran esquematizados en la Figura 3.5 han sido estudiados con mayor detalle para el RNA S. Se supone que el RNA L sigue una estrategia similar.

**Figura 3.5****Estrategia de transcripción/replicación del RNA S de los arenavirus.**

El esquema muestra la codificación *ambisense* en el RNA S del virus Junín. El gen GPC (flecha negra) está codificado en sentido genómico y el gen N (flecha blanca) en sentido antigenómico. Las especies de RNA con polaridad genómica o viral se indica como V y las de polaridad antigenómica o viral complementario como VC. También, se muestran los mRNAs subgenómicos y se indica la dirección de traducción por los extremos de flecha. Las flechas curvadas indican explícitamente, las relaciones entre las diferentes especies de RNA.

Tanto la transcripción como la replicación están confinadas al citoplasma de la célula infectada aunque la información acerca de la existencia de un componente nuclear que pudiera facilitar la replicación de los arenavirus es aún contradictoria. El núcleo podría ser requerido para suministrar los mRNAs celulares provistos de *cap* que actuarían como *primers* en la transcripción y/o la membrana nuclear podría ser el soporte estructural de la replicación y transcripción (Southern, 1996).

Una vez que el virus infecta a una célula, la RNA polimerasa que ingresa con las nucleocápsides comienza la transcripción de la región 3'. Cuando la polimerasa alcanza las estructuras intergénicas en horquilla se disocia del RNA molde, dando origen a una especie subgenómica que es el mRNA de la proteína N.

Los mRNAs subgenómicos derivados del RNA S de los arenavirus tienen extremos 5' no codificantes que se extienden más allá del extremo de los RNAs genómicos que sirven como molde. Estas extensiones son de longitud variable (1 a 7 nucleótidos adicionales no codificados y de secuencia heterogénea; Garcin *et al.*, 1990; Meyer *et al.*, 1994; Raju *et al.*, 1990) y terminan en una caperuza (estructura *cap*). Es posible que estas extensiones deriven, como en influenza y bunyavirus, de mRNAs celulares vía "*cap snatching*" (Krug, 1981; Garcin & Kolakofsky, 1992). Por otra parte, los extremos 3' de los mRNAs carecen de cola de poli A.

Los análisis de secuencias de los RNAs L y S genómicos y antigenómicos del virus LCM, revelaron una gran heterogeneidad en los extremos 5' y 3' con bases no codificadas agregadas. También en los extremos, se observó un patrón característico de deleciones cortas, generadas y acumuladas durante la infección natural (Meyer & Southern, 1994 y

1997). Estas moléculas de RNA genómico podrían cumplir un papel importante en la determinación de la persistencia viral (Meyer & Southern, 1997).

El extremo 3' de los mRNAs de N, en los virus Tacaribe (Iapalucci *et al.*, 1991) y Junín (Rivera Pomar *et al.*, 1993), contiene la copia de la primera estructura en horquilla de la región intergénica que encuentra la RNA polimerasa en la dirección de la transcripción. Si la RNA polimerasa no se detiene en la región intergénica, el resultado es una copia completa del RNA S. Esta nueva especie, de secuencia antígenómica, sirve como molde para la transcripción de las dos especies de RNA S de secuencia genómica: el mRNA de la proteína GPC y el RNA S genómico viral de longitud completa.

Por otra parte, si la síntesis proteica se encuentra inhibida, el mRNA de N es la única especie que puede ser sintetizada, producto de la transcripción del RNA S (Franze Fernández *et al.*, 1987). La aparición de las otras especies de RNA virales es dependiente de la síntesis proteica, lo cual implica necesariamente que el mecanismo de antiterminación de la transcripción del RNA S depende de la síntesis proteica. Este efecto de antiterminación podría ser llevado a cabo por la proteína N, alguna otra proteína viral o algún polipéptido celular con una alta velocidad de recambio. Experimentos recientes en los que se estudiaron los eventos tempranos de la replicación y transcripción del RNA S del virus Junín (Lee *et al.*, 2000; Tortorici *et al.*, 2001) indican que una de las principales responsables de la acción antiterminadora *in vivo* es la proteína N.

## PROTEÍNAS VIRALES

En las partículas virales purificadas de los distintos arenavirus sobre los cuales se ha trabajado hasta el momento, se han detectado tres proteínas mayoritarias. Estas son la proteína de la nucleocápside viral, N y las glicoproteínas estructurales G1 y G2, originadas a partir del precursor de las glicoproteínas, GPC (Ramos *et al.*, 1972; Gard *et al.*, 1977; Martínez Segovia y De Mitri, 1977; Vezza *et al.*, 1977; Buchmeier *et al.*, 1977, 1978, 1981; Buchmeier y Oldstone, 1978, 1979, 1981; Buchmeier y Parekh, 1987; Gangemi *et al.*, 1978; Saleh *et al.*, 1979; Cresta *et al.*, 1980; Compans *et al.*, 1981; Grau *et al.*, 1981; Harnish *et al.*, 1981a y b; Kiley *et al.*, 1981; Leung *et al.*, 1981; Boersma *et al.*, 1982; Bruns *et al.*, 1983a y b, 1986; Clegg y Lloyd, 1983; Young *et al.*, 1981). Estas parecen ser las proteínas estructurales más importantes del virión.

Además, se han identificado otras dos proteínas, la proteína L (identificada como la RNA polimerasa RNA dependiente o replicasa) y Z (una proteína que une zinc) que finalmente resultan encapsidadas en proporción variable dentro de la partícula viral (Iapalucci *et al.*, 1989 a y b; Salvato y Shimomaye, 1989).

## PROTEÍNA DE LA NUCLEOCÁPSIDE (N)

La proteína N es el constituyente principal de la nucleocápside y es la más abundante del virión, representando un 70% de la masa proteica viral. En el virus Pichindé se ha estimado que hay unas 1500 moléculas de proteína N por virión (Vezza *et al.*, 1977), la mayor parte de las cuales está asociada a los RNAs virales, por lo cual es indudable que la

función principal de la proteína N es netamente estructural. El conocimiento de las secuencias aminoacídicas de diferentes proteínas N permite estimar una longitud promedio de 564 aminoácidos y un peso molecular promedio de aproximadamente 63 kDa. Además, permitió reconocer la presencia de varios sitios potenciales de N-glicosilación y de fosforilación así como probables dominios de unión a RNA. La responsabilidad o participación de la proteína N en otra u otras funciones virales no es muy clara hasta el momento.

El ensayo de fijación de complemento fue utilizado para establecer relaciones entre los distintos arenavirus (Rowe *et al.*, 1970a; Casals *et al.*, 1975). Estos estudios permitieron dividir a las especies de arenavirus en dos grupos antigénicamente relacionados, los arenavirus del Nuevo Mundo (o complejo Tacaribe) y los arenavirus del Viejo Mundo. Gschwender y Lehmann-Grube (1973) determinaron que la fijación de complemento estaba asociada con una fracción soluble obtenida a partir de células infectadas con LCM. Posteriormente, Buchmeier *et al.* (1977) y De Mitri y Martínez Segovia (1980) demostraron que la proteína N o productos de menor peso molecular, supuestamente generados por proteólisis intracelular, son los antígenos responsables de la fijación de complemento.

Por otra parte, se ha demostrado que la proteína N de los virus Junín, Pichindé y Lassa puede sufrir un procesamiento o degradación produciendo un polipéptido de 25-30 kDa (Harnish *et al.*, 1981a; Young *et al.*, 1987; Sánchez *et al.*, 1989). Este producto puede liberarse por lavado de las células infectadas con el virus Junín y detectarse libre en el medio de cultivo sobrenadante, de donde puede suponerse asociado a la superficie celular. Por el contrario, en células infectadas con Pichindé la localización del mismo sería intranuclear (Young *et al.*, 1987).

Además, se ha descrito la existencia de al menos un epítipo de N en la superficie del virión de LCM, así como en la superficie de células infectadas (Bruns *et al.*, 1986; Zeller *et al.*, 1986 y 1988). Esta observación está soportada, en teoría, por el hecho de que N presenta regiones hidrofóbicas que podrían anclarla en la membrana celular. La proteína N ha sido localizada en el citoplasma de las células infectadas ya sea por inmunomicroscopía óptica o electrónica. Young *et al.* (1987) describieron que la proteína N estaba presente en el núcleo de las células infectadas con Pichindé, aspecto no demostrado en los demás arenavirus.

Hay algunos indicios de modificaciones postraduccionales en la proteína N pero la forma no modificada es la especie más abundante. Un análisis detallado de las secuencias aminoacídicas de las proteínas N permite reconocer la presencia de varios sitios potenciales de N-glicosilación y de fosforilación por proteinquinasas, caseinquinasas y tirosinquinasas. Todos los estudios sobre proteínas virales glicosiladas demuestran que estos sitios potenciales en la proteína N no son utilizados *in vivo*.

Al menos en LCM, Tacaribe y Pichindé, se ha detectado una forma fosforilada de la proteína a tiempos largos en infecciones agudas y en mayor abundancia en células persistentemente infectadas. Esto sugiere que la fosforilación de N podría estar involucrada en la atenuación de la expresión génica viral que marca la progresión desde una infección aguda a una persistente (Boersma y Compans, 1985; Bruns *et al.*, 1986 y 1988). Esta fosforilación depende de una actividad de proteinquinasa asociada al virión que utiliza como

sustrato a la proteína N (Howard y Buchmeier, 1983). Esta actividad aún no ha sido asignada a ninguna proteína del virión.

En experimentos recientes se estudiaron los eventos tempranos de la replicación y transcripción del RNA S del virus Junín. Los resultados experimentales indican que la proteína N es la principal responsable de la acción antiterminadora *in vivo* (Tortorici *et al.*, 2001). Estos datos están fuertemente apoyados por el hallazgo de Lee *et al.* (2000) que confirma que la proteína N junto con la proteína L, constituyen los factores mínimos requeridos en *trans* para la síntesis de RNA mediada por la polimerasa del virus LCM.

#### PRECURSOR DE LAS GLICOPROTEÍNAS (GPC)

Las glicoproteínas G1 (45 a 48 kDa) y G2 (36-38 kDa) se generan por el procesamiento proteolítico del precursor GPC (70-80 kDa). El conocimiento de la secuencia aminoacídica de varios precursores de las glicoproteínas permitió estimar una longitud promedio de 494 aminoácidos y un peso molecular promedio aproximado de 56 kDa en su forma no glicosilada. Este precursor está constituido por tres regiones: un péptido señal y las glicoproteínas G1 y G2.

La síntesis de la proteína GPC ocurre en polirribosomas asociados a la membrana del retículo endoplásmico rugoso, como sucede en otros virus envueltos (Stephens y Compans, 1988). El procesamiento de éste ocurre en dos etapas (Burns & Buchmeier, 1993). El péptido señal es procesado en el retículo endoplásmico, probablemente por la acción de la peptidasa señal celular, antes de que la glicoproteína sea transportada hacia el Golgi (York *et al.* 2004). El procesamiento del resto del precursor ocurre entre el Golgi medio y el trans-Golgi por el clivaje proteolítico en los virus Lassa y LCM de una proteasa subtilasa SKI-1/S1P (Lenz *et al.*, 2001; Beyer *et al.*, 2003), enzima involucrada en el metabolismo del colesterol. De esta forma se producen las proteínas G1 y G2, con 5 y 2 oligosacáridos complejos, respectivamente, unidos a asparagina (Wright *et al.*, 1990). El movimiento final de las glicoproteínas hacia la membrana plasmática es mediado por un proceso de transporte vesicular. Recientemente, York *et al.* (2004) determinaron que el péptido señal se miristoila, forma parte de la estructura de las espículas y es necesario para la actividad fusogénica dependiente del pH que posee el complejo de glicoproteínas maduro.

El uso de anticuerpos monoclonales en el mapeo de epitopes y la microsecuenciación de las glicoproteínas de LCM, han permitido establecer que G1 proviene de la región amino terminal del precursor (Buchmeier *et al.*, 1987; Burns *et al.*, 1990). Esta proteína parece ser la responsable principal de la reactividad inmunológica específica de cada virus. Además, tal como se desprende del análisis de secuencias aminoacídicas, es la región más variable de las glicoproteínas. En cambio, la proteína G2, formada a partir de la mitad carboxilo terminal, es más conservada y muestra reactividad inmunológica cruzada.

Las glicoproteínas G1 y G2, se hallan en cantidades equimolares en el virión y son proteínas de superficie, observables al microscopio electrónico como espículas claviformes de 5 a 10 nm. G1 es una proteína periférica, mientras que G2 es una proteína integral de membrana. Burns & Buchmeier (1991) propusieron el siguiente modelo para la estructura de las típicas espículas observadas por microscopía electrónica en la cubierta del virus LCM: la

proteína G1 formaría tetrámeros globulares asociándose no covalentemente con tetrámeros de la proteína G2. La proteína G2 en el interior del virión se conectaría con la nucleocápside viral y como se mencionó anteriormente, las evidencias experimentales indican que la glicoproteína G1 mediaría la interacción con el receptor celular (Figura 3.3; Borrow & Oldstone, 1994; Cao *et al.*, 1998).

#### RNA POLIMERASA VIRAL (L)

La proteína L es un polipéptido no glicosilado con una longitud promedio de 2200 aminoácidos y un peso molecular promedio de 180-250 kDa (Salvato *et al.*, 1992). La actividad que se le atribuye es la de RNA polimerasa RNA dependiente (replicasa) análoga a la proteína L de rhabdovirus y paramyxovirus.

Esta proteína se halla asociada a la nucleocápside viral formando un complejo ribonucleoproteico. Como ya se mencionó, Lee *et al.* (2000) mostraron que esta proteína, junto a la proteína de nucleocápside, constituyen los factores mínimos necesarios (que actúan *en trans*) para permitir la síntesis de RNA.

Un aspecto llamativo es que, si bien la proteína L presenta regiones consenso con otras replicasas, el análisis en bancos de datos revela homologías poco explicables.

Así, la replicasa del virus de la estomatitis vesicular (VSV) presenta mayor homología con la proteína N del virus LCM que con la replicasa misma. Otro aspecto destacable es la escasa homología (identidad y cambios conservativos) que se encuentra cuando se efectúan alineamientos, múltiples o de a pares, de las secuencias nucleotídicas o aminoacídicas entre las RNA polimerasas de los arenavirus.

#### PROTEÍNA Z

Esta proteína, de unos 11 kDa en el virus LCM, está codificada por el gen Z del RNA L. En su extremo carboxilo terminal presenta un motivo de unión a zinc tipo *RING finger*. Salvato & Shimomaye (1989) mostraron experimentalmente que la proteína Z une zinc *in vitro*.

Se ha sugerido que la proteína Z es un componente estructural de las nucleocápsides (Salvato *et al.*, 1992) y que actúa como cofactor en la replicación viral y/o la transcripción (Garcin *et al.*, 1993). Sin embargo, Lee *et al.* (2000) demostraron que mientras que las proteínas N y L constituyen los factores mínimos necesarios para que exista síntesis de RNA, la proteína Z tendría un efecto inhibitorio en la replicación y transcripción de los minigenomas construidos artificialmente del virus LCM.

Esta aparente discrepancia posiblemente se deba a diferencias en las funciones de la proteína Z de los virus Tacaribe y LCM. También es posible que los anticuerpos anti-proteína Z de Tacaribe usados en los estudios pudieran afectar a factores celulares requeridos para la síntesis de RNA. Por otra parte, como la proteína Z es un componente estructural del virión, la eliminación con anticuerpos de proteína Z podría causar también la eliminación de la proteína N. Sin embargo, cuando al virus LCM se lo trata con detergentes no iónicos, la proteína Z particiona en la fase hidrofóbica en lugar de permanecer asociada a

la nucleocápside viral. Este hallazgo llevó a proponer que la proteína Z de los arenavirus sería la contraparte de las proteínas de matriz halladas en otros virus RNA negativos (Lee y de la Torre, 2002; Eichler *et al.*, 2004).

Por otro lado, Borden *et al.* (1998) mostraron que la proteína Z interactúa con la fracción nuclear de la proteína P0 ribosomal y relocaliza los cuerpos nucleares denominados (PML) al citoplasma. Estos datos motivaron estudios para tratar de determinar si la proteína Z podría tener algún efecto en la traducción celular.

Los resultados publicados por Campbell-Dwyer *et al.* (2000) demostraron que la proteína Z del virus LCM inhibe la síntesis de proteínas a través de interacciones con la maquinaria de traducción celular. Esta acción de la proteína Z es dependiente de la integridad de su motivo *RING finger* y podría explicar la disminución del crecimiento observado en las células infectadas. Además, quizás representa una estrategia viral para establecer la infección crónica (Campbell-Dwyer *et al.* 2000).

De todas estas observaciones se desprenden numerosos interrogantes que restan contestar sobre el espectro de funciones de la proteína Z de los arenavirus.

## PATOGÉNESIS VIRAL

### INFECCIÓN

El ciclo de infección viral comienza con la unión de los viriones a la membrana de la célula blanco. Esta unión depende de la interacción entre las proteínas de la superficie del virión y una proteína de la membrana plasmática que actúa como receptor viral. La segunda etapa es el ingreso del virus dentro de la célula ocurre por un proceso de fusión de membranas (Chopin y Scheid, 1980; Marsh y Helenius, 1989; Helenius *et al.*, 1989).

Ese ha descrito que el virus LCM penetra a la célula blanco a través de un mecanismo de endocitosis mediada por receptor y fusión dependiente de pH (Borrow y Oldstone, 1994). En este sistema, la glicoproteína G1 es la única responsable de la interacción inicial. Recientemente, se identificó a la proteína periférica de membrana denominada  $\alpha$ -dystroglycano como el receptor celular de los virus LCM y Lassa, (Cao *et al.*, 1998). Esta proteína está codificada por un único gen y se procesa para dar origen a dos cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  que conforman el complejo dystroglycano. Este complejo se expresa en una gran variedad de tejidos y media las interacciones de las células con la matriz extracelular (Schneider-Schaulies, 2000).

El ingreso en la célula se produce a través de grandes vesículas de paredes lisas y no asociadas con clatrina o microfilamentos. Posteriormente, la progresiva acidificación del endosoma que contiene al virión hace que a pH 5,3-5,5 (endosoma tardío) se produzca la fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal, un cambio de conformación irreversible en G1 que lleva a la disociación del complejo G1-G2, la formación de un poro (Di Simone *et al.*, 1994; Di Simone y Buchmeier, 1995) y la liberación de las nucleocápsides y las proteínas asociadas (Z y L) al interior de la célula. Posteriormente, se produce la disociación del complejo proteína N-RNA y se inicia una serie de eventos en la célula infectada que incluye: la transcripción de los genes virales, la traducción de los mRNAs y la replicación del RNA genómico. Estos llevan, finalmente, al ensamblado de las

nucleocápsides, a la encapsidación (mecanismo del cual se conoce poco) y la brotación de los nuevos virus.

Utilizando técnicas de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína N (Zeller *et al.*, 1988), la misma es detectada mayoritariamente en el citoplasma, lugar donde, probablemente, se produce el ensamblaje de las nucleocápsides.

Es posible que las glicoproteínas G1 (externa) y G2 (transmembrana) se dispongan en la membrana plasmática en grupos (*rafts*), excluyendo a las proteínas de membrana celulares (York *et al.*, 2004). Las nucleocápsides podrían interactuar con el dominio citoplásmico de G2, con (Salvato *et al.*, 1992) o sin (Bruns *et al.*, 1986) la intervención de la proteína Z. Una vez concretadas estas interacciones moleculares, se produce la brotación de las partículas virales a nivel de la membrana plasmática de la célula infectada, que es la única etapa de la morfogénesis viral que ha sido observada por microscopía electrónica (Figura 3.1; Dalton *et al.*, 1968; Murphy *et al.*, 1970).

#### PARTÍCULAS DEFECTIVAS E INTERFERENCIA VIRAL

Las infecciones virales, en animales o en células en cultivo, normalmente, se caracterizan por la generación de una proporción variable de la progenie con algún tipo de alteración en su genoma que afectan a una o más de las funciones necesarias para su replicación autónoma. Las modificaciones van desde un simple cambio en la RNA replicasa (Inokuchi y Hirashima, 1987) hasta formas incompletas, con deleciones más o menos importantes o con rearrreglos en su genoma (Whitaker-Dowling y Younger, 1987). Estas partículas son liberadas al medio de la misma manera que los virus normales (Fenner *et al.*, 1974) y poseen la capacidad de interferir en el desarrollo de éstos, por lo cual Huang y Baltimore (1970) propusieron el nombre de partículas defectivas interferentes (DI), para diferenciarlos de los virus infectivos.

Estas partículas interferentes fueron definidas en base a la pérdida de parte de su genoma, la presencia de las proteínas normales de los virus infectivos, la replicación sólo en presencia de virus infectivos homólogos o muy relacionados y la interferencia con la replicación de las partículas infectivas (Huang y Baltimore, 1977).

Las partículas DI interfirieron con la replicación del virus estándar del cual provienen sin inhibirla totalmente, de modo tal que puedan seguir produciéndose las formas DI a expensas de la maquinaria replicativa de los virus infectivos y suelen estar asociadas a los virus estándar en las infecciones persistentes.

En particular, las partículas DI de los arenavirus se generan en una alta proporción durante las infecciones agudas o a partir de células persistentemente infectadas y fueron descritas con detalle para los virus LCM y Pichindé (Southern, 1996). Estas se caracterizan por tener viriones de menor tamaño que los infectivos, igual composición proteica, aunque con una estequiometría diferente y la existencia de formas de RNA S y L de tamaño subgenómico y de ambas polaridades (genómica y antígenómica), que evidenciarían algún tipo de deleción (Romanowski y Bishop, resultados no publicados; Stocker *et al.*, 1994).

Las partículas DI de los arenavirus se generan en una alta proporción durante las infecciones agudas y a partir de células persistentemente infectadas. Este fenómeno, se

manifiesta en las infecciones por arnavirus cuando se utilizan multiplicidades de infección (mdi) mayores que una unidad formadora de placas por célula (ufp/cel). En estos casos, se observa una disminución del nivel de lisis celular y de los títulos de los sobrenadantes. Este inconveniente se puede solucionar utilizando diluciones sucesivas del mismo inóculo. Por este motivo, cuando se amplifica un inóculo viral en cultivos de células, se utiliza una mdi de 0,1 a 0,01 ufp/cel para evitar la infección simultánea de partículas virales funcionales con partículas interferentes defectivas (Rivera Pomar, 1991; Lozano, 1995).

El conocimiento acerca de la generación de las partículas DI de los arnavirus y la comprensión de los mecanismos moleculares de la interferencia es aún muy escaso. Bruns *et al.* (1990) han propuesto un modelo de replicación del RNA S del virus LCM en células BHK, que permitiría explicar la formación de las partículas defectivas interferentes.

### INFECCIONES PERSISTENTES

La interacción de un virus con células en cultivo es compleja y cuando se considera el sistema animal hospedador la complejidad aumenta aún más, ya que, además de la respuesta propia de las células directamente infectadas, están involucradas las respuestas inmunes específicas. En muchos sistemas virales se ha encontrado que, una vez que el virus ha entrado en las células o en el animal, el desarrollo posterior puede seguir uno de dos caminos: una infección aguda o una infección crónica o latente que implica la persistencia viral (Ahmed y Stevens, 1990).

Las infecciones virales persistentes pueden resultar en una enfermedad crónica y progresiva. Los virus humanos que pueden causar infecciones persistentes incluyen a los retrovirus, hepadnavirus, adenovirus, paramyxovirus y herpesvirus. Los arnavirus tienen capacidad de producir infecciones persistentes, ya sea en cultivo de células o en animales. Por otra parte, el desarrollo de una infección persistente es una condición necesaria para el mantenimiento del virus en la población de reservorios naturales.

Los mecanismos moleculares utilizados por los virus para persistir incluyen la anulación de la respuesta inmune primaria y la interferencia directa con la respuesta inmune. La primera estrategia está ejemplificada con los virus que restringen la expresión de sus genes cuando están latentes. Por ejemplo, el virus herpes simplex expresa sólo un transcripto asociado a la latencia, los citomegalovirus expresan solamente genes inmediatamente tempranos y los arnavirus y paramyxovirus reducen la expresión de las glicoproteínas virales. En cambio, algunos adenovirus interfieren en la expresión del antígeno de histocompatibilidad clase I. Otro ejemplo de interferencia directa con la respuesta inmune es el ofrecido por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). En este caso el virus es transmitido selectivamente desde monocitos a linfocitos T activados y el efecto citopático que causa excede la capacidad regenerativa del sistema inmune.

En los arnavirus, la interacción con las células en cultivo puede producir tanto infecciones estándar, con o sin efecto citopático, como infecciones persistentes. En los sistemas animales estudiados, las infecciones producen patrones de enfermedad variados, dependiendo de la vía y el momento de entrada de los virus (Staneck *et al.*, 1972; Staneck y

Pfau, 1974; Hotchin, 1974; Van der Zeijst *et al.*, 1983; Coto *et al.*, 1979; D'Aiutolo y Coto, 1986; Oldstone *et al.*, 1988).

En este sentido, los estudios sobre la persistencia en el virus LCM, han permitido coleccionar una gran cantidad de datos relacionados con este fenómeno. Una de las cuestiones de mayor importancia es el esclarecimiento de la incapacidad del sistema inmune de un organismo para reconocer e interferir con la acción de los virus (Zinkernagel y Doherty, 1974; 1977; Welsh y Oldstone, 1977; Zinkernagel *et al.*, 1982; Oldstone, 1987b; Whitton *et al.*, 1988 a y b).

En LCM, la presencia o ausencia de la respuesta inmune mediada por los linfocitos T citotóxicos (CTL) determina si una infección es o no disipada. En este contexto, Salvato *et al.* (1991) mostraron que el simple cambio de un aminoácido en la proteína GPC de LCM (ARM) (Phe<sub>260</sub>→Leu<sub>260</sub>) es responsable de una selección clonal órgano-específica, de la capacidad para infectar macrófagos selectivamente y necesario, pero no suficiente, para eliminar la respuesta citotóxica (CTL). Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual una mutación en la glicoproteína lleva a esta supresión aun no está claro. Otro cambio, hallado en la RNA polimerasa viral (Lys<sub>1079</sub>→Gln<sub>1079</sub>, Clon 13 o Lys<sub>1079</sub>→Asn<sub>1079</sub>, Clon 28b), está asociado con el fenotipo CTL-, el tropismo hacia los macrófagos y la capacidad de replicar muy eficientemente en los mismos (Salvato *et al.*, 1988; Matloubian *et al.*, 1990; Salvato *et al.*, 1991; Ahmed *et al.*, 1991; Matloubian *et al.*, 1993). Pircher *et al.* (1990), encontraron en LCM (WE) variantes que escapan a la respuesta citotóxica mediante cambios en el epítipo T.

Un hallazgo muy importante fue realizado por Klenerman *et al.* (1997). Este grupo de investigación mostró que secuencias específicas del virus LCM persisten en forma de DNA en ratones infectados. Estos resultados estarían revelando una nueva vía de interacción entre virus a RNA exógenos, retrovirus endógenos (que aportarían la transcriptasa reversa) y, quizás, componentes celulares que conducirían a una forma de persistencia viral.

La persistencia a nivel celular es demostrable *in vitro* a partir de células que sobreviven a infecciones líticas de arenavirus y que pueden subcultivarse indefinidamente. Estas células se caracterizan por tener una morfología y crecimiento igual a las no infectadas, por presentar una mayor expresión de la proteína N con una drástica disminución de la expresión de la GPC y ser resistentes a infecciones con virus homólogos, no así, con heterólogos (Oldstone y Buchmeier, 1982; Francis *et al.*, 1987). Como punto destacable, el establecimiento *in vitro* de una infección persistente, trae aparejada la producción cíclica de partículas DI e infectivas (Popescu y Lehmann Grube, 1977).

#### EFFECTOS DE LA INFECCIÓN A NIVEL CELULAR. CITOPAGENICIDAD

La infección viral se halla asociada a cambios en la morfología y fisiología celular. El conjunto de fenómenos asociados a la infección viral que determinan estos cambios se denomina efecto citopático.

La propagación de los arenavirus en cultivo de células puede provocar un efecto citopático o infecciones persistentes, dependiendo de la línea celular y del tipo de inóculo utilizado (Iapalucci *et al.*, 1994).

El efecto citopático se observa en las primeras etapas de infección y se caracteriza por la presencia en el citoplasma celular de numerosos cuerpos de inclusión y vacuolas, por la destrucción celular y una alta producción de viriones. Las células que sobreviven a esta etapa de la infección son capaces de sobrevivir, reconstituyen la monocapa con involución del efecto citopático visible al microscopio y resultan en una línea celular infectada persistentemente que puede ser cultivada en forma indefinida (Welsh & Buchmeier, 1979).

El efecto citopático más marcado en las infecciones de arnavirus es el cambio de morfología celular. Este conduce a la lisis en líneas susceptibles como Vero, CV-1, MDCK y HeLa. En cambio, células como la línea BHK-21 no presentan un efecto citopático marcado. En este sentido, la susceptibilidad diferencial de las líneas celulares se puede aprovechar para la propagación de los virus y la titulación de los inóculos virales. Durante el desarrollo de este estudio, el virus Junín fue propagado infectando células BHK-21 y los sobrenadantes de los cultivos fueron titulados por ensayo de placas en células Vero.

Sin embargo, se han informado cambios morfológicos en etapas agudas a alta multiplicidad de infección con el virus LCM (Romanowski, comunicación personal) o Tacaribe (Garcín y Kolakofsky, 1990). Este efecto se caracteriza por una extensa vacuolización del citoplasma y la aparición de cuerpos de inclusión polimórficos basófilos irregularmente distribuidos en el citoplasma o cerca de la membrana nuclear (Tkaczewski y Correa, 1972). Estos cuerpos de inclusión, vistos al microscopio electrónico, son estructuras membranosas que incluyen partículas de aspecto ribosomal o ribonucleoproteicas (Murphy *et al.*, 1970 y 1973) o solamente estructuras multilamelares como se observó en LCM (Mannweiler y Lehman Grube, 1973). Frecuentemente, aparecen células gigantes de nucleolo marcadamente distinguible (Tkaczewski y Boxaca, 1970).

A nivel bioquímico se han descrito como efectos citopáticos la disminución en el nivel de acetilcolinesterasa en células de neuroblastoma infectadas con el virus LCM (Oldstone, 1977) o modificaciones en los niveles de transcripción de genes (como por ejemplo la disminución en el nivel de expresión de la hormona de crecimiento, Klavinskis & Oldstone, 1989), aunque sin alterar las funciones de mantenimiento celular o *house-keeping* (Klavinskis y Oldstone, 1989), ni la bomba de  $Ca^{2+}$  y  $Na^+/K^+$  sensible a la ouabaina (Rey *et al.*, 1988, Rey, 1990). Por otra parte, Teng *et al.* (1996) mostraron que el cambio de un único aminoácido en la glicoproteína G1 del virus LCM podría causar el cambio de tropismo viral asociado a la deficiencia de hormona de crecimiento.

## CAPÍTULO 4

### VIRUS JUNÍN

#### EL VIRUS JUNÍN Y LA FIEBRE HEMORRÁGICA ARGENTINA

##### EPIDEMIOLOGÍA DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA ARGENTINA

El virus Junín es el agente etiológico de la fiebre hemorrágica argentina (FHA), cuyos síntomas clínicos incluyen alteraciones hematológicas, neurológicas, cardiovasculares, renales e inmunológicas (Maiztegui, 1975). Su mortalidad puede ser de hasta 30%, pero el tratamiento temprano con plasma inmune la reduce a menos del 2% (Enría *et al.*, 1986).

Los primeros casos registrados aparecieron a mediados de la década del 50 y, desde entonces, cada año se ha informado un número variable de casos, entre 100 y 4000. A partir del año 1991 las cifras se redujeron a un número de casos anuales de entre 60 y 170 como consecuencia de la aplicación de la vacuna específica Candid #1 (Enría *et al.*, 2002).

La etiología viral de la infección fue establecida en 1958 por dos grupos en forma independiente (Parodi *et al.*, 1958; Pirotsky *et al.*, 1959). Ellos aislaron un agente viral a partir de sangre u órganos obtenidos a partir de necropsias en el Hospital Regional de la ciudad de Junín, en la Provincia de Buenos Aires. El agente etiológico fue llamado virus Junín debido al nombre de la ciudad donde se efectuó su primer aislamiento.

En estudios de captura de roedores en el área endémica de FHA se encontró que el principal reservorio en la naturaleza del virus Junín es *Calomys musculinus*, un ratón de campo de la familia Cricétidae con hábitos rurales, pero también se encontraron infectadas otras especies de cricétidos como *Calomys laucha*, *Akodon azarae* (Maiztegui, 1975, Martínez Peralta *et al.*, 1993), *Oryzomys flavescens* y *Bolomys obscurus*, así como el carnívoro predador *Galictis cuja* (Mills *et al.*, 1994). Ocasionalmente, se ha encontrado la infección en otros roedores con hábitos urbanos como *Mus musculus* (Sabattini *et al.*, 1977). Otros arenavirus poseen diferentes reservorios; en particular, *Mus musculus* es el reservorio natural más importante para el virus LCM, el otro arenavirus que fue aislado dentro del área endémica del virus Junín.

La distribución geográfica del virus se puede inferir de la distribución de casos que se ha extendido progresivamente desde un foco inicial alrededor de la ciudad de Junín hasta el área endémica actual de más de 150.000 km<sup>2</sup>, con una población cercana a los 5 millones de habitantes (Maiztegui *et al.*, 1977; Enría y Feuillade, 1998, Feuillade *et al.*, 2004).

Esta región corresponde a la zona agrícola-ganadera más importante de la Argentina, y la población más expuesta está constituida por los trabajadores rurales. Por ello, la enfermedad, a pesar de no poseer una casuística importante, ha tenido un considerable impacto en la salud y en la economía de la Argentina. Consecuentemente, se ha estimulado la investigación sobre FHA y su agente etiológico para resolver este problema sanitario.

Esta extensión progresiva todavía no ha podido ser explicada ni tampoco ha alcanzado los límites de la población de *Calomys musculinus*, su hospedador reservorio. Sin embargo, el virus no está completamente ausente fuera del área endémica, dado que

existen aislamientos ocasionales en otras poblaciones de *Calomys musculinus* en diferentes regiones de la pampa Argentina (Parodi *et al.*, 1961; Weissenbacher *et al.*, 1985; Milis *et al.*, 1991). Así, no está claro si la alta prevalencia de los roedores infectados es consecuencia de cambios en el virus, de cambios en el roedor hospedador o de alguna interacción entre los dos que conducen a una diseminación de la enfermedad.

La vía de entrada del virus Junín en humanos es a través de las mucosas (conjuntiva, inhalatoria u orofaríngea) o por cortes o raspaduras de la piel, por contacto con semillas, tallos de malezas o por inhalación de aerosoles o polvo u otros materiales contaminados con la orina o la saliva de un roedor infectado (Aribalzaga, 1955; Rugiero *et al.* 1964a,b,c; Maiztegui, 1975; MacKenzie *et al.*, 1964; Weissenbacher *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 1965; Peters *et al.*, 1974). En muy pocos casos se ha demostrado el contagio interhumano, observándose en todos ellos la existencia de un contacto muy íntimo con el enfermo.

Aunque se detectan casos de FHA durante cualquier época del año, esta enfermedad tiene una distribución estacional que abarca desde marzo hasta julio, con un número máximo de casos durante el mes de mayo (Weissenbacher & Damonte, 1983). Este hecho está relacionado con el número de roedores dentro del área endémica. La población de *Calomys* aumenta considerablemente durante estos meses del año, probablemente debido a un cambio en las condiciones ambientales que favorecen su desarrollo. En ese sentido, se han hecho especulaciones epidemiológicas, que vinculan el cambio en el tipo y las condiciones de cultivo en la pampa húmeda durante la segunda guerra mundial, con la emergencia de la FHA como enfermedad humana. Se supone que la prevalencia de la FHA en varones y particularmente dentro de la población rural está también estrechamente relacionada con los hábitos de sus reservorios y con la relación ocupacional de la exposición. Durante el primer brote de FHA, la enfermedad afectó principalmente a personas que trabajaban en la cosecha de cereales. En los campos sembrados con cereales se encontró una mayor densidad de roedores así como oportunidades para la transmisión del virus entre el roedor y el hombre durante la cosecha. En efecto, es común encontrar en la piel de los trabajadores rurales cortes o abrasiones que constituyen la principal vía de entrada del virus.

El mantenimiento y la dispersión de la infección en los roedores presenta patrones complejos. La dispersión horizontal se produce por contacto directo con secreciones nasales, saliva u orina, como también por aerosoles o por contacto con material infectado en el ambiente, aunque el mecanismo más eficiente para la infección es por mordida (Vitullo *et al.*, 1987 y 1988).

Las hembras infectadas neonatalmente son virtualmente estériles cuando son adultas, minimizando su rol de producción de descendencia virémica crónicamente. Los machos portadores pueden simultáneamente inseminar e infectar hembras no infectadas, conduciendo a la producción de descendencia de ambos sexos infectada congénitamente. Las hembras infectadas en la edad adulta pueden ser fértiles o subfértiles (Vitullo *et al.*, 1987; Childs y Peters, 1993). A pesar de la complejidad de esta situación, que hipotéticamente conduce a una interacción fluctuante cíclica entre infección y densidad de población de roedores, los datos de un estudio de dos años dentro el área endémica de

Argentina sugieren que durante este período existe una considerable transmisión de virus entre los roedores a través de encuentros agresivos entre machos adultos. Esto está facilitado por la concentración de la especie reservorio del virus Junín *Calomys musculinus* a lo largo de los alambrados y de los terrenos a los lados de las rutas que terminan siendo áreas localizadas con una alta densidad de población (Mills, 1991 y 1994).

#### FISIOPATOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR VIRUS JUNÍN

La fisiopatología de las enfermedades producidas por los arenavirus sudamericanos, Junín, Machupo y Guanarito (FHV, fiebre hemorrágica Venezolana), es muy similar, diferenciándose en este aspecto de la fiebre producida por el virus de Lassa, un arenavirus originario de África.

El conocimiento actual sobre la patogénesis de la FHA proviene principalmente de la experimentación con ratones lactantes y cobayos (Bruno Lobo *et al.*, 1968; Coto *et al.*, 1972; Garay, 1975). Muchas de las alteraciones fisiológicas y patológicas observadas en estos animales luego de la inoculación con el virus Junín no se correlacionan con las manifestaciones de la FHA en el hombre. Estas limitaciones fueron superadas más adelante usando *Macaca mulatta* como modelo de la infección del hombre con el virus Junín (McKee *et al.*, 1987).

Se ha demostrado que en la fase aguda de la infección, el virus Junín se replica activamente en linfomonocitos de sangre periférica, sugiriendo que éste es el sitio primario de replicación viral (Ambrosio *et al.*, 1986). Aunque aún no se han realizado estudios definitivos, la evolución de la enfermedad parece estar relacionada con el título del virus en sangre o en tejidos. Los estudios de microscopía electrónica mostraron inclusiones citoplasmáticas y un daño celular inespecífico en todos los órganos examinados. Los estudios de inmunofluorescencia sugieren que los daños celulares podrían estar relacionados con antígenos virales pero no con inmunoglobulinas o fracciones del complemento. Los estudios clínicos revelan la activación del sistema de complemento, pero no existe evidencia de la formación del complejo inmune (de Bracco *et al.*, 1978). Probablemente, el daño celular sea causado directamente por la replicación viral más que por la respuesta inmune (Maiztegui, 1975; Maiztegui *et al.*, 1975). En ese sentido, se ha encontrado que la presencia de la nucleoproteína viral en el citoplasma de células en cultivo mimetiza el efecto citopático producido por la infección con el virus Junín (Rivera Pomar *et al.*, 1991).

La función de los órganos, excepto para el sistema endotelial, permanece intacta. El período crítico de shock es corto, durando apenas entre 24 a 48 hs. El daño hepático es escaso, produciendo una hepatitis mediana (Mando, 1977) y la función renal está bien mantenida. Aún cuando la hemorragia es prominente, no es la causa del shock y de la muerte. Sin embargo, la ruptura capilar es significativa, produciendo una pérdida de proteínas y de volumen intravascular, mucho más pronunciada que la pérdida de eritrocitos. De hecho, el progreso de la enfermedad se ve asociado con una proteinuria elevada y una deshidratación junto con hemoconcentración. Las observaciones clínicas sugieren que una disfunción endotelial vascular y la subsiguiente falla circulatoria, sin que exista una clara

evidencia de replicación viral en el endotelio con el correspondiente daño o ruptura endotelial.

## DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

### CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La fiebre hemorrágica argentina (FHA) comienza insidiosamente con fiebre y malestar general. Son comunes el dolor de cabeza, mialgia, dolor epigástrico y anorexia. El período de incubación dura entre 6 y 14 días, mientras que en los primeros 4 días (período de invasión) aparecen los síntomas clínicos tempranos más característicos como una postración más severa, náuseas, vómitos, desvanecimientos e indicadores tempranos de daño vascular. Esta sintomatología fue descrita a partir de una epidemia ocurrida en los años 1953 y 1955 en Bragado, provincia de Buenos Aires (Aribalzaga, 1955).

Después de un período de estado (desde que comienzan los síntomas) de 6 a 11 días, se puede producir, en los pacientes con fiebre hemorrágica, la remisión espontánea de la enfermedad. En caso contrario, aparece un conjunto de síntomas poco específicos, que caracterizan el comienzo de la segunda etapa de la enfermedad. En esta etapa, la enfermedad puede aparecer como un síndrome hemorrágico agudo, cuyas manifestaciones más comunes son epistaxis y hematemesis (Melcon & Herskovits, 1981), o como un síndrome neurológico agudo (Rugiero *et al.*, 1960). Los informes acerca de infecciones subclínicas son raros. Después del comienzo de los síntomas hasta que se produce la curación o muerte transcurre un período de entre 12 y 15 días.

En la etapa aguda de la enfermedad, continúan los síntomas de malestar, fiebre elevada, mialgia severa, anorexia, y aparecen, además, dolor lumbar, sensibilidad abdominal, conjuntivitis, dolor retroorbital, generalmente, con fotofobia y constipación. Después de los dos o tres primeros días de la enfermedad, frecuentemente, ocurren náuseas y vómitos. La temperatura es alta, generalmente alrededor de 40°C, con muy pocas fluctuaciones. En el examen físico, el paciente aparece como intoxicado, y los signos más comunes en la primer semana de la enfermedad son inyección conjuntival, edema palpebral discreto y exantema eritematoso de cara, cuello y tercio superior del tronco. Después del cuarto o quinto día de la enfermedad es muy común encontrar petequias, aunque en general, en escasa cantidad y circunscriptas a las regiones axilares y al tercio superior de los brazos. Además, aunque la faringitis es poco común, el enantema bucofaríngeo es una de las manifestaciones más características de la enfermedad aguda. Las manifestaciones hemorrágicas que aparecen en casi la mitad de los enfermos, presentan la mayoría de los signos clínicos tempranos, más característicos de la FHA. En particular, después de una semana de infección, las encías se presentan tumefactas, congestivas y, en algunos casos con hemorragias. Además, en la mayoría de los pacientes aparece una línea de enrojecimiento en la encía, a nivel de la inserción dentaria, denominada ribete gingival, cuya presencia es un indicador clínico importante de la enfermedad. En ese sentido, en la mujer, se presenta una metrorragia precoz, que es generalmente escasa, pero constante y se constituye en un signo de gran valor para la sospecha de diagnóstico de FHA.

En general, a nivel del aparato cardiovascular, se observa una bradicardia relativa e hipotensión postural. Además, pueden presentarse arritmias que son transitorias y benignas. Hay diferentes grados de deshidratación y oliguria.

Los virus causantes de las fiebres hemorrágicas sudamericanas no parecen afectar en gran medida las vías aéreas superiores. Algunos enfermos pueden presentar una tos seca, pero sin dolor de garganta. Además, aunque se puede observar enanema faríngeo no se detectan alteraciones bronco-pulmonares, lo que adquiere especial importancia en el diagnóstico diferencial de otros procesos infecciosos agudos.

Al comienzo de la segunda semana de evolución, entre el día noveno y undécimo, en la mayoría de los casos se produce una franca mejoría, desaparecen o disminuyen las manifestaciones hemorrágicas y neurológicas, y se restablece la diuresis. A nivel del laboratorio, comienzan a subir los glóbulos blancos y las plaquetas y desaparece la proteinuria. En estos casos, se inicia un período de convalecencia, que puede prolongarse más de un mes. Aunque esta enfermedad cura, generalmente, sin secuelas, es frecuente observar transitoriamente durante este período, diferentes manifestaciones como hipoacusia, irritabilidad, inestabilidad emocional y caída del cabello.

Se reconocen varias formas clínicas de FHA: leves o comunes y graves. Las formas graves, a su vez, se clasifican en predominantemente hemorrágicas, predominantemente neurológicas o mixtas. Las formas graves se observan en el 30% al 40% de los pacientes no tratados con plasma de convalecientes y son, casi siempre, mortales.

Alrededor de la mitad de los pacientes de FHA, desarrollan un síndrome neurológico agudo. En general, durante los primeros 4 o 5 días el examen cuidadoso sólo permite detectar temblores en los dedos de las manos y en la lengua. Después de los primeros 7 días de evolución de la FHA es común observar un decaimiento general en los pacientes, incluyendo la somnolencia y cierto grado de lentitud y desorientación mental. También, hay hiperestesia cutánea, hipotonía muscular e hiporreflexia osteotendinosa. En los casos graves se intensifican el estado de confusión mental y los temblores, con excitación psicomotriz marcada, *delirium tremens*, convulsiones generalizadas y, finalmente, coma. Sin embargo, la complicación del sistema nervioso central permanece oscura, no existiendo, hasta el presente, evidencia de infección directa de los tejidos nerviosos. Además, los síntomas meníngeos y las alteraciones del fluido cerebroespinal son raras. Por otra parte, en los convalecientes de FHA que han recibido inmunoterapia se ha descrito un síndrome neurológico tardío que se caracteriza por síntomas cerebelares (Melcom y Heskovits, 1981; Maiztegui *et al.*, 1979; Enría *et al.* 1986).

Casi la mitad de los pacientes con FHA presenta manifestaciones hemorrágicas en la segunda etapa de la enfermedad. Estas hemorragias pueden manifestarse en las superficies mucosas o en la piel como petequias, con un aumento previo del volumen del paquete eritrocitario. En general, se observan hemorragias gingivales, epistaxis, metrorragia, petequias, equimosis, melena y hematuria (Maiztegui, 1975). Además, en esta etapa, se mantiene la presencia de eritema en la cara, cuello y tórax, así como también petequias en las encías. Sin embargo, la hemorragia no es la causa del shock y de la muerte. Por otra parte, no se presentan linfadenopatías ni esplenomegalia y la ictericia es poco frecuente en los estadios terminales de algunas formas graves. En los casos severos aparece, además, el compromiso de los sistemas gastrointestinal y nervioso, con náusea,

vómitos, temblores y convulsiones. Los síntomas son acompañados generalmente, por uremia, proteinuria, hematuria y oliguria. El daño renal se localiza principalmente en las células tubulares distales y en los conductos colectores, y en pocas ocasiones afecta los glomérulos o los túbulos proximales (Cossio *et al.*, 1975). Esta localización fue confirmada mediante la observación de valores normales tanto para la velocidad de filtración glomerular, como para el flujo de plasma renal y la eliminación de creatinina (Maiztegui, 1975). Sólo en pocos casos se describió la existencia de falla renal (Agrest *et al.*, 1969).

En los casos fatales se demostró colapso vascular con shock hipotensivo, hipotermia y edema pulmonar. La persistencia del shock hipovolémico, a pesar de la presencia de dilatadores del volumen intravascular, sugiere que esto es debido al daño de la función endotelial y a la pérdida de fluido dentro de los espacios extravasculares. Las observaciones clínicas llevan a la conclusión que la falla circulatoria, asociada con la pérdida de función endotelial es importante (Ruggiero *et al.*, 1964a). En el examen microscópico se puede observar una alteración general en las células endoteliales y un edema leve de las paredes vasculares, junto con engrosamiento capilar y hemorragia perivascular (Child *et al.*, 1967; Elsner *et al.*, 1973). Generalmente, se observan grandes áreas de hemorragia intraalveolar o bronquial, sin evidencia de la existencia de algún proceso inflamatorio. Además, en la mitad de los casos, aparece una neumonía asociada con bronquitis necrotizante o embolia pulmonar. También existe hemorragia y un infiltrado linfocitario del pericardio junto con alguna evidencia electrocardiográfica de miocarditis intersticial (Ruggiero *et al.*, 1964b). Los nódulos linfáticos están agrandados y obturados mostrando una hiperplasia de las células reticulares. Además, la hemorragia esplénica y la congestión medular con hemorragia pélvica y pericapsular son comunes.

A pesar de que en un único caso se encontraron evidencias de productos de degradación del fibrinógeno y ausencia de fibrinolisis (Agrest *et al.*, 1969), la coagulación intravascular diseminada, descrita en algunos casos, no parece ser un rasgo característico de esta patología (Molinas y Maiztegui, 1981; Weissenbacher *et al.*, 1987).

Otras complicaciones, que se observan frecuentemente, sobre todo en el caso de pacientes que no han sido tratados con plasma de convaleciente, son las infecciones bacterianas micóticas agregadas, que pueden producir una sepsis generalizada. En estos pacientes, la tasa de mortalidad llega hasta un 30%.

Los primeros signos son la inyección conjuntival, enrojecimiento en la cabeza y a veces sobre el torso, petequias e hipotensión moderada. Son comunes el temblor de la lengua y de las manos pudiendo imitar una enfermedad cerebelar. En los casos más severos se desarrollan hemorragias en las membranas de mucosas y moretones en los sitios de punción con agujas. La aparición de shock junto con las hemorragias, indica un pronóstico malo. En algunos casos hay signos neurológicos extensos que incluyen coma y convulsiones y presentándose en estos casos una alta mortalidad. Usualmente alrededor de los días 10 al 13 los pacientes empiezan a mejorar y la aparición de anticuerpos neutralizantes señala el comienzo de la respuesta inmune. La convalecencia a menudo dura varias semanas con fatiga, desvanecimientos y pérdida del cabello.

## DIAGNÓSTICO CLÍNICO

El diagnóstico de FHA es primariamente establecido por examen clínico, análisis generales de laboratorio bioquímico y anamnesis del paciente.

Los síntomas y signos iniciales de la FHA son similares a los de muchas otras enfermedades infecciosas. Sin embargo, la velocidad de eritrosedimentación, que es normal o está disminuida, y la leucopenia permiten descartar la mayoría de las infecciones bacterianas. Además, el recuento de plaquetas es por debajo de 100.000 y los tiempos de sangría y de retracción de coágulo están concordantemente prolongados. También, se ha descrito la presencia de un inhibidor de la agregación de plaquetas circulante (Cummins *et al.*, 1990) junto con niveles disminuidos de los factores de coagulación II, V, VII, VIII y X y de fibrinógeno. A pesar de ello, las alteraciones en las funciones de coagulación son menores.

En FHA se han observado, además altos niveles de interferón en pacientes con una enfermedad severa llegando hasta 64.000 UI/ml (Levis *et al.*, 1984), y una disminución en el complemento. Los niveles de interferón en los pacientes con FHA se relacionan con la severidad de la enfermedad y con su progreso (Levis *et al.*, 1985). Contrariamente, los títulos virales en suero son bajos, pero la infección es aparentemente pantrópica (Weissenbacher *et al.*, 1975).

## DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

La gran diversidad de formas en que se presenta la FHA y la alta frecuencia de cuadros clínicos confusos resaltan la importancia de los ensayos de laboratorio específicos que puedan aplicarse en el período temprano de la enfermedad.

El ensayo de ELISA es el más comúnmente utilizado para la detección de anticuerpos en estudios clínicos y en investigaciones seroepidemiológicas (Meegan *et al.*, 1986; Barrera Oro *et al.*, 1990). Incluso se ha podido detectar la persistencia de anticuerpos después de más de 30 años (Peters *et al.*, 1996).

Los inmunoensayos son específicos, aunque su utilidad es limitada ya que la presencia de anticuerpos es detectada tardíamente durante la convalecencia. En efecto, aunque la conversión serológica ocurre, en general, después del primer mes, su detección se utiliza como un ensayo definitivo, recién a los 60-90 días después de la internación del paciente, sólo con el fin de confirmar el diagnóstico etiológico de FHA.

También se utilizan técnicas de inmunofluorescencia indirecta (análoga a la desarrollada para la fiebre hemorrágica boliviana, Peters *et al.*, 1973) o de neutralización (Webb *et al.*, 1969). Estos ensayos utilizan antígenos virales obtenidos por medio de cultivo de tejidos infectados. La técnica de fijación de complemento es muy poco utilizada en la actualidad (Casals, 1977) debido a la falta de especificidad y/o sensibilidad. Teniendo en cuenta que la conversión serológica ocurre tardíamente durante el transcurso de la infección, estos ensayos no pueden ser usados como marcadores sensibles en las etapas tempranas de la enfermedad. Debido al riesgo intrínseco, derivado de la manipulación de virus vivos, se están desarrollando inmunoensayos que utilizan antígenos producidos en el laboratorio, por medio de la tecnología del DNA recombinante (Ghiringhelli *et al.*, resultados no publicados).

Es posible la detección de antígenos virales por ELISA a partir de sangre, suero u homogenados de tejido. Estos ensayos pueden ser usados en el diagnóstico de pacientes sospechados de FHA y son a menudo los primeros resultados obtenidos en casos fatales rápidos en los que el paciente muere antes de la aparición de anticuerpos. La detección de antígenos es también posible durante estudios ecológicos a partir de orina, sangre o hisopados de garganta (Mills *et al.*, 1994; Kiazek *et al.*, datos no publicados).

Los virus se pueden aislar durante la fase febril aguda a partir de sangre o suero (Lascano *et al.*, 1981) desde el día 2 hasta 10 o 12 días después, por inoculación de hámster o ratones recién nacidos. También se pueden aislar de muestras bucales o faríngeas en la etapa aguda, de leche materna (Maiztegui *et al.*, 1973) y necropsias. La inoculación de cultivos (BHK-21, Vero) es más segura y más fácil de realizar en laboratorios BSL-4. El co-cultivo de células mononucleares de sangre periférica con células Vero parece ser un método más sensible que los ratones lactantes o la inoculación de células Vero con aislamientos de virus Junín a partir de pacientes (Ambrosio *et al.*, 1986), sin embargo el procedimiento es lento y de manipulación compleja, por lo que sólo sirve para confirmar el diagnóstico clínico. En estudios de roedores, el virus se puede aislar de sangre, orina, hisopados de garganta y tejidos de autopsia.

Por último, es importante tener en cuenta que las manipulaciones con virus Junín, ya sea para su detección o para la obtención de antígenos virales para los ensayos serológicos, poseen una complicación adicional ya que requieren la utilización de condiciones de seguridad especiales (laboratorios BSL-3 o BSL-4).

Sin embargo, los bajos títulos de virus Junín en las etapas tempranas de la FHA requieren la puesta a punto de un sistema diagnóstico con una sensibilidad de detección directa muy alta o con una capacidad de amplificación suficiente para obtener una señal detectable.

Los ensayos de diagnóstico basados en la detección de los ácidos nucleicos ofrecen la posibilidad de trabajar con el agente patógeno inactivado en una etapa temprana después de la extracción de la muestra, disminuyendo, de esta manera, los riesgos a los que se expone el personal de laboratorio encargado de llevar a cabo el análisis. Además, estos ensayos son, en general, más sensibles y tempranos que los que se basan en la detección de antígenos o de anticuerpos de respuesta, por medio de técnicas inmunológicas.

El procedimiento permite inactivar el agente patógeno después de la extracción de sangre y disminuye notablemente los riesgos de la manipulación (Lozano *et al.*, 1993). La detección de los ácidos nucleicos del virus se logra con una reacción de RT-PCR (transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa). Esta técnica ha sido validada exitosamente para la detección del virus Junín en muestras de sangre extraídas durante la fase aguda de la FHA, en el marco de un proyecto de colaboración entre el IBBM y el INEVH (Lozano *et al.*, 1995).

## TERAPÉUTICA Y PREVENCIÓN

Por ensayos realizados en modelos animales, se ha demostrado que la administración pasiva de anticuerpos de origen humano, fue suficiente para alcanzar la protección de los monos contra el virus Machupo (Eddy, 1975). El resultado de esta investigación sugirió la posible utilización de esta terapia en pacientes humanos con fiebre hemorrágica boliviana o FHA.

La terapia de soporte es importante en el manejo de pacientes con FHA. Para el tratamiento se indica el evitar los viajes y el trauma general de los pacientes, con sedación suave y alivio del dolor con dosis conservativas de narcóticos, precauciones generales para los pacientes con diátesis hemorrágica (por ejemplo, evitando las inyecciones intramusculares o el ácido acetilsalicílico), así como el cuidadoso mantenimiento de la hidratación. Para compensar las pérdidas por el sangrado deben suministrarse transfusiones de plaquetas y factores de coagulación, como está indicado según el juicio clínico y estudios de laboratorio.

El tratamiento para el shock es dificultoso. Un aumento modesto en el hematocrito indica un problema generalizado de permeabilidad vascular pero no de la magnitud vista en enfermedades como el síndrome pulmonar por hantavirus. Sin embargo, una infusión vigorosa de cristaloides conduce a un alto riesgo de edema pulmonar.

Aunque se ha probado la eficacia de varias drogas antivirales *in vitro*, sólo la ribavirina, un análogo de la guanosina, ha mostrado una aplicación práctica. Todos los arnavirus ensayados han sido inhibidos en cultivos celulares por concentraciones similares de ribavirina y la droga fue efectiva en todos los modelos estudiados. En el caso del virus Junín, la profilaxis con ribavirina en cobayos previene la enfermedad aguda pero no impide la entrada del virus al SNC ni el desarrollo de una encefalitis letal. La ribavirina penetra pobremente en el líquido cerebroespinal en los casos agudos por lo tanto, no existe una terapia antiviral práctica para infecciones del SNC.

Por otra parte, ha sido estudiada cuidadosamente la terapia de las infecciones del virus Junín con plasma de convalecientes en humanos y en modelos animales en los que resultó bastante eficaz con reducción de la mortalidad del 15 al 30% al 1 o 2% cuando se inició dentro de los ocho primeros días de la infección. El tratamiento de elección es la administración de 2-3 unidades (dependiendo del título) de plasma de convaleciente. Cerca del 10% de los pacientes retornan 3 a 6 semanas después con signos neurológicos como fiebre, cefaleas, temblor cerebelar y parálisis de los nervios craneanos. Este síndrome neurológico tardío es a menudo autolimitado. La erradicación tardía del virus por los linfocitos T puede ser un factor en su patogénesis (Enria *et al.*, 1985).

Con respecto a la prevención de la enfermedad, se ha desarrollado una vacuna mediante un proyecto de colaboración entre el Ministerio de Salud Pública de la República Argentina y los laboratorios de USAMRIID en Maryland, Estados Unidos. Esta es una vacuna a virus vivos de virulencia atenuada (Barrera Oro y Eddy, 1982).

La cepa vacunal Junín Candid #1 (*Candidate 1*) presenta un alto grado de atenuación de la virulencia y se administra como vacuna a virus vivos, para inducir la respuesta inmune de los pacientes. La vacuna no mostró efectos adversos en primates y ha pasado exitosamente una serie de pruebas clínicas muy rigurosas en EE.UU y en Argentina.

De hecho, se han vacunado más de 230.000 personas viviendo o trabajando en zonas endémicas de FHA, produciéndose una reducción importante en el número de casos documentados durante los últimos años (Maiztegui, 1990; Maiztegui *et al.*, 1998; Feuillade *et al.*, 2004).

La vacunación consiste en la administración de una cepa de virus Junín de virulencia atenuada, llamada Candid #1, para provocar la respuesta inmune protectora en los pacientes. La cepa vacunal fue derivada de la misma cepa original de la cual, 20 años antes, se obtuvo la cepa atenuada XJ-Cl<sub>3</sub> (Weisenbacher *et al.*, 1987). La cepa atenuada vacunal demostró no poseer efectos adversos en primates, sin evidencia de persistencia viral. Esta vacuna, que ha pasado exitosamente una serie de pruebas clínicas en Estados Unidos y en Argentina, incluyendo un estudio realizado con 6000 voluntarios, es un adelanto para la protección de individuos con muy alto riesgo de contraer la enfermedad. Los estudios realizados indicaron que la vacunación confiere una protección importante tanto para los trabajadores rurales en el área endémica como para el personal del sistema de salud que trabaja en estrecho contacto con el virus.

Sin embargo, la alta frecuencia de mutación de los virus cuyo genoma está constituido por RNA (Holland *et al.*, 1982), es un argumento a ser tenido en cuenta en la evaluación del riesgo que implica el uso de una vacuna a virus vivos, toda vez que no se conocen los determinantes de la atenuación de la virulencia a nivel molecular. A ello deben sumarse, además, la alta frecuencia de recombinación y reasociación de los virus con genoma segmentado (Veza *et al.*, 1980) y la aparición de viriones con genomas poliploides (Romanowski y Bishop, 1983). En base a estas consideraciones resulta prudente mantener la vacunación reducida a la población con alto riesgo de contagio de FHA. Por otra parte, aunque los intentos de desarrollo de una vacuna con virus inactivados no tuvieron éxito, esta estrategia está siendo reevaluada por otros investigadores.

## **FORMAS CLÍNICAS DE FIEBRE HEMORRÁGICA ARGENTINA**

DIFERENTES AISLAMIENTOS: LEDESMA, ESPÍNDOLA Y ROMERO

Si bien los arenavirus se caracterizan por una notable variabilidad en sus propiedades biológicas dependiente de la historia de pasajes, existe información válida atribuible a diferencias determinadas genéticamente en distintas cepas de campo (Kenyon *et al.*, 1988).

En particular, durante las epidemias de FHA, se han descrito distintas formas clínicas de la enfermedad (Maiztegui, 1975). Estos casos son clasificados por los médicos clínicos experimentados en comunes o leves, hemorrágicos y neurológicos.

Las cepas de virus Junín usadas en estos experimentos fueron obtenidas de pacientes humanos con FHA que contrajeron la enfermedad en las provincias de Buenos Aires y de Santa Fe (Argentina) durante 1976 y 1977. La cepa Romero fue obtenida a partir de un caso no fatal de infección con características propias de la FHA "común"; la cepa Ledesma fue aislada de un paciente terminal con forma "neurológica" agresiva de la enfermedad y la cepa Espíndola fue obtenida de un paciente agonizante con características "hemorrágicas" de la enfermedad.

El conocimiento actual sobre la patogénesis de la FHA proviene principalmente de la experimentación con ratones lactantes y cobayos. Muchas de las alteraciones fisiológicas y patológicas observadas en estos animales luego de la inoculación con el virus Junín no se correlacionan con las manifestaciones de la FHA en el hombre.

Estas limitaciones fueron superadas recientemente usando *Macaca mulatta* como modelo de la infección del hombre con el virus Junín. En estos experimentos, realizados inoculando virus aislados de pacientes que presentaban las diferentes formas clínicas de FHA en *M. mulatta*, se observó un estricto paralelismo entre los cuadros clínicos que manifestaban los monos con aquellos observados en los pacientes humanos, indicando que las diferencias en el comportamiento biológico están asociadas a los virus y no a la susceptibilidad del individuo infectado (McKee *et al.*, 1985 y 1987).

En estas investigaciones, los monos inoculados con la cepa Espíndola desarrollaron una enfermedad predominantemente hemorrágica, letal en el 100% de los casos. En contraste, la cepa Ledesma produjo una disfunción neurológica y fue altamente letal. En cambio, luego de la inoculación con la cepa Romero, los monos desarrollaron una forma leve de FHA y se recuperaron completamente.

El aislamiento Espíndola estuvo asociado con hemorragia, necrosis de médula ósea y moderada necrosis hepatocelular. El aislamiento Ledesma estuvo asociado con una polioencefalomielitis pronunciada y ganglioneuritis autonómica, pero con una necrosis hepatocelular, necrosis de la médula ósea y hemorragias muy suaves o ausentes. La muerte de los macacos infectados con la cepa Espíndola fue usualmente atribuida a la hemorragia con infecciones bacterianas secundarias severas, mientras que en los macacos infectados con Ledesma la muerte fue asociada con tanto una infección bacteriana secundaria severa o por una lenta y progresiva polioencefalomielitis (Green *et al.*, 1987).

La reproducción en *M. mulatta* de los patrones de enfermedad humana junto con los descubrimientos virológicos e histopatológicos son un fuerte indicio en el sentido que las diferencias de la respuesta biológica son atribuibles a las propiedades de las distintas cepas de virus. Sin embargo, no se han encontrado diferencias en las curvas de crecimiento o en neutralización cruzada.

#### VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL VIRUS JUNÍN

Desde su identificación como agente etiológico de la fiebre hemorrágica argentina, continuamente se han realizado aislamientos a partir de pacientes y de roedores. Los ensayos iniciales en animales modelo permitieron encontrar una alta correlación entre los patrones de virulencia en humanos y en cobayos adultos y, por ello, se ha utilizado a estos últimos como herramienta principal para caracterizar la patogenia de los aislamientos (Coto *et al.*, 1993).

Acorde con su letalidad en cobayos adultos, se pueden mencionar tres grupos de cepas de diferente patogenicidad: muy patogénicas, de patogenicidad intermedia y cepas poco patogénicas (con diferentes grados de atenuación).

Al grupo de las altamente patogénicas pertenecen la cepa prototipo XJ, de origen humano (Parodi *et al.*, 1958) y la cepa AN 9446, aislada de un roedor en 1967. Al grupo de

las de patogenicidad intermedia pertenece la cepa MC2, aislada de un roedor (Berría *et al.*, 1967). Por último, al grupo de las atenuadas pertenecen la cepa XJCl<sub>3</sub>, derivada de XJ por sucesivos pasajes en laboratorio (Guerrero *et al.*, 1969), la cepa IV 4454, aislada de un caso humano leve (Contigiani y Sabattini, 1977) y la cepa Candid #1, derivada de XJ por pasajes sucesivos en laboratorio (Barrera Oro y Eddy, 1982).

En síntesis, tanto en poblaciones naturales como en cepas obtenidas en laboratorio, existe una considerable variabilidad en cuanto a sus características patogénicas. Esta variabilidad necesariamente tiene una base molecular que puede comenzar a ser dilucidada recién en el momento en que se disponga de información detallada a este nivel.

PARTE II

OBJETIVOS

## OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS

### OBJETIVOS GENERALES

Caracterización molecular de los genomas de las variantes del virus Junín asociadas a diferentes formas clínicas de la fiebre hemorrágica argentina (FHA). La atención se circunscribirá al análisis de los genes correspondientes a las proteínas estructurales más abundantes: la proteína de la nucleocápside (N) y el precursor de las glicoproteínas virales (GPC) de las cepas prototipo estudiadas por McKee *et al.* (1987).

Diseño de una metodología para detectar y caracterizar arenavirus del área endémica de la FHA. Se realizará la caracterización molecular de los arenavirus desconocidos que pudieran ser encontrados.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Se cultivarán cepas con distinto grado de virulencia y se aislarán sus RNAs para luego obtener copias de cDNA. Éstos serán amplificados por PCR y se determinará la secuencia nucleotídica de los RNAs S completos.

La caracterización de las cepas prototipo estará orientada a la búsqueda de alteraciones en el genoma de los RNAs S y al análisis de sus productos génicos (principalmente el precursor de las glicoproteínas virales, GPC), con el objeto de identificar cambios que pudieran estar asociados a los diferentes comportamientos biológicos.

De la comparación de los genomas y productos génicos de variantes del virus Junín con distintos grados y patrones de virulencia se podrán sugerir las causas moleculares de los diferentes comportamientos biológicos observados.

Además, se buscarán regiones conservadas en la secuencia nucleotídica de los RNAs S de diferentes arenavirus. Este análisis hará posible el diseño de un conjunto de *primers* generalizados que permitirían amplificar por RT-PCR regiones homólogas del genoma de los arenavirus. Los fragmentos amplificados serán caracterizados por RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) y/o por secuenciamiento nucleotídico.

Se empleará la técnica de RT-PCR-RFLP para detectar y caracterizar, en forma rápida, aislamientos de arenavirus desconocidos o emergentes en programas de *screening* en poblaciones de roedores. La obtención de fragmentos solapados permitirá realizar un clonado rápido que abarque el RNA S completo de los arenavirus encontrados.

Se realizará el análisis filogenético molecular a partir de la comparación de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas predichas de los diferentes arenavirus caracterizados. Dicho análisis permitirá relacionar los diferentes arenavirus reportados y realizar una clasificación que refleje las relaciones que surgen de la reconstrucción hipotética de la filogenia.

## PARTE III

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## CAPÍTULO 5

### CLOADO, SECUENCIACIÓN E INFORMACIÓN MOLECULAR DE LOS RNAs S DE DIFERENTES AISLAMIENTOS CLÍNICOS DEL VIRUS JUNÍN (LEDESMA, ESPÍNDOLA Y ROMERO)

*We are searching for the essence  
that lies behind the fortuitous.*

*Paul Klee (1879-1940)*

#### ORIGEN DE LAS CEPAS DEL VIRUS JUNÍN QUE PRODUCEN DIFERENTES PATRONES CLÍNICOS

Con la finalidad de iniciar el análisis de las bases moleculares de los diferentes patrones clínicos descriptos durante las epidemias de FHA, se seleccionaron cepas prototipo del virus Junín, asociadas a las diferentes formas clínicas de FHA. Estas cepas fueron aisladas de pacientes humanos que contrajeron la enfermedad en las provincias de Buenos Aires y Santa Fe, durante 1976 y 1977 (McKee *et al.*, 1985).

La cepa Romero se obtuvo de un caso de infección no terminal, con las características comunes de FHA. La cepa Ledesma fue aislada de un paciente terminal con una forma de enfermedad preponderantemente neurológica. La cepa Espíndola se obtuvo de un paciente con una enfermedad caracterizada como hemorrágica, que resultó letal (ver Capítulo 4).

Todos los aislamientos virales fueron obtenidos a partir de muestras tomadas de pacientes dentro de los dos días de su admisión al hospital. Un aislamiento primario fue realizado inoculando sangre entera en ratones lactantes. Los aislamientos de Romero, Ledesma y Espíndola usados en los experimentos representan aislamientos a partir de sangre (diluciones 1:30) inoculadas directamente en monocapas de células MRC-5 (células humanas diploides de pulmón). Los virus fueron sometidos a dos pasajes más por la misma línea celular y posteriormente fueron diluidos a  $7,5 \times 10^3$  pfu/ml,  $3,2 \times 10^1$  pfu/ml, y  $4,5 \times 10^1$  pfu/ml, respectivamente.

#### DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

En base a la secuencia nucleotídica de la cadena S de la cepa de virus Junín MC2 (Ghiringhelli *et al.*, 1991) se diseñaron oligonucleótidos para usar como *primers* en la síntesis de cDNA como también en las amplificaciones enzimáticas por PCR. Para el diseño de los oligonucleótidos, se alinearon las secuencias disponibles de las cepas XJ-Parodi, XJ-44, Candid #1 y MC2 del virus Junín y se seleccionaron regiones conservadas de entre 15 a 25 nucleótidos. Además, a algunos de ellos se les agregó en el extremo 5', a continuación de la región homóloga con Junín, una zona complementaria a la secuencia nucleotídica de los *primers* universales de M13, así como uno o dos sitios de corte de enzimas de restricción. Estos *primers* recibieron los nombres de JDG1 al JDG18. Este diseño permitiría realizar las reacciones de secuenciación utilizando *primers* universales como cebadores directamente sobre los fragmentos de amplificación por PCR, evitándose el clonado de dichos fragmentos.

## PURIFICACIÓN DE RNA VIRAL

Debido a los distintos grados de virulencia de las cepas, su manipulación debe realizarse en laboratorios de bioseguridad de nivel *BSL4*. Por tal motivo se estableció un acuerdo de colaboración con uno de los Centros de Control de Enfermedades de Estados Unidos (Centers for Disease Control -CDC-, Atlanta, EEUU) para el cultivo de dichas cepas.

A partir de células MRC-5 infectadas con cada una de las cepas, se obtuvo el RNA total mediante una modificación del método de Chomczynski y Sacchi (1987), basado en el uso del tiocianato de guanidinio (TCG), un poderoso agente caotrópico, que produce una inactivación inmediata de los virus. De esta manera, se preserva la integridad de las moléculas de RNA, permitiendo el transporte y mantenimiento de las muestras a temperatura ambiente y eliminando el riesgo de la infectividad (Lozano *et al.*, 1993a).

El *pellet* de viriones de cada cepa, obtenido a partir de a 25 ml del sobrenadante de un cultivo de células infectadas, se resuspendió en 250  $\mu$ l de 1X TCG (4M isotiocianato de guanidinio, 25mM citrato de sodio pH 7.0, 0,5% sarkosyl y 90mM  $\beta$ -mercaptoetanol).

Por otra parte, las células infectadas fueron cosechadas al 5° día postinfección (dpi), para obtener RNA total a partir de las mismas. Las monocapas fueron lavadas con PBS 1X (buffer fosfato salino, 0.13 M NaCl, 20 mM fosfato de potasio pH 7,4) y las células se lisaron por el agregado de 1 volumen de una solución de 1X TCG (Lozano *et al.*, 1993a, 1993b). Preservadas de esta forma, las muestras fueron remitidas a nuestro laboratorio.

Posteriormente, con la finalidad de purificar el RNA, se realizó sobre cada muestra una extracción con fenol ácido (pH 4) seguida de una extracción con cloroformo:isoamilico (24:1). El RNA viral se obtuvo de la fase acuosa por precipitación en presencia de 0,3 M NaAc y 2,5 volúmenes de etanol. El *pellet* de RNA se resuspendió en agua y se guardó a -70°C.

## SÍNTESIS DE cDNA Y AMPLIFICACIÓN POR PCR

A partir del RNA obtenido se sintetizó la primera cadena del cDNA, utilizando la transcriptasa reversa de AMV. Posteriormente, se utilizó esta cadena como molde para amplificar por PCR regiones específicas de la misma. Este método es denominado RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, Doherty *et al.*, 1989).

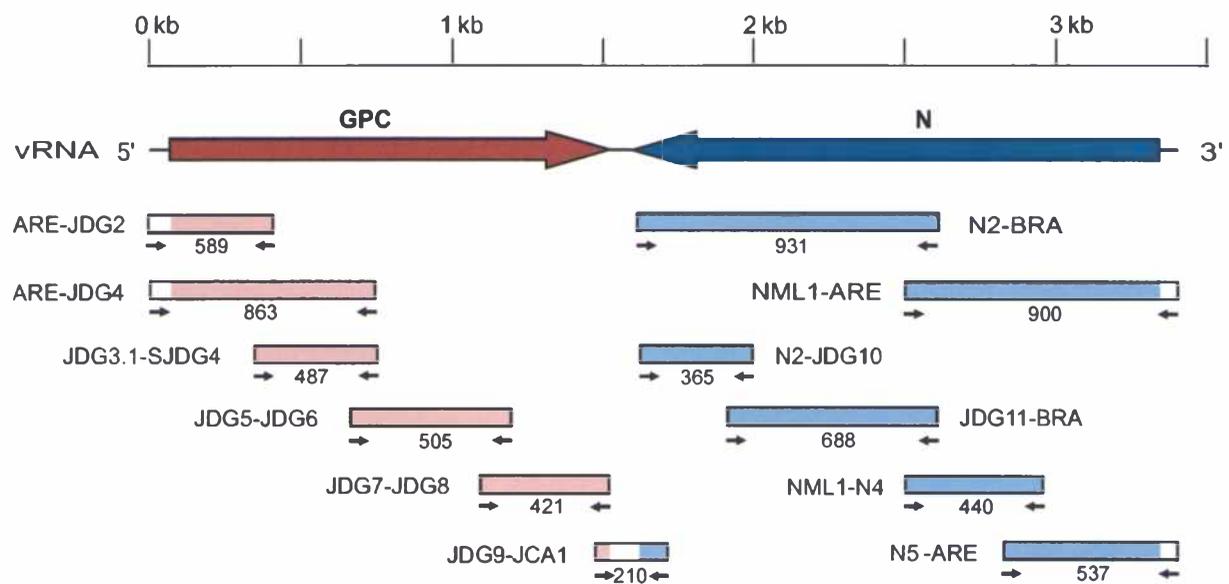
Para la síntesis de cDNA de las cepas Espíndola, Ledesma y Romero, se realizaron al menos dos reacciones, que diferían solamente en los oligonucleótidos utilizados como *primers*. En una de las reacciones se utilizó el *primer* "Arena" (ARE, que hibrida en las regiones conservadas de los extremos 3' de las cadenas viral o genómica y viral complementaria o antígenómica) y en las otras, diferentes *primers* que hibridaban en la región intergénica, de modo de asegurar la síntesis de diferentes moléculas de cDNA que abarcaran la totalidad del RNA S de estas cepas.

Una vez sintetizada la primera cadena del cDNA, la misma se utilizó como molde para las reacciones de amplificación enzimática por ciclismo térmico (PCR), que se llevaron a cabo utilizando la DNA polimerasa termoestable de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu* DNA pol,

Stratagene, La Jolla, USA) la que posee una frecuencia de error considerablemente menor que la *Taq* polimerasa gracias su actividad de lectura de prueba.

Debido a que la cantidad de RNA disponible como material de partida era limitada, las reacciones de síntesis de cDNA y las posteriores amplificaciones por PCR tuvieron un rendimiento por debajo del esperado. Esto determinó la necesidad de reamplificar un gran número de los fragmentos obtenidos por PCR para asegurar el éxito en las tareas de clonado.

Los *primers* diseñados permitieron amplificar varios fragmentos que, solapados, abarcaban la totalidad del RNA S (Figura 5.1). Por otra parte, también se utilizaron otros *primers* de utilidad comprobada en amplificaciones por PCR sobre diferentes cepas del virus Junín y sobre distintos arenavirus.



**Figura 5.1**

**Estrategia de amplificación por RT-PCR del RNA S de las cepas prototipo del virus Junín.**

En la figura se representa el RNA S viral en orientación 5'→3'. La flecha roja representa el marco de lectura abierto del gen GPC (polaridad viral). La flecha azul representa el marco de lectura abierto del gen N (polaridad viral complementaria). Las líneas por fuera de las flechas corresponden a las regiones no codificantes. La escala por encima del RNA S está expresada en kilobases (kb). Los rectángulos de color corresponden a los fragmentos amplificados por PCR y usados para el clonado y la determinación de las secuencias nucleotídicas del RNA S de las cepas analizadas del virus Junín. En blanco aparecen las secuencias no codificantes. Los *primers* empleados en la amplificación de los fragmentos se indican con flechas de color negro. Cada fragmento generado fue denominado con el nombre de los *primers* utilizados en las reacciones de amplificación. Los números debajo de los fragmentos indican sus tamaños en pares de bases.

**CLONADO Y SECUENCIACIÓN DEL CDNA**

Los fragmentos de amplificación por PCR de doble cadena fueron clonados alternativamente en el plásmido pGem-T, en el plásmido pUC19 digerido con *Sma* I o en los plásmidos pBR322, pBluescript o pZErO-2 digeridos con *EcoR* V.

La secuencia nucleotídica de los subclones se determinó según el método enzimático de terminación de cadenas utilizando dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977; ver Capítulo 9 Materiales y Métodos). Se secuenciaron ambas cadenas de al menos tres clones de cada uno de los fragmentos clonados. A partir de esta información se obtuvieron las secuencias consenso y se realizó la reconstrucción del RNA S completo. No se hallaron diferencias de secuencia en las regiones de solapamiento entre los distintos fragmentos.

### SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL RNA S DE LAS CEPAS ESPÍNDOLA, ROMERO Y LEDESMA

A partir de la información de la secuencia nucleotídica obtenida y del análisis comparativo con secuencias de los RNAs S de otros arenavirus, se reconstruyó la secuencia completa del RNA S de las cepas Espíndola, Ledesma y Romero del virus Junín. La longitud de las secuencias es coincidente con el tamaño del resto de las cepas del virus Junín y se ajusta al rango de tamaños de los diferentes RNAs S de los Arenavirus. Las longitudes de los RNAs S de las cepas prototipo y de las composiciones nucleotídicas están detallados en la tabla 5.1.

| Cepa      | Longitud | A   |       | C   |       | G   |       | U    |       |
|-----------|----------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|------|-------|
|           |          | N°  | Mol%  | N°  | Mol%  | N°  | Mol%  | N°   | Mol%  |
| Espíndola | 3411     | 908 | 26.62 | 778 | 22.81 | 713 | 20.90 | 1012 | 29.67 |
| Ledesma   | 3411     | 896 | 26.27 | 790 | 23.16 | 722 | 21.17 | 1003 | 29.40 |
| Romero    | 3411     | 902 | 26.44 | 782 | 22.93 | 717 | 21.02 | 1010 | 29.61 |

**Tabla 5.1**  
**Longitud y composición nucleotídica de los RNAs S de las cepas prototipo del virus Junín.** Además de la longitud, para cada cepa se indica el número bases nucleotídicas y la composición molar %.

Como se describió previamente en este capítulo, las secuencias nucleotídicas se obtuvieron a partir del RNA por RT-PCR, clonado y secuenciación. Para generar los productos de amplificación por PCR de los extremos del RNA S, se utilizó el *primer* ARE que hibrida con una corta secuencia muy conservada de los extremos de los RNAs de los arenavirus. Por lo tanto, los primeros 19 nucleótidos de la secuencia del extremo 5' corresponden al *primer*, mientras que partir del nucleótido 20 la secuencia pertenece a cada cepa en particular. Lo mismo ocurre en el extremo 3', donde los últimos 19 nucleótidos corresponden a la secuencia complementaria al *primer* ARE.

La homología global entre los RNAs S completos de los diferentes arenavirus oscila entre 46,3% entre Pichindé/LCM (Armstrong) y 68,5% entre Junín (Candid #1)/Tacaribe (Ghiringhelli, 2002). Como es lógico esperar, estos valores se incrementan al comparar las diferentes cepas del virus Junín con valores que oscilan entre 0,944% para Romero/XJ44 y Romero/Candid #1 y 0,987% entre XJ44/ Candid #1 (Tabla 5.2).

Cuando se analiza la distribución de homología en función de un alineamiento múltiple se observa que las regiones de mayor conservación corresponden en gran medida a las regiones codificantes para la proteína de la nucleocápside, la glicoproteína G2 y el péptido señal del precursor de las glicoproteínas. Mientras que las regiones de mayor variabilidad

corresponden a la región codificante para la glicoproteína G1 y las regiones no codificantes de los extremos. La presencia de nucleótidos conservados en las regiones intergénicas se correlacionan, como se describe más adelante, con la formación de estructuras del tipo horquillas (*hairpin-loop*).

|        | Esp   | Led   | Rom   | XJ-Par | XJ44  | Cd1   |
|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
| Esp    | 1,000 | —     | —     | —      | —     | —     |
| Led    | 0,967 | 1,000 | —     | —      | —     | —     |
| Rom    | 0,970 | 0,965 | 1,000 | —      | —     | —     |
| XJ-Par | 0,956 | 0,957 | 0,952 | 1,000  | —     | —     |
| XJ44   | 0,946 | 0,947 | 0,944 | 0,986  | 1,000 | —     |
| Cd1    | 0,946 | 0,947 | 0,944 | 0,984  | 0,987 | 1,000 |

**Tabla 5.2**  
**Identidad de nucleótidos.**

Identidad entre las cepas en estudio Espíndola (Esp), Ledesma (Led), Romero (Rom) y las cepas XJ-Parodi (Par), XJ44 y Candid #1 (Cd1) del virus Junín. Los valores están expresados en porcentajes. En gris oscuro se destacan los límites superior e inferior de homología entre las diferentes cepas.

La búsqueda de marcos de lectura abiertos en las seis fases posibles (tres en sentido viral y tres en sentido viral complementario) dio como resultado varios potenciales marcos en ambas orientaciones, entre los cuales fue seleccionado el más largo en cada orientación, en correlación con la información experimental disponible.

En las tres cepas, un marco de lectura comienza en el nucleótido 90 y termina en el 1544, posee una longitud 1458 nt (485 aminoácidos) y corresponde al precursor de las glicoproteínas virales (GPC). El otro codifica para la proteína mayoritaria de la nucleocápside (N), comienza en el nucleótido complementario al 3330, termina en el complementario al 1642 y posee una longitud de 1695 nt (564 aminoácidos). Los codones de iniciación y terminación indicados en el Apéndice 1 corresponden a estos marcos seleccionados.

## REGIONES CODIFICANTES

### GEN DEL PRECURSOR DE LAS GLICOPROTEÍNAS (GPC)

Las comparaciones de la secuencia nucleotídica de las cepas Espíndola, Romero y Ledesma con secuencias de diferentes cepas de virus Junín mostraron que el gen GPC comienza en un marco de abierto de lectura en un codón AUG (posiciones 90 a 92, tercer marco en polaridad viral) y termina en un codón UAA (posiciones 1545 a 1547), siendo su longitud de 1458 nucleótidos. Los nucleótidos que flanquean a este primer codón AUG (GCACAAUGG) coinciden con la secuencia consenso observada en todos los genes de arenavirus. Dicha secuencia corresponde a un residuo de purina en la posición -3, a una G en +4 y una de las C previas identificadas por Kozak (1978, 1983, 1984). Dentro del mismo marco de lectura, el octavo codón es un AUG (posiciones 111 a 113), pero no posee la A o la G en la posición -3 ni las C previas. Por lo tanto, se deduce que el primer triplete AUG debe ser el codón de iniciación funcional (Apéndice 1).

El tamaño del polipéptido resultante es de 485 aminoácidos y posee un peso molecular estimado, sin contar las glicosilaciones, de 55619 Da, 55560 Da y 55584 Da para la cepas Espíndola, Ledesma y Romero, respectivamente.

Las comparaciones de las regiones secuenciadas de las cepas Espíndola, Romero y Ledesma con aquéllas correspondientes a las cepas XJ-Parodi, XJ44 y la cepa vacunal Candid #1, muestran un alto grado de homología. Sin embargo, se han encontrado cambios característicos de cada una de las cepas, así como cambios que son comunes a estas tres cepas que los diferencian de las otras cepas del virus (Apéndice 2).

Algunos de los cambios en las secuencias nucleotídicas resultan en cambios en la secuencia de los aminoácidos para los que codifican, mientras que otras modificaciones son silenciosas (Capítulo 6).

#### GEN DE LA PROTEÍNA DE LA NUCLEOCÁPSIDE (N)

El gen de la proteína de la nucleocápside, de polaridad viral complementaria comienza en un AUG<sub>82-84</sub>, termina en un UAA<sub>1774-1776</sub> y posee una longitud de 1695 nt (564 aminoácidos). Aunque más adelante se encuentra otro AUG en la misma fase, el primero es considerado el verdadero codón de iniciación de la proteína N, basado en la conservación de algunos de los nucleótidos del entorno (Kozak, 1978, 1983, 1984; Apéndice 1).

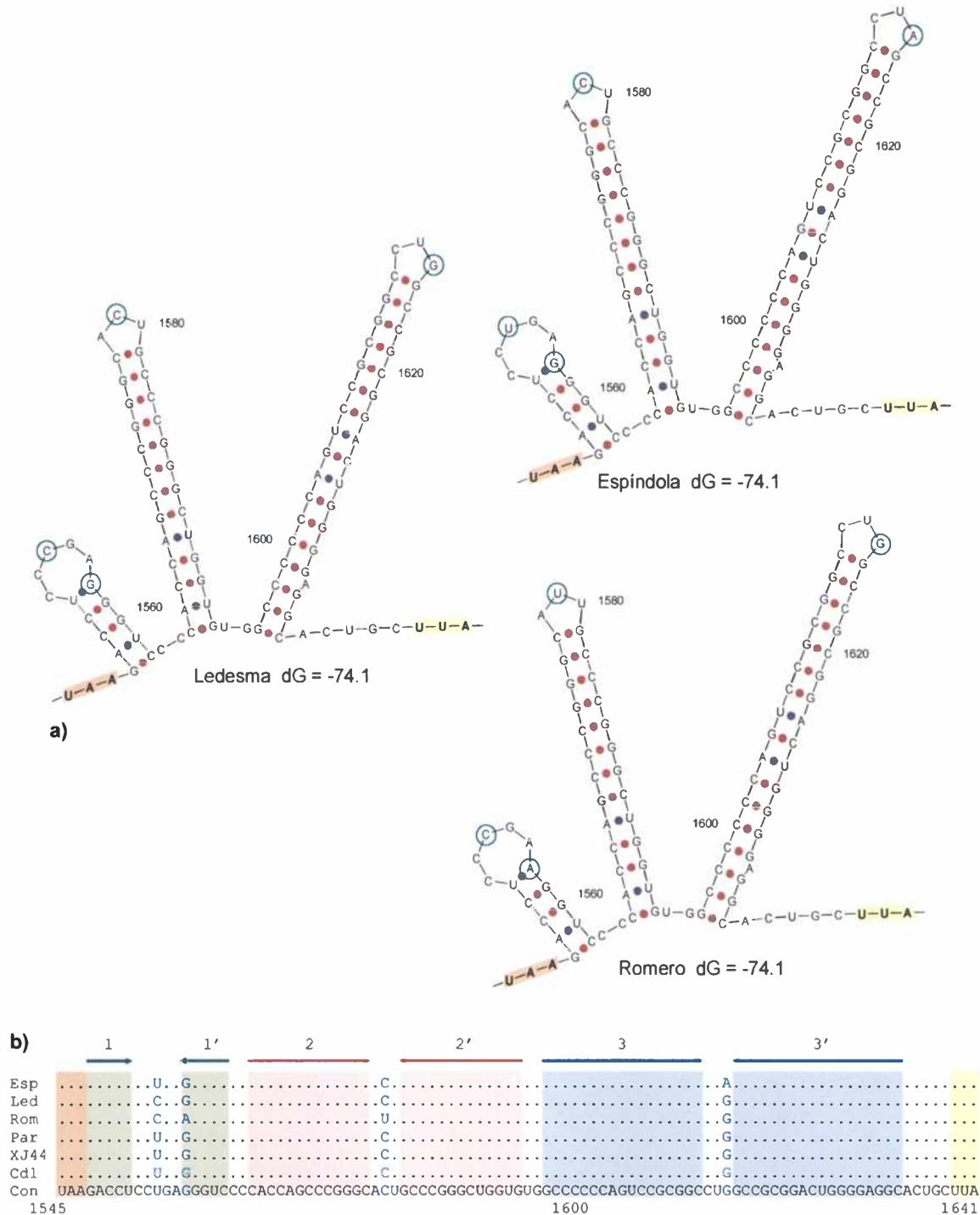
#### REGIONES NO CODIFICANTES

##### REGIÓN INTERGÉNICA

Entre los genes GPC y N (nucleótidos 1548 al 1638 en polaridad viral) se encuentra la región intergénica. Ésta posee regiones autocomplementarias que permiten constituir tres estructuras tipo *hairpin-loop* muy estables ( $\Delta G^\circ$  -74,1 kcal/mol, Figura 5.2a).

El análisis de la secuencia nucleotídica de la región intergénica del RNA S reveló que las cepas Espíndola y Ledesma presentan un solo cambio con respecto a la secuencia consenso, la cepa Romero presenta tres sustituciones, mientras que las cepas XJ-Parodi, XJ44 y Candid #1 poseen un 100% de homología con respecto al consenso (Figura 5.2b).

El hairpin cercano al gen GPC (nucleótidos 1548-1560) está formado por 3 pares GC, un par AU y uno UG en Espíndola y Ledesma, cambiando éste último por un par AU en Romero ( $\Delta G^\circ$  -4,6 kcal/mol; Tinoco *et al.*, 1973). El hairpin del medio (nucleótidos 1563-1593) está formado por 11 pares GC y 2 pares AU ( $\Delta G^\circ$  -28,5 kcal/mol) mientras que el cercano al gen N (nt. 1596-1633) está formado por 15 pares GC y 2 pares AU ( $\Delta G^\circ$  -37,4 kcal/mol; Figura 5.2a). Estas estructuras fueron calculadas mediante análisis computacional con el algoritmo de Zuker (Zuker *et al.*, 1999; Mathews *et al.*, 1999).

**Figura 5.2****Comparación de la región intergénica de diferentes cepas del virus Junín.**

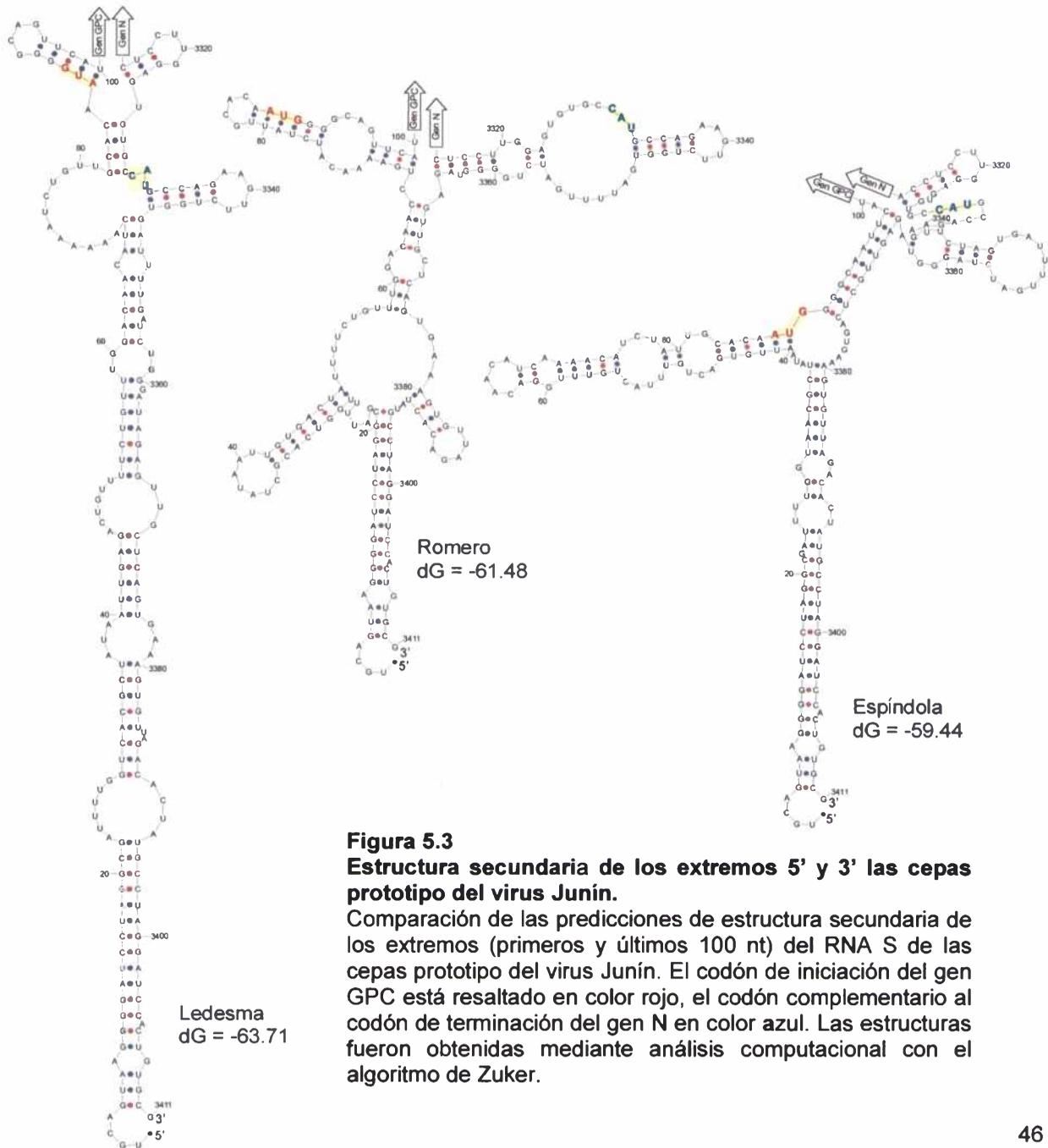
**a)** Predicción de la estructura secundaria de la porción del RNA S que abarca la región intergénica (nt. 1548-1638) de las cepas prototipo del virus Junín. El codón de terminación del gen GPC está sombreado en color anaranjado pálido, el codón complementario al codón de terminación del gen N en color amarillo. Las posiciones variables entre las cepas se indican con un círculo verde. Las potenciales estructuras tipo *hairpin-loop* están estabilizadas por el apareamiento entre 5, 13 y 17 pares de bases ( $\Delta G^\circ -4,6$  kcal/mol;  $\Delta G^\circ -28,5$  kcal/mol y  $\Delta G^\circ -37,4$  kcal/mol respectivamente). Las estructuras fueron obtenidas mediante análisis computacional con el algoritmo de Zuker.

**b)** Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de la región intergénica de las cepas del virus Junín. Las posiciones variables entre las cepas se indican con los nucleótidos resaltados en azul. Las regiones autocomplementarias correspondientes a los *hairpins* están sombreadas e indicadas con flechas: en verde claro (1-1') el primero;

en rosado el segundo (2-2') y en celeste el tercero (3-3'). Los puntos representan identidad con respecto a la secuencia consenso. Esp, cepa Espíndola; Led cepa Ledesma; Rom, cepa Romero; Par, cepa XJ-Parodi; XJ44, cepa XJ44; Cd1, cepa Candid #1; Con, consenso.

#### EXTREMOS 5' Y 3' DEL GENOMA VIRAL

La determinación de los motivos de estructura secundaria de los extremos de los RNAs S se realizó mediante el análisis comparativo de las estructuras 5-óptimas (5-optimal, Zuker, 1989; Jaeger *et al.*, 1990; Zuker *et al.*, 1991) para cada RNA particular, en base al cálculo de plegamiento de los RNAs completos y de moléculas quiméricas. Éstas se construyeron con 100 nucleótidos de cada extremo viral separados por una secuencia nucleotídica homopolimérica de 200 nt (Figura 5.3).



**Figura 5.3**  
**Estructura secundaria de los extremos 5' y 3' las cepas prototipo del virus Junín.**

Comparación de las predicciones de estructura secundaria de los extremos (primeros y últimos 100 nt) del RNA S de las cepas prototipo del virus Junín. El codón de iniciación del gen GPC está resaltado en color rojo, el codón complementario al codón de terminación del gen N en color azul. Las estructuras fueron obtenidas mediante análisis computacional con el algoritmo de Zuker.

En ambos extremos existen variaciones entre las cepas. El extremo 5' es el que presenta el mayor número de cambios, además de dos deleciones (posiciones 42 y 72) en Espíndola, Ledesma, Romero con respecto a las otras cepas. La deleción de la posición 42 es compartida por XJ-Parodi y la de la posición 72 por Candid #1 (Alineamientos 5.1 y 5.2)

|        |            |            |            |              |              |            |             |
|--------|------------|------------|------------|--------------|--------------|------------|-------------|
|        | 10         | 20         | 30         | 40           | 50           | 60         | 70          |
| Esp    | -UGCAGUAAG | GGGAUCCUAG | GCGAUUUUGG | UAACGCUAUA   | A-UUGUGACU   | GUUUACUGUU | UGGACAACAU  |
| Led    | -.....     | .....      | .....      | C.....       | -...A.....   | U.....     | .....       |
| Rom    | -.....     | .....      | .....      | C.....       | -...A.....   | A...U..... | .....C..... |
| XJ-Par | -.....     | .....      | .....      | U.....       | -...A.....   | U.....     | .....       |
| XJ44   | -.....     | .....      | .....      | U.....       | U GUAA.....  | U.....     | .....       |
| Cd1    | C.....     | .....      | .....      | G...G...U... | C...U...A... | .....      | .....       |

|        |            |            |       |
|--------|------------|------------|-------|
|        | 80         | 90         |       |
| Esp    | C-AAAACAUC | UAUUGCACAA | UG    |
| Led    | -...A..... | G.....     | ..... |
| Rom    | G.....     | .....      | ..... |
| XJ-Par | A.....     | C.....     | ..... |
| XJ44   | A.....     | C.....     | ..... |
| Cd1    | -...C..... | U.....     | ..... |

### Alineamiento 5.1

#### Comparación de la secuencia nucleotídica del extremo 5' no codificante del RNA S de las diferentes cepas del virus Junín.

El codón de iniciación del gen GPC está resaltado en amarillo. Los primeros 19 nucleótidos de las cepas Espíndola, Ledesma y Romero (resaltados en color celeste) no fueron determinados por secuenciación, sino que corresponden a la secuencia de los *primers* específicos con los que se generaron los productos de amplificación por PCR. Esp, cepa Espíndola; Led cepa Ledesma; Rom, cepa Romero; XJ-Par, cepa XJ-Parodi; XJ44, cepa XJ44; Cd1, cepa Candid #1 del virus Junín.

|        |            |              |                       |            |            |            |            |
|--------|------------|--------------|-----------------------|------------|------------|------------|------------|
|        | 3340       | 3350         | 3360                  | 3370       | 3380       | 3390       | 3400       |
| Esp    | CAUGCCAGAA | GUUCUAGUGA   | UUUUGAUCUA            | GGGUAGAGUU | GCUCAGUGAA | AGUGUUAGAC | ACUAUGCCUA |
| Led    | .....      | G.....       | G.....                | A.....     | .....      | .....      | .....      |
| Rom    | .....      | G.....       | G.....                | .....      | .....      | .....      | .....      |
| XJ-Par | .....      | G.....       | AA.....               | .....      | .....      | .....      | .....      |
| XJ44   | .....      | G.....       | AA.....               | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Cd1    | .....      | A...G...G... | G...A...AA...A...A... | .....      | .....      | .....      | .....      |

|        |            |       |
|--------|------------|-------|
|        | 3410       | 3414  |
| Esp    | GGAUCCACUG | UGCG  |
| Led    | .....      | ..... |
| Rom    | .....      | ..... |
| XJ-Par | .....      | ..... |
| XJ44   | .....      | ..... |
| Cd1    | .....      | ..... |

### Alineamiento 5.2

#### Comparación de la secuencia nucleotídica del extremo 3' no codificante del RNA S de las diferentes cepas del virus Junín.

La secuencia está en sentido viral. En amarillo se indica la secuencia complementaria del codón de iniciación del gen N. Los últimos 19 nucleótidos de las cepas Espíndola, Ledesma y Romero (resaltados en color celeste) no fueron determinados por secuenciación, sino que corresponden a la secuencia de los *primers* específicos con los que se generaron los productos de amplificación por PCR. En esta región existe identidad completa en las secuencias de las cepas XJ-Parodi y XJ44. Esp, cepa Espíndola; Led cepa Ledesma; Rom, cepa Romero; XJ-Par, cepa XJ-Parodi; XJ44, cepa XJ44; Cd1, cepa Candid #1 del virus Junín.

## ABUNDANCIA RELATIVA DE OLIGONUCLEÓTIDOS

En distintos organismos, con genomas basados en DNA o RNA, la organización de la información nucleotídica es sumamente variada. En una secuencia particular, esta heterogeneidad puede verse reflejada en la existencia de diferentes peculiaridades, tales como:

- a) Una excesiva dispersión en la abundancia relativa de di-, tri- y tetranucleótidos, globalmente o con distribución diferencial en regiones codificantes y no codificantes.
- b) La distribución de marcadores definidos: conjuntos de nucleótidos, motivos regulatorios, sitios de restricción, etc.
- c) La presencia de oligonucleótidos o péptidos en cantidades excepcionales, muy raros o muy frecuentes.

En 1994, Karlin and Cardon describieron un conjunto de métodos, basados en los conceptos anteriores, que permiten determinar heterogeneidades de organización, nucleotídica o peptídica. En esencia, estos métodos se basan en el análisis de las frecuencias propias de los di-, tri- y tetranucleótidos y la relación existente entre ellas y las frecuencias de sus componentes mono-, di- y trinucleotídicos (abundancia relativa). Para ello, se pueden utilizar, alternativamente, dos tipos de análisis, de acuerdo al ácido nucleico en estudio (simple o doble cadena). En el caso de ácidos nucleicos de simple cadena se puede realizar un análisis de tipo no simétrico y en el caso de ácidos nucleicos de doble cadena se puede realizar un análisis de tipo simétrico.

Por otra parte, basándose en datos experimentales y en análisis estadísticos estrictos, los mismos autores destacan que la existencia de valores de abundancia relativa  $\leq 0,78$  o  $\geq 1,23$  tienen una probabilidad  $\leq 0,001$ , independientemente de la composición de bases del genoma. Por lo tanto, cualquier valor inferior a 0,78 se considera sub-representado y cualquier valor mayor a 1,23 se lo considera sobre-representado.

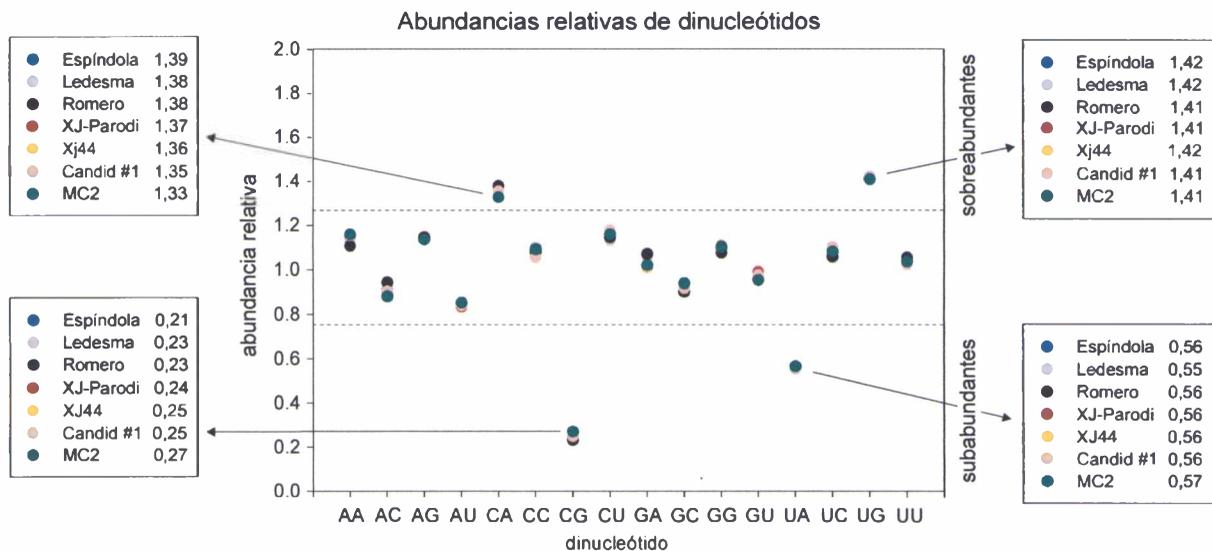
Si se extiende el estudio a un conjunto de secuencias relacionadas, el hallazgo de sub-representaciones y/o sobre-representaciones de oligonucleótidos cortos podría conducir a la búsqueda de su significado evolutivo (funcional o estructural).

## ANÁLISIS GLOBAL

El análisis de la abundancia relativa (AR) de oligonucleótidos cortos (di, tri y tetranucleótidos) en los RNAs S de los distintos aislamientos del virus Junín muestra que la mayor parte los mismos se encuentran dentro del rango estadísticamente esperable (Karlin y Cardon, 1994).

Cuatro de los 16 dinucleótidos posibles, 6 de los 64 trinucleótidos posibles y muchos de los 256 tetranucleótidos posibles presentan algún valor diferencial (sobre o sub-abundancia) en cualquiera de las polaridades (V o VC). En el caso de los dinucleótidos, las sobre-abundancias (CA y UG) o las sub-abundancias (CG y UA) son consistentes para todos los aislamientos analizados (Figura 5.4). Vale destacar que el dinucleótido CG es extremadamente sub-abundante, lo cual puede estar asociado, tanto con aspectos

estructurales (formación de estructuras tipo *hairpin loop*), como con aspectos regulatorios (Karlin y Cardon, 1994).



**Figura 5.4**

**Abundancias relativas de dinucleótidos.**

Patrón de abundancias relativas de dinucleótidos. El análisis se realizó con las rutinas diseñadas por Ghiringhelli (2002). Para facilitar la discriminación rápida entre sub- y sobre-representaciones y la visualización gráfica, las líneas de guiones marcan los límites entre lo esperable por azar (0,78 y 1,23) de los valores representativos. En los recuadros se indican los valores específicos para cada aislamiento.

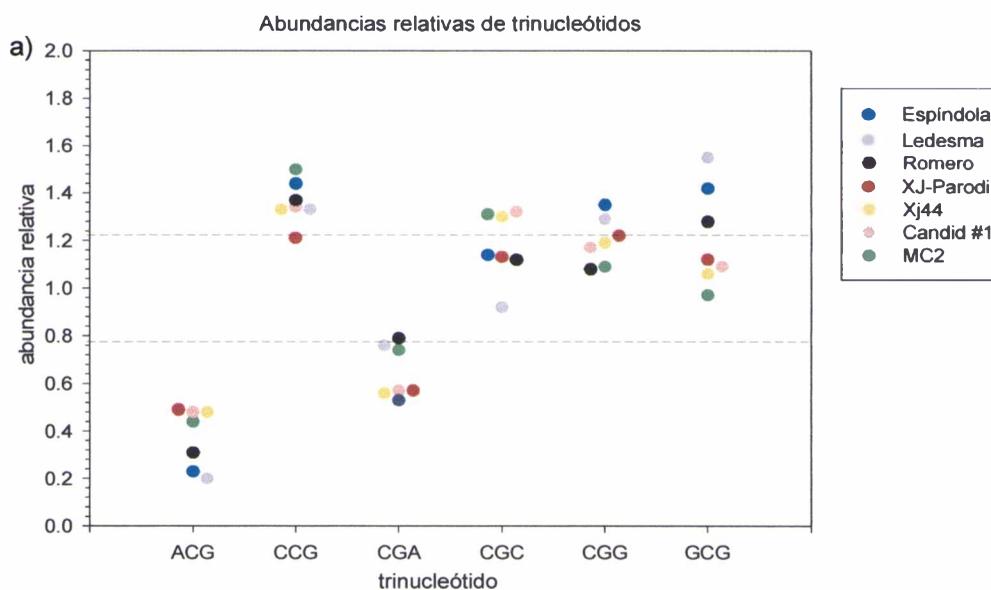
Respecto de los tri y tetranucleótidos, el patrón de sobre y sub-abundancias es variable entre los diferentes aislamientos. Algunos tri o tetranucleótidos son sub-abundantes (o sobre-abundantes) para ciertos aislamientos, mientras que son normales para otros. En particular, en el caso de los trinucleótidos, todas las sobre- y sub-abundancias detectadas están directamente relacionadas con la subabundancia del dinucleótido CG; si bien existe una sub-abundancia del dinucleótido CG, algunos trinucleótidos que contienen a este dinucleótido son sobreabundantes con respecto a lo estadísticamente esperable (Figura 5.5).

**ANÁLISIS DIFERENCIAL POR REGIONES**

El análisis diferencial por regiones (no codificantes y las posiciones I+II, II+III y III+I en la sucesión de codones), permite detectar sobre- o sub-abundancias locales que pueden asociarse con una estructura sintáctica de la información nucleotídica (Figuras 5.4 y 5.6). Las posiciones I+II indican el primero y el segundo nucleótido de un codón en un determinado marco de lectura, II+III indican el segundo y el tercer nucleótido del codón y III+I corresponden al último nucleótido de un codón y al primero del codón siguiente en ese marco de lectura.

Es interesante destacar que las sobre- o sub-abundancias relativas de dinucleótidos detectadas a nivel global en los RNAs S de los distintos aislamientos presentan una predominancia diferencial en distintas regiones. El dinucleótido CA es especialmente sobre-

abundante en las posiciones III+I de los marcos de lectura, el dinucleótido CG es especialmente sub-abundante en las regiones codificantes en las tres posiciones de los marcos de lectura (I+II, II+III y III+I), el dinucleótido UA es especialmente sub-abundante en las regiones codificantes, especialmente en las posiciones I+II y II+III de los marcos de lectura y el dinucleótido UG es especialmente sobre-abundante en las posiciones II+III y III+I de los marcos de lectura. Esta homogeneidad en la distribución de sobre- y sub-abundancias refleja, probablemente, una similitud sintáctica en los RNAs S de los distintos aislamientos. El resto de los 16 dinucleótidos posibles, presentan patrones de sobre-abundancia, sub-abundancia o abundancia normal que se desvían menos de los valores estadísticos promedio esperables por azar, probablemente asociados con la información particular de cada genoma (Figura 5.6).



b)

|     | Esp    | Led    | Rom    | XJ-Par | XJ-44  | Cd1    | MC2    |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| ACG | 0.2320 | 0.2040 | 0.3126 | 0.4858 | 0.483  | 0.4792 | 0.4446 |
| CCG | 1.4360 | 1.3334 | 1.3714 | 1.2084 | 1.3260 | 1.3366 | 1.5019 |
| CGA | 0.5322 | 0.7565 | 0.7885 | 0.5717 | 0.5569 | 0.5664 | 0.7388 |
| CGC | 1.1377 | 0.9181 | 1.1218 | 1.1274 | 1.2970 | 1.3220 | 1.3065 |
| CGG | 1.3542 | 1.2861 | 1.0756 | 1.2226 | 1.1934 | 1.1654 | 1.0930 |
| GCG | 1.4210 | 1.5452 | 1.2830 | 1.1180 | 1.0616 | 1.0876 | 0.9678 |

**Figura 5.5**

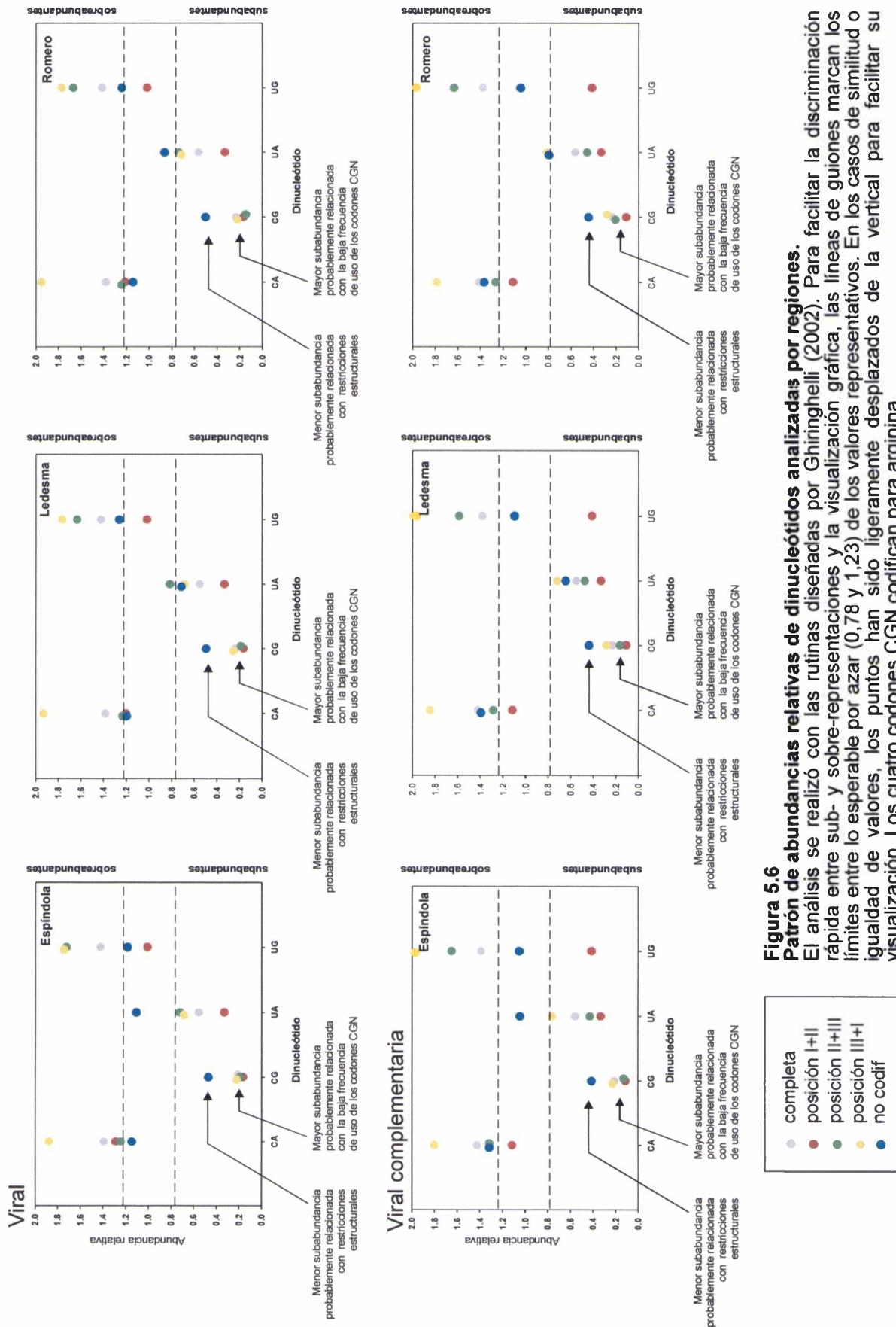
**Abundancia relativa de trinucleótidos.**

a) Patrón de abundancias relativas de trinucleótidos en los RNAs S de arenavirus.

El análisis se realizó con las rutinas diseñadas por Ghiringhelli (2002). Para facilitar la discriminación rápida entre sub- y sobre-representaciones y la visualización gráfica, las líneas de guiones marcan los límites entre lo esperable por azar (1,23 y 0,78) de los valores representativos. En los casos de similitud o igualdad de valores, los puntos han sido ligeramente desplazados de la vertical para facilitar su visualización.

b) Abundancias relativas de dinucleótidos. Los valores por encima y por debajo de los límites esperados por azar (1.23 y 0.78) se encuentran sombreados en color gris.

Esp: cepa Espíndola; Led: cepa Ledesma; Rom: cepa Romero; XJ-Par: cepa XJ-Parodi; XJ-44: cepa XJ-44; Cd1: cepa Candid #1; MC2: cepa MC2.



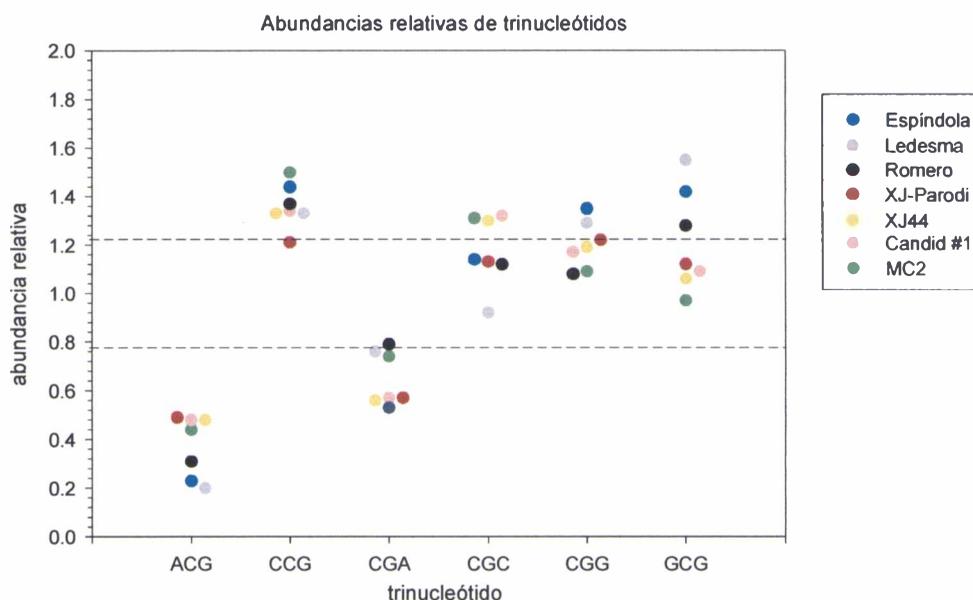
**Figura 5.6**

**Patrón de abundancias relativas de dinucleótidos analizadas por regiones.**  
 El análisis se realizó con las rutinas diseñadas por Ghiringhelli (2002). Para facilitar la discriminación rápida entre sub- y sobre-representaciones y la visualización gráfica, las líneas de guiones marcan los límites entre lo esperable por azar (0,78 y 1,23) de los valores representativos. En los casos de similitud o igualdad de valores, los puntos han sido ligeramente desplazados de la vertical para facilitar su visualización. Los cuatro codones CGN codifican para arginina.

## ANÁLISIS DIFERENCIAL DE TRINUCLEÓTIDOS

Como se puede observar en la figura 5.7, el patrón de abundancias relativas (sub- o sobre-abundancias) de los seis trinucleótidos diferenciales presentan homogeneidad en algunos de ellos y heterogeneidad en otros.

Un análisis combinado del patrón de sub- o sobre-abundancias de los trinucleótidos diferenciales muestra que existe una cierta correlación entre el producto de las abundancias relativas de los trinucleótidos diferenciales y la mayor o menor letalidad para humanos de las distintas cepas (ver más adelante, Figura 5.8).



**Figura 5.7**

**Patrón de abundancias relativas de trinucleótidos diferenciales en las distintas cepas del virus Junín.**

El análisis se realizó con las rutinas diseñadas por Ghiringhelli (2002). Para facilitar la discriminación rápida entre sub- y sobre-representaciones y la visualización gráfica, las líneas de guiones marcan los límites entre lo esperable por azar (0,78 y 1,23) de los valores representativos. En los casos de similitud o igualdad de valores, los puntos han sido ligeramente desplazados de la vertical para facilitar su visualización.

## DISCUSIÓN

Inicialmente, este trabajo se enfocó en la obtención y el análisis de la secuencia nucleotídica del RNA S, de las cepas Espíndola, Ledesma y Romero del virus Junín. La caracterización molecular de estas cepas con diferente grado de virulencia y tropismo celular y su comparación con la información disponible del resto de las cepas del virus Junín, permitiría una aproximación sistemática en la determinación de las bases de la virulencia.

Gracias a la amplificación por RT-PCR, al clonado de la totalidad de los fragmentos, a su secuenciación y a la comparación con la información disponible, se ha reconstruido el RNA S completo de las cepas Espíndola, Ledesma y Romero del virus Junín. Si bien los *primers* para amplificar el cDNA fueron diseñados incluyendo en su secuencia regiones de

hibridación para *primers* universales en los extremos 5', los resultados obtenidos por secuenciación directa resultaron con un alto *background* y muchas imprecisiones. Por lo tanto, se prefirió seguir el método más tradicional y más seguro del clonado de los fragmentos de amplificación previo a la secuenciación.

De la comparación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las cepas en estudio, se puede observar que existen diferencias en los dos niveles. Si bien el número de sustituciones que se encuentran en la secuencia nucleotídica es considerable, no todas ellas se manifiestan como cambios de la secuencia aminoacídica (Capítulo 6).

## REGIONES NO CODIFICANTES

Evidencias en muchos sistemas virales sugieren que las regiones no codificantes de los genomas virales son portadoras de importantes determinantes de virulencia. Los efectos de cambios en regiones no codificantes de picornavirus, poliovirus, flavivirus, togavirus y alfavirus (Kobiler *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 2000; Tucker *et al.*, 1999; Macadam *et al.*, 1992; Kuhn *et al.*, 1992; Bandyopadhyay *et al.*, 1993) se manifiestan en variaciones en la atenuación, defectos en la acumulación de RNA, alteración de las tasas de crecimiento en cultivos celulares y variación de la capacidad de producir enfermedad en ratones, lo que sugiere que estas regiones son importantes en la determinación de la virulencia tanto *in vivo* como *in vitro*.

### Región intergénica

En la región intergénica del RNA S se ha descrito la existencia de un solo *hairpin-loop* en los virus Pichindé (Auperin *et al.*, 1984b), LCM (Romanowski *et al.*, 1985; Salvato *et al.*, 1988) y Lassa (Auperin y McCormic 1988; Clegg *et al.*, 1990), mientras que en Tacaribe (Franze-Fernández *et al.*, 1987, 1993), Junín (Ghiringhelli *et al.*, 1991, Ghiringhelli, 2002), Oliveros (Bowen *et al.*, 1996) y Mopeia (Wilson y Clegg, 1991) el plegamiento del RNA permite la formación de dos *hairpin-loops* diferentes. Sin embargo, Ghiringhelli (2002) postuló la presencia de tres estructuras del tipo *hairpin loop* en los virus Sabiá y Tacaribe.

El análisis de los alineamientos de secuencia y de las predicciones de plegamiento de las moléculas de RNA mostró que las posiciones en las que aparecen las diferencias nucleotídicas entre las cepas corresponden al extremo del *hairpin*, donde el RNA forma un asa y en los que no existen apareamientos intracatenarios entre nucleótidos. En el caso del primer *hairpin* hay un cambio en el apareamiento de un par de bases en el que se sustituye un par no convencional UG en las cepas Espíndola y Ledesma por un par AU en Romero. Sin embargo, ninguno de estos cambios altera la estabilidad termodinámica de la estructura secundaria (triple *hairpin-loop*) predicha para esta región en las cepas del virus Junín analizadas (Figura 5.2b).

De la misma forma, los cambios de nucleótidos con respecto al consenso de las cepas XJ-Parodi, XJ-44 y Candid #1 se encuentran ubicados en las mismas cuatro posiciones variables que en las cepas prototipo (en los extremos de los *hairpins*), sin afectar la estabilidad termodinámica de estos, resultando en estructuras secundarias análogas a las

ya descritas. Por consiguiente, estos datos sugieren que, a semejanza de lo descrito en los virus Sabiá y Tacaribe, no serían dos sino tres las estructuras tipo *hairpin-loop* presentes en el virus Junín.

Además, la conservación de los cambios nucleotídicos en esta zona esté relacionada probablemente con la función de terminador de transcripción propuesta para la estructura secundaria tipo *hairpin-loop* de esta región (Tortorici *et al.*, 2001).

#### *Extremos 5' y 3' del genoma viral*

Las regiones 5' y 3' no codificantes del RNA viral de las cepas prototipo están constituidas por 86 y 81 nucleótidos respectivamente. Como se mencionó en el Capítulo 3, estas dos regiones presentan secuencias nucleotídicas con un alto grado de complementariedad que pueden formar estructuras tipo *panhandle*. Esta complementariedad en los extremos explicaría el hecho que las nucleocápsides purificadas observadas al microscopio electrónico aparezcan como estructuras circulares cerradas (Young y Howard, 1983; Auperin *et al.*, 1984b; Romanowski *et al.*, 1985; Bishop y Auperin, 1987).

Las predicciones de estructura secundaria completas del RNA S como la de los extremos de los 5' y 3' muestran que la complementariedad de secuencia va más allá de los 19 nucleótidos conservados de los extremos. Por ejemplo en la cepa Ledesma se forma una estructura del tipo *panhandle* de alrededor de 70 nucleótidos. Si bien en la figura 5.3 se representan las estructuras óptimas, en las estructuras subóptimas de las cepas Espíndola y Romero aparecen motivos semejantes a los de Ledesma.

Al analizar las regiones no codificantes de los extremos del virus Junín, ha sido demostrado que existe una cierta variabilidad detectada al secuenciar clones independientes de las cepas XJ44 (Albariño, 1997), MC2 y Candid#1 (Ghiringhelli, 2002). La heterogeneidad podría generarse por un mecanismo de edición de los productos de transcripción, similar al publicado para el virus Tacaribe (Garcin y Kolakofski, 1992). Esta misma variabilidad se ha encontrado en las cepas en estudio (datos no mostrados).

El efecto de los cambios en las regiones no codificantes sobre el tropismo celular, la infectividad y la traducción de genes ha sido informado en la literatura para distintos sistemas virales (Harvala, 2003; Sekiguchi, 2003; Tucker, 1999). Por ejemplo, en poliovirus tipo 1 y tipo 3, se ha demostrado que sustituciones de apenas un nucleótido en regiones no codificantes son las responsables de cambios en la virulencia y el tropismo celular (Li *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 2000). En arenavirus, la importancia de la formación de complejos intra e intermoleculares está asociada a eventos de regulación de la iniciación de la replicación y la transcripción.

Evidencia obtenida con virus a RNA de polaridad negativa ha demostrado que las señales para la encapsidación y la entrada de la polimerasa están localizadas en las regiones no codificantes terminales de los genomas virales. La existencia de conservación de los extremos 3' en arenavirus y la complementariedad entre los extremos 3' y 5' (Lee *et al.*, 2002), conducen a hipotetizar que también en estos virus pueden ser importantes las regiones no codificantes con señales en *cis* que puedan ser necesarias para la transcripción o la replicación por parte de la RNA polimerasa.

Sin embargo, aun no se conoce con exactitud la participación de estas regiones no codificantes del RNA S en la atenuación virulencia, los cambios en la patogenicidad, la producción de un patrón clínico determinado y/o la variación del tropismo celular. Por otra parte, los datos obtenidos no permiten elaborar una hipótesis al respecto, por lo que se deberá aguardar a que estas regiones sean evaluadas más extensamente.

Los nuevos sistemas de genética reversa recientemente desarrollados ofrecen una promesa considerable en el delineamiento de secuencias reguladoras esenciales localizadas dentro de los moldes de RNA viral y la clarificación de los roles que juegan las proteínas virales y las del hospedador en infecciones agudas y persistentes de arnavirus (Lee y de la Torre, 2002, Jacamo *et al.*, 2003). Sin embargo, debido a que el curso de la infección dentro del hospedador está determinado por efectos acumulativos de infecciones en diferentes tipos celulares podría ser informativo, a medida que los procedimientos de genética reversa sean más accesibles, extender estos experimentos a un rango de diferentes tipos celulares.

#### ABUNDANCIA RELATIVA DE OLIGONUCLEÓTIDOS

La heterogeneidad (u homogeneidad) de los genomas puede ser analizada en términos de su composición nucleotídica, especialmente en función de las abundancias relativas de los di-, tri- y tetranucleótidos. El análisis de las abundancias relativas, a diferencia del análisis de las frecuencias absolutas, permite la identificación de aspectos llamativos de la composición de un genoma determinado *versus* lo esperable por azar.

Desde este punto de vista, en varias publicaciones se describe el uso de esta metodología de análisis para caracterizar genomas de diferentes orígenes, llegando hasta el concepto de la existencia de una "firma genómica" (*genome signature*) (Sved y Bird, 1990; Burge *et al.*, 1992; Karlin *et al.*, 1994a; 1994b, 1994c; Karlin y Ladunga, 1994; Cardon *et al.*, 1994; Karlin y Burge, 1996; Karlin *et al.*, 1997; Karlin y Mrázek, 1997; Mrázek y Karlin, 1998; Campbell *et al.*, 1999; Karlin *et al.*, 1999).

En el caso de los arnavirus, como se puede observar en la figura 5.4, los dinucleótidos CG y UA son sub-abundantes, mientras que los dinucleótidos CA y UG son sobre-abundantes. Por otra parte, las sub- o sobre-abundancias de los tri- y tetranucleótidos están directamente relacionadas con la sub-abundancia del dinucleótido CG, ya que éste es un componente de todos aquellos que se han detectado con valores extremos.

Cuando se realiza un análisis por regiones, resulta llamativo observar que el dinucleótido CG es especialmente sub-abundante en cualquiera de las tres posiciones (I+II, II+III, III+I) en las regiones codificantes, mientras que el dinucleótido CG presenta las menores sub-abundancias en las regiones no codificantes (extremos y región intergénica). Esto último guarda una íntima correlación con la existencia de estructuras secundarias doble cadena de gran estabilidad, asociadas con la conformación circular de las nucleocápsides (observada en microscopía electrónica) y con la regulación de los fenómenos de transcripción/replicación (Franze Fernández *et al.*, 1987; Ghiringhelli *et al.*, 1991; Rivera Pomar *et al.*, 1993; Tortorici *et al.*, 2001). Por último, los dinucleótidos UG y CA son

especialmente sobre-abundantes en la posición III+I de los marcos de lectura (Figuras 5.4 y 5.6).

Por otra parte, la información concerniente a las sub- y sobre-abundancias de dinucleótidos es coincidente con lo encontrado en otros virus con genoma de RNA, tales como los picornavirus, los flavivirus, los coronavirus, los retrovirus, los calicivirus, los rhabdovirus, los paramyxovirus y los orthomyxovirus (Karlín *et al.*, 1994b).

La constancia en la sub-abundancia del dinucleótido CG, genera varios interrogantes:

1) ¿El contenido y/o patrón de distribución del dinucleótido CG puede generar una estructura definida que afecte, en particular, la interacción con proteínas? En función de esto, ¿Existen restricciones estructurales y/o regulatorias intrínsecas al dinucleótido CG?

2) ¿Existen mecanismos de mutación preferencial, mediante desaminación u otras fuerzas selectivas que afecten especialmente al dinucleótido CG?

3) ¿El contenido del dinucleótido CG afecta de alguna manera la frecuencia de uso de aminoácidos tales como la arginina (codones CGN)? o ¿Sólo afecta la frecuencia de uso de codones?

Respecto de los cuestionamientos planteados en 1), no se han encontrado evidencias que justifiquen una hipótesis asociada con cuestiones estructurales y/o regulatorias.

Respecto del cuestionamiento 2), un análisis de correlación entre la sub-abundancia del dinucleótido CG y las sobre-abundancias de los dinucleótidos UG y CA (datos no mostrados) muestra una cierta coincidencia entre las mismas. Esto sugiere que podría existir una desaminación preferencial de las Cs (Lewin, 1997) que forman parte del dinucleótido CG durante el ciclo replicativo, lo cual llevaría, en forma directa, a un incremento en el dinucleótido UG y, en forma indirecta, a un incremento posterior en el dinucleótido CA. Por otra parte, el mismo tipo de análisis realizado entre la sub-abundancia del dinucleótido UA y las sobre-abundancias de los dinucleótidos UG y CA sugiere que la sub-abundancia del dinucleótido UA está asociada con mecanismos diferentes e independientes.

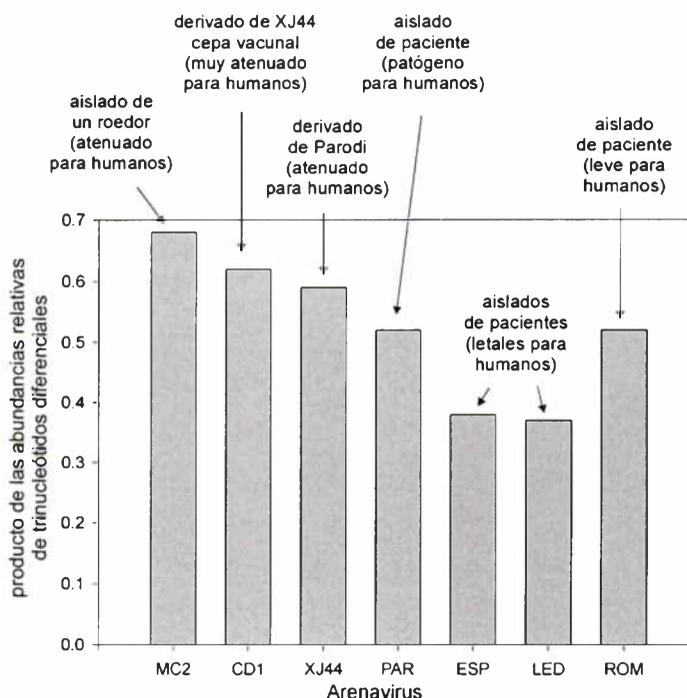
Respecto de los cuestionamientos planteados en 3), la frecuencia promedio de arginina en las proteínas GPC y N de los distintos aislamientos es 4,97%, lo cual coincide con lo esperable por simple azar (5.00%). En la tabla 5.4 se puede observar que el único efecto de la sub-abundancia del dinucleótido CG está asociado con la frecuencia de uso de codones.

Por último, un análisis pormenorizado de las abundancias relativas de trinucleótidos permite verificar que el patrón de sub- y sobre-abundancias no es igual para todas las cepas de virus Junín analizadas. Además, en base a este análisis se puede identificar una especie de firma

| Virus     | Proteína GPC |      | Proteína N |      |
|-----------|--------------|------|------------|------|
|           | CGN          | AGR  | CGN        | AGR  |
| Espíndola | 0.61         | 3.29 | 0.53       | 5.66 |
| Ledesma   | 0.61         | 3.09 | 0.53       | 5.66 |
| Romero    | 0.62         | 3.09 | 0.53       | 5.48 |
| XJ-Parodi | 0.61         | 3.09 | 0.53       | 5.48 |
| XJ-44     | 0.61         | 3.09 | 0.53       | 5.66 |
| Candid #1 | 0.61         | 3.09 | 0.53       | 5.66 |
| MC2       | 0.62         | 3.52 | 0.71       | 5.66 |

**TABLA 5.4**  
Frecuencias de uso de los codones de arginina en las proteínas GPC y N de los aislamientos (%).

genómica (*genomic signature*) que muestra una cierta correlación con la letalidad para humanos de las distintas cepas en estudio (Figura 5.8).



**Figura 5.8**

**Perfiles de abundancias relativas de trinucleótidos diferenciales en las distintas cepas del virus Junín.**

El análisis se realizó con las rutinas diseñadas por Ghiringhelli (2002). Las distintas barras del histograma representan el producto de los valores de abundancia relativa de los diferentes trinucleótidos identificados como diferenciales (sub- y sobre-representaciones,  $<0,78$  ó  $>1,23$ , respectivamente) en las distintas cepas. MC2: cepa MC2; CD1: Candid #1; XJ44: cepa XJ44; Esp: Espíndola; Led: Ledesma; Rom: Romero.

Los genomas de los virus a RNA están en una lucha permanente entre la generación de mutaciones y los mecanismos para eliminar se sus genomas los cambios deletéreos acumulados y crear y extender cambios beneficiosos de manera eficiente (Worobey y Holmes, 1999) afectando la adaptabilidad viral. En los últimos años, las metodologías de análisis para caracterizar genomas condujeron al concepto de *firma genómica* que ofrece claves para la identidad genética de los microorganismos, su origen geográfico, la modificación genética que aumenta su resistencia a antibióticos y/o a vacunas, etc.

La correlación encontrada entre las abundancias relativas de trinucleótidos diferenciales y la letalidad para humanos entre las diferentes cepas del virus Junín podría estar, de alguna forma, asociada a factores que afecten la adaptación y la supervivencia de las diferentes cepas en interacción con distintos tipos celulares del hospedador. Sin embargo debido a la dificultad o imposibilidad de poner a prueba esta correlación en el laboratorio, se deberá aguardar el desarrollo de nuevas metodologías que puedan aportar datos para corroborar esta hipótesis.

## CAPÍTULO 6

### INFORMACIÓN MOLECULAR DE LOS PRODUCTOS GÉNICOS DE LOS DIFERENTES AISLAMIENTOS CLÍNICOS DEL VIRUS JUNÍN (LEDESMA, ESPÍNDOLA Y ROMERO)

*La biologie moderne a l'ambition d'interpréter les propriétés de l'organisme par la structure des molécules qui le constituent.  
François Jacob. La logique du vivant.*

#### GLICOPROTEÍNAS VIRALES

##### ESTRUCTURA PRIMARIA DEL PRECURSOR DE LAS GLICOPROTEÍNAS (GPC)

El marco de lectura abierto de la mitad 5' del RNA S de las cepas prototipo (nucleótidos 87 al 1544) codifica para un único producto de traducción, el precursor de las glicoproteínas (GPC), de 485 aminoácidos. Este péptido es glicosilado y procesado postraduccionalmente (Figura 6.1).

En la proteína GPC se pueden identificar tres dominios: el péptido señal, la glicoproteína G1 y la glicoproteína G2.



**Figura 6.1**

#### Procesamiento postraduccional del precursor de las glicoproteínas (GPC)

En el esquema se muestran los tres productos proteicos que se generan por procesamiento postraduccional de la proteína GPC. Los sitios de clivaje proteolítico y las secuencias correspondientes han sido determinados por homología con LCM (Buchmeier *et al.*, 1987; Burns y Buchmeier, 1993).

##### ESTRUCTURA DEL PÉPTIDO SEÑAL

El péptido señal de las tres cepas en estudio, Espíndola, Ledesma y Romero, posee una longitud de 58 aminoácidos, concordando con los datos de Burns y Buchmeier (1993) y Romanowski (1993).

Este péptido está constituido por un 48,28% de aminoácidos hidrofóbicos, un 18,97% de aminoácidos hidrofílicos y un 32,75% de aminoácidos anfipáticos. Cuando se comparan las cepas en estudio entre sí y con el resto de las cepas del virus Junín, los porcentajes de la composición aminoacídica no varían, ya que en esta región solo se producen dos cambios conservativos de aminoácidos (V<sub>35</sub> → I<sub>35</sub> y F<sub>46</sub> → L<sub>46</sub>).

El análisis por computadora de la potencial estructura secundaria de la secuencia aminoacídica permite efectuar predicciones que resultan coincidentes con los datos experimentales conocidos para otros arenavirus. El algoritmo PHDSEC (PHD *predicted secondary structure*, Rost y Sander, 1993, 1994a) predice una hélice entre el aminoácido 7 al 53, el algoritmo PHDHTM (PHD *probability for assigning transmembrane helix*, Rost, 1996; Rost *et al.* 1996) predice la existencia de una  $\alpha$  hélice transmembrana entre los aminoácidos

14 y 54, y el algoritmo PIMOHTM (PHD *prediction of membrane topology*, <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein>) predice un dominio transmembrana entre los aminoácidos 18 al 42, con el extremo amino terminal orientado hacia el espacio extracelular y el extremo carboxilo terminal orientado hacia el citosol. Los datos de predicción resultaron coherentes entre sí y son coincidentes con los requerimientos mínimos de un péptido señal. Recientemente, se demostró que este péptido es miristoilado y forma parte de la estructura de las espículas, en asociación con G1 y G2 (York *et al.*, 2004).

#### ESTRUCTURA DE LAS GLICOPROTEÍNAS G1 Y G2

Según los datos aportados por Buchmeier *et al.* (1987) y Burns y Buchmeier (1993), una proteasa de origen celular cliva a la proteína GPC del virus LCM en la cercanía de dos residuos de arginina (R<sub>262</sub>R<sub>263</sub>) generando los polipéptidos G1 (mitad amino terminal, 193 aminoácidos) y G2 (mitad carboxilo terminal, 234 aminoácidos). El mismo procesamiento ocurre en el virus Junín (Padula *et al.*, 1996). En forma análoga, se pueden deducir que en las cepas en estudio existen sitios de clivaje homólogos cercanos al par de argininas R<sub>247</sub>R<sub>248</sub>.

Al analizar las comparaciones de secuencias nucleotídicas de los distintos aislamientos del virus Junín se evidencia que la región con mayor cantidad de cambios dentro de la GPC corresponde a la región codificante para la glicoproteína G1 (en especial, hay una región altamente variable hacia el extremo 5' de esta proteína), mientras que la región que codifica para la proteína G2 es una de las de mayor conservación (Capítulo 5). Cuando se analizan los patrones de identidad de aminoácidos no se evidencia dicha diferencia (la identidad de aminoácidos entre las diferentes cepas del virus Junín oscila entre 0,964% y 1,000% para G1 y 0,966% y 1,000% para G2). Por lo tanto, la mayor parte de las sustituciones de nucleótidos no se ven reflejadas en cambios de la secuencia de aminoácidos (Tabla 6.1).

| G1     |       |       |       |        |       |       | G2     |       |       |       |        |       |       |
|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
|        | Esp   | Led   | Rom   | XJ-Par | XJ44  | Cd1   |        | Esp   | Led   | Rom   | XJ-Par | XJ44  | Cd1   |
| Esp    | 1,000 | 0,990 | 0,990 | 0,974  | 0,974 | 0,974 | Esp    | 1,000 | 0,970 | 0,974 | 0,980  | 0,983 | 0,974 |
| Led    | 0,990 | 1,000 | 0,990 | 0,974  | 0,974 | 0,974 | Led    | 0,966 | 1,000 | 0,979 | 0,987  | 0,987 | 0,979 |
| Rom    | 0,990 | 0,990 | 1,000 | 0,974  | 0,974 | 0,974 | Rom    | 0,970 | 0,979 | 1,000 | 0,991  | 0,991 | 0,983 |
| XJ-Par | 0,969 | 0,969 | 0,964 | 1,000  | 1,000 | 1,000 | XJ-Par | 0,979 | 0,987 | 0,991 | 1,000  | 1,000 | 0,991 |
| XJ44   | 0,964 | 0,964 | 0,969 | 0,995  | 1,000 | 1,000 | XJ44   | 0,979 | 0,987 | 0,991 | 1,000  | 1,000 | 0,991 |
| Cd1    | 0,969 | 0,969 | 0,969 | 1,000  | 0,995 | 1,000 | Cd1    | 0,970 | 0,979 | 0,983 | 0,991  | 0,991 | 1,000 |

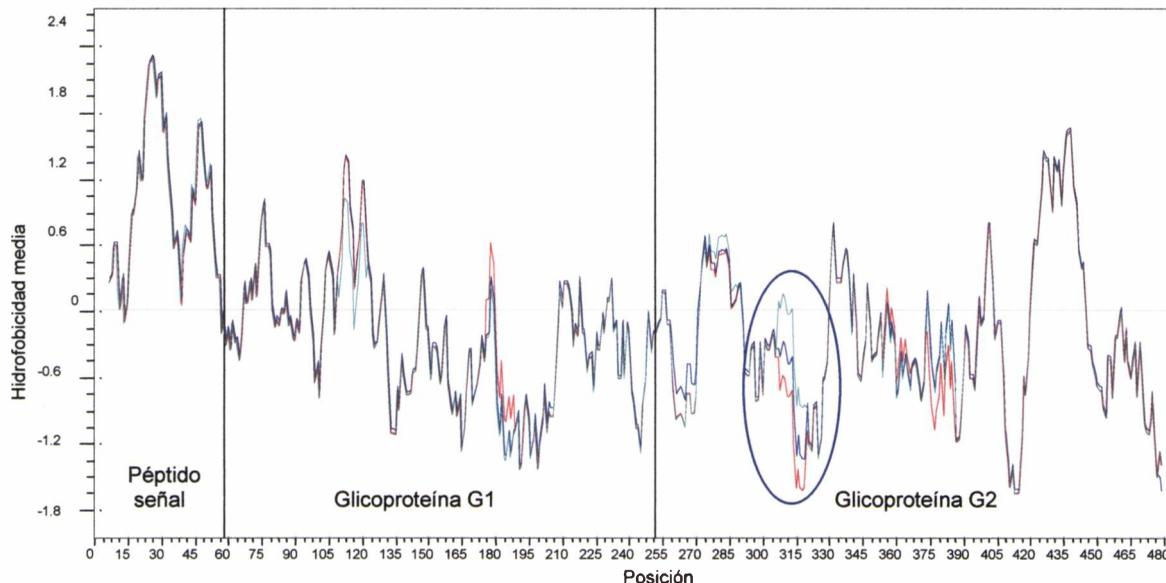
**Tabla 6.1**

**Identidad y similitud de aminoácidos de las glicoproteínas G1 y G2.**

El triángulo inferior contiene los valores de identidad de aminoácidos (%) y el triángulo superior los valores de similitud (%). Los valores mínimos de identidad están sombreados en gris oscuro.

Sin embargo, cuando se analizan individualmente las sustituciones de aminoácidos en los alineamientos se ve que la distribución de los cambios es diferente. En G1 existen posiciones variables en las que hay un aminoácido común a las cepas Espíndola, Ledesma y Romero que es reemplazado por otro común al resto de las cepas (posiciones 99; 111; 157; 184 y 209; Apéndice 3). Cuatro de estas cinco sustituciones son cambios conservativos. En la posición 99 el cambio es no conservativo. Además de estas posiciones, existen cambios que son característicos de cada una de las cepas y que no se repiten en ninguna otra. Mientras tanto, en la proteína G2, los cambios son sustituciones simples de aminoácidos que son característicos de cada cepa y no se presentan en ninguna de las otras.

La glicoproteína G1 está constituida por un promedio (para las tres cepas) de: 29,70% de aminoácidos hidrofóbicos, un 34,88% de aminoácidos hidrofílicos y un 35,41% de aminoácidos anfipáticos. La proteína G2 está constituida por un promedio de: 28,62% de aminoácidos hidrofóbicos, un 33,76% de aminoácidos hidrofílicos y un 37,88% de aminoácidos anfipáticos. Los porcentajes de la composición de aminoácidos no varían en forma significativa al comparar las proteínas G1 o las G2 de las tres cepas en estudio. La comparación numérica anterior o un análisis más detallado no muestran diferencias significativas entre G1 y G2. Por otra parte, el estudio de la distribución de aminoácidos hidrofóbicos mediante perfiles de hidrofobicidad media muestra diferencias concretas entre las glicoproteínas G1 y G2 (Figura 6.2).



**Figura 6.2**

**Perfil de hidrofobicidad de la proteína GPC de las cepas prototipo**

Las líneas en color corresponden a los valores de hidrofobicidad media de Kyte y Doolittle (1982) de los precursores de las glicoproteínas virales de las cepas Espíndola (azul), Ledesma (rojo) y Romero (verde) del virus Junín. Las líneas verticales marcan las regiones de cada gráfico correspondientes a los dominios: péptido señal, glicoproteína G1 y glicoproteína G2. El óvalo azul indica la región más variable entre las cepas.

En la tabla 6.2 se detallan las sustituciones de nucleótidos que producen cambios en los perfiles de hidrofobicidad media en las cepas Espíndola, Ledesma y Romero. Para las distintas cepas existen muchos otros cambios que, por ser conservativos, no generan cambios en los perfiles de hidrofobicidad. Es de destacar que en Romero se produce una sustitución de una metionina por una isoleucina (cambio conservativo) en la posición 282, que sin embargo se ve reflejado en un cambio del perfil de hidrofobicidad de la proteína GPC de esta cepa. La superposición de los perfiles de hidrofobicidad media muestran que estos cambios producen algunas diferencias entre las cepas (Figura 6.2).

La búsqueda en la base de datos PROSITE (*PROtein SITEs*, Fuchs, 1991; Bairoch, 1993, Falquet 2002, <http://bo.expasy.org/prosite>) predice la existencia de varios sitios potenciales de glicosilación, fosforilación, etc., tanto en G1 como en G2. Hasta el momento, no existen datos experimentales que demuestren la fosforilación o miristoilación en G1 y/o G2, por lo cual se desconoce si estos sitios son biológicamente significativos. Con respecto a los sitios de N-glicosilación, los cambios de aminoácidos entre las cepas analizadas producen en la cepa Ledesma la pérdida de uno de los 8 sitios potenciales de N-glicosilación característicos del virus Junín (NYT, posición 357-359).

El análisis por computadora de la potencial estructura secundaria de la glicoproteína G1 señala a ésta como una proteína periférica (Klein *et al.*, 1985), con 3 regiones de  $\alpha$  hélice, 6 regiones hoja plegada  $\beta$  y 14 regiones definidas como *loops*, donde podrían existir segmentos con estructura *random coil*,  $\beta$ -turn y/o  $\gamma$ -turn (PHDSEC, Rost y Sander, 1993).

El análisis por computadora de la potencial estructura secundaria de la glicoproteína G2 señala a ésta como una proteína integral multimérica, con una región de  $\alpha$  hélice entre los aminoácidos 175 a 185 (PHDSEC, Rost y Sander, 1993, 1994a) seguido de una lámina  $\beta$  entre los aminoácidos 186 y 193, las que formarían un segmento transmembrana delimitado por los aminoácidos 177 a 188 (PHDHTM, Rost *et al.*, 1995). El algoritmo PIMOHM predice un dominio transmembrana entre los aminoácidos 174 y 191, con el extremo amino terminal expuesto hacia la cara extracelular y el extremo carboxilo terminal hacia el citosol. Las predicciones del PHDSEC revelan la existencia de 4 regiones de  $\alpha$  hélice, 3 regiones  $\beta$  hoja plegada y 8 regiones definidas como *loops*, donde podrían existir segmentos con estructura *random coil*,  $\beta$ -turn y/o  $\gamma$ -turn.

## PROTEÍNA DE LA NUCLEOCÁPSIDE

El marco de lectura abierto de polaridad viral complementaria existente en la mitad 3' del RNA S, delimitado por los codones AUG<sub>82-84</sub>-UAA<sub>1774-1776</sub> (numeración VC), codifica para un polipéptido de 564 aminoácidos y un peso molecular promedio para las cepas en estudio de 63.206 Da.

| Cepa      | Cambio | Posición |
|-----------|--------|----------|
| Romero    | A → E  | 116      |
| Ledesma   | T → I  | 182      |
| Espíndola | D → G  | 265      |
| Romero    | M → I  | 282      |
| Romero    | N → I  | 313      |
| Ledesma   | A → P  | 314      |
| Ledesma   | K → P  | 360      |
| Ledesma   | I → T  | 380      |

**Tabla 6.2**  
Sustituciones de nucleótidos que producen cambios en los perfiles de hidrofobicidad media de la proteína GPC.

La proteína N está constituida por 28,36% de aminoácidos hidrofóbicos, 37,58% de aminoácidos hidrofílicos y 32,04% de aminoácidos anfipáticos. La carga neta estimada a pH neutro es de +12 para Espíndola y Ledesma y +10 para Romero, en clara dependencia de la relativa riqueza en Arg y Lys, aminoácidos que se hallan dispersos en toda la proteína N, con varios grupos de dos, tres y hasta cuatro residuos básicos. Esta característica está en relación con la función estructural de la proteína N, que se asocia con el RNA viral para formar las nucleocápsides.

En el alineamiento de la secuencia aminoacídica de las proteínas N de las diferentes cepas del virus Junín se puede observar que existen varias regiones bien conservadas, incluso cuando se las compara con el resto de los arenavirus, lo cual refleja la extensa reactividad inmunológica cruzada de este antígeno de grupo (Apéndice 4). Cuando se analizan los patrones de identidad y similitud de aminoácidos se evidencia esta conservación (la identidad de aminoácidos entre las diferentes cepas del virus Junín oscila entre 97,7% y 99,6% y los valores de similitud van entre 98,4% y 99,8%). Por lo tanto, la mayor parte de las sustituciones de nucleótidos no se ven reflejadas en cambios en la secuencia de aminoácidos (Tabla 6.3).

|        | Esp         | Led  | Rom         | XJ-Par      | XJ44        | Cd1         |
|--------|-------------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Esp    | 100         | 99.3 | 99.3        | 98.8        | 98.6        | <b>98.4</b> |
| Led    | 99.1        | 100  | 99.3        | 99.1        | 98.9        | 98.8        |
| Rom    | 98.6        | 98.8 | 100         | 98.8        | 98.6        | <b>98.4</b> |
| XJ-Par | 98.0        | 98.6 | 98.0        | 100         | <b>99.8</b> | 99.6        |
| XJ44   | 98.0        | 98.6 | 98.0        | <b>99.6</b> | 100         | <b>99.8</b> |
| Cd1    | <b>97.7</b> | 98.2 | <b>97.7</b> | 99.3        | <b>99.6</b> | 100         |

**Tabla 6.3**

**Identidad y similitud de aminoácidos de la proteína N**

El triángulo inferior contiene los valores de identidad de aminoácidos y el triángulo superior los valores de similitud (%). Los valores mínimos y máximos de identidad y similitud están sombreados en gris oscuro.

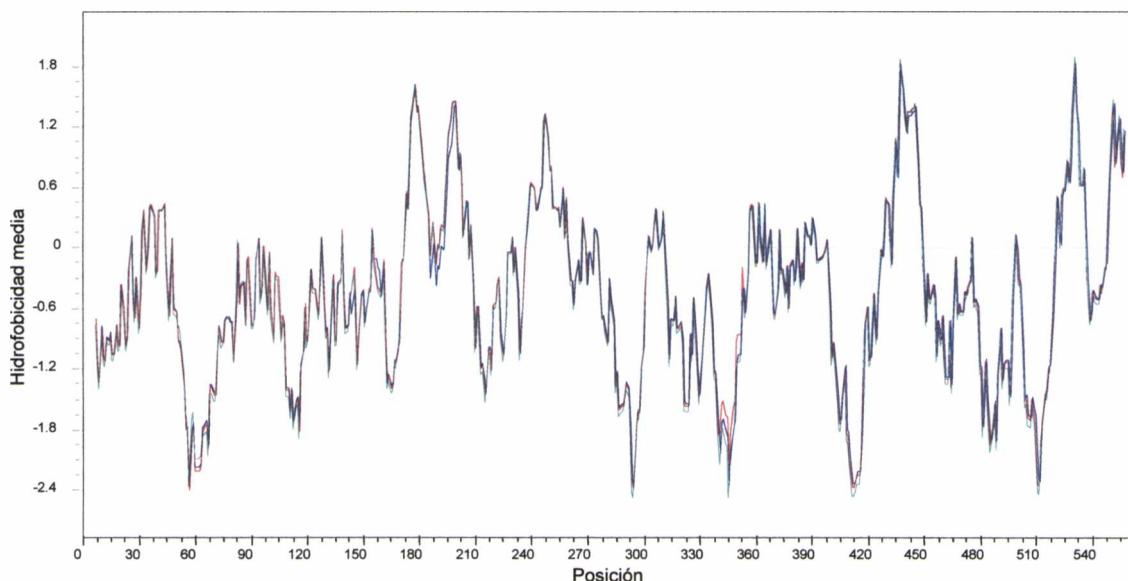
El análisis del perfil de hidrofobicidad media muestra varias regiones de alta hidrofobicidad (residuos 28-48, 164-210, 231-273, 357-399, 426-456 y 520-564) y varias regiones de baja hidrofobicidad (residuos 49-83, 281-304, 332-353, 400-425, 472-494 y 496-519; Figura 6.3).

Al comparar la incidencia de las sustituciones de aminoácidos en los perfiles de hidrofobicidad media de la proteína N de las cepas Espíndola, Romero y Ledesma, se evidencia que, como la mayoría de los cambios son conservativos, no producen variaciones en los perfiles, siendo éstos prácticamente idénticos. Solamente la sustitución de una asparagina por una serina (cambio semiconservativo) en la posición 347 de Ledesma produce un ligero aumento de la hidrofobicidad en esta región.

El estudio computacional de la potencial estructura secundaria de la proteína N indica la presencia de 18 regiones de  $\alpha$  hélice, 11 regiones hoja plegada  $\beta$  y 30 regiones definidas

como *loops*, donde podrían existir segmentos con estructura *random coil*,  $\beta$ -*turn* y/o  $\gamma$ -*turn* (PHDSEC, Rost y Sander, 1993, 1994a).

La búsqueda en la base de datos PROSITE (Fuchs, 1991; Bairoch, 1993) predice la existencia de varios sitios potenciales de glicosilación, fosforilación, etc. Hasta el momento, no existen datos experimentales que demuestren la miristoilación, la sulfatación o la amidación en N, por lo cual se desconoce si estos sitios son biológicamente significativos. Respecto a los sitios de N-glicosilación, se conoce que no son utilizados. Por otra parte, la señal de dimerización podría estar asociada con las interacciones proteína N - proteína N en la nucleocápside y/o con la interacción proteína N - proteína X (viral o celular) para el ejercicio de funciones regulatorias. En referencia a los sitios de fosforilación, no hay resultados experimentales concluyentes acerca de su utilización *in vivo*, pero existen evidencias que sugieren la presencia intracelular de la proteína N en dos estados, fosforilado y no fosforilado (Bruns *et al.*, 1986). Esto último, podría estar en relación con posibles funciones regulatorias de la proteína.



**Figura 6.3**

**Perfil de hidrofobicidad de las proteínas N de las cepas prototipo**

Las líneas en color corresponden a los valores de hidrofobicidad media de Kyte y Doolittle de las proteínas N de las cepas del virus Junín Espíndola (azul), Ledesma (rojo) y Romero (verde).

**BÚSQUEDA DE REGIONES POTENCIALMENTE RESPONSABLES DEL COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE LOS DIFERENTES AISLAMIENTOS CLÍNICOS**

Con el objeto de poder correlacionar los cambios nucleotídicos en el genoma de las distintas cepas virales con los diferentes comportamientos biológicos, se comenzó por realizar un análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.

Este análisis se llevó a cabo utilizando el software para análisis de genes y proteínas del GCG (Genetics Computer Group, Sequence Analysis Software Package, Versión 9.0, University of Wisconsin, EEUU), en una computadora Ultra2, Sun Microsystems Inc. disponible en nuestro laboratorio. Inicialmente, se realizó un alineamiento múltiple de las

secuencias nucleotídicas de los genes GPC y N de distintas cepas del virus Junín (en sentido viral) utilizando el programa PRETTY. En el alineamiento se incluyeron las cepas prototipo Romero, Espíndola y Ledesma secuenciadas en el presente estudio y las cepas Parodi, XJ44 y Candid #1, secuenciadas por miembros de nuestro laboratorio (Apéndice 2). Del mismo modo, se realizaron los alineamientos correspondientes a las secuencias aminoacídicas predichas de las proteínas GPC y N para las cepas prototipo junto con las secuencias respectivas de las cepas Parodi, XJ44 y Candid #1 del virus Junín (Apéndices 3 y 4).

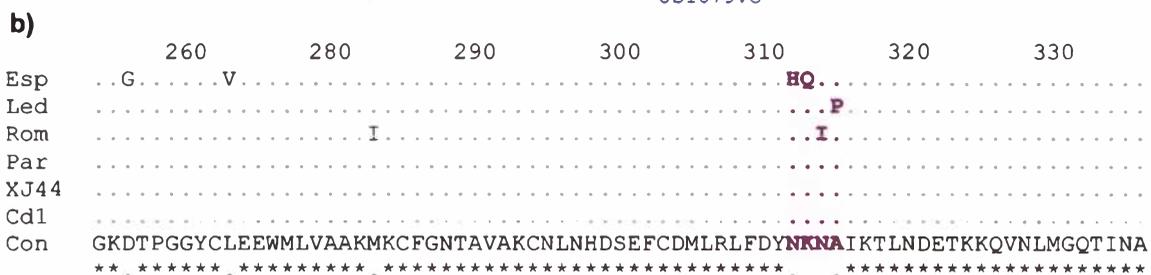
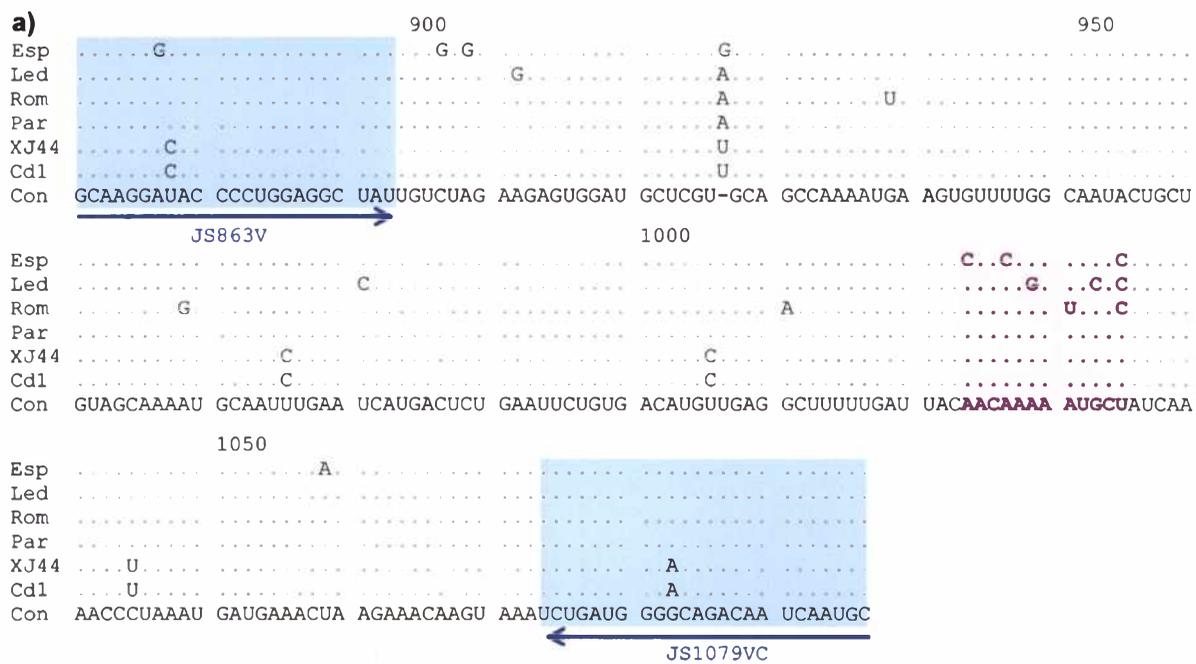
Debido a que la proteína N tiene un alto grado de conservación y a que se ha demostrado que alteraciones en la glicoproteínas de superficie virales están involucradas, en parte, con cambios en la virulencia, el estudio de las bases moleculares del comportamiento biológico se comenzó con el análisis de la proteína GPC. A partir de los alineamientos múltiples se construyeron los patrones de homología relativa correspondientes al marco de lectura del gen GPC y a la proteína GPC. Dichos patrones fueron obtenidos con un programa computacional creado por P. D. Ghiringhelli, integrante del grupo de trabajo. Cada punto del gráfico representa el valor de homología local de una ventana de longitud definida (33 nucleótidos y 11 aminoácidos). Se utilizaron valores arbitrarios para representar la homología en cada posición de la ventana. En los ácidos nucleicos se utilizaron los valores +1 y -1 para representar identidad y ausencia de identidad, respectivamente. En las proteínas, se utilizó el valor +1 para representar identidad, 0.5 para los cambios conservativos y -1 para los cambios no conservativos (según la tabla de similitud de aminoácidos de Schwartz y Dayhoff, 1979). Para establecer una mejor visualización se utilizaron distintas escalas para el marco de lectura y para la proteína (Figura 6.4).

En base a este análisis, se seleccionó una región de aproximadamente 217 pb, que presenta el mayor número de cambios tanto a nivel de secuencia nucleotídica como aminoacídica (Alineamiento 6.1). Para un análisis más detallado, se determinó la homología relativa de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la región correspondiente al fragmento de 217 pb de todas las cepas del virus Junín analizadas (Figura 6.5).

Para evaluar la influencia de los cambios aminoacídicos predichos sobre la estructura proteica se realizó una predicción de las estructuras secundarias de las distintas GPCs y de los fragmentos seleccionados. Dicha predicción se llevó a cabo utilizando los programas PEPTIDESTRUCTURE y PLOTSTRUCTURE del GCG.

El programa PEPTIDESTRUCTURE genera predicciones de estructura secundaria de una secuencia peptídica. El cálculo de la hidrofiliidad se realizó utilizando el algoritmo de Kyte y Doolittle. El programa PLOTSTRUCTURE grafica en forma bidimensional las predicciones obtenidas con el programa PEPTIDESTRUCTURE. En la figura 6.6 están representadas las predicciones de estructura secundaria y el patrón de carácter hidrofóbico e hidrofílico del fragmento de la proteína GPC de 73 aminoácidos producto de la traducción del fragmento de 217 pb de las cepas Espíndola, Ledesma, Romero, XJ-Parodi, XJ44 y Candid #1. Para el caso de del fragmento seleccionado correspondiente a la proteína G2, se optó por utilizar el algoritmo de Garnier-Osguthorpe-Robson (GOR), que es el de preferencia para las proteínas no solubles.

En el gráfico se representan las distintas estructuras secundarias predichas con curvas que poseen formas de ondas diferentes. Las  $\alpha$ -hélices se representan como ondas sinusoidales, las hojas  $\beta$  con una línea en forma de dientes de sierra, los giros con vueltas de 180° y las regiones sin estructura secundaria ordenada con una línea en forma de dientes de sierra aplanados. La hidrofiliicidad se simboliza con octágonos de color verde y la hidrofobicidad con rombos de color rojo, cuando éstos exceden los valores determinados como umbrales. El tamaño de los símbolos es proporcional al valor del atributo. El tamaño mínimo de la longitud de una alfa hélice es de seis aminoácidos y el de una hoja  $\beta$  de cuatro aminoácidos.



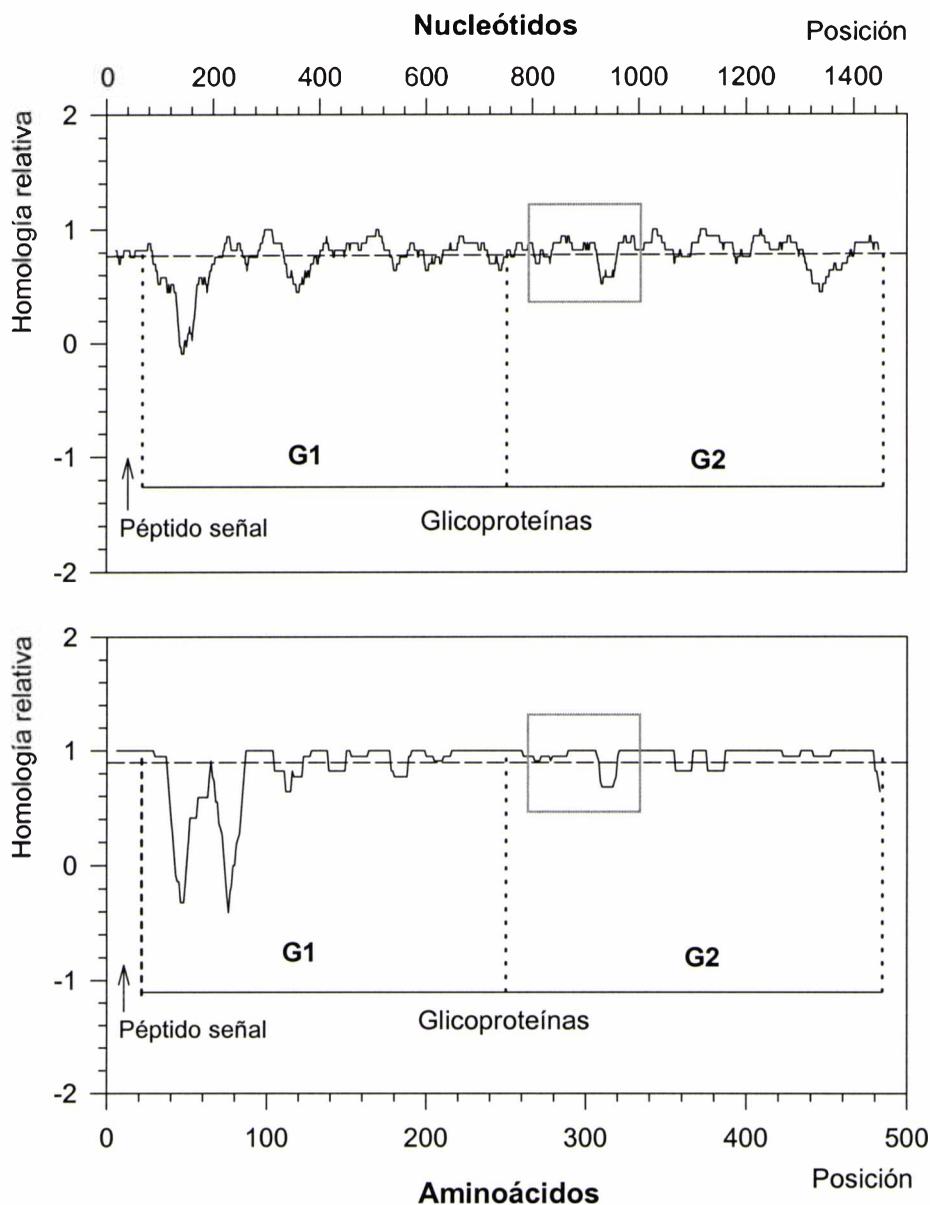
**Alineamiento 6.1**

**Comparación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del fragmento de 217 pb correspondiente al gen GPC.**

a) Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del RNA viral de distintas cepas de virus Junín, en la región comprendida entre los nucleótidos 791 y 1007 de la zona codificante para la proteína GPC. Solamente se muestran los cambios con respecto a la secuencia consenso. El sombreado lila indica la región que presenta la mayor cantidad de cambios entre las distintas cepas. Con flechas azules y sombreado en celeste están representados los *primers* JS863V y JS1079VC que permiten amplificar por PCR el fragmento de 217 pb.

b) Comparación de la secuencia aminoacídica de correspondiente al fragmento seleccionado. En lila se indica la zona con mayor número de cambios de aminoácidos. Los asteriscos representan identidad de aminoácidos, los puntos representan cambios conservativos y los espacios, cambios no conservativos.

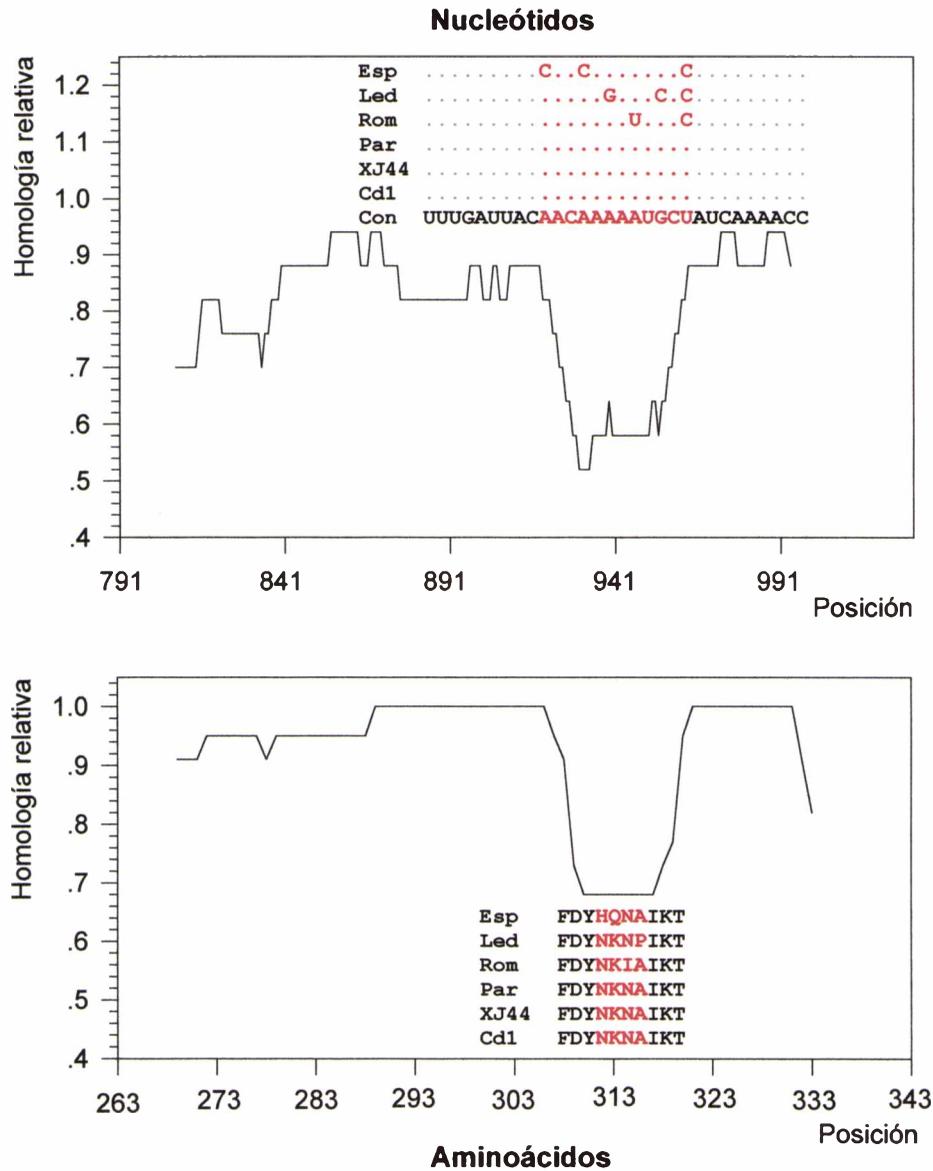
Esp: Espíndola; Led: Ledesma; Rom: Romero; Par: XJ-Parodi; Cd1: Candid #1 y Con: consenso.



**Figura 6.4**

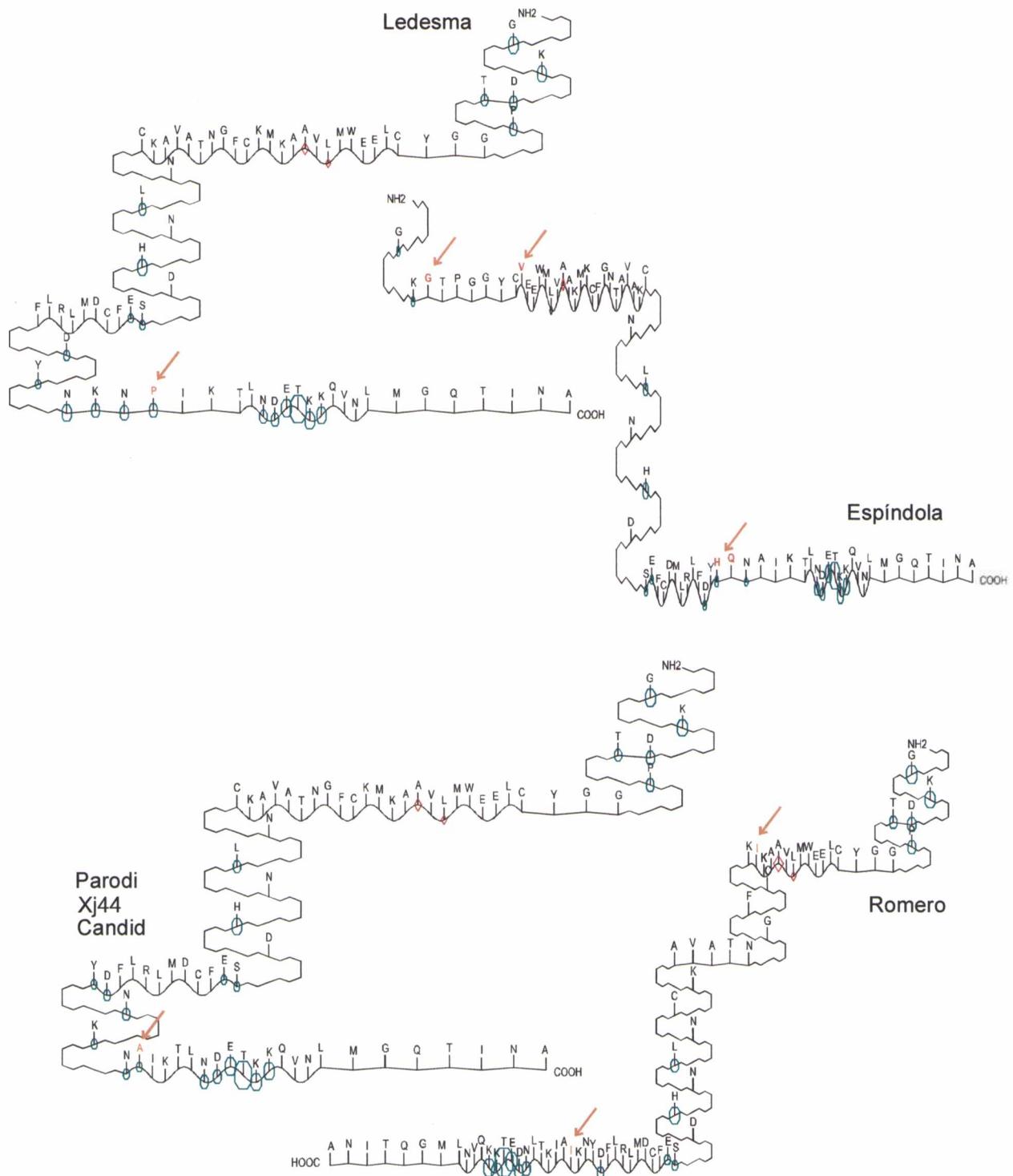
**Patrones de homología relativa correspondientes a los marcos de lectura del gen GPC y a las proteínas GPC, de todas las cepas del virus Junín analizadas.**

Cada punto del gráfico representa el valor de homología local para una ventana de longitud definida (33 nucleótidos y 11 aminoácidos). Se utilizaron valores arbitrarios para representar la homología en cada posición de la ventana. En ácidos nucleicos se utilizaron los valores +1 y -1 para representar identidad y no identidad, respectivamente. En proteínas, se utilizaron los valores +1, +0.5 y -1 para representar identidad, cambio conservativo y cambio no conservativo, respectivamente. Para establecer una mejor visualización, los gráficos fueron realizados a diferentes escalas. Las zonas recuadradas corresponden a la región seleccionada de 217 pb y al producto de traducción de ésta. Para la confección de los gráficos se utilizó el programa diseñado por P.D. Ghiringhelli (2002).

**Figura 6.5**

**Patrones de homología relativa correspondientes a las secuencias del fragmento de 217 pb, de todas las cepas del virus Junín analizadas.**

El fragmento seleccionado corresponde a la región del fragmento analizado por SSCP. Cada punto del gráfico representa el valor de homología local para una ventana de longitud definida (33 nucleótidos y 11 aminoácidos). Se utilizaron valores arbitrarios para representar la homología en cada posición de la ventana. En ácidos nucleicos se utilizaron los valores +1 y -1 para representar identidad y no identidad, respectivamente. En proteínas, se utilizaron los valores +1, +0.5 y -1 para representar identidad, cambio conservativo y cambio no conservativo, respectivamente. Para establecer una mejor visualización, los gráficos fueron realizados a distintas escalas, una para el marco de lectura y otra para la proteína. Sobre los gráficos están superpuestos los segmentos de secuencia en donde se producen los cambios que generan las variaciones más estables en la homología relativa.



**Figura 6.6**

**Estructura secundaria predicha y patrón de carácter hidrofóbico e hidrofílico del polipéptido producto de la traducción del fragmento de 217 pb de distintas cepas del virus Junín.**

La estructura secundaria fue elaborada con el programa PLOTSTRUCTURE, utilizando el algoritmo de Garnier *et. al.* (1978) y la hidrofobicidad se calculó empleando el algoritmo de Kyte-Doolittle (1982). Los rombos rojos indican aminoácidos hidrofóbicos y los octógonos verdes indican aminoácidos hidrofílicos. Los aminoácidos en color naranja son aquellos que cambian con respecto a la secuencia consenso (flechas naranja).

## **POLIMORFISMOS DE CONFORMACIÓN DE SIMPLE CADENA (SSCP)**

Con el objeto de realizar un análisis rápido sobre muestras de pacientes, se apuntó al estudio de la región del RNA S en la que se concentran los cambios indicados en la sección precedente por medio de la técnica denominada SSCP.

La técnica de determinación de polimorfismos de simple cadena (SSCP, *single strand conformation polymorphism*) permite detectar mutaciones conocidas o desconocidas en fragmentos de DNA. El método se basa en la desnaturalización de la doble hebra de DNA y la posterior separación de la muestra por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Esta técnica es capaz de detectar incluso la sustitución de una única base que resulta en un patrón alterado de migración de las cadenas de DNA de hebra simple.

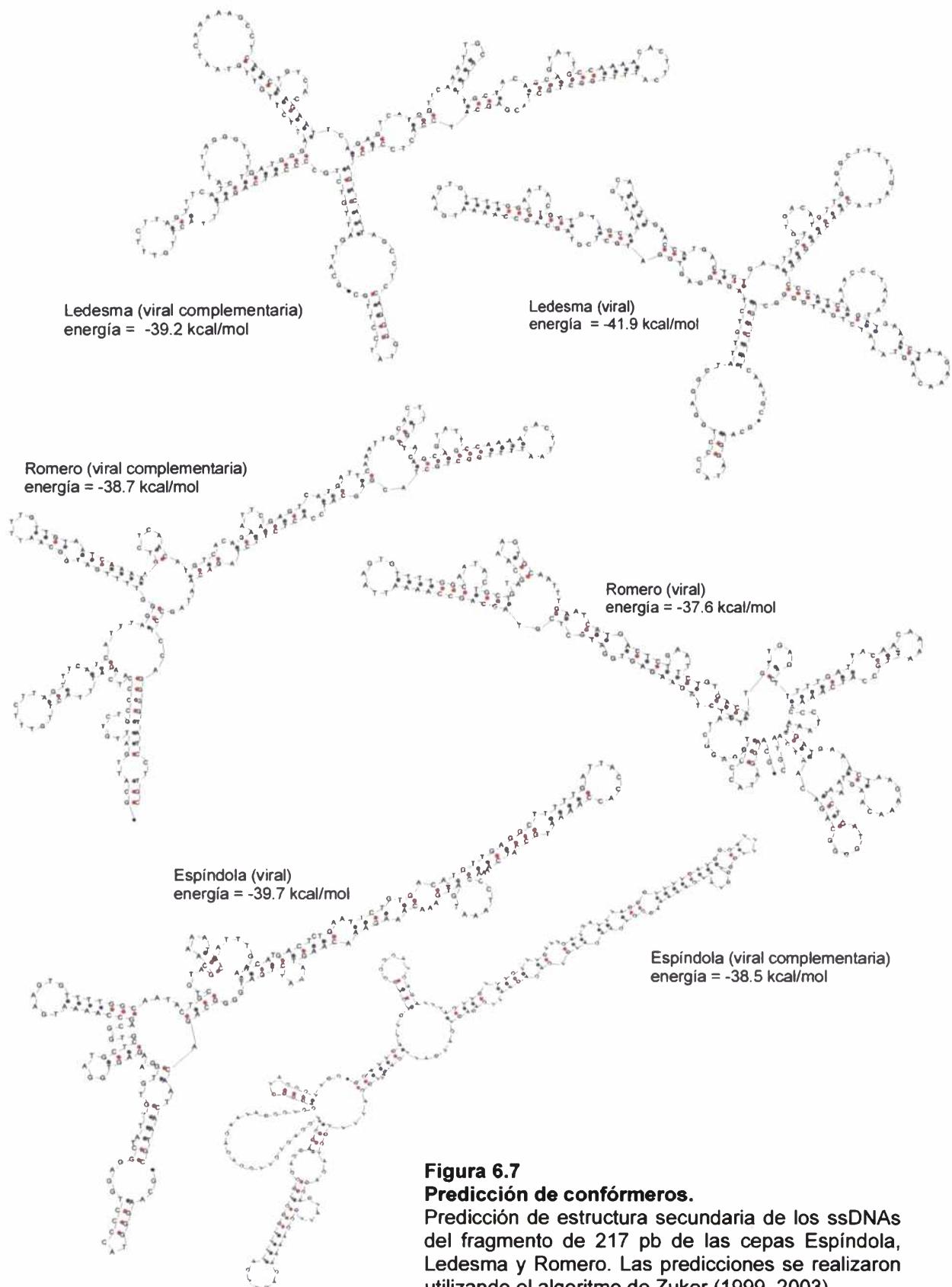
El SSCP está basado en la diferente movilidad electroforética de las hebras de DNA de simple cadena que, debido a la formación de apareamientos intracatenarios entre las bases nitrogenadas, adoptan conformaciones plegadas semiestables (confórmeros), las que dependen de su secuencia nucleotídica. Teóricamente, cualquier cambio en la secuencia genera confórmeros diferentes, los que presentarán diferencias en el patrón de separación de la molécula analizada cuando se la somete a una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. Esto significa que cualquier cambio en el patrón de separación comparado con un DNA prototipo, indica una mutación. La técnica estándar requiere de la generación de un fragmento de PCR y la desnaturalización por calor en presencia de formamida. Posteriormente, el producto desnaturalizado se incuba durante unos minutos a 0°C y se lo siembra en un gel de poliacrilamida nativo. Los productos son visualizados mediante tinción con plata o por autorradiografía de fragmentos marcados previamente con nucleótidos radiactivos.

Para detectar el máximo número de mutaciones puntuales, es necesario encontrar las condiciones óptimas de corrida para cada fragmento. Entre los parámetros que pueden alterar la movilidad electroforética están: la temperatura de corrida, el porcentaje de acrilamida, el grado de ionización de la acrilamida, la fuerza iónica del buffer de electroforesis y la concentración de glicerol en el gel.

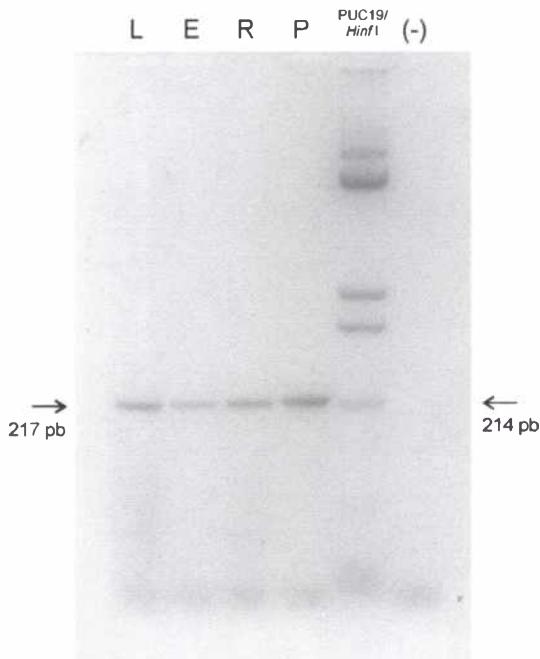
También, se analizó mediante predicción el plegamiento intracatenario de cada hebra de DNA (viral y viral complementaria) para los distintos fragmentos de 217 pb. Dicho análisis se realizó utilizando el programa MFOLD (Michael Zuker, 1999, 2003; Figura 6.7). Además, para seleccionar la temperatura óptima de electroforesis para el SSCP, se estudió la influencia de la misma sobre los confórmeros monocatenarios predichos.

## **SSCP DE CEPAS DEL VIRUS JUNÍN**

En base a los resultados predictivos, se diseñaron y sintetizaron dos oligonucleótidos (JS863V 5'-GCAAGGATACCCCTGGAGGCTAT-3' y JS1079VC 5'-GCATTGATTGTCTGYCCCATCAG-3') para utilizar como *primers* con el fin de amplificar por RT-PCR la región genómica correspondiente al fragmento de 217 pb con la finalidad de poder someterlo a un análisis de SSCP.



Utilizando estos *primers* se logró amplificar por PCR el fragmento de 217 pb esperado, a partir del cDNA de las cepas Ledesma, Espíndola, Romero y Parodi. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 2% y visualizados con bromuro de etidio (Figura 6.8).



**Figura 6.8**  
**RT-PCR de las cepas prototipo del virus Junín.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por RT-PCR usando el par de *primers* JS863V y JS1079VC sobre RNA celular total proveniente de células infectadas con las cepas prototipo Ledesma, Espíndola y Romero y con la cepa Parodi. La flecha de la izquierda señala el fragmento amplificado de un tamaño esperado de 217 pb. La flecha de la derecha indica la posición de la banda de 214 pb del plásmido pUC19 digerido con *Hinf* I utilizado como marcador de peso molecular. L: Ledesma; E: Espíndola; R: Romero; P: Parodi; (-): control negativo.

Como se detalla en el Capítulo 9 (Materiales y Métodos), la técnica de SSCP se realizó utilizando DNA proveniente de reacciones de amplificación por PCR. A estos fragmentos se les agregó formamida, se los desnaturalizó por calor, se los enfrió a 0°C y se los sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida 15% a 22°C. La corrida se realizó en una cuba de electroforesis que permite regular la temperatura.

Los patrones de migración de los conformeros correspondientes a ambas hebras de cada fragmento de PCR fueron visualizados mediante tinción con plata y resultaron sustancialmente diferentes para las distintas cepas analizadas (Figura 6.9).

Para la puesta a punto de la técnica del SSCP y con la finalidad de evitar la variabilidad encontrada en las poblaciones virales naturales, se realizaron ensayos con el fragmento de 217 pb amplificado por PCR a partir de clones de distintas cepas del virus Junín. Las cepas utilizadas fueron Ledesma, Romero y dos clones diferentes de la cepa Parodi. El SSCP de dichos fragmentos resultó en patrones de separación de bandas diferentes para cada una de las cepas. Los fragmentos obtenidos a partir de clones diferentes de la cepa Parodi presentaron el mismo patrón de migración (Figura 6.9 izquierda).

El análisis realizado con el fragmento de 217 pb obtenido por PCR a partir del cDNA de las cepas Ledesma, Espíndola, Romero y Parodi resultó, al analizarlos por SSCP, en un patrón idéntico al obtenido con los fragmentos amplificados a partir de clones. En este ensayo se incorporó el fragmento correspondiente a la cepa Espíndola que presentó una migración diferente a la del resto de las cepas ya analizadas (Figura 6.9 derecha).



**Figura 6.9**  
**SSCP del fragmento de 217 pb de las cepas prototipo del virus Junín.**

Las cuatro calles de la izquierda corresponden al fragmento amplificado a partir de clones de las cepas prototipo y la cepa Parodi. Las cuatro calles de la derecha corresponden a RT-PCRs a partir del RNA celular total. L: Ledesma; R: Romero; P1 y P2: dos clones diferentes de Parodi; E: Espíndola y P: Parodi.

#### ANÁLISIS DE MUESTRAS DE PACIENTES

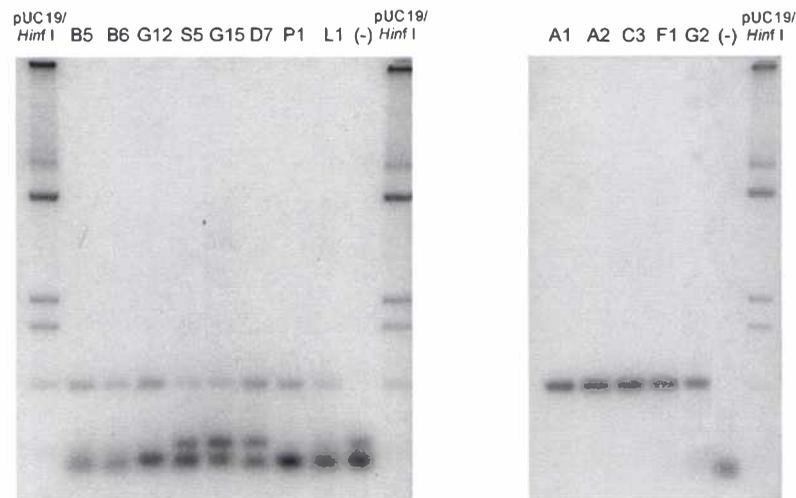
Las muestras de sangre utilizadas para realizar la extracción de RNA viral y la posterior síntesis del cDNA, se obtuvieron de pacientes con FHA hospitalizados en el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH), Pergamino, Argentina. Esos pacientes adquirieron la enfermedad durante el año 1991. Las muestras fueron tomadas dentro de los primeros días de admisión al hospital.

A las muestras de sangre se las inactivó inmediatamente con una solución 8 M de tiocianato de guanidinio (Lozano *et al.*, 1993a). Las sales de guanidinio actúan como un potente agente desnaturizante eliminando la infectividad de las muestras. Por esta misma razón, actúan como inhibidores de RNasas, preservando las muestras, lo que permitió el transporte a temperatura ambiente hasta el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM), UNLP, donde fueron analizadas.

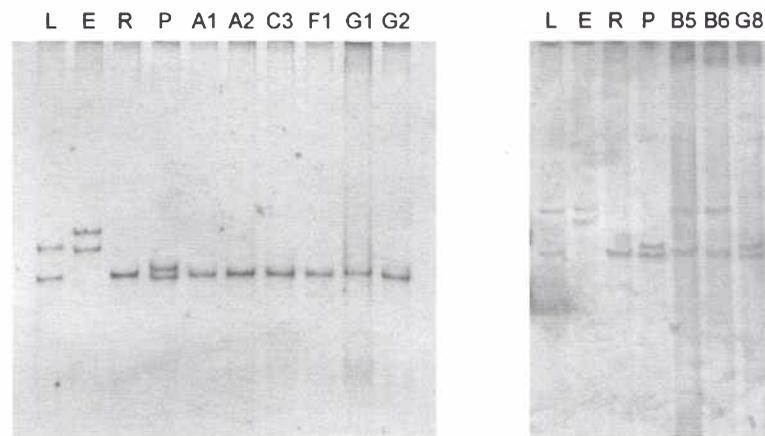
Para la obtención del RNA, a las muestras se les realizó una extracción con fenol ácido y se las precipitó con etanol. Utilizando la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV, Promega) y un oligonucleótido específico como *primer* se generó la primera cadena del cDNA. Ésta se precipitó con etanol y se utilizó como molde para las amplificaciones por PCR.

A partir de diluciones del cDNA de cada uno de los pacientes, se logró amplificar por PCR, de algunas de las muestras, el fragmento de 217 pb esperado utilizando el par de *primers* JS863V y JS1079VC.

Debido al bajo rendimiento obtenido en las amplificaciones por PCR a partir del cDNA, los fragmentos amplificados fueron sometidos a una reamplificación para obtener una cantidad suficiente de DNA que sea posible de analizar por SSCP (Figura 6.10). El análisis por SSCP de dichos fragmentos se muestra en la figura 6.11.

**Figura 6.10****RT-PCR a partir de RNA proveniente de pacientes con FHA.**

Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por RT-PCR usando el par de *primers* JS863V y JS1079VC sobre RNA celular total proveniente de sangre. B5, B6, G12, S5, G15, D7, P1, L1, A1, A2, C3, F1 y G2: pacientes; (-): control negativo.

**Figura 6.11****SSCP del fragmento de 217 pb obtenido por RT-PCR a partir de RNA celular total de sangre de pacientes con FHA.**

Los patrones de SSCP de los pacientes A1, A2, C3, F1, G1, G2 son semejantes a los de la cepa Romero (todos ellos presentaron una forma leve de FHA). Los patrones de los pacientes B5 y B6 (caracterizados como formas neurológica) son semejantes a los de la cepa Ledesma. La muestras G8 caracterizada como una forma hemorrágica presenta un patrón semejante al de la cepa Parodi (forma severa para humanos). L: Ledesma; E: Espíndola; R: Romero; P: Parodi; A1; A2; C3; F1; G1; G2; B5; B6 y G8 (pacientes).

## DISCUSIÓN

### INTRODUCCIÓN

La importancia de la determinación de características moleculares asociadas a la patogénesis se debe a que los Arenavirus han probado ser uno de los mejores modelos experimentales para entender la relación compleja entre los virus y sus hospedadores. En particular, estudios en infecciones en LCM generaron, y continúan generando, información fundamental acerca de la respuesta inmune, como la primera descripción de una respuesta inmune compleja inducida por virus (Oldstone y Dixon, 1969), la primera observación de la respuesta CD8+ restringida a MHC (Zinkernagel and Doherty, 1974) y la inducción por virus de las células NK (Welsh, 1978). A pesar del amplio conocimiento de la inmunobiología y de la patogénesis de la infección de LCM, existe solamente un conocimiento limitado de los mecanismos moleculares involucrados en el control de la replicación del genoma y de la expresión, y cómo se correlacionan estos procesos con la persistencia y la enfermedad. La comprensión de naturaleza de la patogenia, de la persistencia en las infecciones y la posibilidad de generación de vacunas contra los arenavirus patógenos requieren del un profundo conocimiento de la biología y la replicación de estos virus.

Con la finalidad de analizar las bases moleculares del comportamiento biológico se seleccionaron tres aislamientos del virus Junín (cepas patrón o prototipo) a partir de pacientes que contrajeron la fiebre hemorrágica argentina (Capítulo 4). La cepa Espíndola presentaba las características "hemorrágicas" severas de la enfermedad, la cepa Ledesma poseía una forma "neurológica" agresiva y la cepa Romero presentaba las características de la forma leve ("común") de la enfermedad. Para determinar si las diferencias clínicas de los aislamientos estaban asociados con los virus y no con la susceptibilidad de los individuos infectados, se infectaron *Macaca mulatta* con las distintas cepas observándose un estricto paralelismo entre los cuadros clínicos que manifestaban los monos con aquellos observados en los pacientes humanos (McKee *et al.*, 1985 y 1987).

### GLICOPROTEÍNAS VIRALES

Como se describe en el Capítulo 5, en este trabajo se logró obtener la secuencia nucleotídica del RNA S de cada una de las cepas y a partir de ésta se dedujo la secuencia aminoacídica de los productos génicos GPC y N, codificados por este RNA. Posteriormente, se realizó el análisis bioinformático de dichas secuencias.

El análisis de la proteína GPC de las cepas patrón del virus Junín, muestra que el péptido señal está constituido por los primeros 58 aminoácidos de la proteína, con una  $\alpha$  hélice de 47 residuos de longitud, coincidentemente con los datos informados para la mayoría de las otras cepas del virus Junín (con excepción de MC2; Ghiringhelli, 2002).

Existe evidencia en la literatura que indica que el clivaje proteolítico de la glicoproteína de superficie se relaciona con el tropismo y la virulencia en paramyxovirus y togavirus (Tashiro *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1995). Asimismo, se ha detectado la relación entre el patrón de glicosilación de las proteínas de ortomyxovirus y togavirus, y el fenómeno de atenuación (Despande *et al.*, 1987; Zheng *et al.*, 1989). En arenavirus se ha descrito que

un clivaje proteolítico apropiado es esencial para la infectividad, y que alteraciones en el procesamiento o estabilidad de las glicoproteínas virales probablemente afecten la tasa de crecimiento del virus (Ahmed *et al.*, 1991). En las cepas del virus Junín analizadas no se han encontrado diferencias en el sitio propuesto para el clivaje del precursor de las glicoproteínas ni en las regiones flanqueantes a éste. Además, hay un grado de conservación bastante estricto de los sitios de N-glicosilación de esta proteína. Sin embargo, en Ledesma se produce la pérdida de uno de los potenciales sitios de N-glicosilación (posición 357-360). Si bien se conoce que estos sitios son utilizados, no se sabe cuántos ni cuáles están glicosilados *in vivo*. La pérdida de este sitio en Ledesma podría indicar que no es un sitio de glicosilación indispensable para la infectividad viral o, inversamente, podría estar relacionado con el patrón neurológico característico de esta cepa. Por lo tanto, si bien el clivaje del precursor GPC no estaría relacionado con las diferencias del comportamiento biológico de las cepas, no es posible determinar el significado de la pérdida de este sitio de glicosilación.

La proteína G1 tiene una distribución más o menos regular de los aminoácidos hidrofóbicos y no hidrofóbicos, lo que resulta en una mayor probabilidad promedio de exposición al solvente y sugiere que podría ser una proteína soluble. Esta información es coincidente con la predicción computacional realizada para las cepas prototipo del virus Junín, que sugiere que las proteínas G1 son proteínas periféricas y con una conformación del tipo globular. Además, es coincidente con el modelo de Buchmeier *et al.* (1987; Burns and Buchmeier, 1993), donde se postula que la porción externa de las espículas virales está formada por tetrámeros de proteínas globulares (G1).

En cambio, la proteína G2 tiene una distribución menos regular, en la que existen grupos de aminoácidos hidrofóbicos. En particular, es necesario destacar la región delimitada por los residuos 172 a 196 (420-444 en GPC), rica en aminoácidos hidrofóbicos y con muy escasa probabilidad de exposición al solvente, características típicas de una región transmembrana. Este conjunto de datos sugiere que G2 podría ser una proteína asociada a membranas. Esta información es coincidente con el modelo propuesto por Buchmeier *et al.* (1987, 1993), quienes postulan que la base de las espículas virales está formada por tetrámeros de proteínas ancladas a membrana (G2). Dada la ausencia de cisteínas conservadas en la porción transmembrana dentro de los arenavirus, la asociación tetramérica estaría estabilizada por interacciones no covalentes.

Estudios en diferentes sistemas virales han demostrado que la variabilidad de las propiedades antigénicas, cambios en la atenuación y/o los patrones de virulencia o cambios en el tropismo celular están asociados, en parte, con alteraciones a nivel de las glicoproteínas de superficie. En este sentido, hay evidencias experimentales de que alteraciones de las proteínas de superficie producen cambios en el tropismo celular en alfavirus (Kobiler *et al.*, 1999), paramyxovirus (Schneider-Schaulies *et al.*, 2001) y arenavirus (Matloubian, 1993; Teng *et al.*, 1996), alteración de la virulencia en rotavirus y alfavirus (Zhang *et al.*, 1998a; Kobiler *et al.*, 1999) y persistencia en arenavirus (Salvato *et al.*, 1991). Por ejemplo, se ha demostrado que en poliovirus tipo 3 sustituciones de un aminoácido en las proteínas externas (VP3) son los responsables de cambios en el tropismo celular y de la atenuación de la virulencia (Wimmer *et al.*, 1993).

Hasta el momento, poco se ha podido establecer con claridad con respecto a la participación de alguna región genómica en particular, o sus productos codificados, en la patogenicidad de los arenavirus. Según la información disponible sobre la estructura del virus LCM, los tetrámeros formados por los polipéptidos G1 y G2, se asocian para formar las espículas insertadas en la envoltura lipídica (Burns y Buchmeier, 1991). Por este motivo sería esperable que los cambios en uno o ambos polipéptidos pudieran alterar la interacción temprana del virión con la célula hospedadora, afectando el tropismo tisular y/o la infectividad.

Existen evidencias dentro de la familia Arenaviridae de que la sustitución de un único aminoácido en la glicoproteína G1 de LCM produce un cambio en el tropismo celular (Teng *et al.*, 1996) y que la sustitución en esta región de un aminoácido diferente se correlaciona con la replicación selectiva en diferentes tipos celulares como linfocitos, macrófagos, células dendríticas o neuronas (Dockter *et al.*, 1996). Variantes atenuadas de Pichindé, luego de pasajes seriados en cobayos, se transformaron en altamente virulentas, postulándose que tres mutaciones sin sentido en la secuencia de proteínas de G1 serían las responsables del cambio en la virulencia (Zhang *et al.*, 1999b).

Coincidentemente con las publicaciones sobre otros sistemas virales, los resultados de este estudio sugieren que los cambios en las glicoproteínas de superficie podrían tener efecto sobre la virulencia y el tropismo celular en las cepas prototipo. Los resultados de la comparación de los genomas y productos génicos de variantes del virus Junín con distintos grados y patrones de virulencia podrían sugerir las causas moleculares de los diferentes comportamientos biológicos observados.

En estudios realizados en modelos animales (*Macaca mulatta*) sobre el comportamiento de distintos aislamientos del virus Junín, obtenidos tanto de pacientes humanos como de roedores, se ha encontrado un amplio espectro de virulencia. Distintos aislamientos exhibieron grados de virulencia variables: bajos, medios y altos, demostrando que las cepas atenuadas y virulentas coexisten en la naturaleza.

En el caso del virus Junín, las alteraciones en la glicoproteína G2 han sido propuestas como causantes de fenotipos atenuados. Además, los cambios de aminoácidos en dicha proteína pueden ser responsables de una alteración en la interacción entre el virus y el receptor celular en la etapa inicial del ciclo replicativo (Scolaro *et al.*, 1990).

En estudios comparativos de secuencias y de homología relativa de las cepas Espíndola, Romero y Ledesma analizadas en nuestro laboratorio, se han hallado cambios importantes en distintas regiones de la proteína GPC. Estas alteraciones podrían ser, en principio, potenciales responsables de las variaciones de tropismo y virulencia presentes en estas cepas del virus Junín.

Las infecciones virales persistentes en arenavirus conducen a la generación de variantes virales que poseen ventajas específicas de crecimiento en ciertos tejidos. La selección de estas variantes virales está determinada en cierta medida por los tejidos del hospedador (Ahmed *et al.*, 1984; Ahmed y Oldstone, 1988; Oldstone *et al.*, 1988). Este proceso de selección puede involucrar, entre otros factores, una interacción diferente de variantes virales con sus receptores celulares (Kunz *et al.*, 2002).

Después de la unión al receptor, los viriones son internalizados en grandes vesículas endocíticas, que no parecen estar asociadas con clatrina, y son enviados al interior del citoplasma por fusión dependiente del pH de las membranas endocíticas y las del virión. Con la disminución del pH, se produce la fusión y el complejo en forma de espícula que forman las glicoproteínas sufre cambios conformacionales irreversibles, que involucran la disociación de G1 del virión y la exposición de epitopes de G2, entre los que se encuentra el péptido de fusión (Borrow y Oldstone, 1994; Di Simone *et al.*, 1994; Buchmeier, 2002; Kunz *et al.*, 2002).

Ha sido demostrado que clones de linfocitos T CD4+ reconocen epitopes conservados entre los arenavirus del Viejo y del Nuevo Mundo, ubicados en el dominio de fusión propuesto por Glushakova *et al.* (1990) y Ghiringhelli (2002) en el extremo amino terminal de la proteína G2 (ter Meulen *et al.*, 2004; aa<sub>266-283</sub>, Apéndice 3). En esta región existen cambios de aminoácidos en las cepas en estudio (G→D<sub>265</sub> y V→L<sub>272</sub> en Espíndola, I→M<sub>282</sub> en Romero) que podrían interferir en el proceso de fusión de las membranas virales y celulares durante el proceso de infección.

Por otro lado existen varios ejemplos (paramyxovirus, sarampión) en los que cambios de residuos de aminoácidos por fuera del péptido fusogénico pueden resultar en la pérdida de actividad fusogénica y en la generación de cepas con la infectividad alterada (Epan, 2003). De acuerdo con la predicción PHDSEC, el cambio de una A por una P en la G2 de Ledesma produce la desestabilización de la  $\alpha$  hélice en esa zona. Las predicciones de estructura secundaria de esta región realizadas con el algoritmo de Garnier *et al.* (1978) también muestran que el plegamiento es diferente en las cepas en estudio y difiere con respecto a las otras cepas del virus Junín analizadas (Figura 6.6). Es posible que los cambios de aminoácidos en la región variable en el extremo amino terminal de G2 (aa<sub>311-314</sub> de la proteína GPC, Apéndice 3), que producen cambios en la estructura secundaria en regiones adyacentes al péptido de fusión, sean responsables de la modificación de la capacidad fusogénica de las membranas, lo que podría resultar en cambios en la infectividad viral.

Por otra parte, esta región (aa<sub>301-238</sub>) ha sido postulada como una estructura del tipo *coil-coiled*, que sería la responsable de las interacciones proteína-proteína que mantiene estabilizada la porción extracelular del tetrámero formado por G2, gracias a la presencia de aminoácidos hidrofóbicos repetidos cada 7 residuos (*heptad repeats*) según los descrito por Yu *et al.* (1996) (Apéndice 3).

#### ANÁLISIS DE REGIONES VARIABLES

Con la finalidad de buscar un posible marcador para detectar por SSCP las bases moleculares de las diferencias en patrón clínico, se construyeron los patrones de homología relativa correspondientes al marco de lectura del gen GPC y a la proteína GPC. En la región correspondiente al extremo amino terminal de la proteína G1 se detectó una región muy variable, tanto a nivel aminoacídico como nucleotídico. Sin embargo, la variabilidad en esta zona se extiende a toda la familia Arenaviridae y todas las variantes virales de distintos

arenavirus. Por esta razón, se la descartó como un posible marcador molecular asociado al patrón clínico de la enfermedad.

Por otra parte, en una zona próxima al extremo amino de G2 se detectaron varios cambios aminoacídicos. Cuando se analizan las secuencias de las distintas variantes del virus Junín, esta región aparece como variable en las cepas que presentan distintos patrones clínicos y casi constante en los distintos aislamientos que presentan patrones clínicos semejantes. Por esta razón, esta zona fue elegida como objeto de un análisis más detallado. En función de lo expuesto, se exploró la hipótesis de la correlación entre la estructura de esta zona y los diferentes comportamientos clínicos de las variantes virales. A partir de los patrones de homología, se seleccionó una región de 217 pb del gen G2, que presentaba varios cambios de secuencia nucleotídica como aminoacídica.

En base al análisis de las secuencias y de las predicciones computacionales del plegamiento intracatenario de las moléculas de DNA, se estimaron las condiciones óptimas para los ensayos de SSCP. Para la puesta a punto del método se utilizó el fragmento de 217 pb amplificado por RT-PCR a partir de las cepas Ledesma, Espíndola, Romero y Parodi. En las condiciones elegidas, las distintas cepas del virus Junín presentaron patrones de movilidad diferentes y característicos para cada una de ellas. En dicho patrón aparece, para cada cepa, un par de bandas que corresponden a los confórmeros de cada una de las hebras del DNA. Con finalidad de evitar la variabilidad encontrada en las poblaciones virales naturales, se realizaron ensayos con el mismo fragmento amplificado a partir de clones que resultaron en patrones idénticos a los obtenidos por RT-PCR, e idénticos entre sí al comparar dos clones de la misma cepa.

Además, se encontró una muy buena correlación entre los diferentes patrones de SSCP de las cepas prototipo utilizadas con aquellos obtenidos a partir de pacientes que presentaron síndromes clínicos equivalentes. El patrón de migración de las bandas provenientes de pacientes que padecieron una FHA del tipo leve (A1; A2; C3; F1; G1 y G2) fue semejante al de la cepa Romero, prototipo de la forma leve. El patrón de migración de las bandas provenientes de pacientes con síndrome neurológico (B5 y B6) fue coincidente con el de la cepa Ledesma, prototipo de la forma neurológica. La muestra G8, proveniente de un paciente con sintomatología descrita como grave, presentó un patrón semejante al de la cepa Parodi, forma severa de FHA. De las muestras analizadas, solo una presentó un comportamiento diferente a lo esperado. La muestra S5, obtenida de un paciente con una forma de FHA caracterizada como neurológica, dio un patrón semejante al de la cepa Romero.

Para poder evaluar las diferencias observadas en el patrón de SSCP de las muestras de pacientes respecto al comportamiento esperado es necesario, en primer lugar, ampliar el estudio utilizando un mayor número de muestras. Además, se requiere determinar la secuencia nucleotídica de dichos fragmentos y compararla con la de las cepas prototipo. En base a tales resultados, se debe analizar la importancia de dichos cambios y su influencia en la modificación de los patrones de SSCP. Además, se debe analizar en qué grado podrían influir dichos cambios en los diferentes comportamientos de los virus.

Estas relaciones deberán ser apoyadas con datos de secuencias de nuevas regiones seleccionadas de los genomas y analizadas en los aislamientos de virus de pacientes con

los patrones característicos de la enfermedad. Esta información permitirá ampliar la perspectiva para evaluar la importancia de algunos de los cambios de secuencia observados en los productos génicos en función de su conservación o variación en los distintos aislamientos virales.

Los resultados obtenidos hasta el presente sugieren que esta metodología puede ser utilizada para estudiar rápidamente un gran número de muestras y preseleccionar las de mayor interés para un análisis más detallado mediante secuenciamiento nucleotídico.

El análisis retrospectivo de muestras se vio obstaculizado debido a la dificultad encontrada para amplificar por RT-PCR las regiones seleccionadas a partir de aislamientos virales provenientes de pacientes. Probablemente, esto se deba a la mala conservación de las muestras, ya que ensayos realizados sobre muestras en buen estado de conservación han podido ser usadas con resultados positivos. Esta dificultad podría salvarse realizando un estudio prospectivo de muestras a partir de pacientes. Sin embargo, en los últimos años, debido a las campañas de vacunación que se llevan a cabo entre la población de riesgo, el número de casos ha disminuido considerablemente por lo cual, la obtención de un número estadísticamente importante de muestras requeriría de un tiempo considerablemente más largo que el estimado para el presente estudio.

#### EVALUACIÓN DE CANDIDATOS RESPONSABLES DE LAS DIFERENCIAS FENOTÍPICAS

De la comparación de las diferencias en las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas predichas encontradas en las cepas prototipo y en los aislamientos de pacientes, se podrían sugerir cuáles de aquellos cambios tendrían incidencia en la respuesta biológica y se podrían descartar aquellos cambios que no estuvieran relacionados directamente con los distintos comportamientos biológicos observados.

Este trabajo debe ser considerado como parte de la primera etapa de identificación de regiones en el genoma del virus Junín relacionadas a un patrón de virulencia particular. Teniendo en cuenta que el análisis fue restringido al RNA S, no se puede descartar que la responsabilidad de los cambios en el tropismo celular y de la atenuación de la virulencia se deban a otras alteraciones, tales como sustituciones de nucleótidos en las regiones no codificantes o cambios en regiones genómicas no analizadas en este estudio (proteína N) o desconocidas hasta el momento (RNA L y/o sus productos génicos). Tampoco habría que descartar la posibilidad de un esquema más complejo, que involucre la participación simultánea de mutaciones múltiples en los RNA genómicos S y L, como se ha reportado en otros sistemas virales (Snyder *et al.*, 1988).

Para llegar a conclusiones definitivas, los cambios de secuencias identificados en el presente proyecto deberían ser introducidos en forma dirigida en el genoma viral mediante genética reversa, metodología que permite el rescate de virus infectivos a partir de cDNAs clonados. Analizando las propiedades de los virus recombinantes generados podrán identificarse las regiones del genoma asociadas a los cambios de virulencia.

La comprensión de la base genética de la atenuación de la virulencia ha progresado significativamente con el uso de virus recombinantes obtenidos a partir de cDNAs infectivos de virus con genomas no segmentados como el de la rabia, el virus respiratorio sincisial y el

del sarampión (Schnell *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1995; Radecke *et al.*, 1995), y también de virus con genomas segmentados como bunyavirus e influenza (Bridgen and Elliott, 1996; Neuman *et al.*, 1999).

Sin embargo, la genética reversa aún no ha podido ser aprovechada como herramienta en el estudio de los arenavirus, debido a que los RNAs genómicos de polaridad negativa o ambisense, no son traducidos por los ribosomas de la célula hospedadora y en consecuencia, la transcripción y replicación posterior dependen de las proteínas aportadas por el virión. Pérez y de la Torre (2003) encontraron que las secuencias conservadas en los extremos 3' y 5', la integridad del *panhandle* predicho y la región intergénica serían los elementos en *cis* necesarios para la síntesis de RNA por la replicasa viral. Además, Lee *et al.* (2000) demostraron que las proteínas L y N son los factores en *trans* mínimos requeridos para una síntesis eficiente de RNA viral por la polimerasa de LCM. Sin embargo, para el ensamblado y la brotación de partículas virales infectivas también son necesarias las glicoproteínas virales y la proteína Z (Lee y de la Torre, 2002).

La genética reversa ha sido desarrollada recientemente para virus *ambisense* (Lee *et al.*, 2000; Lee y de la Torre 2002; Pérez y de la Torre, 2002), reportándose por primera vez la reconstrucción de un arenavirus modificado por ingeniería genética en el año 2003 (Pinschewer *et al.*, 2003). En este modelo, en el cDNA del RNA S de LCM se sustituyó el gen GPC por el gen de las glicoproteínas del virus de la estomatitis vesicular (VSV) y fue producido intracelularmente bajo el control del promotor de la RNA polimerasa I. La infección de las células transfectadas con el virus LCM salvaje aportó los elementos en *trans* y permitió la reasociación del RNA L salvaje con el RNA S recombinante (LCM/VSV). La selección de los reasociantes que poseen el RNA S recombinante se llevó a cabo en células defectivas en la proteasa S1P, basado en que la infectividad viral requiere del procesamiento correcto de las glicoproteínas de LCM por esta enzima.

Por lo tanto, debido a que aún no se ha desarrollado un sistema de genética reversa para el virus Junín, se ha optado por una estrategia más conservadora que apunta a establecer correlaciones en función de la consistencia de los resultados obtenidos a partir de casos que presenten los mismos patrones clínicos.

## CAPÍTULO 7

### DESARROLLO DE UN MÉTODO DE TIPIFICACIÓN GENÉTICA BASADO EN RT-PCR - RFLP

#### POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

Al comparar genomas diferentes (de especies distintas o de diferentes individuos de la misma especie), se evidencia que existen polimorfismos de secuencia. Éstos corresponden a pequeñas diferencias de secuencia (generalmente cambios de pares de bases únicos) que aparecen en promedio una vez cada pocos cientos de pares de bases. Algunos de estos cambios afectan a sitios de corte de enzimas de restricción, originando diferencias en los tamaños de ciertos fragmentos de DNA producidos al digerir con dichas enzimas. Estas diferencias de tamaño se conocen como polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción o RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*).

Entre las ventajas de trabajar con RFLPs se puede destacar que con este método, la colección de datos y la detección de los polimorfismos puede ser muy rápida y no hay necesidad de conocer la secuencia nucleotídica del DNA a analizar. Además, la similitud o diferencia entre los patrones generados puede ser utilizada para diferenciar especies, cepas o incluso individuos entre sí.

Esta técnica se puede utilizar en combinación con la RT-PCR (Capítulo 9: Materiales y métodos), en la que a partir de muestras de RNA se puede realizar la transcripción reversa, la amplificación por PCR y la digestión con enzimas de restricción de los productos de amplificación para analizar los polimorfismos.

#### DISEÑO DE PRIMERS GENERALIZADOS PARA ARENAVIRUS

Como se explicó en el Capítulo 3, se sabe que todos los miembros de la familia Arenaviridae caracterizados hasta el momento comparten una región muy conservada de 19 nucleótidos en el extremo 3' de sus RNAs S (Romanowski, 1993). Esta secuencia es también altamente conservada en los RNAs L. Además, estas secuencias poseen un alto grado de complementariedad con los extremos 5' de los RNAs L y S, entre los que se produce el apareamiento de bases que conduce a la formación de una estructura secundaria del tipo *panhandle*.

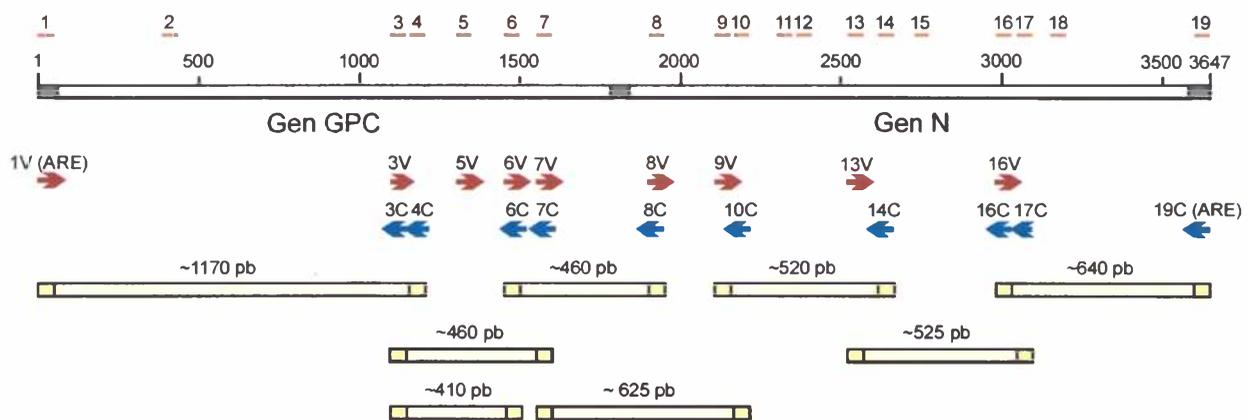
A partir de las secuencias nucleotídicas del RNA S reportadas al momento de iniciar estos análisis (GENBANK, *National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA*), se realizaron alineamientos múltiples y sobre éstos se determinó la secuencia consenso. El análisis de los alineamientos de secuencias permitió identificar regiones que probablemente también serían conservadas entre los arenavirus no caracterizadas hasta el momento.

Para la construcción de un alineamiento múltiple se utilizaron las secuencias nucleotídicas del RNA S de los arenavirus LCM, cepas Armstrong y WE, Mopeia, Lassa, cepas Josiah y Nigeria, Pichindé, Tacaribe, Junín, cepas MC2 y XJ-Parodi, Oliveros y Sabiá. La información de secuencia fue procesada y analizada en una computadora MicroVax 3100 (Digital) usando el paquete de programas GCG (Genetic Computer Group, Sequence

Analysis Software Package, Versión 7.1, University of Wisconsin). Los alineamientos de secuencia se realizaron con el programa PILEUP con los parámetros standard y la secuencia consenso se obtuvo con el programa PRETTY.

Además de las regiones ya descritas en los extremos de los RNAs S y L, el análisis del alineamiento permitió la detección de 17 regiones conservadas adicionales (Figura 7.1). Tiempo después, la incorporación de datos de secuencia de arenavirus caracterizados recientemente permitió ampliar este análisis y fue posible comprobar la presencia de todas las regiones conservadas en las nuevas especies virales.

Tomando como base a las secuencias consenso correspondientes a las regiones conservadas se diseñaron *primers* generalizados para la familia Arenaviridae, con los que es posible amplificar por RT-PCR distintos fragmentos genómicos de cualquiera de los miembros de la familia. (Figura 7.1).



**Figura 7.1**

**Diseño de *primers* generalizados para arenavirus.**

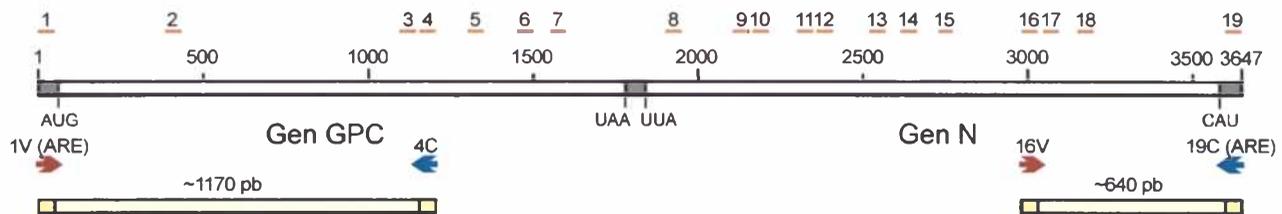
La barra superior representa el RNA S de los arenavirus. Las regiones grises corresponden a las secuencias no codificantes y las blancas a las codificantes. Los números indican la posición relativa en el archivo de comparación obtenido con el PILEUP. Las líneas naranjas encima del RNA S (1 al 19) indican las posiciones de las regiones conservadas. Las posiciones de los *primers* generalizados (serie ArS, por arenavirus RNA S) están indicadas con flechas debajo del RNA S, designados con un número y una letra indicando su polaridad (V para viral, en color rojo y C para viral complementaria, en azul). Las longitudes de las regiones conservadas y los *primers* no están dibujadas a escala; los extremos 3' de los *primers* corresponden a las puntas de las flechas. Las barras amarillas representan a un set de fragmentos de amplificación por RT-PCR, que por combinación de los diferentes *primers* generalizados, permiten amplificar la totalidad del RNA S de los arenavirus. Encima de cada fragmento se indica el tamaño en pares de bases (pb). Los *primers* ArS1V y ArS19C son equivalentes al *primer* ARE (ver Capítulo 5) por lo que, para este caso en particular, se conservará esta nomenclatura.

Los *primers* fueron diseñados con al menos 5 bases consecutivas estrictamente conservadas en el extremo 3'. Para el resto de las 15-17 bases, el *primer* no debía ser diferente en más de un 20% con respecto a las secuencias del alineamiento y además, donde fuera posible, se permitieron degeneraciones para aumentar el apareamiento con cualesquiera de los RNAs S de los arenavirus. En general, se prefirieron aquellos *primers*

que presentaran el menor número de diferencias con las secuencias alineadas más que con respecto al consenso estricto en esa región.

Cada *primer* fue designado con el prefijo "ArS" (indicando su presencia en común a todos los RNAs S de la familia Arenaviridae) seguido por un número que identifica la región conservada (del 1 al 19) y una letra que identifica la polaridad (V para los *primers* de polaridad viral o genómica y C para los de polaridad complementaria o antígenómica). Las secuencias de los *primers* se detallan en el apéndice 5 (*Primers* conservados para el RNA S de arenavirus). Los *primers* ArS1V y ArS19C son equivalentes al *primer* ARE (ver Capítulo 5) por lo que, para este caso en particular, se conservará esta nomenclatura.

Debido a que estas regiones están distribuidas a lo largo de todo el genoma, estos *primers* podrían ser usados para obtener al menos 7 fragmentos de amplificación superpuestos que abarcan el RNA S completo (Figura 7.1). Seis de los productos (en promedio 600 pb de longitud) podrían ser secuenciados sin ser subclonados. Debido al bajo grado de conservación que posee el extremo 5' del gen GPC, no fue posible sintetizar en dicha región *primers* generalizados, por lo que el fragmento de amplificación resultante a partir de una RT-PCR en esa zona genera un fragmento relativamente grande de aproximadamente 1170 pb (Figura 7.2).



**Figura 7.2**

**Primers seleccionados para la RT-PCR-RFLP.**

Representación esquemática del RNA S genómico de los arenavirus y de los *primers* utilizados en la RT-PCR. La barra representa el RNA S de los arenavirus. Dentro de ésta, las áreas blancas corresponden a las secuencias codificantes y las zonas grises a las secuencias no codificantes. Los números indican la posición relativa en el archivo de comparación obtenido con el PILEUP. Las líneas naranja encima del RNA S indican las posiciones de las regiones conservadas. Las barras amarillas representan a los fragmentos candidatos para utilizar en la RT-PCR-RFLP. Los *primers* generalizados utilizados para amplificar estos fragmentos están indicadas con flechas debajo del RNA S. Su polaridad está indicada con colores (viral, en rojo y viral complementarias, en azul). Las longitudes de las regiones conservadas y los *primers* no están dibujadas a escala; los extremos 3' de los *primers* corresponden a las puntas de las flechas. Encima de cada fragmento se indica el tamaño en pares de bases (pb).

## CARACTERIZACIÓN DE ARENAVIRUS POR RT-PCR-RFLP

A partir de la información de secuencia nucleotídica disponible, se construyeron los mapas de restricción con las enzimas *Ava* I, *Dde* I, *Dra* I, *Hae* III y *Hinf* I para cada uno de los 7 fragmentos de amplificación, utilizando el programa MAPLOT (UW-GCG). El análisis de los mapas reveló polimorfismos de longitud en los fragmentos (RFLP).

En base a los mapas de restricción particulares se identificaron aquellas enzimas que, para los diferentes fragmentos, generan patrones característicos y unívocos para cada arnavirus. Los patrones de restricción elegidos fueron los que permitieron diferenciar a todos los arnavirus analizados. En esta elección también se tuvo en cuenta que los productos de la digestión tengan diferencias de tamaño suficientes de modo que puedan ser resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa.

De la comparación de todos los mapas de restricción generados se eligió al producto de digestión con la enzima *Hinf* I del fragmento amplificado con los *primers* ARE-ArS16V, por presentar las características deseadas. Este fragmento corresponde al extremo 3' del RNA S y posee aproximadamente 600 pb (Figura 7.2).

El patrón con *Hinf* I del fragmento ARE-ArS16V fue ensayado experimentalmente, posee un tamaño apropiado y está ubicado dentro del gen N, que no presenta una variabilidad importante en esa región.

A partir de los datos de secuencia disponibles en los bancos de datos, se determinó para cada uno de los arnavirus la secuencia de los posibles fragmentos de amplificación por RT-PCR utilizando los *primers* ARE/ArS16V. Las diferencias en los tamaños de estos fragmentos se deben principalmente a inserciones y deleciones en las secuencias de la región no codificante del extremo 3' del RNA S. Para dichos fragmentos se calculó el patrón de restricción con *Hinf* I esperado y se elaboró una figura con los fragmentos generados en la que se los representa simulando una electroforesis en gel. Esta figura permite comparar fácilmente los patrones de restricción obtenidos para los diferentes virus (Figura 7.3).

En una primera instancia se realizó este análisis con los virus Junín (cepas MC2 y XJ44), Machupo, Tacaribe, Oliveros, Pichindé, LCM (cepas WE y Armstrong), Lassa (cepas Josiah y Nigeria), Mopeia y un nuevo virus, no caracterizado hasta ese momento, el que posteriormente fue denominado Pampa. A medida que se fue disponiendo de nuevas secuencias nucleotídicas de arnavirus, se adicionó la información correspondiente a las cepas del virus Junín Espíndola, Ledesma y Romero, caracterizadas en la presente tesis, y a los virus Amapari, Flexal, Guanarito, Latino, Paraná, Pirital, Whitewater Arroyo, Allpahuayo, Cupixi, Bear Canyon y otro nuevo virus, no caracterizado hasta ese momento, al que se denominó, provisionalmente, Río Carcarañá (Figura 7.3).

#### IDENTIFICACIÓN DE ARENAVIRUS POR RT-PCR-RFLP

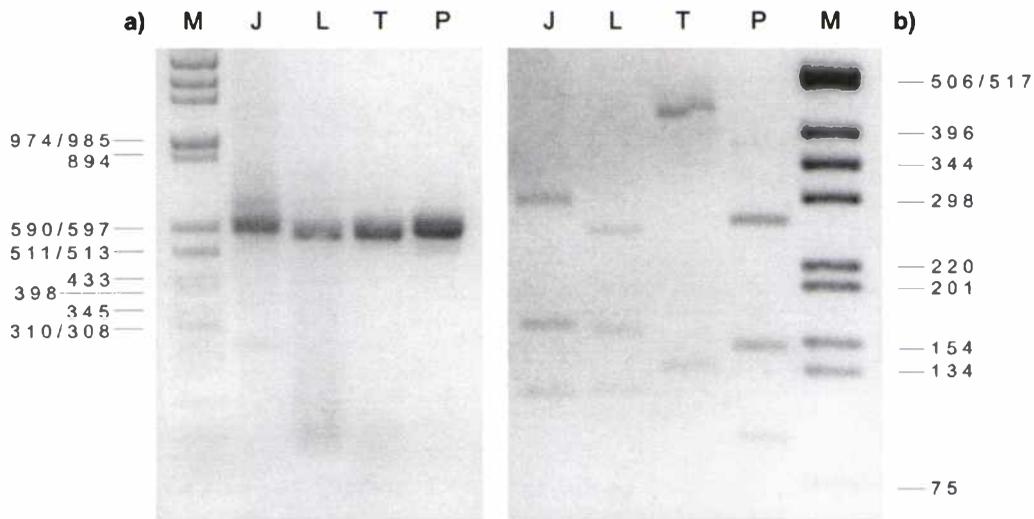
Se realizó el análisis por RT-PCR-RFLP para tipificar los fragmentos amplificados a partir del cDNA de arnavirus del Viejo Mundo y del Nuevo Mundo. El par de *primers* ARE/ArS16V fue utilizado en una reacción de RT-PCR sobre muestras de RNA de los arnavirus JUN (cepas MC2, Espíndola, Ledesma y Romero), TAC y LCM. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa (Figuras 7.4a y 7.5a). Los fragmentos amplificados, de 600 pb aproximadamente, fueron purificados a partir del gel y digeridos con *Hinf* I (Figuras 7.4b y 7.5b). Los tamaños de los fragmentos de amplificación así como los tamaños de las bandas del patrón de restricción de dichos fragmentos se

| LCM WE | LCM Arm | LAS Jos | LAS Nig | MOP | PAR | FLE | PIC | ALL | PIR | WWA | BCN | OLV | LAT | AMA | GTO | CPX | TAC | MAC | JUN Par | JUN XJ44 | JUN Cd1 | JUN MC2 | JUN Esp | JUN Led | JUN Rom | PAM | RCÑ |
|--------|---------|---------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|-----|-----|
| 587    | 587     | 639     | 641     | 606 | 600 | 574 | 610 | 579 | 575 | 581 | 584 | 612 | 595 | 576 | 576 | 581 | 600 | 591 | 605     | 605      | 605     | 605     | 605     | 605     | 605     | 617 | 612 |
|        |         | 376     | 503     |     |     | 454 |     | 366 | 417 |     |     |     | 354 | 434 |     | 427 |     |     |         |          |         |         | 460     | 460     |         |     | 365 |
| 257    | 293     | 253     |         |     | 339 |     |     | 366 |     | 306 |     | 318 |     |     | 259 | 315 |     | 289 | 293     | 293      | 293     | 293     |         |         |         | 271 |     |
| 164    |         |         |         | 211 |     |     | 236 |     | 187 |     | 232 |     |     |     |     |     |     |     | 191     | 167      | 167     | 167     |         |         |         |     |     |
| 122    |         |         | 138     | 171 | 145 |     | 203 | 124 |     |     |     | 146 |     |     |     | 119 | 136 | 103 | 121     | 121      | 121     | 121     | 121     | 121     |         | 150 | 128 |
|        |         |         |         | 142 |     |     | 116 | 89  | 88  | 88  |     | 124 | 114 | 74  | 92  | 97  |     | 82  |         |          |         |         |         |         |         |     | 119 |
|        |         |         |         |     | 69  |     |     |     | 70  |     | 61  |     | 103 |     | 82  |     |     |     |         |          |         |         |         |         |         | 95  |     |
|        |         |         |         |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     |     | 50  |     |     |     |     |         |          |         |         |         |         |         |     |     |
| 37     |         |         |         | 45  | 47  | 47  |     |     |     |     | 41  |     |     |     | 37  | 37  |     | 54  |         |          |         |         |         |         |         | 54  |     |
|        |         |         |         | 37  |     |     |     |     |     |     | 20  | 24  | 24  | 18  |     |     |     | 39  |         |          |         | 24      | 24      | 24      | 24      | 47  |     |
| 7      |         |         |         |     |     | 14  |     |     |     |     |     |     |     |     | 17  |     |     | 24  |         |          |         | 24      | 24      | 24      |         |     |     |

Figura 7.3

**Caracterización de arnavirus por RT-PCR-RFLP.**

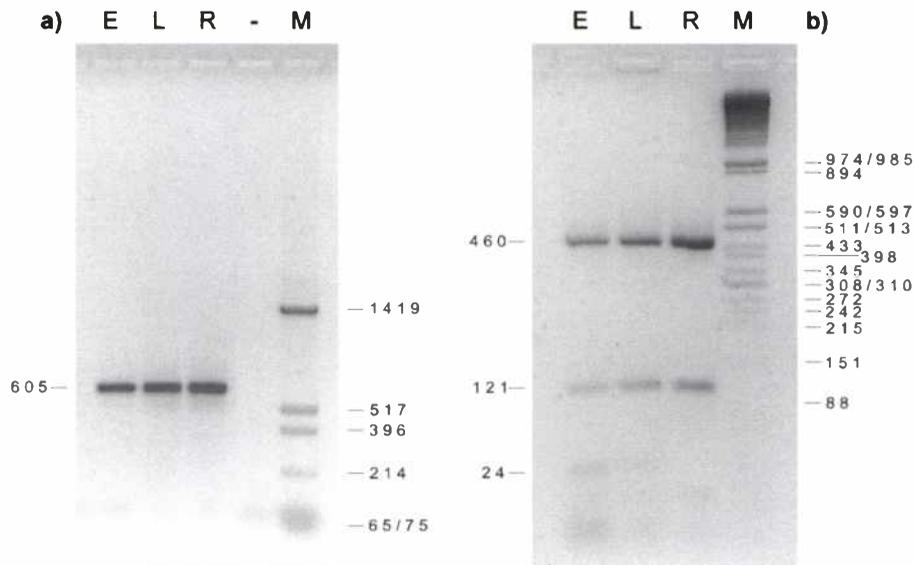
Patrones de restricción con *Hinf* I esperados para los fragmentos amplificadas por RT-PCR, usando los *primers* ARE/ARS16V sobre el RNA S de los arnavirus de los que se conoce la secuencia nucleotídica de este fragmento. En la parte superior de cada columna se indican el nombre del virus y la longitud correspondiente al fragmento amplificado. Debajo, los números encerrados por los rectángulos representan los fragmentos de restricción con sus tamaños esperados, como si hubieran sido resueltos por medio de una electroforesis en gel. En amarillo se indican aquellos virus con los cuales se generaron productos de amplificación por RT-PCR y se realizaron RFLPs. En el patrón de Guaranito falta una banda de 89 pb que estaría superpuesta con las de 92 y 82 pb. LCM-WE; cepa WE del virus LCM; LCM-Arm, cepa Armstrong del virus LCM; LAS-Jos, cepa Josiah del virus Lassa; LAS-Nig; cepa Nigeria del virus Lassa; MOP, Mopeia; PAR, Paraná; FLE, Flexal; PIC, Pichindé; ALL, Alipahuayo; PIR, Piritai; WWA, Whitewater Arroyo; BCN, Bear Canyon; OLV, Oliveros; LAT, Latino, AMA, Amapani; GTO, Guaranito; CPX, Cupixi; TAC, Tacaribe; MAC, Machupo; Jun Par, cepa XJ-Parodi del virus Junín; Jun XJ44, cepa XJ44 del virus Junín; Jun Cd1, cepa Candid #1 del virus Junín; JUN MC2, cepa MC2 del virus Junín; JUN Esp, cepa Espindola del virus Junín; JUN Led, cepa Ledesma del virus Junín; JUN Rom, cepa Romero del virus Junín; PAM, Pampa y RCÑ, Río Carcarañá.



**Figura 7.4**

**Análisis por RT-PCR y RFLP del RNA S de arenavirus.**

a) Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por amplificación por RT-PCR usando el par de *primers* ARE/ArS16V sobre RNA celular total obtenido a partir de células BHK21 infectadas con los virus Junín (cepa MC2); LCM (cepa WE); Tacaribe y Pampa. b) Digestiones con la enzima de restricción *Hinf* I de estos fragmentos (RFLP). Los números indican los tamaños de las bandas de los marcadores de peso molecular en pares de bases. M, marcador de peso molecular (a:  $\lambda$ /Ava II; b: 1kb DNA ladder, BRL); J, cepa MC2 del virus Junín; L, cepa WE del virus LCM; T, virus Tacaribe; P, virus Pampa.



**Figura 7.5**

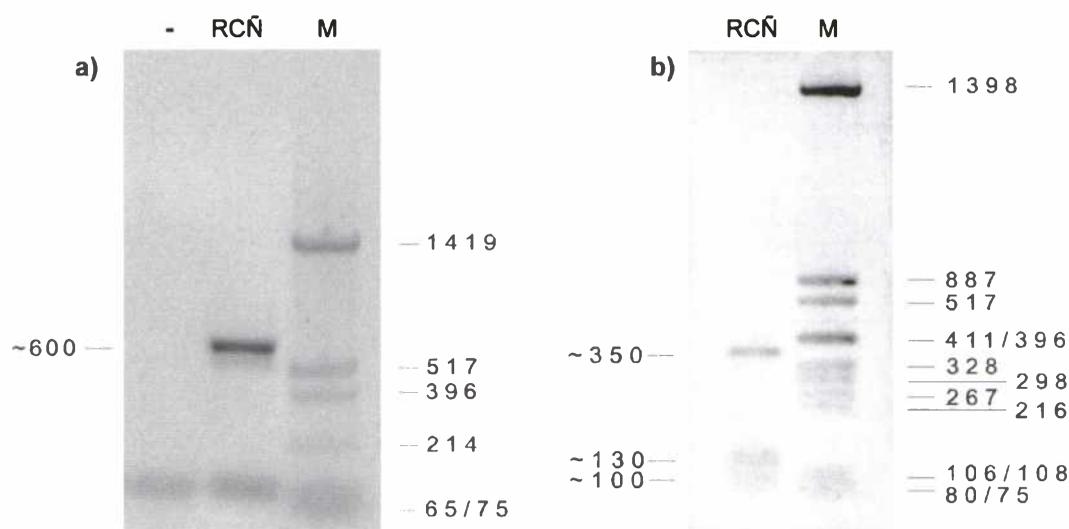
**Análisis por RT-PCR y RFLP de diferentes cepas del virus Junín.**

a) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por RT-PCR usando el par de *primers* ARE/ArS16V sobre RNA celular total obtenido a partir de células BHK21 infectadas con las cepas Espíndola, Ledesma y Romero del virus Junín. b) Digestiones con la enzima de restricción *Hinf* I de estos fragmentos (RFLP). Los números indican los tamaños de las bandas en pares de bases. E: cepa Espíndola del virus Junín; L: cepa Ledesma del virus Junín; R: cepa Romero del virus Junín; (-): control negativo; M: marcador de peso molecular (a: pUC19/*Hinf* I; b:  $\lambda$ /Ava II).



A partir de células infectadas se aisló el RNA total y se amplificó por RT-PCR generándose un producto de amplificación de aproximadamente 600 pb, utilizando el par de *primers* ARE/ArS16V, coincidente con el tamaño esperado para el mismo fragmento en el resto de los miembros de la familia. La digestión con *Hinf* I del fragmento amplificado presentó un patrón de bandas diferente al de los otros arenavirus analizados (Figura 7.6a y b) y diferente de los patrones calculados a partir de las secuencias rpublicadas del RNA S de los arenavirus (Figura 7.3). Estos resultados sugirieron la presencia de un nuevo aislamiento al que se lo denominó, tentativamente, Río Carcarañá (RCÑ), por haber sido encontrado en un roedor capturado en las cercanías de este río.

Para obtener mayor información sobre este aislamiento, este fragmento y algunos otros fueron secuenciados parcialmente y se comparó la secuencia con las regiones homólogas del resto de los arenavirus. Como resultado de las comparaciones se observó que en algunas regiones había una alta homología con el virus Junín y mientras que en otras la homología era mayor con el virus Oliveros, lo que sugería la posibilidad de que se tratara de un recombinante natural. Por lo tanto se decidió avanzar en la caracterización de este virus, la que se describe el Capítulo 8 (Caracterización del RNA S de Río Carcarañá).



**Figura 7.6**

**Análisis por RT-PCR y RFLP de nuevos arenavirus.**

**a)** Electroforesis en gel de agarosa de producto de amplificación por RT-PCR a partir del RNA de un nuevo arenavirus usando el par de *primers* ARE/ArS16V. **b)** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión con *Hinf* I del fragmento amplificado. Los números indican los tamaños de las bandas en pb. Las longitudes de los fragmentos producto de la digestión son diferentes a aquellas obtenidas para los arenavirus conocidos hasta el momento. (-): control negativo; RCÑ: Río Carcarañá; M: marcadores de peso molecular.

## ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Los análisis filogenéticos moleculares pueden proveer información de la relación entre virus a diferentes niveles. Es posible realizar este tipo de análisis para evidenciar los

patrones de semejanzas entre las diferentes familias virales, para describir las relaciones entre las especies dentro de una familia o para relacionar distintas variantes de una misma especie viral.

Si bien las relaciones entre especies virales pueden analizarse a partir de diferentes tipos de datos como la reactividad serológica, el tamaño y la organización del genoma o composición proteica, las comparaciones filogenéticas de virus pueden proporcionar una descripción cuantitativa mucho más precisa y detallada de las relaciones entre ellos y además pueden aportar información sobre los pasos evolutivos que condujeron a las situaciones actuales. A un nivel más práctico, estas aproximaciones proporcionan herramientas para investigaciones epidemiológicas detalladas, en las cuales se pueden seguir los patrones y dinámica de dispersión de cada rama individual de virus, así como la variación de secuencia en el curso de una epidemia. La definición precisa de linajes virales generada por datos de secuencia permite también la investigación de una posible correlación entre las variaciones a nivel del genoma con la virulencia, el tropismo celular o tisular, el rango de hospedadores u otra propiedad biológica importante.

A partir de un set de secuencias alineadas, los métodos de filogenia molecular permiten generar árboles filogenéticos que intentan reconstruir la historia de los pasos sucesivos que tuvieron lugar durante la evolución. Con dicha estrategia es posible realizar una clasificación que refleje las relaciones genealógicas y establecer una reconstrucción hipotética de la filogenia.

Normalmente, en los análisis filogenéticos se incorpora un set de datos adicional (grupo externo o *outgroup*) que puede ser una unidad taxonómica considerada ancestral dentro del grupo en estudio o un grupo emparentado con el grupo en estudio pero que no pertenece a éste. Esto se realiza con el objeto de enraizar los árboles y de normalizar las ramas de los árboles con respecto a la longitud de las ramas del *outgroup*. Durante la construcción de los árboles se seleccionaron como *outgroup* diferentes especies de arenavirus del Viejo Mundo, pero siempre se generaban árboles en los que la especie elegida estaba separada topológicamente del resto; incluso se separaban las cepas de una misma especie. Para evitar este inconveniente y ante la imposibilidad de utilizar algún virus emparentado debido a que la distancia filogenética es muy grande con cualquiera de las familias virales conocidas, se utilizó como *outgroup* la secuencia consenso de los arenavirus. Si bien este *outgroup* es discutible, el objetivo de utilizarlo es solamente enraizar el árbol y evitar que alguno de los taxa en estudio resulte apartado del resto por un problema metodológico producido por el algoritmo, no relacionado con la distancia filogenética. Por lo tanto, tampoco fue incluido en los árboles.

Las secuencias nucleotídicas de las cepas Espíndola, Ledesma y Romero fueron obtenidas en el presente trabajo de tesis. Las restantes cepas del virus Junín fueron secuenciadas por miembros de nuestro laboratorio. Las secuencias del resto de los Arenavirus se obtuvieron a través del GenBank (*National Institutes of Health, Bethesda, Maryland*). A partir de todas ellas se buscaron los marcos de lectura abiertos y se dedujo la secuencia aminoacídica de los genes GPC y N. Como se explica más adelante, para la construcción de los árboles se prefirió utilizar las secuencias aminoacídicas que resultan mucho más conservadas que las secuencias nucleotídicas.

Los alineamientos de las secuencias se realizaron con el programa PILEUP (GCG-University of Wisconsin) en una computadora Ultra2, Sun Microsystems Inc. El análisis filogenético se realizó procesando los alineamientos de secuencias con el programa PHYLIP (*Phylogeny Inference Package*, Felsenstein, 1989 y 2002) en una computadora personal.

A partir de los alineamientos de secuencias se generaron 1000 sets de datos que consisten en un remuestreo (*sequence bootstrapping*) de la versión ingresada utilizando la rutina SEQBOOT. El método trabaja tomando muestras de datos al azar con reemplazos a partir de los datos iniciales y sirve para calcular los límites de confianza de los árboles. La variación entre los árboles generados por muestreo y el árbol obtenido a partir de los datos originales da una idea de la forma en que está representada la información en dicho árbol. La variación al azar de los sets de datos generados por *bootstrapping* es estadísticamente equivalente a la variación que se puede obtener al coleccionar nuevos sets de datos. Para comprender el significado de los valores de *bootstrapping* que aparecen en la base de las ramificaciones, se ha estimado en base a cálculos estadísticos (con un nivel de significación del 5%), que se puede hablar de un grupo monofilético si éste se encuentra representado en, por lo menos, el 95% de los árboles.

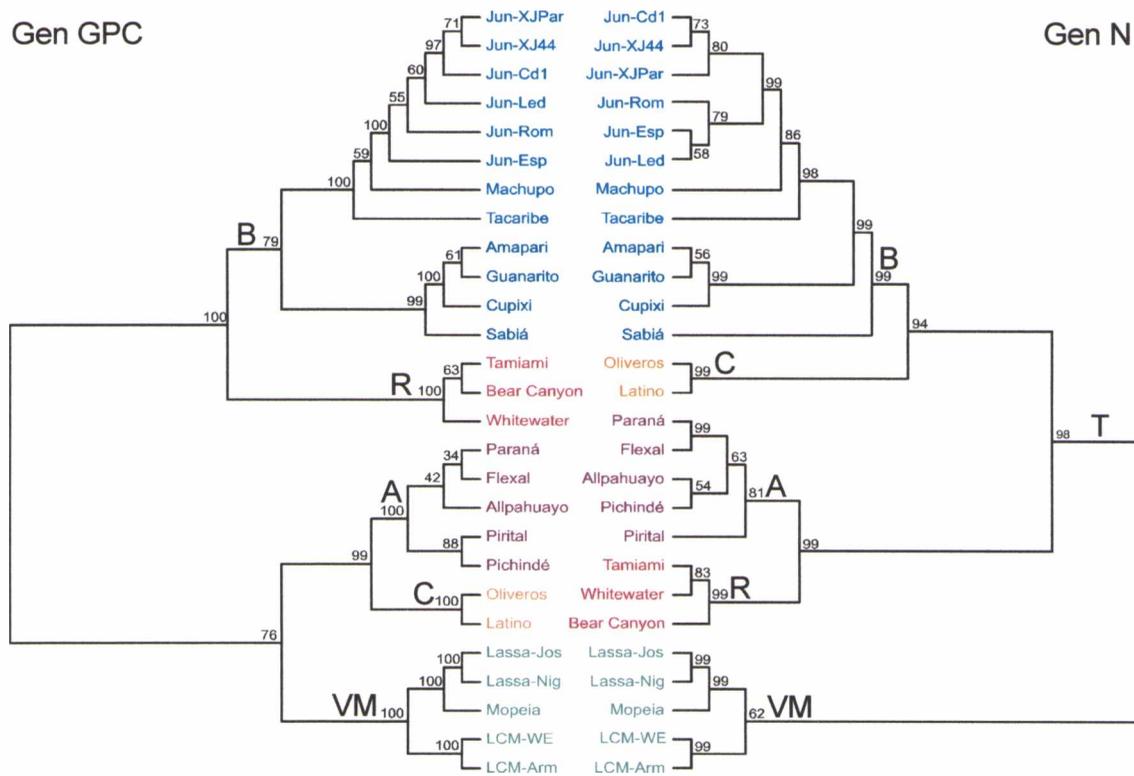
Los árboles filogenéticos fueron generados por el método de parsimonia (PROTPARS, *Protein sequence parsimony method*). Este criterio consiste en determinar el número mínimo de cambios (sustituciones) requeridos para transformar una secuencia en su vecina más cercana. El algoritmo de máxima parsimonia busca el número mínimo de eventos genéticos (sustituciones de nucleótidos o cambios de aminoácidos) para inferir, a partir de un set de secuencias, el árbol más parsimonioso. El mejor árbol es aquel que necesita menos cambios. Como resultado del análisis de parsimonia se generaron 1000 árboles filogenéticos, cada uno correspondiente a un set de datos. Debido a que los resultados de la mayoría de los programas dependen del orden en que las especies entran en los árboles, se seleccionó la opción *Jumble* que genera diferentes ordenamientos al azar de las especies en los archivos de entrada.

Posteriormente, se construyó un árbol consenso (CONSENSE, *Consense tree program*) usando la regla de la mayoría (los grupos que aparecen en más del 50% de los árboles estarán representados en el árbol consenso). Los valores en las ramificaciones indican el número de veces (expresado en porcentaje) que aparece representado un grupo en el árbol consenso. Los árboles fueron graficados con el programa TREEVIEW (*Tree drawing software*, versión 1.6.6, Page *et al.* 1996; Figura 7.7).

Para confirmar los resultados se realizó un análisis de distancia con los algoritmos disponibles en el programa PHYLIP. A partir de las secuencias aminoacídicas de las proteínas GPC y N de los arenavirus se generaron 1000 sets de datos de remuestreo (SEQBOOT), los que se utilizaron para calcular la distancia entre cada par de unidades taxonómicas (PROTDIST, *Protein distance*) utilizando la matriz PAM de Dayhoff, que estima las probabilidades de cambios de un aminoácido por otro. Con los datos de distancia se construyó una matriz de distancia para todos los pares posibles de unidades taxonómicas. Los cladogramas se calcularon utilizando el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) con el programa NEIGHBOR (*Neighbor Joining*). Posteriormente, se

construyó un árbol consenso (CONSENSE, *Consense tree program*) usando la regla de la mayoría. Las representaciones gráficas se realizaron con el programa TREEVIEW (Figura 7.8).

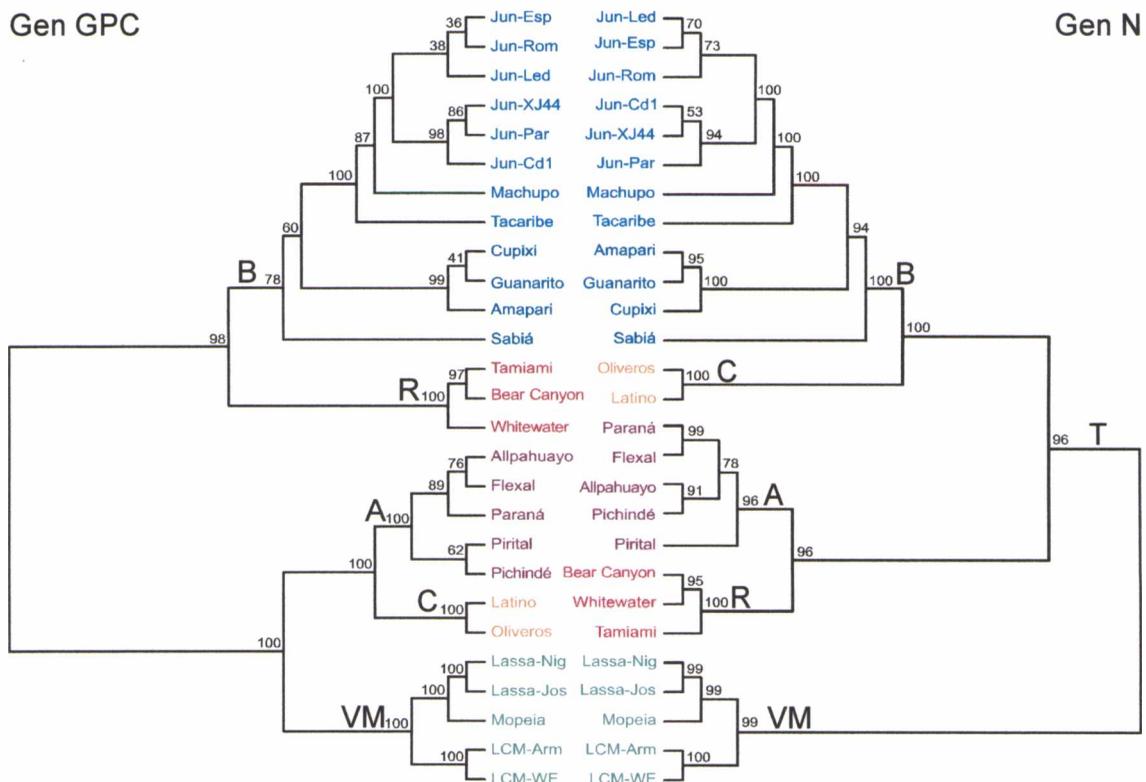
Con el objeto de verificar que los resultados no fueran dependientes del programa utilizado, se realizó el análisis de filogenia con el programa **MEGA2** (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, Kumar *et al.* 2001) por el método de máxima parsimonia, tanto para la proteína GPC y N. Los resultados generaron agrupamientos con la misma topología que la obtenida con el PHYLIP.



**Figura 7.7**

**Análisis filogenético de los arenavirus por el método de parsimonia.**

Árbol filogenético consenso construido según el método de parsimonia en base a las secuencias aminoacídicas completas de los genes GPC y N de los arenavirus. Los valores de *bootstrapping* que se indican en los nodos corresponden a 1000 ciclos de remuestreo. Los linajes evolutivos se indican como A (en color violeta), B (en distintos tonos de azules), C (en color naranja), R (recombinantes, en color rojo), VM (Viejo Mundo, en color verde) y T (complejo Tacaribe o virus del Nuevo mundo). Los árboles están enfrentados para facilitar la comparación. Las longitudes de las ramas de los cladogramas carecen de significado. Jun-Par, cepa XJ-Parodi; Jun-XJ44, cepa XJ44; Jun-Cd1, cepa Candid #1; Jun-Led, cepa Ledesma; Jun-Rom, cepa Romero; Jun-Esp, cepa Espíndola del virus Junín; Whitewater, virus Whitewater Arroyo; Lassa-Jos, cepa Josiah del virus Lassa; Lassa-Nig, cepa Nigeria del virus Lassa; LCM-WE; cepa WE del virus LCM; LCM-Arm, cepa Armstrong del virus LCM.



**Figura 7.8**

**Análisis filogenético de los arenavirus por el método de distancia.**

Árbol filogenético consenso construido en base a las secuencias aminoacídicas completas de los genes GPC y N de los arenavirus, a partir de matrices de distancia de a pares por el método *Neighbor Joining*, utilizando el método de agrupamiento UPGMA. Los valores de *bootstrapping* que se indican en los nodos corresponden a 1000 ciclos de remuestreo. Los linajes evolutivos se indican como A (en color violeta), B (en distintos tonos de azules), C (en color naranja), R (recombinantes, en color rojo), VM (Viejo Mundo, en color verde) y T (complejo Tacaribe o virus del Nuevo mundo). Los árboles están enfrentados para facilitar la comparación. Las longitudes de las ramas de los cladogramas carecen de significado. Jun-Par, cepa XJ-Parodi; Jun-XJ44, cepa XJ44; Jun-Cd1, cepa Candid #1; Jun-Led, cepa Ledesma; Jun-Rom, cepa Romero; Jun-Esp, cepa Espíndola del virus Junín; Whitewater, virus Whitewater Arroyo; Lassa-Jos, cepa Josiah del virus Lassa; Lassa-Nig, cepa Nigeria del virus Lassa; LCM-WE; cepa WE del virus LCM; LCM-Arm, cepa Armstrong del virus LCM.

## DISCUSIÓN

### TIPIFICACIÓN GENÉTICA BASADA EN RT-PCR-RFLP

Los arenavirus comparten propiedades morfológicas y moleculares que han sido descritas ampliamente en la bibliografía. Entre ellas se encuentran secuencias conservadas presentes en ambos extremos de sus RNAs S y L. Por medio del alineamiento de las secuencias nucleotídicas completas del RNA S de los arenavirus se pudieron identificar secuencias conservadas no caracterizadas hasta el momento, en regiones genómicas diferentes a las descritas. A partir de estas regiones, se diseñaron *primers* generalizados con la potencialidad de amplificar por RT-PCR el RNA S completo de todos

los arenavirus. La obtención de fragmentos de amplificación solapados posibilitaría clonar y secuenciar rápidamente el RNA S de cualquiera de los miembros de la familia.

Además, los fragmentos amplificados por PCR con estos *primers* podrían ser rápidamente caracterizados por sus patrones de restricción (RT-PCR-RFLP) y/o por secuenciamiento nucleotídico. El mapa de restricción esperado del fragmento ARE/ArS16V con *Hinf* I permitió distinguir a todos aquellos arenavirus cuya secuencia se encontraba disponible. Incluso permitió diferenciar cepas dentro de la misma especie viral. Este ensayo de RT-PCR-RFLP fue probado sobre algunas muestras de RNA virales, en las que resultaron patrones idénticos a los patrones predichos a partir de las secuencias nucleotídicas publicadas (Figuras 7.3; 7.4 y 7.5). Además, el análisis por RT-PCR-RFLP demostró ser eficaz para detectar y caracterizar dos aislamientos de arenavirus desconocidos.

El primero de ellos fue denominado provisoriamente Pampa por la región fitogeográfica de la cual proviene. Este virus, relacionado inmunológicamente con Oliveros, fue aislado a partir de un roedor del género *Bolomys* y caracterizado por RT-PCR-RFLP. El fragmento de cDNA amplificado con los *primers* ARE/ArS16V mostró un patrón de restricción con la enzima *Hinf* I diferente al resto de los arenavirus conocidos, incluyendo a Oliveros. Esta técnica fue capaz de evidenciar las diferencias en secuencia existentes entre este aislamiento y el resto de los arenavirus.

La comparación de secuencia nucleotídica del fragmento ARE-ArS16V de este virus con los fragmentos equivalentes de los otros miembros de la familia Arenaviridae dio como resultado una mayor similitud con el virus Oliveros (84.0% de identidad de secuencia nucleotídica; 93,7% de identidad de aminoácidos; 96,5% de similitud de aminoácidos), coincidente los datos inmunológicos. Dado que los datos indican que los virus Pampa y Oliveros están relacionados en secuencia, no es sorprendente que hayan sido aislados del mismo género de roedores.

Con el objeto de establecer reglas generales para la demarcación de especies virales dentro de los arenavirus se han propuesto criterios de acuerdo a lo propuesto por el ICVT (Clegg *et al.*; 2000). Estos incluyen:

- a) la asociación con especies hospedadoras específicas o grupos de especies.
- b) la presencia de un área geográfica definida.
- c) la posibilidad de ser agente etiológico en humanos.
- d) las diferencias en reactividad antigénica cruzada incluyendo la ausencia de neutralización cruzada.
- e) diferencias significativas de secuencia aminoacídica con respecto a otras especies del género.

Aplicando el concepto de que las especies virales son “una clase polifilética de virus que constituyen un linaje replicativo y ocupan un nicho ecológico particular” (Clegg *et al.*, 2000; Van Regenmortel, 2004), se acepta que los virus que difieren en al menos dos de estos criterios pertenecen a dos especies virales diferentes.

En cuanto a la diferenciación de especies dentro de los arenavirus, se ha observado que la relación genética reconocida más cercana entre dos especies reconocidas de

arenavirus se encuentra entre los virus Junín y Machupo (87.59% de identidad para la proteína N) y Flexal y Allpahuayo (83,63 de identidad para la proteína GPC). La máxima divergencia dentro de una misma especie se da entre las cepas Josiah y Nigeria del virus Lassa (90,70% de identidad para N y 93,08% para GPC). Este valor podría considerarse como el máximo de variación genética que se puede encontrar dentro de los arenavirus.

Basado en estudios de diferentes familias virales, Ward (1993) propuso que la identidad de secuencia en las regiones codificantes de cepas de un mismo virus debería ser relativamente alta (85-90%). Por otra parte, la clasificación de la familia de los picornavirus (Rueckert, 1990) muestra que los serotipos reportados (cepas) exhiben más de un 85% de identidad en la secuencia nucleotídica de la región P1. De acuerdo al mismo autor, las especies y géneros virales exhiben un 65-85% y 45-65% de identidad en la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos respectivamente. Específicamente para los arenavirus, Bowen *et al.* (2000) han propuesto como valor de corte una diferencia de aminoácidos del 12% para delinear una especie dentro de la familia. Si bien los autores no aclaran si este valor está referido a homología o a identidad de secuencia aminoacídica, un análisis de la comparación de ambas entre los diferentes arenavirus permitiría suponer que se trata de un valor de identidad.

Sin embargo, el uso de las secuencias nucleotídicas (en lugar de las aminoacídicas) en la determinación de la filogenia debe ser reevaluado. Guanarito y Amapari presentan los mayores valores de identidad de secuencia nucleotídica dentro de la familia (72.3%), mientras que Lassa y Tamiami presentan los menores valores (34.1%). La variación intraespecífica tiene valores muy disímiles. Los valores mínimos de identidad de secuencia nucleotídica varían entre un 93,3% en el virus Junín o un 84,5% en LCM, a un 38.0% en el virus Lassa. Desde este punto de vista, algunos autores (Bowen *et al.*, 1997; Lozano *et al.*, 1997) postulan que las variantes de Lassa (Josiah y Nigeria) deberían pertenecer a diferentes especies virales. Estos valores de identidad intraespecífica son muy inferiores a los valores de identidad interespecífica entre arenavirus alejados filogenéticamente (por ejemplo, entre Pichindé y LCM, 46.9%). Esta diferencia es debida principalmente a sustituciones en la tercera posición de los codones, las que representan una potencial fuente de ruido en las comparaciones de secuencia y en los análisis filogenéticos (Bowen *et al.*, 1997). No obstante, la similitud en la secuencia de aminoácidos de las proteínas N y GPC (90,7% y 93,1% respectivamente) entre las cepas del virus Lassa, definen su estrecha relación inmunológica.

Si se analiza la taxonomía actual de los arenavirus usando las mismas reglas propuestas por Ward, Rueckert y Bowen, utilizando el valor de corte específico para la familia propuesto por este último (88% de identidad), todas las especies reconocidas de arenavirus serían válidas excepto el virus Pampa, para el que habría que considerar la posibilidad de que fuera una variante del virus Oliveros, ya que posee un 93,7% de identidad de secuencia aminoacídica con este último (en secuencias parciales del gen N) y ambos fueron aislados de roedores del mismo género (*Bolomys*). De todas formas, una definición

más clara de las relaciones taxonómicas y el posible reconocimiento de Pampa como una especie separada dependerá de la identificación de características que lo diferencien lo suficiente de su pariente más cercano, el virus Oliveros. A medida que se acumule nueva información de secuencia intra e interespecífica, tanto del RNA S como del L, será posible determinar si, el valor de 88% de identidad en la secuencia de la proteína N propuesto permanecerá como criterio válido de definición de especie dentro de los arenavirus.

La relación entre especies virales y sus hospedadores roedores ha sido estudiada en varios hantavirus (familia Bunyaviridae). Mills (1996), informó que cada especie de virus infecta a una única especie de roedor y que la filogenia de los virus parece reflejar la filogenia de sus hospedadores. Este resultado es consistente con la hipótesis de coevolución de hantavirus y sus hospedadores roedores, asociado con una baja tasa de transmisión interespecífica de virus.

Bowen *et al.* (1996b) mostraron alguna evidencia que soporta la hipótesis de coevolución entre arenavirus y sus hospedadores roedores. Ellos agrupan a los arenavirus del Nuevo Mundo en tres linajes diferentes, llamados A, B y C, usando un segmento de la región carboxilo terminal del gen N. En particular, Pichindé, Paraná y Flexal (miembros del linaje A) tienen como hospedador a especies del género *Oryzomys*, mientras que Junín y Machupo (miembros del linaje B) tienen de hospedador al género *Calomys*. Sin embargo, ellos también publicaron que un mismo arenavirus puede infectar varias especies de roedores, por ejemplo: el virus Junín puede infectar a *Calomys musculinus*, *Calomys laucha*, *Akodon azarae*, *Bolomys obscurus* y *Mus musculus*. Además, la misma especie de roedor puede ser infectada por dos arenavirus diferentes (los virus Machupo y Latino pueden infectar a *Calomys callosus*).

El ensayo de RT-PCR-RFLP permitió la identificación de un segundo aislamiento de arenavirus, al que se denominó Río Carcarañá, aislado de un roedor capturado en el sur de la provincia de Santa Fe. La digestión con la enzima *Hinf* I del fragmento de cDNA amplificado con los *primers* ARE/ArS16V mostró un patrón de restricción diferente a los descriptos hasta ese momento.

Debido a la reactividad cruzada con los virus JUN y OLI y a la presencia de un patrón de restricción diferencial, se amplificaron otras regiones del virus y se determinó la secuencia nucleotídica, la que se utilizó en un análisis filogenético para determinar la relación entre el nuevo arenavirus y el resto de los miembros de la familia. La caracterización de este nuevo aislamiento está descrita en el Capítulo 8 de esta tesis (Caracterización del RNA S de Río Carcarañá).

Hasta el presente, esta es la primera descripción de un set de *primers* conservados para amplificar por RT-PCR fragmentos que abarquen la totalidad del RNA S de todos los miembros de la familia Arenaviridae. Estos *primers* diseñados a partir de las regiones conservadas halladas en los alineamientos de secuencias, han demostrado ser de utilidad, incluso con la incorporación de nuevos datos de secuencia disponibles con posterioridad al desarrollo de esta técnica.

La técnica de RT-PCR-RFLP podría ser empleada para detectar y caracterizar, en forma rápida y sencilla, aislamientos de arenavirus desconocidos hasta el presente y

diferenciarlos de aquellos ya caracterizados. Además, al posibilitar la generación de productos de amplificación a partir de los cuales se puede obtener la secuencia nucleotídica, permitiría deducir la ubicación filogenética relativa de los arenavirus emergentes.

Esta RT-PCR-RFLP, que fundamentalmente es un procedimiento rápido, sencillo y de relativamente bajo costo, podría ser el primer paso de caracterización de arenavirus conocidos o aún no descritos en estudios epidemiológicos (en los que es necesario analizar un gran número de muestras clínicas y/o de campo), o ser de utilidad en etapas preliminares de estudios moleculares de la familia *Arenaviridae*.

#### ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El análisis filogenético se realizó siguiendo diversas aproximaciones y metodologías con el objeto de obtener resultados consistentes que minimicen las diferencias que se generan por la utilización de distintos algoritmos. Inicialmente, se siguió el abordaje clásico considerando una similitud general seguido de un análisis filogenético. Se utilizaron programas que, a partir de los alineamientos de secuencias, generan matrices de distancia como paso previo a la construcción de los cladogramas o calculan el camino evolutivo más directo en base al método de parsimonia. El estudio incluyó un análisis global sobre el RNA S, así como también el análisis de los genes GPC y N y de sus productos génicos.

Para analizar las relaciones filogenéticas dentro de la familia, se prefirió utilizar las secuencias del RNA S y de sus productos génicos completos, con el objeto de reducir los posibles artefactos que pudieran surgir del análisis de datos parciales.

El análisis de filogenia fue realizado con todos los arenavirus de los que se disponía la secuencia completa del RNA S. A las secuencias publicadas y disponibles en el GENBANK se le sumaron las secuencias de las cepas Espíndola, Ledesma y Romero del virus Junín, constituyendo un total de 27 secuencias nucleotídicas del RNA S completo correspondientes a 20 arenavirus (algunos de los cuales aún no han sido reconocidos por el ICTV). De los virus Lassa, LCM y Junín se contaba con secuencias de más de un aislamiento, las que también fueron incluidas en el análisis. Las secuencias nucleotídicas y las secuencias aminoacídicas predichas fueron alineadas para obtener alineamientos múltiples y a partir de estos construir los árboles filogenéticos.

Uno de los métodos utilizados para determinar las relaciones entre los diferentes arenavirus es el cladismo o sistemática filogenética. Esta estrategia busca encontrar las relaciones evolutivas entre los seres vivos en base a caracteres derivados compartidos, generando árboles que reflejan las relaciones genealógicas y permiten una reconstrucción hipotética de la filogenia. Este análisis se realizó con ayuda del programa PHYLIP.

Debido a la alta divergencia que se presenta dentro de la familia *Arenaviridae* producida por la alta tasa de error de las RNA polimerasas virales y también, probablemente, al largo tiempo de evolución independiente de estos virus, los alineamientos de las secuencias nucleotídicas resultan arbitrarios y dependientes de los parámetros y de los programas que se utilicen para generarlos, conduciendo a filogenias poco consistentes (Archer y Rico-Hesse, 2002). Debido a esto, si bien en una primera aproximación se

utilizaron las secuencias nucleotídicas para la reconstrucción de la filogenia, posteriormente se prefirió utilizar las secuencias aminoacídicas mucho más conservadas.

Ya ha sido descrito que dentro de los arenavirus del nuevo mundo se pueden distinguir tres linajes denominados A, B y C. Estos agrupamientos están soportados por valores de *bootstrapping* cercanos o iguales al 100% (Bowen *et al.* 1996b; Clegg *et al.*, 2000; Archer y Rico-Hesse, 2002; Charrel *et al.* 2002; Charrel y Lamballerie, 2003).

El linaje A incluye a cinco arenavirus de Sudamérica: Pichindé, Pirital, Paraná, Flexal y Allpahuayo. El Linaje B contiene a siete arenavirus sudamericanos: Sabiá, Cupixi, Guanarito, Amapari, Tacaribe, Machupo y Junín. Dentro de este linaje algunos autores reconocen tres sublinajes (B1: Junín, Machupo y Tacaribe; B2: Cupixi, Guanarito y Amapari y B3: Sabiá; Charrel *et al.*, 2002). El linaje C comprende a dos virus sudamericanos: Latino y Oliveros.

Además, se ha observado en estudios de filogenia de arenavirus, que cuando se analizan independientemente las secuencias de los genes GPC y N, los agrupamientos generados son diferentes (Albariño *et al.* 1998; Charrel y Lamballerie, 2002; Charrel *et al.*, 2001, 2002; Archer y Ricco-Hesse, 2002).

Si bien los agrupamientos que surgieron del análisis filogenético se correlacionaron en líneas generales con los propuestos previamente por otros autores, no fueron totalmente coincidentes y se encontraron diferencias con respecto a ellos. Por otra parte, los resultados encontrados fueron coherentes con los publicados previamente por nuestro grupo de trabajo (Albariño *et al.*, 1998). Incluso la incorporación de nuevas especies virales no modificaron las relaciones ya establecidas (Figuras 7.7 y 7.8).

### *Filogenia de la proteína N*

En los grandes agrupamientos dentro de la familia, los árboles filogenéticos basados en la proteína N mostraron una topología semejante a las publicadas a partir de secuencias parciales de la proteína (Bowen *et al.*, 1996b; Moncayo *et al.*, 2000; Figuras 7.7 y 7.8). No se observaron diferencias en la topología de los grandes agrupamientos al comparar el árbol generado por parsimonia y el obtenido por el método de distancia. Todos los miembros del complejo Tacaribe (del Nuevo Mundo) se agruparon juntos, en un *cluster* independiente del que contiene a los virus del Viejo mundo, en concordancia con la gran cantidad de ensayos serológicos reportados (Wulff *et al.*, 1978; Howard, 1993; Buchmeier y Oldstone, 1981; Compans *et al.*, 1981; Compans y Bishop, 1985; Ruo *et al.*, 1991; Ghiringhelli *et al.*, 1991; Clegg, 1993) y con ensayos de protección cruzada contra desafíos del virus Lassa en infecciones experimentales en primates con el virus Mopeia (Killey *et al.*, 1979; Walker *et al.*, 1982).

Cuando se analizaron los linajes dentro de los arenavirus del Nuevo Mundo, se pudieron reconocer cuatro agrupamientos diferentes. El linaje A incluye a los virus sudamericanos Paraná, Flexal, Allpahuayo, Pichindé y Pirital. Este último ocupa el nodo ancestral mientras que Allpahuayo-Pichindé y Flexal-Paraná forman dos sublinajes separados. Esta topología es diferente de la publicada por Moncayo *et al.* (2001) o Fulhorst *et al.* (2002), en la que Pirital es el nodo más ancestral de un agrupamiento mayor que

incluye al linaje A y a los arenavirus de América del Norte. En estos dos estudios, el análisis se basó en secuencias aminoacídicas parciales de la proteína N, las cuales no parecen pertenecer a la región más apropiada para la delineación de las relaciones entre los virus de este linaje.

Claramente independiente del linaje A, pero asociado a éste, se encuentra un linaje que comprende a los arenavirus de América del Norte: Tamiami, Whitewater Arroyo y Bear Canyon. Estos tres virus presentan topologías muy diferentes cuando se analiza la filogenia de los genes N y GPC. Charrel *et al.* (2001) demostraron que Whitewater Arroyo es un recombinante natural (con un posible sitio de recombinación en la región intergénica o próxima a ella, al final del marco de lectura del gen GPC) en el que el gen GPC proviene del linaje B mientras que el gen N proviene del linaje A. Posteriormente, se postuló que podría suceder lo mismo con los otros dos arenavirus de América del norte y que los tres podrían haber derivado de un antecesor común en el que se produjo el evento de recombinación (Charrel *et al.* 2002; Archer y Ricco-Hesse, 2002). Este hecho es confirmado por valores de *bootstrapping* entre el 99 y 100%, independientemente del gen usado en el análisis. A este linaje se lo denominó R, por estar constituido por los arenavirus recombinantes.

El linaje B está integrado por los virus Junín, Machupo, Tacaribe, Amapari, Guanarito, Cupixi y Sabiá. Los tres primeros forman un *cluster* distinguible del resto, por lo que se postuló que formaban parte del sublinaje B1. Amapari, Guanarito y Cupixi forman otro *cluster* que corresponde al sublinaje B2. Algunos autores (Charrel *et al.* 2002) postulan un tercer linaje que estaría formado por Sabiá, que aparece como un nodo ancestral de los otros sublinajes. Sin embargo, su asignación a la categoría de sublinaje podría ser discutible, sobre todo si se analizan su asociación al sublinaje B2 en las filogenias generadas a partir de la secuencia aminoacídica de la proteína GPC.

Es probable que la posibilidad de causar fiebres hemorrágicas en humanos haya sido adquirida más de una vez dentro de la familia. Todos los arenavirus del Nuevo Mundo que producen fiebres hemorrágicas se encuentran dentro del linaje B y es posible que esta característica haya aparecido solamente una vez dentro de éste grupo monofilético. Por otra parte, parece estar claro que en el virus Lassa, esta propiedad habría evolucionado independientemente. Por lo tanto, la capacidad de producir fiebres hemorrágicas habría aparecido al menos dos veces dentro de la familia. La posibilidad de que otros miembros de la familia puedan ser patógenos para el hombre no está exhaustivamente explorada. De hecho, ha habido informes en los últimos años de infecciones causadas por arenavirus que se desconocía que fueran patógenos para los humanos. Uno de estos informes es el de Whitewater Arroyo, que es capaz de producir una enfermedad fatal con un síndrome respiratorio agudo, falla hepática y manifestaciones hemorrágicas (Byrd *et al.* 2000). Se requerirá de nuevos conocimientos en esta área antes de comprender claramente los mecanismos por los cuales los virus adquieren la capacidad de causar enfermedades en humanos.

Dentro del linaje B, la comparación de las relaciones filogenéticas entre las distintas cepas del virus Junín obtenidas por los métodos de parsimonia y de distancia resultaron en agrupamientos de idéntica topología. Como es de esperar, las cepas de un mismo virus aparecen en todos los casos asociadas en *clusters* específicos. Se puede observar que XJ-

Parodi, XJ-44 y Candid #1, tres aislamientos derivados uno del otro por sucesivos pasajes por cultivo de células y por cerebro de ratón, se agrupan entre sí y se separan del *cluster* formado por Ledesma, Romero y Espíndola, tres aislamientos independientes obtenidos a partir de pacientes. En estas tres últimas cepas, se evidencia una mayor cercanía entre Espíndola y Ledesma con respecto a Romero.

El linaje C comprende a los virus Oliveros y Latino y se encuentra relacionado filogenéticamente con el linaje B.

### *Filogenia de la proteína GPC*

Cuando se analiza la filogenia de la proteína GPC se observan algunas características que son similares a las que se obtienen en el análisis del gen N. Entre estas se encuentran: a) la identificación de los principales linajes A, B, C y VM, b) la existencia de un grupo diferente que incluye a los tres arenavirus de América del Norte (R) y c) la inclusión del los virus que causan fiebres virales hemorrágicas dentro del linaje B.

Sin embargo, a partir del gen GPC se obtienen árboles cuya topología difiere en los grandes agrupamientos con respecto a los que se obtienen con la proteína N. No existe la clara división entre los arenavirus del Viejo y del Nuevo Mundo, sino que los linajes A y C (del Nuevo Mundo) se asocian con los virus del Viejo Mundo, separándose del resto de los virus del Nuevo Mundo (linaje B; Figuras 7.7 y 7.8). Este agrupamiento está sustentado por valores de *bootstrapping* de 100% (distancia) y de 76% (parsimonia) y ya ha sido propuesto por Clegg *et al.* (1991) y Albariño *et al.* (1998), en discrepancia a los propuestos por Charrel *et al.* (2002), Archer y Rico-Hesse (2002). El análisis por separado de las regiones G1 y G2, utilizando la misma estrategia, permitió obtener en ambos casos el mismo resultado, la asociación de los linajes A y C con los virus del viejo mundo. Estos resultados sugieren que estos virus estarían más relacionados con los arenavirus ancestrales que el resto de los arenavirus del Nuevo Mundo.

En la filogenia generada por el método de parsimonia, en el linaje B se pueden distinguir claramente los linajes B1 y B2. Sabiá se agrupa dentro del *cluster* B2 sin formar un sublinaje; sin embargo, en el cladograma de distancia, Sabiá aparece como una rama aparte de los sublinajes B1 y B2, por los que confirmaría la pertenencia a un tercer sublinaje (B3) de acuerdo con lo propuesto por Charrel *et al.* (2002).

Dentro del linaje B, las relaciones filogenéticas entre las distintas cepas del virus Junín obtenidas por los métodos de parsimonia y de distancia muestran resultados diferentes. Utilizando el método de distancia las cepas XJ-Parodi, XJ-44 y Candid #1 aparecen en un *cluster* diferente de las cepas Espíndola, Ledesma y Romero, de forma semejante a lo que ocurre con el análisis del gen N. Sin embargo, según el método de parsimonia, estas variantes del virus Junín forman un único agrupamiento con similitud decreciente desde Parodi hasta Espíndola (Figuras 7.7 y 7.8).

También aparecen diferencias en la topología del linaje C. Cuando se compara el gen N, Oliveros y Latino se agrupan con el linaje B, mientras que cuando se analiza el gen GPC, estas dos especies virales aparecen asociados al linaje A. Es posible explicar este cambio de asociación por un fenómeno de recombinación entre virus de los linajes A y B, por el cual

se habría originando un antecesor hipotético a partir del cual divergieron Oliveros y Latino. Sin embargo, el perfil filogenético generado con el programa PHYLPRO (Capítulo 8), presenta picos poco definidos sin una disminución significativa de la correlación filogenética que pudiera indicar claramente la presencia de recombinantes o de posibles sitios de recombinación. Los resultados de este último análisis podrían ser discutibles, dado que en los arenavirus de América del Norte, en los que se ha demostrado su origen recombinante, el perfil filogenético tampoco es muy definido. Es posible que, tanto en Oliveros y Latino como en los arenavirus norteamericanos, los procesos de recombinación se hayan producido en especies virales ancestrales que, durante la divergencia, acumularon cambios que de alguna forma enmascaran la detección *in silico* de eventos de recombinación. Por lo tanto, no es posible descartar esta hipótesis, dado que las similitudes globales de secuencia entre los diferentes genes GPC y N aún se conservan y se manifiestan en los agrupamientos.

La posición de Oliveros y Latino podría también ser explicada por la existencia de presiones selectivas diferenciales que podrían haber operado sobre los productos del gen GPC (expuestos en la superficie del virión) y no así sobre el producto del gen N, generando la divergencia antes mencionada. En este sentido, serían más relevantes desde el punto de vista filogenético, las conclusiones derivadas del análisis de la proteína N.

Los estudios sobre la filogenia del gen GPC son pocos. De hecho, la mayor parte de los análisis filogenéticos de arenavirus realizados hasta el momento están basados exclusivamente en comparaciones de secuencias del gen N, incluso muchos de ellos, en secuencias parciales de dicho gen (Bowen *et al.*, 1996b; Lozano *et al.*, 1997; Clegg *et al.*, 2002; Fulhorst *et al.*, 2002) o bien en análisis comparativo de los genes GPC y N, pero de un número reducido de especies virales (Bowen *et al.*, 1997).

Estudios recientes, basados en secuencias parciales del gen de la polimerasa viral en algunas especies de arenavirus, comenzaron a ampliar el conocimiento de las relaciones filogenéticas dentro de la familia Arenaviridae (Charrel *et al.*, 2003). La información disponible hasta el momento parecería confirmar los agrupamientos descritos para la proteína N.

Para comprender la posición de los linajes A y C con respecto al resto de los arenavirus, será necesario utilizar nuevos enfoques y/o incorporar nuevos datos de secuencia antes que las filogenias resulten congruentes y puedan ser evaluadas adecuadamente. La comprensión de las relaciones filogenéticas de los arenavirus aumenta progresivamente con la incorporación de nuevos datos genómicos, en particular, cuando se utilizan secuencias génicas completas para el análisis. En este sentido, será sumamente importante la caracterización de los RNAs L de otros miembros de la familia, para confirmar o rechazar las hipótesis actuales y para investigar la posibilidad de existencia de recombinación dentro de los RNAs S y/o L. Esto permitirá ampliar nuestro conocimiento general sobre evolución viral, pero además posibilitará el desarrollo de nuevas metodologías de diagnóstico y herramientas terapéuticas y de prevención, de utilidad ante la aparición de infecciones por arenavirus.

## CAPÍTULO 8

### CARACTERIZACIÓN DEL RNA S DE RÍO CARCARAÑÁ

*How many vain chimeras have you created?...*  
*Go and take your place with the seekers after gold.*  
*Leonardo Da Vinci. The notebooks.*

#### RECOMBINACIÓN VIRAL

La recombinación en los virus a RNA es un fenómeno ampliamente extendido y se considera que juega un papel muy importante en la generación de la variabilidad y por lo tanto de la evolución viral. Desde su descubrimiento, la recombinación viral ha sido ampliamente documentada y se ha podido demostrar que un número cada vez mayor de virus a RNA han sufrido algún proceso de recombinación, ya sea bajo condiciones naturales o experimentales. A pesar de haber transcurrido más de tres décadas desde su descubrimiento, recién están empezando a ser dilucidados los mecanismos por los cuales se produce la recombinación de RNA. Publicaciones recientes sugieren que la recombinación de RNA está ligada a la replicación viral y se han propuesto varios mecanismos posibles. Sin embargo, en contraste con lo que ocurre con la recombinación del DNA, no se han podido asociar genes específicos relacionados con la formación de recombinantes.

Debido a la alta tasa de error producida en la replicación RNA dependiente, los virus a RNA existen como poblaciones heterogéneas de moléculas conocidas como *cuasiespecies* (Domingo *et al.* 1996). La generación de cuasiespecies presenta una ventaja para el virus ya que, ante un cambio en la presión de selección, podría existir en la población de cuasiespecies un genoma ya adaptado o podría evolucionar rápidamente a partir de alguno de los miembros de la población. La desventaja de la alta tasa de error producida durante la replicación está asociada con la acumulación de un elevado número de mutaciones perjudiciales. Sin embargo, es posible rescatar estos defectos genéticos por recombinación con otras moléculas de la población de cuasiespecies que posean genes funcionales (Miller *et al.*, 1998). Además, este mecanismo permite que un virus pueda adquirir súbitamente características nuevas (genes nuevos) en un solo paso.

La recombinación es común en los virus a RNA y podría ser más importante para un cambio evolutivo y de especiación que la acumulación de mutaciones puntuales. Virus tan diversos como los alfavirus, coronavirus y luteovirus contienen genes cercanamente relacionados a los de otros grupos, indicando eventos de recombinación recientes en su evolución (Hahn *et al.*, 1988; Lai *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1995).

Los eventos de recombinación viral puede clasificarse en homóloga, homóloga aberrante y no homóloga (Lai, 1996). En la recombinación homóloga los recombinantes se originan a partir de RNAs que son muy similares, como en el caso de la recombinación intratípica, o menos similares, como en la recombinación intertípica. Los recombinantes homólogos fueron definidos como aquellos que no contienen alteraciones de secuencia (con excepción de las mutaciones marcadoras) cuando se los compara con las moléculas parentales; mientras que la recombinación homóloga aberrante contiene modificaciones como sustituciones (*mismatch mutations*), deleciones o inserciones, en o cerca del sitio de



recombinación. La recombinación no homóloga se produce cuando ocurre recombinación entre genomas virales diferentes o entre genomas virales y moléculas RNAs de la célula hospedadora. Sin embargo, esta clasificación no contempla los mecanismos por los cuales se generan este tipo de recombinantes.

Entre los modelos más aceptados de recombinación de RNA se encuentra el modelo de selección de copia dirigido por la replicasa o modelo de cambio de molde (*copy choice* o *template switching*, Cooper *et al.*, 1974; Duggal *et al.*, 1997; Jarvis & Kirkegaard, 1992; Kirkegaard & Baltimore, 1986; Nagy & Bujarski, 1995, 1998; Nagy *et al.*, 1998; Simon & Nagy, 1996; Nagy & Simon, 1997), el modelo de ruptura y ligación (transesterificación o *breakage-induced template exchange*; Chetverin *et al.*, 1997, 1999; Chetverina *et al.*, 1999; Gmyl *et al.*, 1999), el modelo de cambio de molde inducido por ruptura (*breakage and ligation* o *dynamic copy choice*; Hajjar and Linial, 1993; Zhang and Sapp, 1999; Svarovskaia *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2001) y el modelo de alineamiento de *primer* y extensión (*primer alignment and extension*, Pierangeli *et al.*, 1999). Dado que todos estos modelos pueden conducir a la formación de recombinantes de RNA similares, no es posible deducir el mecanismo particular a partir de la secuencia de los productos finales de recombinación.

En la recombinación viral por intercambio de molde, durante la síntesis de una cadena negativa, la RNA polimerasa empieza copiando el extremo 3' de una cadena parental positiva, cambia el molde por una segunda cadena parental positiva y continúa copiando a partir de la posición en la que se había detenido. A este tipo de recombinación se lo conoce como modelo de selección de copia (*copy choice*). El mecanismo exacto de cómo se produce el intercambio de un molde por otro no se conoce, pero podría ser desencadenado por una pausa de la polimerasa durante la elongación de la cadena. Este proceso fue demostrado por primera vez en células infectadas con poliovirus (Cooper *et al.*, 1974) y ha sido ampliamente estudiado en sistemas experimentales.

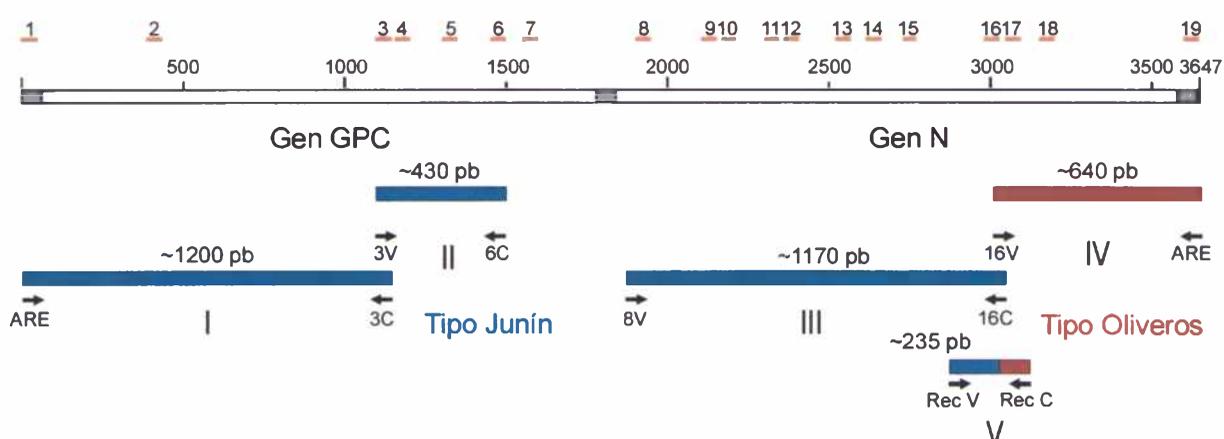
En el modelo de intercambio de cadena inducida por una ruptura (*breakage-induced template exchange*) se postula que la ruptura del molde de RNA que está siendo copiado promueve el intercambio de un molde por otro. Un tercer modelo postula que los RNAs recombinantes se pueden formar por un mecanismo de ruptura y ligación (*breakage and ligation*) similar al que ocurre durante el procesamiento de los mRNAs o durante la recombinación de algunos DNAs. Un mecanismo adicional postulado es el de *primer alignment and extension*. Este mecanismo implica la hibridación local entre una región de una hebra defectiva de RNA de polaridad positiva y una hebra de RNA de polaridad negativa que sirve como molde para la continuidad de la síntesis de la nueva hebra positiva.

## **CLONADO Y SECUENCIACIÓN DEL RNA S VIRAL**

Como se describió en el Capítulo 7 (Desarrollo de un método de tipificación genética basado en RT-PCR-RFLP), se analizaron muestras de tejidos obtenidos de un roedor de la especie *Necromys benefactus* (capturado en la región al noroeste de la ciudad de San Lorenzo, cerca del Río Carcarañá en la provincia de Santa Fe). Este individuo fue aprehendido durante un programa de captura de roedores implementado por el INEVH para llevar a cabo estudios epidemiológicos de FHA. Inicialmente, se realizó un análisis serológico

aprehendido durante un programa de captura de roedores implementado por el INEVH para llevar a cabo estudios epidemiológicos de FHA. Inicialmente, se realizó un análisis serológico en el que las muestras de tejido de este roedor presentaron reacción cruzada al utilizar antisueros contra el virus Oliveros y contra el virus Junín. Los resultados de este análisis sugerían que este roedor estaba infectado con algún arenavirus de identidad incierta.

A partir de muestras de sangre se infectaron células Vero, se cosecharon a los 12 dpi a partir de ellas se aisló y purificó el RNA total. Éste se utilizó para sintetizar el cDNA, empleando la transcriptasa reversa modificada del virus de la Leucemia Murina de Moloney (SuperScript II, Invitrogen) y, posteriormente, se amplificaron por PCR regiones específicas del mismo (Figura 8.1; Capítulo 9, Materiales y Métodos).



**Figura 8.1**

**Estrategia de amplificación por RT-PCR del RNA S del virus Río Carcarañá**

La barra representa el RNA S viral en orientación 5'-3'. Dentro de ésta, el rectángulo blanco de la izquierda representa el marco de lectura abierto del gen GPC (polaridad viral) y el rectángulo blanco de la derecha representa el marco de lectura abierto del gen N (polaridad viral complementaria). Los rectángulos grises corresponden a las secuencias no codificantes. La numeración corresponde al apilamiento de las secuencias de los arenavirus obtenido con el PILEUP. Las líneas naranja encima del RNA S (1 al 19) indican las posiciones de las regiones conservadas. Las barras de color azul y rojo representan los fragmentos amplificados por RT-PCR, utilizados para el clonado y la determinación de las secuencias nucleotídicas del RNA S. Cada uno de los fragmentos está identificado con números romanos. El color azul de los fragmentos representa regiones de alta homología con el virus Junín, el color rojo representa regiones de alta homología con el virus Oliveros. Los números sobre los fragmentos indican su tamaño aproximado en pares de bases. Los *primers* utilizados para la amplificación se indican con flechas de color negro. Por razones estrictamente gráficas, en los nombres de los *primers* se ha omitido el prefijo común ArS. Los *primers* ArS1 y ArS19C son equivalentes al *primer* ARE (ver Capítulo 5) por lo que, para este caso en particular, se conservará esta nomenclatura.

El producto de amplificación con los *primers* ARE/ArS16V poseía el tamaño esperado para este fragmento en los arenavirus (alrededor de 600 pb), pero la digestión con *Hinf* I presentó un patrón de bandas diferente al del resto de la familia. Estos resultados sugirieron la presencia de un nuevo virus, el que recibió provisoriamente el nombre de Río Carcarañá (RCÑ; Capítulo 7).





que en el extremo 3' del RNA S la homología era alta (90%) con otros virus de la región pampeana (Oliveros y Pampa, linaje B; Figura 8.1; Alineamiento 8.1).

Dado que el solapamiento de los fragmentos de amplificación III y IV correspondientes a esta región no era completo y que era imprescindible confirmar la secuencia de la zona de recombinación, se diseñaron dos *primers*, denominados Rec V y el Rec C, que permitieron amplificar por RT-PCR el fragmento denominado V. El *primer* Rec V hibrida con la secuencia de Junín mientras que el Rec C hibrida con la secuencia de Oliveros. Con este par de *primers* se amplificó y se secuenció por secuencia directa un fragmento de 235 pb que abarca la zona de recombinación (Figura 8.1, Alineamiento 8.1).

El alineamiento 8.1 muestra el cambio en la homología relativa entre el arnavirus Río Carcarañá y los virus Junín y Oliveros: los caracteres en azul muestran la identidad de secuencia con Junín y los caracteres en rojo muestran la identidad de secuencia con Oliveros. Entre estas dos regiones existen dos nucleótidos, que no tienen homología ni con Junín ni con Oliveros que, como se discutirá más adelante, podrían corresponder al potencial sitio de recombinación. En la región *upstream* con respecto a estas bases, Río Carcarañá posee una muy elevada homología con la secuencia del virus Junín (98,1%). En cambio, en la región *downstream* al posible sitio de recombinación (las dos bases recuadradas), la homología de Río Carcarañá es mucho mayor con respecto a Oliveros (89,9%).

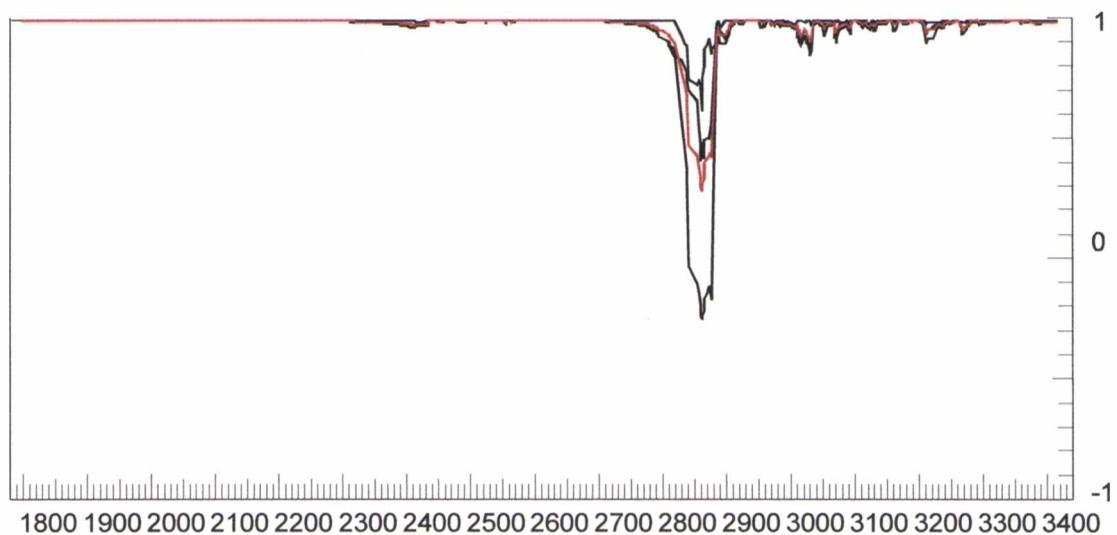
## PERFIL FILOGENÉTICO

Para explorar la posibilidad de recombinación se utilizó el programa PHYLPRO que aplica el algoritmo de perfil filogenético propuesto por Willer (1998). Este algoritmo permite mostrar gráficamente la coherencia de las relaciones a lo largo de un set de secuencias homólogas alineadas. En vez de utilizar la comparación de la topología de los árboles o matrices de compatibilidad, este programa utiliza la técnica de dos ventanas adyacentes que se desplazan a lo largo de las secuencias, determinando las distancias de a pares de todas las secuencias de la ventana y evalúa, para cada secuencia, el grado en que concuerdan los patrones de distancia de esas regiones.

Para determinar la correlación filogenética de una determinada secuencia en una posición particular, el método define dos ventanas de secuencias, localizadas inmediatamente antes e inmediatamente después del sitio a ser analizado y se determinan las diferencias entre la secuencia a ser comparada con las otras secuencias de la ventana, resultando en datos de distancia (por comparación de a pares) de dos vectores. Si la secuencia a analizar es similar a las otras secuencias de las dos ventanas, los dos vectores exhibirán la misma tendencia y la correlación será buena. La correlación entre estos dos sets de datos de distancia se denomina *correlación filogenética*. Sin embargo, si la secuencia a ser comparada es producto de un proceso de recombinación, los fragmentos de secuencia de ambas ventanas tendrán diferentes historias filogenéticas y la correlación será baja. Cuando la ventana se mueve a través de una unión de recombinación, la correlación filogenética disminuye y adquiere el menor valor cuando la unión de recombinación está exactamente

entre las dos ventanas. El gráfico de la correlación filogenéticas de una secuencia para cada posición se denomina *perfil filogenético*.

La figura 8.2 representa el perfil filogenético que se obtiene de la comparación de las secuencias nucleotídicas de los virus Junín, Oliveros y Río Carcarañá. Las señales de recombinación aparecen en el gráfico como áreas de baja correlación filogenética, visualizada por un único pico hacia abajo. Si la correlación filogenética de una posición particular de una secuencia determinada es muy baja (en este caso la correspondiente a Río Carcarañá), esa posición corresponde a un posible sitio de recombinación de esa secuencia. La precisión de la correlación filogenética disminuye ligeramente hacia los extremos del gráfico debido a la reducción en tamaño de una de las ventanas con respecto a la otra.



**Figura 8.2**

**Perfil filogenético de Río Carcarañá.**

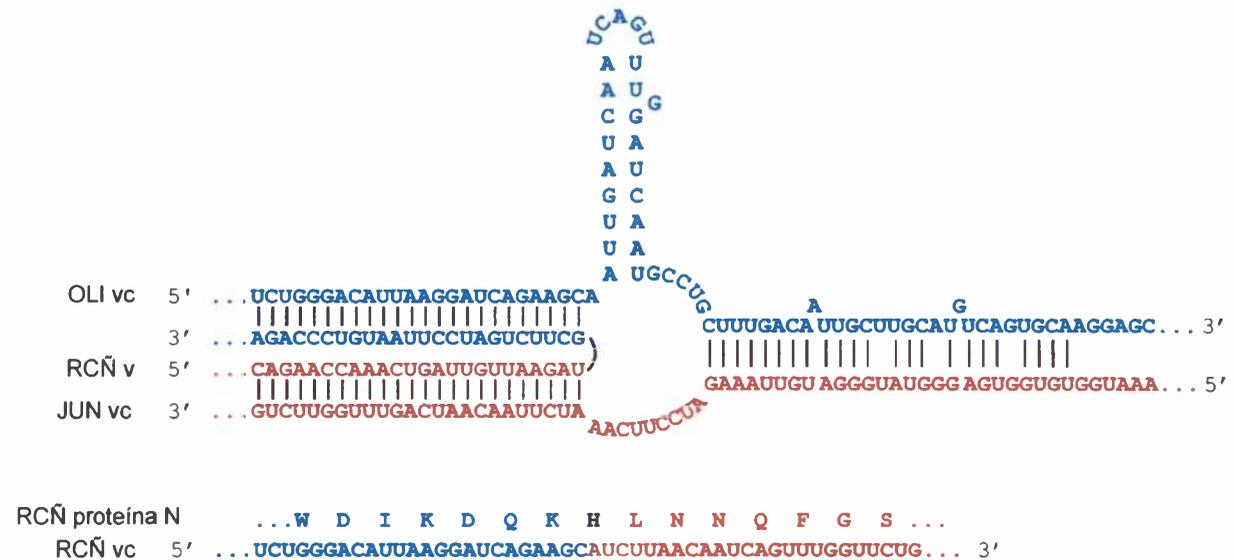
La figura representa el perfil filogenético de las secuencias nucleotídicas de los virus Junín, Oliveros y Río Carcarañá. El eje X indica la posición en el alineamiento (nucleótidos 1762 al 3415 de la numeración correspondiente a Junín, 1890 al 3535 de la numeración de Oliveros). El eje Y representa la correlación filogenética con valores que van entre 1 y -1. La curva que presenta el menor valor de correlación filogenética (-0.25) corresponde al virus Río Carcarañá. La línea de color rojo indica la media de la correlación filogenética de todas las secuencias. Parámetros utilizados: matriz de identidad, ventana 10 diferencias, medida de correlación.

## MECANISMOS DE RECOMBINACIÓN

Dado que todos los mecanismos de recombinación pueden conducir a la generación de moléculas de RNA similares, no es posible sustentar un mecanismo particular basado solamente en la secuencia de recombinación de los productos finales. Para poder precisar el mecanismo por el cual se originó una molécula recombinante es necesario la caracterización de los intermediarios de recombinación y de los componentes de la maquinaria de recombinación.

La figura 8.3 muestra una de las alternativas posibles de emergencia del nuevo arnavirus Río Carcarañá mediante recombinación en las regiones complementarias a secuencias codificantes para las proteínas N de los arnavirus Junín y Oliveros. En este

caso particular, el mecanismo de **copy choice** permitiría explicar la generación de un RNA S viral complementario que codifica para los 166 aminoácidos de la proteína N de Oliveros y para los últimos 397 residuos de la proteína N de Junín.



**Figura 8.3**

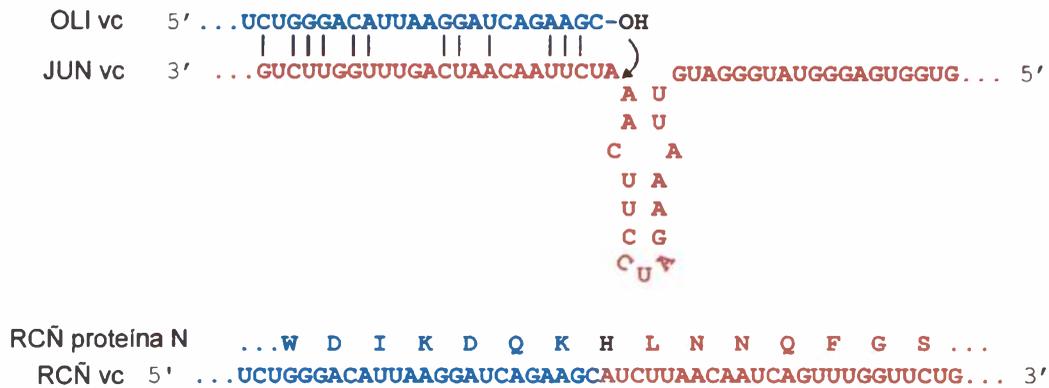
**Generación de un recombinante interespecífico entre los arnavirus Junín y Oliveros mediante el mecanismo de *copy choice*.**

Las secuencias en color azul corresponden al virus Junín, las secuencias en rojo al virus Oliveros. En la parte superior de la figura se representa la secuencia nucleotídica del híbrido parcial entre dos cadenas de RNAs S viral (de Oliveros y Junín) en la región codificante de la proteína N y la secuencia nucleotídica de la molécula recombinate. En la parte inferior se representa la secuencia aminoacídica y nucleotídica de la molécula recombinate resultante.

Según este mecanismo, la replicasa (RNA polimerasa RNA dependiente) comienza la replicación de la cadena de polaridad viral utilizando como molde a la cadena de polaridad complementaria del virus Junín, pero la presencia de un apareamiento entre la hebra VC del virus Junín y la hebra VC del virus Oliveros, con una estructura secundaria del tipo de tipo *hairpin loop*, produce una pausa en la replicación y, posiblemente, la liberación de la RNA polimerasa. Posteriormente, la polimerasa retoma la síntesis de la cadena naciente pero reemplazando la hebra molde por una molécula de polaridad viral complementaria del virus Oliveros, completando de esta forma la replicación de la molécula de RNA recombinate. El proceso de selección de molde está favorecido por la hibridación parcial entre los RNAs moldes, la presencia de estructuras secundarias, la disponibilidad de nucleótidos y/o la existencia de regiones promotoras próximas reconocidas por las RNA polimerasas (Nagy and Symon, 1997; Kim and Kao, 2001).

Una segunda alternativa para generar una molécula recombinate interespecífica es por medio del mecanismo de **transesterificación** (Figura 8.4). Inicialmente, se produce el apareamiento de una molécula abortiva de polaridad viral complementaria del virus Oliveros que presenta pequeños segmentos en los que existe complementariedad de bases con una molécula completa de RNA de polaridad viral complementaria del virus Junín. Posteriormente, se produce el ataque nucleofílico por parte del hidroxilo 3' libre del virus

Oliveros sobre una de las uniones fosfoéster de un nucleótido de la molécula de RNA de Junín, produciéndose el clivaje de esta última seguido de la ligación de las dos moléculas de RNA, generando así una molécula híbrida, por una reacción semejante a la que produce durante el *splicing* de intrones del grupo II, en el procesamiento de los precursores de mRNAs celulares.



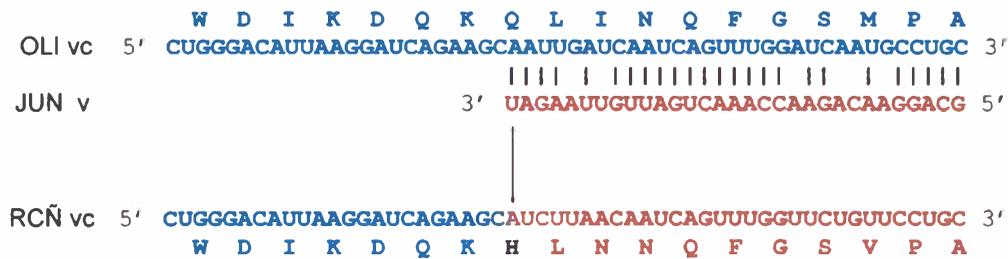
#### Figura 8.4

**Generación de un recombinante interespecífico entre los arnavirus Junín y Oliveros por el mecanismo de recombinación mediante transesterificación (no replicativa).**

Las secuencias en color azul corresponden al virus Junín, las secuencias en rojo al virus Oliveros. En la parte superior de la figura se representa el apareamiento parcial entre una molécula defectiva del RNA S VC de Oliveros con el RNA S VC de Junín, en la región codificante de la proteína N. La transesterificación mediante el ataque nucleofílico por parte del hidroxilo 3' libre del virus Oliveros en la posición indicada con la flecha, permitiría la formación de una molécula de RNA S recombinante. En la parte inferior se representa la secuencia aminoacídica y nucleotídica de la molécula recombinante resultante.

Por este mecanismo se podría generar un RNA S recombinante de 3420 nt de longitud derivado de la unión de 2836 nt correspondientes a la mayor parte del RNA S del virus Junín de polaridad viral complementaria con 584 nt de la región complementaria al marco de lectura para la proteína N de Oliveros más la región no codificante (extremo 5'). En este caso, el marco de lectura codificante para N de Junín queda en la misma fase que el correspondiente marco codificante para la proteína N de Oliveros, permitiendo la traducción de una proteína N híbrida.

Una tercera alternativa, que postula la generación de una molécula recombinante por medio del mecanismo de *primer alignment and extension*, se muestra en la figura 8.5. Según este modelo, una hebra de RNA abortiva de polaridad viral con un extremo hidroxilo 3' libre del virus Junín hibrida con una cadena S de polaridad viral complementaria del virus Oliveros que servirá como molde para la continuidad de la síntesis de la hebra abortiva. Por este mecanismo se generaría una hebra recombinante de polaridad viral que codifica para los primeros aminoácidos de la proteína N de Oliveros y los últimos residuos de la proteína N de Junín.

**Figura 8.5**

**Generación de un recombinante interespecífico entre los arnavirus Junín y Oliveros mediante el mecanismo de *primer alignment and extension*.**

Las secuencias en color azul corresponden al virus Junín, las secuencias en rojo al virus Oliveros. En la parte superior de la figura se representa la secuencia nucleotídica del híbrido parcial entre dos cadenas de RNA S viral (Oliveros y Junín). En la parte inferior se representa la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la molécula recombinante resultante.

## DISCUSIÓN

La adaptación de los organismos vivos a los cambios ambientales por medio de la evolución requiere un compromiso entre la variación genética y la selección de fenotipos. En el caso particular de los virus a RNA, se observa una alta tasa de variabilidad como consecuencia de la intervención de tres fuerzas evolutivas: mutación, reasociación (en el caso de los virus con genoma segmentado) y recombinación. La replicación viral está caracterizada por una alta tasa de mutación, debido a la ausencia de actividad de lectura de prueba de las RNA polimerasas RNA dependientes. Esto, junto con los cortos tiempos de replicación y la alta multiplicidad conduce a una población mutante dinámica (cuasiespecies). Sin embargo, la divergencia está restringida por las presiones selectivas del ambiente y principalmente por la necesidad de mantener un genoma viral funcional. En este sentido, la recombinación permite rescatar genomas virales portadores de mutaciones deletéreas en genes virales esenciales o en estructuras que son necesarias para la replicación de RNA.

Como se describió en el Capítulo 7, la técnica de RT-PCR-RFLP permitió la detección y caracterización inicial de dos arnavirus, hasta ese momento desconocidos. En estudios preliminares, uno de ellos, el virus denominado Río Carcarañá, presentó reactividad cruzada con dos arnavirus (Junín y Oliveros) cuyas áreas de distribución incluyen a la localidad en la que fue capturado el roedor portador de este virus. Con el objeto de determinar la identidad de este nuevo virus, se amplificó por RT-PCR el fragmento ARE-ArS16V, se digirió con la enzima *Hinf* I y se analizó el patrón de restricción que resultó diferente al del resto de los arnavirus caracterizados hasta ese momento.

Los resultados de las comparaciones de secuencia nucleotídica del fragmento ARE/ArS16V (fragmento I) permitieron agrupar al nuevo virus con los virus Oliveros y Pampa. Sin embargo, las comparaciones de secuencia nucleotídica del fragmento amplificado con los *primers* ArS8V/ArS16C (fragmento III) dieron como resultado la asociación de Río Carcarañá con los virus Junín y Tacaribe. El análisis parcial de las

secuencias nucleotídicas de otras regiones del RNA del virus Río Carcarañá (fragmentos I y II), arrojó resultados análogos a los obtenidos del análisis del fragmento III.

Al analizar el perfil filogenético de los virus Río Carcarañá, Oliveros y Junín, surge claramente del gráfico que existe una única región con una muy baja correlación filogenética, visualizada como un pico hacia abajo en la curva correspondiente a Río Carcarañá. Esta región de baja correlación filogenética señala el posible sitio de recombinación. Los resultados obtenidos al analizar el resto de los arenavirus no muestran regiones en las cuales se evidencie tan claramente un cambio en los patrones de correlación entre las ventanas, que se refleje en una disminución importante en el perfil filogenético.

Es de destacar que, a diferencia de lo que ocurre con Río Carcarañá, en los arenavirus de América del Norte (Whitewater Arroyo, Tamiami y Bear Canyon) que fueron señalados como recombinantes, no existe un pico marcado en los perfiles, sino que hay una disminución de la correlación que abarca casi la totalidad de la región intergénica, indicando que en estos virus el posible sitio de recombinación estaría dentro de una región mucho más amplia de alrededor de 100 nucleótidos de longitud.

Al examinar la secuencia nucleotídica del RNA S de Río Carcarañá se evidencia que, hacia el extremo 5' de la región indicada como posible sitio de recombinación, existe una muy elevada homología con la secuencia del virus Junín (98,1%, 1055 de 1075 nucleótidos). En esta zona, Río Carcarañá difiere de Junín solamente en 20 de 1075 nucleótidos, de los cuales solo 5 (el 25%) son idénticos a la secuencia de Oliveros. Este valor se corresponde con el que se esperaría de una variación producto del azar (25%). Si se analiza la homología entre Río Carcarañá y Oliveros, la identidad en esta región es del 64,6% (713 de 1075 nt).

En cambio, hacia el extremo 3' del posible sitio de recombinación, la homología de Río Carcarañá es mucho mayor con respecto a Oliveros (89,9%, 526/585). Río Carcarañá difiere con respecto a Oliveros en 59 residuos de 585, de los cuales solo 17 corresponden a la secuencia de Junín (28,8 %), valor que se aproxima al 25% esperable de variación al azar. En esta región hay un 58.1% (336/578) de identidad entre Río Carcarañá y Junín.

El sitio propuesto de recombinación quedaría restringido a solo dos nucleótidos que están indicados con un recuadro sobre la secuencia de Río Carcarañá en el alineamiento 8.1. Las primeras 7 bases de este virus, leídas a partir del *primer* ArS16V, tienen mayor similitud con la secuencia de Junín (3 corresponden a Junín y las otras 4 están conservadas en los tres virus). Esta similitud es continua con la mayor homología del fragmento III con el virus Junín. A partir del décimo nucleótido hay un cambio en la homología hacia el virus Oliveros que continúa a lo largo del fragmento IV hasta el extremo 3' viral (los nucleótidos 10 al 15 son idénticos a los del virus Oliveros). Entre estas dos regiones, existe en Río Carcarañá, un dinucleótido cuya primera base (la número 8) es diferente tanto a Junín como a Oliveros, mientras que la base siguiente (la número 10) se encuentra conservada en los tres virus. La posición de este dinucleótido es coincidente con el pico de baja correlación filogenética que se observa en el perfil filogenético. Debido a la recombinación, se produce un cambio de codón que posibilita la aparición de un residuo de histidina (H), inexistente en esa posición en cualquiera de los virus parentales. Curiosamente, solamente en la cepa MC2 del virus Junín existe en esta posición un codón que codifica para un residuo de histidina.

Estos datos sugieren que el virus Río Carcarañá sería un recombinante natural entre dos arenavirus de distribución geográfica superpuesta aunque hospedados por diferentes roedores. Además, la posible región de recombinación, parece encontrarse dentro de una secuencia muy conservada y el sitio posible de recombinación, reducirse a sólo dos nucleótidos cercanos al *primer* ArS16V del fragmento III.

La aparición de este virus sería posible debido a la alta tasa de adaptación que parecen tener los arenavirus a nuevas especies de hospedadores (Hugot *et al.*, 2001). Por esto, es evidente la dificultad existente para establecer patrones claros de coevolución entre los virus y sus hospedadores roedores.

Para que pueda llevarse a cabo un evento de recombinación entre dos especies virales se debe producir la coinfección simultánea de un mismo individuo con los dos virus. La posibilidad de este evento ya ha sido demostrada para arenavirus simpátricos y una posibilidad de que esto suceda podría darse en individuos que padecen de una infección crónica por un virus (por ejemplo por exposición congénita) y sufren una superinfección como resultado del contacto (por ejemplo por pelea) con un roedor infectado por un segundo virus (Charrel *et al.*, 2001).

Si bien el reservorio natural del virus Junín es *Calomys musculinus*, también ha sido encontrado en otras especies reservorio como *Calomys laucha*, *Akodon azarae*, *Oryzomys flavescens*, *Bolomys obscurus*, *Mus musculus* e incluso en el carnívoro *Galictis cuja*. El virus Oliveros tiene como hospedador conocido a *Bolomys obscurus*, pero también se lo ha aislado de unos pocos individuos de otras especies del área (Mills *et al.*, 1996).

Con respecto al origen de Río Carcarañá en relación a sus hospedadores roedores, se puede especular que la coinfección y el evento de recombinación podría haberse producido en un individuo de la especie *Bolomys obscurus* (especie hospedadora de las dos especies virales; Salazar-Bravo *et al.*; 2002) y posteriormente el recombinante, con un rango de hospedadores diferente al de los virus parentales, habría sido capaz de infectar a *Necromys benefactor*.

La taxonomía del género *Bolomys* está actualmente en revisión. Massoia y Pardinás (1993) sugirieron que *Necromys* es un sinónimo más antiguo que *Bolomys*, y Galliari y Pardinás (2000) sugirieron recientemente que la especie que habita la Argentina es *Necromys benefactor*. Por otra parte, Ellis *et al.* (1997) encontraron que la especie *B. benefactor* es reportada con el nombre de *B. obscurus*. Una segunda interpretación acerca del origen de este recombinante podría ser explicada por la posibilidad de que tanto Junín como Oliveros serían capaces de infectar la misma especie de roedor (*N. benefactor* = *B. benefactor* = *B. obscurus*), por lo cual el recombinante generado no habría tenido la necesidad de superar barrera de especie alguna ni adaptarse a un nuevo roedor hospedador.

Explicaciones más claras acerca del posible origen y las potenciales especies reservorio de este nuevo arenavirus deberán esperar estudios más abarcativos sobre los rangos de hospedadores de las tres especies virales y sobre la taxonomía de este género de roedor.

La recombinación entre arenavirus ya fue descrita por Charrel *et al.* (2001, 2002) Charrel y Lamballerie (2003), y Archer y Rico-Hesse (2002). Sin embargo, si bien se han

propuesto varios mecanismos que explican la ocurrencia de posibles eventos de recombinación (Ghiringhelli, 2002), estos se basan en casos hipotéticos. En este trabajo se caracterizó al arenavirus Río Carcarañá y se postularon posibles mecanismos por los cuales se podría haber generado este recombinante natural.

En diferentes sistemas virales se ha propuesto que los entrecruzamientos ocurren debido a interacciones locales entre secuencias presentes en el RNA naciente y el RNA aceptor. Posteriormente se han propuesto modelos más complejos, en los que se requieren otros elementos de secuencia (Nagy *et al.*, 1999).

Ya ha sido propuesto que en el mecanismo de recombinación por *copy choice*, las replicasas hacen una pausa en regiones de secuencia ricas en AU (Nagy *et al.*, 1999) y posteriormente cambian a una nueva molécula molde aceptora. En el mecanismo propuesto se encuentra esta región rica en AU, que se continúa con un segmento en el que la complementariedad de bases permite la formación de un apareamiento heterotípico (23 pares de bases de 26 posibles, estabilizando la interacción entre los moldes) y de una estructura secundaria del tipo *hairpin loop*, las mismas colaboran con la detención de la polimerasa y, posiblemente, con el desprendimiento de ésta y el posterior cambio de molde.

Ha sido propuesto que la pausa de las RNA polimerasas y el cambio de molde se produce por la dificultad que encuentran las replicasas para desenrollar regiones de RNA dúplex, posiblemente por efecto de las mutaciones en los dominios de helicasa o por la poca procesividad de las RNA polimerasas (Nagy *et al.*, 1999; Bujarski, 1996). Es posible que existan modos alternativos de saltos de polimerasas *in vivo* que podrían estar influenciadas por factores desconocidos y eventos asociados con la activa replicación viral. En este sentido, trabajos relativamente recientes responsabilizan a la concentración intracelular de RNA como un factor clave en el aumento de la frecuencia de recombinación (Raju *et al.*, 1995).

Es común que a partir de virus salvajes se originen partículas defectivas interferentes (DI), ya sea por deleciones espontáneas o por replications incompletas causadas por la poca procesividad de las replicasas. Debido a las deleciones, las partículas DI tienen alterado o carecen de al menos uno de los genes virales, pudiéndose propagar solamente si la misma célula es coinfectada con un virus intacto que pueda proveer las proteínas faltantes *en trans*.

La generación de partículas defectivas interferentes, particularmente durante las infecciones virales con alta multiplicidad, produce altas concentraciones intracelulares de RNAs abortivos emparentados. La presencia de pequeños segmentos de complementariedad de bases entre estos RNAs y moléculas virales completas de la misma polaridad permiten que se formen pequeños segmentos heteroduplex. Precisamente, es en estas regiones en donde el extremo hidroxilo 3' libre de la molécula abortiva produce el ataque nucleofílico sobre el RNA viral, produciendo la ruptura de una unión fosfoéster. La posterior ligación entre la moléculas de RNA permite la formación de la molécula recombinante.

Recientemente, se han llevado a cabo experimentos para explorar la posibilidad de recombinación en ausencia de replicasas (Chetverina *et al.* 1999). En estos ensayos, una mezcla de fragmentos de RNAs fue capaz de recombinar *in vitro* en presencia de un buffer

salino y concentraciones milimolares de  $Mg^{++}$ . Los sitios de recombinación demostraron no ser dependientes de secuencia y no variaban cuando las secuencias eran alteradas, por lo que se descartó la posibilidad de existencia de estructuras crípticas del tipo de las ribozimas. Estos experimentos demostraron la posibilidad de recombinación no replicativa, en la que solamente es necesaria la presencia del RNA para producir un evento de recombinación. De hecho, este tipo de autorrecombinación pudo haber jugado un papel importante en el mundo prebiótico de RNA como en el mundo contemporáneo de DNA.

Existe una amplia evidencia experimental que demuestra que, durante las infecciones agudas o a partir de células persistentemente infectadas con arenavirus, se generan una alta proporción de partículas DI de tamaño subgenómico y de ambas polaridades (genómica y antigenómica; Southern, 1996; Romanowski y Bishop, resultados no publicados; Stocker *et al.*, 1994). Es posible que la sola presencia de elevadas concentraciones intracelulares de estas moléculas de RNA defectivas sea suficiente para producir eventos de recombinación por transesterificación, sin descartar la participación de factores proteicos que puedan aumentar la frecuencia recombinogénica.

Cuando se analizan todas las posibles regiones de complementariedad entre el RNA S del virus Junín en polaridad viral versus el resto de los arenavirus del Nuevo y Viejo Mundo (incluido Oliveros) en polaridad viral complementaria aparecen un sinnúmero de regiones candidatas para posibles eventos de recombinación mediante el mecanismo de *primer alignment and extension* (Ghiringhelli, 2002). Para que esto ocurra, es necesario que alguna de las hebras involucradas sea abortiva, presente un extremo 3' complementario con una molécula de RNA viral y aporte un hidroxilo 3' libre. La poca procesividad de las replicasas que permanentemente se liberan y reinician la replicación sobre extremos 3' libres suministrados por alguna de las múltiples moléculas incompletas de RNA, permiten explicar fácilmente la posibilidad de formación de moléculas recombinantes por este mecanismo.

Si bien estos modelos permiten explicar la formación de moléculas de arenavirus recombinantes, son hipótesis que deberían ser confirmadas con experimentos diseñados especialmente para ello. Además, quedan varios aspectos por elucidar con respecto a la recombinación de los arenavirus. Estos están relacionados principalmente con la identificación del mecanismo que efectivamente permite la generación de moléculas recombinantes y, asociado a esto, la determinación de elementos de secuencia que puedan ser requeridos para el proceso, la necesidad de factores proteicos celulares o virales, la cantidad relativa de replicasas con respecto a los RNAs moldes, la necesidad de formación de híbridos mixtos entre RNAs limitantes de sentido negativo y exceso de RNA de sentido positivo (o viceversa), la concentración intracelular de RNA como factor determinante del aumento de la frecuencia de recombinación o la influencia de otros factores desconocidos o eventos asociados con la replicación viral activa.

La recombinación puede ser un evento mucho más común de los que a menudo se asume, pero puede pasar indetectada por la acción de fuertes presiones de selección que eliminarán a las nuevas combinaciones deletéreas. Para cuantificar el número de eventos de recombinación se utiliza la frecuencia de recombinación (sin especificar unidades), pero ésta depende críticamente de si se evalúa la recombinación antes o después de que actúen los procesos de selección. Un virus puede producir híbridos de RNA bajo condiciones de

laboratorio, pero puede ser que los genomas recombinantes no se encuentren o se encuentren rara vez en la naturaleza.

Aparentemente, el intercambio genético juega un rol importante en varios grupos de virus y esto está vinculado directamente con la diversidad viral antigua y reciente. Así, el conocimiento evolutivo de la recombinación tiene un amplio impacto sobre diferentes aspectos del estudio de los virus a RNA, desde la investigación taxonómica hasta los detalles de la epidemiología molecular y el diseño de vacunas. El flujo de datos de secuencias de genomas virales y la accesibilidad a nuevos y poderosos métodos filogenéticos hace que la detección y caracterización de la recombinación viral sea cada vez más fácil y la lista de virus que presentan recombinación sea cada vez más amplia. La evidencia de recombinación, no solo entre virus cercanamente relacionados sino también entre virus alejados filogenéticamente, virus de polaridad positiva y negativa, partículas DI de virus a RNA e incluso con RNAs del hospedador sugiere que casi cualquier material genético puede estar sometido a algún evento de recombinación.

PARTE IV

MATERIALES Y MÉTODOS

## CAPÍTULO 9

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### PRODUCTOS QUÍMICOS Y ENZIMAS

En la realización del presente trabajo fueron utilizados reactivos de grado analítico o grado biología molecular provistos por las empresas Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, USA), Bio Rad (Hercules, USA), Fluka (Suiza), Carlo Erba (Milano, Italia) o Mallinckrodt (Phillipsburg, USA). Las enzimas utilizadas fueron abastecidas por las empresas Sigma (USA), Stratagene (La Jolla, USA), Promega (Madison, USA) USB Corporation (Cleveland, USA), Perkin Elmer (Cypress, USA) o New England Biolabs (Beverly, USA).

Los componentes de los medios de cultivo para bacterias utilizados fueron de Difco (Detroit, USA). Los medios de cultivo de células eucariotas fueron suministradas por Gibco BRL (Grand Island, USA) y los sueros fetales por Bioser (Buenos Aires, Argentina) o GEN (Buenos Aires, Argentina). Las cajas de Petri y los frascos de poliestireno, utilizados en el cultivo de células fueron provistos por Nunc (Kamstrup, Dinamarca) y Corning (USA).

Debido la necesidad del uso en los protocolos de biología molecular de una máxima calidad y pureza de los reactivos e incluso del agua, ésta fue destilada, desionizada y esterilizada por autoclave a 120°C.

#### MATERIAL RADIATIVO

La marcación de ácidos nucleicos para las reacciones de secuencia de nucleótidos fue realizada por incorporación de [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]dATP. Éste nucleótido fue sintetizado en nuestro laboratorio a partir de [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP, provisto por New England Nuclear (NEN, USA).

El dosaje de material radiactivo se realizó por medición con un contador Geiger (para <sup>32</sup>P) o por medio de un contador de centelleo líquido por efecto Cerenkov ó utilizando solución de centelleo.

Para autorradiografías se utilizaron películas X-Omat™ de Kodak (Rochester, USA) o Curix Ortho HT™ de Agfa (Mortsel, Bélgica). El revelado se realizó en forma manual de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes.

#### BACTERIAS Y PLÁSMIDOS

Para el clonado de los productos de amplificación por RT-PCR se utilizaron los vectores pUC19 (Mesing, 1983), pBR322 (Bolivar *et al.* 1977), pBS II KS+ (Stratagene, USA), pGEM-T (Promega, USA) y pZErO-2 (Invitrogen, USA) y las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$ F', SURE y TOP10.

**DH5 $\alpha$ F'** {endA1, hsdRI7(rk-, mk+), supE44, thi1, recA1, gyrA96, relA1,  $\Delta$ lacU169 F' $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15}}. Hanahan (1983); BRL (1986).

**SURE** {mcrA, mcrB, mrr, endA1, supE44, recA1, l', thi, gyrA96, umuC::Tn5 (kan<sup>r</sup>), cbcC201, uvrC, lac<sup>-</sup>, relA1, recB, recJ, D(hsdRMS), F'[proAB, lacI<sup>q</sup>, lacZDM15, Tn10 (tet<sup>r</sup>)]}. Stratagene<sup>TM</sup> (1989).

**TOP10** F', mcrA,  $\Delta$ (mrr-hsd RMS-mcrBC),  $\phi$ 80/lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74, deoR, recA1, araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL(StrR), endA1, nupG. Invitrogen.

*Medios de cultivo para bacterias: Medio LB (Luria Bertani, Sambrook et al., 1989)*

|                      |         |
|----------------------|---------|
| Triptona             | 10 g    |
| Extracto de levadura | 5 g     |
| Cloruro de sodio     | 10 g    |
| Agua destilada       | 1000 ml |

Se ajustó el pH a 7,6 y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 120°C. Para medio sólido (LB/agar) se agregó antes de autoclavar 15 g de agar /litro. La temperatura a la cual se cultivaron las *E. coli* fue de 37°C.

*Medios de conservación*

La conservación de las cepas bacterianas a largo plazo se realizó por congelación rápida de cultivos crecidos hasta la fase logarítmica tardía a los que se los suplementó con glicerol estéril como criopreservante hasta una concentración final de 15% (V/V). Los tubos se mantuvieron a -135°C, manteniendo la viabilidad durante varios años.

## CÉLULAS Y VIRUS

La propagación de las distintas cepas del virus Junín se realizó infectando monocapas de células BHK-21 (C13) en cultivo (fibroblastos de riñón de hámster lactante, Stoker and McPherson, 1961; ATCC, CRL8544, C1008). Las titulaciones de arenavirus se realizaron sobre monocapas de células Vero (fibroblastos de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aegypticus*, Yasumura and Kawakita, 1963; ATCC, CCL81).

La manipulación de las cepas virulentas se realizó en laboratorios de máxima bioseguridad biológica (BSL4, BioSafety Level 4). Para este fin se estableció un acuerdo de colaboración con los Centers for Disease Control (CDC, Atlanta, USA) para el cultivo de las cepas prototipo, las que fueron suministradas como un lisado de células infectadas inactivado con isotiocianato de guanidinio (Lozano et al., 1993a).

**SOLUCIONES PARA LA PURIFICACION Y EL ANALISIS DE LOS ACIDOS NUCLEICOS***PURIFICACIÓN DE RNA**TCG 2X*

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| isotiocianato de guanidinio | 8 M    |
| Citrato de sodio            | 50 mM  |
| Sarkosyl                    | 1%     |
| β-mercaptoetanol            | 180 mM |

La solución de TCG 2X cristaliza a temperatura ambiente. Para disolverla se debe poner la botella en un baño maría (100°C) durante 15 minutos, aflojando la tapa. Cuando se observa que la solución se torna translúcida, se debe agitar la botella por rotación hasta que la solución quede homogénea.

*Fenol ácido*

El fenol ácido es fenol equilibrado con agua bidestilada estéril. Para obtenerlo se fundió el fenol en un baño maría, se le agregó 0,3 volúmenes de agua, se lo agito hasta formar una emulsión y se lo dejó decantar las fases. La fase superior corresponde a la solución acuosa y la fase inferior al fenol. El pH de la solución acuosa debe estar alrededor de 4,5.

*Cloroformo - alcohol isoamílico*

Se mezclan 24 partes de cloroformo más 1 parte de alcohol isoamílico. El alcohol isoamílico no es esencial y se utiliza para mejorar la separación de fases.

*NaAc 3M*

Se disuelven 408,1 g de acetato de sodio en 800 ml de H<sub>2</sub>O. Se ajusta el pH a 5,2 con ácido acético glacial, se ajusta el volumen a 1 litro y se esteriliza por autoclave.

*Alcoholes*

Isopropanol y etanol 96% y 70 %.

*Fenol básico (pH 8)*

Fenol equilibrado con Tris:HCl pH 8. El fenol se fundió en un baño maría, se le agregó 1 volumen de una solución de Tris base 1 M, se lo agitó hasta formar una emulsión y se dejó decantar las fases. La fase superior corresponde a la solución acuosa y la fase inferior al fenol. Se elimina la solución acuosa. Se repite el procedimiento hasta que el pH de la solución acuosa alcance el valor de 8,0.

*Fenol- cloroformo - alcohol isoamílico*

Se mezclan 24 partes de fenol, pH 8, 24 partes de cloroformo y 1 parte de alcohol isoamílico. El alcohol isoamílico no es esencial y se utiliza para definir mejor la interfase.

### **PRESERVACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE CON TIOCIANATO DE GUANIDINIO**

El tiocianato de guanidinio 8 M cristaliza inmediatamente al bajar la temperatura por lo que es necesario mantenerlo fundido a baño maría. Si fuera necesario se le agrega el  $\beta$ -mercaptoetanol. Considerando que también se cristaliza dentro de las pipetas, es necesario calentar las pipetas de vidrio sobre el mechero previo al fraccionamiento.

La sangre se extrajo sin anticoagulante o usando EDTA o citrato de sodio como anticoagulante. No se recomienda utilizar heparina ya que inhibe la polimerasa en las reacciones de PCR. Sin embargo, en algunas muestras de sangre de pacientes con FHA se utilizó heparina lo que requirió un tratamiento con Chelex 100 (Bio-Rad; Walsh *et al.* 1991) para eliminarla.

Se mezclaron partes iguales de sangre y tiocianato de guanidinio 8 M fundido y se los mezcló por agitación vigorosa. En estas condiciones se han conservado muestras a temperatura ambiente durante varios meses sin observarse degradación de ácidos nucleicos al momento de su procesamiento.

### **EXTRACCIÓN DE RNA A PARTIR DE CÉLULAS INFECTADAS**

El RNA total de células infectadas en cultivo se obtuvo desprendiendo la monocapa usando PBS sin  $\text{Ca}^{+2}$  ni  $\text{Mg}^{+2}$ , a 4°C, y con 5 mM final de EDTA. La suspensión de células se centrifugó a baja velocidad en una centrífuga clínica, descartándose el sobrenadante. Se efectuó la lisis celular con solución TCG 1X, usando un volumen equivalente a 20 veces el volumen de las células obtenido en el paso anterior. Esta solución se extrajo con fenol ácido (1 volumen) y cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 v/v (0,2 volúmenes) y luego se precipitó con 2 volúmenes de isopropanol en presencia de acetato de sodio 0,2 M pH 5,2; de acuerdo a la técnica de Chomczynski y Sacchi (1987), con modificaciones menores.

En nuestros experimentos el *pellet* de RNA obtenido se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de agua libre de RNasas, se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol en presencia de acetato de sodio 0,3 M, y se lavó con etanol 70%. El RNA así aislado, se secó, se resuspendió en 10  $\mu\text{l}$  de agua libre de RNasas y se conservó congelado a -70°C. La calidad del RNA obtenido se analizó por electroforesis en geles de agarosa.

### **SÍNTESIS DE CDNA Y AMPLIFICACIÓN POR PCR**

La síntesis y amplificación del cDNA se realizó según el método denominado RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, Doherty *et al.*, 1989). Por este método se sintetiza solamente la primera cadena del cDNA, a partir de la cual se amplifican regiones específicas de la misma por PCR.

Las muestras de RNA fueron calentadas a 95°C durante 5 minutos en presencia de un *primer* (2  $\mu\text{M}$ , concentración final) antes de iniciar la transcripción reversa. La síntesis de cDNA de la primera cadena se llevó a cabo en un volumen de 10  $\mu\text{l}$  conteniendo 60 mM de Cl, 25 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM de ditioneitol, 0,5 mM de cada uno de los dideoxinucleósidos trifosfato (dNTPs), 7,5 u de RNasin (inhibidor de RNasa

pancreático, Promega) y 4 u de transcriptasa reversa de AMV (virus de la mieloblastosis aviar, Promega). La muestra de reacción fue incubada durante 1 hora a 42°C. La primera cadena de la reacción de cDNA fue precipitada con etanol, acetato de sodio (100 mM final) y 2,5 µg de poliacrilamida lineal (PAL).

Después de la síntesis de la primera cadena de cDNA, las reacciones de amplificación enzimática del cDNA por ciclado térmico se llevaron a cabo utilizando la DNA polimerasa termoestable de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu DNA pol*, Stratagene, La Jolla, USA).

La *Pfu DNApol* posee, a diferencia de la *Taq DNA* polimerasa, la capacidad de lectura de prueba (actividad exonucleasa 3'-5'), que disminuye considerablemente la frecuencia de error (Doherty *et al.*, 1989; Kunkel Eckert, 1989). Otra diferencia es que la *Pfu* genera extremos perfectamente romos que facilitan el posterior clonado, cosa que no ocurre con la *Taq DNA* polimerasa.

Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando el buffer específico de la enzima (50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> y 0,01% de gelatina) en un volumen final de 10 µl. Además, las reacciones contenían 1 a 4 µl de la reacción de cDNA (como molde), 1 µM de cada *primer*, 200 µM de cada uno de los dNTPs y 0,25 unidades de *Pfu DNA* polimerasa. Después del agregado de todos los componentes, la reacción fue cubierta con una gota de aceite mineral y luego se inició el ciclado de temperaturas.

Las reacciones se llevaron a cabo en un ciclador térmico en base al siguiente programa:

| Etapa                     | Temperatura<br>(°C) | Tiempo<br>(seg) | Ciclos |
|---------------------------|---------------------|-----------------|--------|
| desnaturalización inicial | 94°                 | 60              | 1      |
| desnaturalización         | 94°                 | 30              |        |
| hibridación (annealing)   | 48°                 | 30              | 40     |
| polimerización            | 72°                 | 80              |        |
| extensión final           | 72°                 | 180             | 1      |

La etapa inicial favorece la desnaturalización de la muestra y la etapa final asegura la terminación de todas las moléculas sintetizadas. El perfil de ciclado fue modificado ligeramente de acuerdo a las características de los *primers* usados en cada reacción, el tamaño de los fragmentos esperados y tipo de ciclador usado.

Inicialmente, las amplificaciones por PCR se realizaron en un ciclador térmico *Hybaid* (Teddington, UK). A medida que se pudo disponer de otros equipos, las reacciones se realizaron alternativamente en un ciclador *Air Thermo Cycler 1605* (Idaho Technology, Salt Lake City, Utah, USA) y en un *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Hamburg, Alemania).

Los productos de las reacciones de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa (1 a 2 %) en buffer TAE (40mM Tris, 0,114% de ácido acético, 1 mM EDTA pH 8,0) a 10 V/cm. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y la detección se realizó por transiluminación con luz UV. Las regiones conteniendo los fragmentos

amplificados de interés se cortaron del gel con bisturí y se las conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, el DNA fue separado de la agarosa con *GeneClean II* (Bio 101, La Jolla, USA), método basado en la adsorción-desorción de las moléculas de DNA sobre polvo de sílice. Básicamente, el método consiste en disolver el fragmento de agarosa en 1 volumen de una solución de NaI (6M) a  $55^{\circ}\text{C}$ , luego, se agrega la matriz de sílice, permitiendo la adsorción del DNA durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión se centrifuga y se lava el sedimento 3 veces, con una solución concentrada de NaCl y Tris-HCl pH 8 en etanol (50%). Finalmente, el DNA se eluye en agua a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. Después de la purificación se estimó el porcentaje de recuperación corriendo una alícuota en un gel de agarosa.

Dado que el rendimiento de las amplificaciones por PCR a partir de cDNA no fue muy bueno, antes de iniciar el clonado fue necesario generar una mayor cantidad de cada uno de los fragmentos de amplificación, sin la cual no se puede obtener una buena eficiencia en el clonado. Por lo tanto se realizaron reamplificaciones por PCR de varios de los fragmentos obtenidos.

Dichas reamplificaciones se efectuaron utilizando los mismos *primers* que se emplearon en la amplificación a partir del cDNA de simple cadena. Como molde se utilizaron diluciones 1/100 o 1/1000 de los fragmentos amplificados a partir del cDNA y se utilizó la polimerasa termoestable de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu* DNA pol). Los productos de reamplificación fueron analizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y, posteriormente, purificados con *GeneClean II*.

#### ANÁLISIS DE ACIDOS NUCLEICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

##### *Geles de Agarosa*

Agarosa 0,7%, Agarosa 1%, Agarosa 2%, Agarosa 3%. Estas soluciones contienen TAE 1X y Bromuro de etidio 0,16 mg/ml

##### *Buffer de corrida: TAE 1X*

Tris-acetato            0,04 M

EDTA                    0,001 M

El TAE se puede preparar como solución concentrada 50X.

##### *Stock TAE 50X (para 1 litro)*

Tris base                    242 g

0,5 M EDTA, pH 8        100 ml

ácido acético glacial    57,1 ml

##### *Bromuro de etidio*

Se preparó una solución stock concentrada de 10 mg/ml de bromuro de etidio en agua que se conservó a temperatura ambiente, protegida de la acción de la luz natural. La concentración final utilizada en los buffers de corrida de geles de agarosa fue de  $0,5 \mu\text{g/ml}$

### *Soluciones para la siembra de muestras*

De acuerdo a la concentración del gel se utilizaron 2 soluciones diferentes: TAE 1X, glicerol 50%, xilencianol 0,2% (p/v) y azul de bromofenol 0,2% (p/v), para geles de agarosa 0,7% o 1%; y TAE 1X, glicerol 50% y naranja G 0,2% (p/v), para geles de agarosa 2,5% o 4%.

## **TÉCNICAS DE CLONADO DE DNA**

### *Digestión de DNA con enzimas de restricción*

El número de unidades enzimáticas a utilizar en la digestión depende de la cantidad de DNA a digerir y del tiempo de digestión, tomándose como standard la siguiente proporción: 1U enzimática/mg de DNA/hora de digestión. Para cada enzima existe un buffer específico que ha de tenerse en cuenta para cada reacción.

El siguiente corresponde a un protocolo típico:

|  |                  |
|--|------------------|
| DNA plasmídico 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ | 20 $\mu\text{l}$ |
| Buffer de restricción 10X                  | 5 $\mu\text{l}$  |
| Enzima de restricción 10 U/ $\mu\text{l}$  | 1 $\mu\text{l}$  |
| Agua                                       | 24 $\mu\text{l}$ |
| Incubar durante 2 horas a 37°C.            |                  |

Las reacciones de digestión se analizaron por electroforesis en geles de agarosa nativos. La concentración de los fragmentos de DNA se estimó, en forma aproximada, por comparación con la intensidad de fluorescencia producida después de la electroforesis por los fragmentos presentes en patrones de peso molecular de concentración conocida.

### *Ligación de los productos de la digestión*

La cantidad de los diferentes DNAs a utilizar en las reacciones de ligación debe guardar una relación molar que se aproxime a 1:1. Sin embargo, dependiendo del método de selección de clones recombinantes utilizado y del tipo de extremos a ser ligados, es posible que esa relación cambie por lo que debe ser ajustada experimentalmente.

Si uno de los fragmentos es un vector plasmídico, por regla general se utilizan 5 ng del mismo en la reacción frente a diferentes relaciones molares del otro fragmento.

El siguiente corresponde a un protocolo típico:

|   |                 |
|---|-----------------|
| Fragmento A (X ng)                      | 2 $\mu\text{l}$ |
| Fragmento B (Y ng)                      | 2 $\mu\text{l}$ |
| Buffer de ligación 10X                  | 1 $\mu\text{l}$ |
| ATP 10 mM (1 mM final)                  | 1 $\mu\text{l}$ |
| Agua (para completar 10 $\mu\text{l}$ ) | 3 $\mu\text{l}$ |
| DNA ligasa (0,1U Weiss/ $\mu\text{l}$ ) | 1 $\mu\text{l}$ |

Las reacciones de ligación se realizaron utilizando la ligasa del fago T4 (0,5 a 1 unidad por cada 20-40 ng de vector, Promega o USB) y el buffer suministrado por los fabricantes

(condiciones finales de reacción: 30 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT y 1 mM ATP). Las reacciones de ligación se realizaron a 14°C durante toda la noche o a 16°C durante una hora, en una proporción molar inserto:vector de 1 a 1 en el caso de ligaciones de extremos cohesivos y de 10 a 1 para los extremos romos. Para la ligación de extremos romos se utilizó ATP a una concentración final de 0,5 mM y 5 veces más de DNA ligasa.

#### *Preparación de bacterias competentes (método de Hanahan)*

Las bacterias pueden ser genéticamente transformadas por la entrada de un DNA exógeno, sin embargo, aún no fueron dilucidados el o los mecanismos moleculares que rigen dicho fenómeno. La transformación es posible gracias a tratamientos a los que se someten a las bacterias (en especial con soluciones de CaCl<sub>2</sub>) que inducen un estado transitorio de competencia durante el cual son capaces de incorporar moléculas de DNA foráneo del medio circundante. La preparación de bacterias competentes se realizó de acuerdo al método de Hanahan (Sambrook *et al.*, 1987).

Se realizó un cultivo a 37°C, con agitación durante toda la noche de la cepa de interés (DH5 $\alpha$ ) en medio LB. A partir de este cultivo se inició otro 1/100 en el mismo medio (100 ml) y se lo cultivó en las mismas condiciones hasta llegar a una DO<sub>600</sub> de alrededor de 0.6. Se enfrió durante 15 min a 0°C (en agua y hielo) y se centrifugó durante 10 min a 4000 X g y a 4°C (todas las centrifugaciones se realizan a 4°C). Se descartó el sobrenadante y se resuspendió al *pellet* de bacterias en 40 ml de la solución Tfb I (30 mM KAc, 100 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Cl<sub>2</sub>Mn, 15% glicerol, pH a 5,8, a 0°C) incubando durante 15 min a 0°C.

Posteriormente se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y se resuspendió el *pellet* de bacterias en 4 ml de Tfb II (10 mM PIPES, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 15% glicerol, pH a 6,5, a 0°C). Se incubó durante 15 min en agua y hielo, y se fraccionó en alícuotas de 200  $\mu$ l que se congelaron a -80°C para su preservación.

#### *Transformación por shock térmico (Sambrook et al., 1989)*

Por cada transformación se descongelaron 50  $\mu$ l bacterias competentes obtenidas por el método químico y se incubaron a 0°C durante 10 min, se les agregó el DNA (de 1 a 10 ng de la mezcla de ligación) y se incubó la nuevamente a 0°C durante 30 min. Transcurrido éste tiempo, se sometió a las bacterias a un *shock* térmico (42°C durante no más 2 min), para incubarlas nuevamente durante 2 min a 0°C. Tras este tratamiento, se le adicionaron 200  $\mu$ l de LB, se las incubó durante una hora a 37°C sin antibiótico y se las plaqueó en medio LB sólido con el antibiótico de selección.

#### *Preparación de bacterias electrocompetentes*

La electroporación es un método de transformación en el cual se somete a las bacterias a un pulso eléctrico para conseguir la entrada de material del medio circundante al interior de la célula. Para la preparación de las bacterias electrocompetentes se siguió la técnica de Dower *et al.* (1988).

A un litro de medio de cultivo LB sin NaCl se lo inoculó con 1 ml de un cultivo saturado de bacterias y se lo cultivó a 37°C con agitación vigorosa. Cuando el cultivo alcanzó una

DO<sub>600</sub> de 0,6, se lo enfrió y se lo centrifugó en frío (4°C) durante 15 min a 4000 x g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet resultante en 1 L de glicerol al 10% frío. Se repitió el procedimiento tres veces más resuspendiendo el pellet en 0,5 L, 20 ml y finalmente en 2 ml de glicerol 10% frío, se fraccionó en alícuotas de 100 µl y se las conservó a -80°C.

### Electroporación

La electroporación, transformación bacteriana por shock eléctrico, se realizó en un equipo Gen Pulser (BioRad, California, USA) en cubetas de 0,2 ml, de acuerdo con las indicaciones del fabricante (25µF; 2,2 kV y 200 Ω).

Se mezclaron 100 µl de las bacterias electrocompetentes con 1 a 5 µl de la mezcla de ligación, se incubó durante un minuto, se efectuó el pulso eléctrico, se resuspendieron las bacterias en 400 µl de LB y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se plaqueó en cajas de Petri con LB sólido y se incubó durante toda la noche a 37°C.

### Medios para selección de recombinantes

Para la selección de los clones recombinantes se utiliza generalmente el medio LB al que se le adiciona el antibiótico adecuado (que depende del gen de resistencia que se exprese en el plásmido transformante). Los antibióticos fueron agregados a los medios de cultivo a partir de soluciones stock concentradas 1000 veces con respecto a la concentración final de los mismos. Los antibióticos utilizados y sus concentraciones se detallan en la tabla 9.1.

| Antibiótico       | Solución stock    | Concentración final   |
|-------------------|-------------------|---|
| Ampicilina sódica | 100 mg/ml         | 100-200 µg/ml   |
| Tetraciclina      | 5 mg/ml en etanol | 10 µg/ml para plásmidos de control estricto.<br>50 µg/ml para plásmidos de control relajado |
| Cloranfenicol     | 34 mg/ml          | 30 µg/ml  |
| Kanamicina        | 25 mg/ml          | 25-50 µg/ml   |

**Tabla 9.1**

**Antibióticos utilizados para la selección de colonias recombinantes.**

Para cada antibiótico se indica la concentración de las soluciones stock y la concentración final en el medio de cultivo.

Las soluciones preparadas con agua fueron esterilizadas por filtración a través de filtros de nitrocelulosa de 0,2 µm de tamaño de poro. No es necesario esterilizar las soluciones preparadas con alcohol.

En algunos sistemas, la selección de colonias bacterianas que llevan plásmidos recombinantes se puede realizar por el ensayo de α-complementación. En estos sistemas, el sitio múltiple de clonado está dentro de la secuencia del gen que codifica para la porción amino terminal (péptido α) de la enzima β-galactosidasa (*lacZ*). Los vectores de este tipo se usan para transformar cepas bacterianas que codifican para el extremo carboxilo terminal de la proteína. La forma activa de la enzima surge por la asociación de los dos polipéptidos.

Las bacterias que realizan  $\alpha$ -complementación son reconocidas por formar colonias azules en presencia del sustrato cromogénico 5-Br-4-Cl-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido (X-gal) ( $\alpha$ -complementación positiva). Sin embargo, la inserción de un fragmento de DNA foráneo en el sitio de clonado múltiple del plásmido resulta, en casi la totalidad de los casos, en la producción de un fragmento amino terminal que no es capaz de realizar  $\alpha$ -complementación ( $\alpha$ -complementación negativa). Por lo tanto, las bacterias que llevan los plásmidos recombinantes forman colonias blancas.

En estos ensayos es necesario adicionar al medio de cultivo el inductor IPTG (isopropil-tio- $\beta$ -D-galactósido) y el X-gal. Así, a las cajas de Petri preparadas con LB/agar y el antibiótico adecuado, se le agregan 40  $\mu$ l de una solución de X-gal en N,N-dimetilformamida (20 mg/ml) y 4  $\mu$ l de una solución acuosa de IPTG (200 mg/ml).

Como sistema alternativo para el clonado fue utilizado el vector pZErO (Invitrogen). Este plásmido permite disminuir el número de colonias que han sido transformadas con plásmidos sin inserto facilitando la selección de las colonias recombinantes. Este vector permite la selección directa y positiva de insertos por disrupción del gen letal *ccdB* (gen B de control de la muerte celular). El gen *ccdB* codifica para la proteína CcdB, que es altamente letal cuando se une a la enzima DNA girasa. La proteína CcdB permite a la girasa clivar su sustrato de DNA, pero inhibe su habilidad de resellar los cortes en el DNA.

El vector pZErO expresa la proteína CcdB, causando un gran daño al DNA celular conduciendo finalmente a la muerte celular. Sin embargo, cuando un inserto es clonado en el vector pZErO, se produce una disrupción en el gen letal CcdB y solo pueden crecer los recombinantes. El vector fue digerido con la enzima de restricción *EcoR* V, que deja extremos romos. La transformación se realizó por electroporación de bacterias *E. coli* TOP10 electrocompetentes. Esta cepa es la recomendada para el vector pZErO, dado que no contiene el gen *lacI*, por lo que el gen *ccdB* es expresado constitutivamente sin necesidad de inducción con IPTG.

Para confirmar si el fragmento clonado estaba presente en las colonias seleccionadas, se realizó sobre cada una de ellas una reacción de PCR. Al material proveniente de cada colonia se lo resuspendió en 20  $\mu$ l de agua, se lo lisó por calor (10 minutos a 100 °C) y se utilizó una alícuota (en general 1  $\mu$ l) como molde en la reacción. Los *primers* utilizados T7 y SP6 (correspondientes a las secuencias promotoras de los fagos T7 y SP6) o los *primers* universales de M13 (directos: -20, -40 y reversos: -24 o -48) hibridan con secuencias del vector que flanquean a la región de clonado múltiple (*polylinker*). Los productos de amplificación poseen, además del fragmento clonado, las regiones flanqueantes del vector. Aquellos clones en los cuales no se amplificaba la banda correspondiente fueron descartados.

Eventualmente, podría suceder que durante el proceso de clonado se introduzca un fragmento de DNA que, al secuenciarlo, resulta no ser el fragmento que se intentó clonar. Dichos fragmentos aparecen como artefactos o contaminaciones durante las reacciones de amplificación por PCR o de purificación del DNA. Debido a esto, sobre cada clon positivo en la reacción de PCR con los *primers* que hibridan a los lados del sitio múltiple de clonado, se realizó una nueva reacción utilizando *primers* específicos que hibridan en los extremos o dentro del fragmento clonado. En la mayor parte de los casos se utilizó el mismo par de

*primers* con el que se amplificó el fragmento a partir del cDNA. En casi la totalidad de las reacciones realizadas, se pudo comprobar la presencia de los fragmentos clonados ya sea utilizando los *primers* que hibridan en el vector como los *primers* que hibridan en el fragmento clonado.

#### *Extracción de DNA plasmídico por el método de la lisis alcalina*

Los plásmidos recombinantes fueron amplificados en *E. coli* DH5 $\alpha$  F' y *E. coli* TOP10 F', y purificados por lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Este método permite separar el DNA plasmídico del resto de los componentes bacterianos (entre los que se incluye el DNA cromosómico). Esto es posible gracias a que los plásmidos son moléculas circulares covalentemente cerradas y a que su tamaño es relativamente pequeño.

La purificación se realiza a partir de un cultivo bacteriano saturado en medio LB al que se le adicionó la cantidad apropiada de antibiótico para selección de los recombinantes. Se centrifuga 1,5 ml del cultivo a 10.000 g durante 1 min. Se descarta el sobrenadante y se repite la operación dos veces más. Posteriormente se resuspende el *pellet* de bacterias resultante en 200  $\mu$ l de la solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0). Se le agregan 300  $\mu$ l de la solución II (0,2 N NaOH, 1% SDS). Esta solución genera una condición de alcalinidad tal (pH 12,0 a 12,6) que se produce la desnaturalización del DNA cromosómico de la bacteria sin afectar al DNA plasmídico. Posteriormente se neutraliza el pH alcalino con el agregado de 300  $\mu$ l de una solución de acetato de potasio 3 M pH 4,8 (solución III). El agregado de una solución rica en sales y el bajo pH generan las condiciones para que precipiten los ácidos nucleicos y las proteínas bacterianas. El DNA cromosómico junto con los restos celulares y las proteínas son eliminados después de centrifugar durante 15 min a 14.000 x g.

Al sobrenadante se le extraen las proteínas con volumen de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) y se precipita el DNA plasmídico presente en la fase acuosa con el agregado de 2,5 volúmenes de etanol. Se centrifuga a 14.000 x g durante 20 min. Al *pellet* resultante se lo lava con etanol 70%, se lo seca al vacío y se lo resuspende en agua bidestilada estéril.

#### *Método de lisis alcalina y precipitación con PEG*

Uno de los factores determinantes en el éxito de las reacciones de secuenciación por el método de terminación de cadena utilizando dideoxinucleótidos es la calidad del DNA molde. Por lo tanto, las preparaciones de DNA plasmídico utilizadas se realizaron por una modificación del protocolo de lisis alcalina que incluye un paso de precipitación con polietilenglicol<sub>8000</sub> (PEG<sub>8000</sub>), según está descrito en el manual de instrucciones del secuenciador automático modelo 373A de *Applied Biosystems*.

Para aumentar el número de bacterias por mililitro de medio, que se traduce en un mayor rendimiento de plásmido, el protocolo propone cultivar las bacterias el medio TB (*Terrific Broth*) ya que es más nutritivo que el LB (*Luria Broth*).

Al sobrenadante obtenido después de precipitar el DNA cromosomal y los restos celulares se lo trata con RNasa A (20  $\mu$ g/ml, durante 20 min a 37°C) para eliminar el RNA

bacteriano que interfiere con las reacciones de secuenciación. Posteriormente se extrae la enzima con un volumen de cloroformo (este procedimiento se repite dos veces).

Una vez precipitado el DNA plasmídico y resuspendido el pellet en agua bidestilada se realiza una segunda precipitación con NaCl (0,4 M) y PEG<sub>8000</sub> (6,5%) incubando a 0°C durante 20 min. Posteriormente se centrifuga durante 20 min, a 4°C y 10.000 x g. El precipitado resultante se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en agua bidestilada estéril.

## SECUENCIACIÓN DE DNA

La secuenciación del DNA se realizó según el método enzimático de terminación de cadenas utilizando dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977). Éste método consiste la síntesis *in vitro* de una cadena de DNA usando una DNA polimerasa. La síntesis es iniciada en el único lugar donde hibrida un *primer* con la cadena molde. La terminación de la síntesis se logra por la incorporación de un análogo de nucleótido (2',3'-deoxinucleósido 5'-trifosfato; ddNTP) que impide la continuación de la cadena. En un primer momento las reacciones de secuenciación se realizaron usando una forma modificada de la DNA polimerasa del fago T7 (Sequenase<sup>®</sup>, USB, Cleveland, USA). Posteriormente las reacciones se realizaron por ciclado térmico utilizando una polimerasa termoestable (AmpliTaq DNA polimerasa FS).

A partir de colonias en la que se confirmó la presencia del fragmento clonado, se inició un cultivo líquido y se realizó una purificación de DNA plasmídico por lisis alcalina y precipitación con PEG, según fue descrito anteriormente. En aquellos casos en que se utilizaron fragmentos de PCR como molde en las reacciones de secuencia, se cortaron las bandas de los geles de agarosa y se purificaron con GeneClean II, utilizando el producto final como molde en las reacciones. Alternativamente, los productos de amplificación fueron purificados por precipitación con PEG<sub>6000</sub> y cloruro de sodio.

### *Secuenciación con Sequenasa*

La secuenciación con Sequenasa<sup>®</sup> 2.0 utiliza una variante de la DNA polimerasa del fago T7 que carece de actividad exonucleasa 3'→5'. Además, se incluye en las reacciones de síntesis un oligonucleótido marcado radiactivamente de forma de poder visualizar por autorradiografía las cadenas de diferentes longitudes una vez realizada la separación por electroforesis de alta resolución.

Para ello, el DNA plasmídico (5 µg, en 20 µl de TE) se desnaturalizó con el agregado de 1 µl de 10M NaOH y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se purificó la muestra por cromatografía en columna utilizando la resina de exclusión molecular Sepharosa CL-4B (Miniprep Spun Column, Pharmacia, Suecia). A la fracción resultante se la concentró por evaporación al vacío en *speed-vac* hasta llegar a un volumen final de 7 µl los que se mezclaron con 2 µl del buffer de *annealing* 5X (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM NaCl) y 1 µl del *primer* utilizado como cebador (20 ng/µl). A esta mezcla se la incubó durante 1 hora a temperatura ambiente para permitir el *annealing*.

Para la marcación con  $\alpha^{32}\text{P}$  dATP se tomaron 5  $\mu\text{l}$  de la mezcla de *annealing* y a los que se les agregó los siguientes reactivos:

|   |                     |
|---|---------------------|
| mezcla de <i>annealing</i>  | 5,0 $\mu\text{l}$   |
| 0.1 M DTT (ditiotreitól)  | 0,5 $\mu\text{l}$   |
| <i>Labeling mix</i> (7,5 $\mu\text{M}$ de cada dNTP)                              | 0,2 $\mu\text{l}$   |
| $\alpha^{32}\text{P}$ dATP (4 $\mu\text{Ci}$ /reacción)                           | 1,05 $\mu\text{l}$  |
| Sequenasa   | 0,125 $\mu\text{l}$ |
| Buffer de dilución de la enzima (10mM Tris-HCl<br>pH7,5; 5 mM DTT; 0,5 mg/ml BSA) | 0,875 $\mu\text{l}$ |
|   | 7,75 $\mu\text{l}$  |

Después de incubar la mezcla de reacción a temperatura ambiente entre 30 segundos y 1 minuto, se la separó en alícuotas de 1,75  $\mu\text{l}$  en cuatro tubos conteniendo 1,25  $\mu\text{l}$  de cada solución de terminación. Cada una de estas soluciones contienen: uno de los 2'3'-dideoxynucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP o ddTTP; 8  $\mu\text{M}$ ), los cuatro dNTPs (80  $\mu\text{M}$  de cada uno) y 50 mM de NaCl. Estos tubos se incubaron a 37°C durante 5 a 8 min. Posteriormente se le agregó a cada tubo 4  $\mu\text{l}$  de la solución de terminación (95 % formamida, 20 mM EDTA, 0,05 % azul de bromofenol y 0,05 % xilen cyanol).

El análisis de las secuencias se realizó por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (6% acrilamida (38:2), 50% urea, 1X TBE). Las corridas electroforéticas se realizaron a una potencia constante de 80 *watts* para geles de 60 cm (largo) x 30 cm (ancho) y 0,4 mm de espesor. Las secuencias se detectaron por autorradiografía.

#### *Secuenciación automática*

Las reacciones de secuenciación automática se realizaron utilizando una DNA polimerasa termoestable, forma modificada de la Taq DNA polimerasa (AmpliTaq DNA polimerasa FS, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) que carece totalmente de actividad exonucleasa 5'→3'. El sistema utiliza el ciclado térmico para realizar una amplificación lineal *in vitro* del producto a secuenciar utilizando la polimerasa termoestable y un programa de ciclado en un ciclador térmico. Además, la enzima fue desarrollada específicamente para la secuenciación con terminadores (ddNTPs) marcados con moléculas fluorescentes (fluoróforos) que permiten la visualización de las cadenas de diferente tamaño a medida que son resueltas en un gel de poliacrilamida de alta resolución. Además, el uso de dideoxynucleótidos terminadores marcados con cuatro colorantes fluorescentes diferentes permite analizar la secuencia completa en una sola calle durante la corrida en el secuenciador automático.

En estas reacciones, la polimerasa termoestable, agrega deoxynucleótidos a partir de un *primer* que hibrida sobre la cadena de DNA utilizada como molde, hasta que se incorpora un dideoxynucleótido (marcado con un colorante fluorescente) que actúa como nucleótido terminador de la cadena (*ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit*, Perkin Elmer, Cypress, CA, USA).

La secuenciación se realizó utilizando como molde DNA plasmídico de doble cadena conteniendo los fragmentos clonados (aproximadamente 350 ng de un plásmido de 4000 pb por reacción) y sobre moléculas de DNA obtenidas por PCR (30 ng de un producto de amplificación de aproximadamente 400 pb precipitado con PEG<sub>6000</sub> por reacción).

Cada reacción incluyó el DNA molde, el *primer* (1 mM), 8 ml de la mezcla comercial de reacción (que incluye la DNA polimerasa termoestable, los dNTPs, los ddNTPs marcados con fluoróforos y el buffer de reacción) y agua bidestilada estéril hasta alcanzar un volumen final de 20  $\mu$ l. El ciclado térmico se realizó en un ciclador Perkin Elmer Gene Amp 2400 utilizando el siguiente programa:

| Etapa                   | Temperatura<br>(°C) | Tiempo<br>(seg) | Ciclos |
|-------------------------|---------------------|-----------------|--------|
| Desnaturalización       | 96°                 | 10              |        |
| Hibridación (annealing) | 50°                 | 5               | 25     |
| Polimerización          | 60°                 | 240             |        |

Para iniciar las reacciones de secuenciación se emplearon los *primers* directo y reverso de M13 (-20 directo y -24 reverso), los *primers* T7 y SP6 como también *primers* de secuencia específica para distintas regiones del RNA S del virus Junín.

Posteriormente al ciclado, las reacciones de secuencia fueron purificadas a través de columnas de exclusión molecular (Sephadex G50, Pharmacia) para eliminar los nucleótidos no incorporados, se secaron y se desnaturalizaron por calor en presencia de formamida desionizada. Inmediatamente después, los productos purificados se resolvieron en un gel desnaturalizante de poli(acrilamida) (6% poli(acrilamida), 7 M urea) en un secuenciador automático (*Applied Biosystems Model 373A DNA Sequencing System*). Generalmente se obtuvieron datos de secuencia legible que rondaron entre 250 y 400 bases por corrida. Los datos crudos de corrida fueron analizados por un software que automáticamente extrae las secuencias y permite almacenar la información de la corrida en un electroferograma.

## TÉCNICA DE SSCP

Para los ensayos de la técnica de SSCP (*Single Strain Conformation Polymorphism*, Polimorfismo de conformación de simple cadena), se utilizaron aproximadamente 10 ng de los fragmentos amplificados por PCR. A estos fragmentos se les agregó formamida desionizada (95% concentración final), 0.5 M EDTA (20 mM final), se los desnaturalizó por calor a 96°C durante 10 minutos, se los transfirió a un baño con agua y hielo (0°C) durante 4 minutos y se los sometió a electroforesis en geles nativos de poli(acrilamida) de distintas concentraciones (12%, 15% y 18% de una solución de acrilamida-bisacrilamida 30:1). Para asegurarse de mantener una temperatura constante durante la corrida, se utilizó una cuba de electroforesis Mighty Small II (Hoeffer) que posee una cámara cuyas paredes están en contacto con el buffer de corrida y por la que circula agua proveniente de un baño de temperatura controlada (0° a 100°C).

La temperatura seteada en el baño fue de 14°C, pero la temperatura medida dentro del buffer era de 22°C (temperatura considerada como efectiva durante la electroforesis y que fue seleccionada como óptima según los análisis predictivos de plegamiento intracatenario). Las corridas se efectuaron a 200 V, durante tres horas y media. Los patrones de migración de los confórmers correspondientes a ambas hebras de cada fragmento de PCR fueron visualizados mediante tinción con plata. Los geles de acrilamida al 15% fueron los que mostraron una mejor resolución de los confórmers.

Para evitar distorsiones en el patrón de corrida es necesario que la acrilamida esté completamente desionizada. Para ello se la trató con la resina AG 501-X8 (D) Resin 20-50 mesh (BioRad) la que se utiliza para desionizar y desalar agua y sustancias no iónicas. Esta resina posee un colorante que vira de color azul verdoso a amarillo cuando la capacidad de intercambio está agotada.

El buffer de electroforesis utilizado fue TBE 1X (0.089 M Tris base, 0.089 M ácido bórico, 2 mM EDTA). Los geles pueden prepararse con 5-10% de glicerol, que retarda el tiempo de electroforesis. Para estimar el tiempo de la corrida electroforética se debe considerar que las moléculas migran de forma similar a una molécula de DNA de doble cadena con un tamaño de 10 veces mayor. Cualquier variación mínima de las condiciones de electroforesis: temperatura, voltaje, % de la acrilamida, buffer, adición de otras sustancias, etc. puede variar drásticamente la SSCP.

#### *Síntesis de cDNA a partir de muestras de pacientes*

Las muestras de sangre utilizadas para realizar la extracción de RNA viral y la posterior síntesis del cDNA, provienen de muestras de sangre de pacientes con FHA hospitalizados en el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH), Pergamino, Argentina. Esos pacientes adquirieron la enfermedad durante el año 1991. Las muestras fueron tomadas dentro de los primeros días de admisión al hospital.

La extracción se realizó en presencia de heparina (14,6 u/ml). Posteriormente, la sangre se mezcló en partes iguales con una solución 8 M de tiocianato de guanidinio (GTC) (8 M isotiocianato de guanidinio, 1% sarkosyl, 50 mM citrato de sodio, 200 mM b-mercaptoetanol, Lozano *et al.*, 1993).

Para la obtención del RNA, a las muestras de sangre en GTC se les realizó una extracción con fenol ácido (pH 4.00), cloroformo y alcohol isoamílico y se las precipitó con etanol. Los pellets de RNA se resuspendieron en agua bidestilada estéril. Para la obtención de la primera cadena del cDNA, se utilizó la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV, Promega), en presencia de un inhibidor de ribonucleasas (RNAsin, Promega), utilizando un oligonucleótido específico como primer. El cDNA se precipitó con etanol y se utilizó como molde para PCR.

A partir de una dilución (1/100 o 1/1000) del cDNA de cada uno de los pacientes, se logró amplificar por PCR, solamente en algunas muestras, el fragmento de 217 pb esperado utilizando el par de primers JS863V y JS1079VC. Las amplificaciones fueron realizadas en un ciclador térmico Idaho Technology, utilizando el siguiente ciclado:

| Etapa                     | Temperatura<br>(°C) | Tiempo<br>(seg) | Ciclos |
|---------------------------|---------------------|-----------------|--------|
| desnaturalización inicial | 94°                 | 15              | 1      |
| desnaturalización         | 94°                 | 3               |        |
| hibridación (annealing)   | 54°                 | 5               | 40     |
| polimerización            | 72°                 | 20              |        |
| extensión final           | 72°                 | 60              | 1      |

Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 2% con bromuro de etidio. Las bandas correspondientes a los productos de amplificación fueron cortadas del gel y purificadas con Geneclean II (Bio 101).

Debido al bajo rendimiento obtenido en las amplificaciones por PCR a partir del cDNA, los fragmentos amplificados fueron sometidos a una nueva ronda de amplificación utilizando como molde una dilución 1/1000 del fragmento original. Una alícuota de estas reacciones fue analizada mediante electroforesis en agarosa 2% y el resto se conservó a -20°C para utilizarlo posteriormente para el SSCP.

#### *Tinción de geles de acrilamida con plata*

Para la obtención de buenos resultados en la técnica de tinción con plata es indispensable el uso de agua destilada ultrapura (MiliQ o similar) para el lavado de los recipientes plásticos y para la preparación de las soluciones.

Al gel de poliacrilamida se colocó en un recipiente plástico (previamente enjuagado con agua destilada ultrapura) y se le agregó una solución de fijación (acético 10%). Se agitó en agitador orbital durante 20 min. Se descartó la solución de fijación y posteriormente se realizaron 3 lavados (de dos minutos cada uno) con agua ultrapura y agitación. Después del último lavado, se dejó drenar el agua de 10 a 20 seg.

A continuación se realizó impregnación con plata con 100 ml de una solución de nitrato de plata (1,5 g/L nitrato de plata, 0,056% formaldehído en agua ultrapura) y se incubó con agitación durante 30 min. Se descartó la solución de nitrato de plata y agregó aproximadamente 100 ml de agua ultrapura. Se lavó el gel durante 5 a 10 segundos y se escurrió rápidamente. A continuación se adicionaron 100 ml de la solución reveladora (30 g/L de carbonato de sodio, 0,056% de formaldehído, 400 µg/L de tiosulfato de sodio) preenfriada a 10°C. Se agitó bien durante 1 a 2 minutos, se descartó la solución de carbonato y agregó nuevamente 100 ml de la solución de revelado preenfriada. Se continuó el revelado hasta que las bandas fueron visibles. Se descartó la solución de revelado y se detuvo la reacción con 100 ml de la solución de stop (10% de ácido acético) y se incubó con agitación durante 2-3 minutos.

## MÉTODOS COMPUTACIONALES

### *Perfiles de hidrofobicidad*

Los perfiles de hidrofobicidad son generados usando el método general de Kyte y Doolittle (1982). El método compila un set de valores de hidropatía para los 20 aminoácidos basados en la compilación de datos experimentales de la literatura. Una ventana de tamaño definido se mueve a lo largo de la secuencia, se suman los valores de hidropatía a lo largo de la ventana y se obtiene el promedio (la suma dividida el tamaño de la ventana) para cada posición en la secuencia. Los valores de hidrofobicidad media se grafican para el residuo del centro de la ventana.

### *Gráficos cartesianos de homología*

El alineamiento múltiple se realizó utilizando el paquete de rutinas **CLUSTAL V** (*Multiple Sequence Alignments*; Higgins and Sharp, 1988, 1989). El archivo de salida del alineamiento generado por el **CLUSTAL V** está formado por las secuencias y una línea con caracteres gráficos. En el caso de las secuencias nucleotídicas, se indica la identidad de nucleótidos con un asterisco (\*) y la no identidad con un espacio en blanco ( ). En el caso de las secuencias aminoacídicas la línea de caracteres gráficos indica identidad de aminoácidos con un asterisco (\*), posiciones fuertemente conservadas con dos puntos (:), posiciones débilmente conservadas con un punto (.) y posiciones no conservadas con un espacio en blanco ( ) de acuerdo a la matriz de sustitución Gonnet Pam250.

Con las líneas de datos correspondientes a los caracteres gráficos se generó un archivo ASCII independiente, carente de cualquier formato. Este archivo se procesó con la rutina **HOMGRAPH** (Ghiringhelli, 2002), para generar un archivo ASCII numérico con valores de homología relativos.

El archivo ASCII con la tabla de datos de homología relativa fue importado en el programa **SIGMAPLOT** para Windows v. 1.01 (Jandel Corporation), con el cual se confeccionó el gráfico definitivo.

### *Búsqueda de regiones codificantes*

Existen diversos métodos que permiten predecir la capacidad de codificación de una determinada secuencia nucleotídica. La mayor parte de estos métodos corresponden a una de dos categorías: los métodos que buscan las señales que delimitan las regiones codificantes (búsqueda por señales) y los métodos que analizan el contenido informativo de las potenciales regiones (búsqueda por contenido) (Rice *et al*, 1991).

En las secuencias eucariotas las señales que se buscan son, principalmente, codones de iniciación en un entorno adecuado, codones de terminación, sitios de *splicing*, señales de poliadenilación, etc.

Respecto de los codones de iniciación, Kozak (1983, 1984) ha demostrado que la eficiencia de traducción in vitro está en directa función del entorno nucleotídico del AUG. En función de esto, Kozak y otros autores han compilado y analizado el entorno de muchos AUGs eucariotas, construyendo una secuencia consenso y matrices de pesos logarítmicos que posibilitan la predicción de los codones de iniciación. Sin embargo, no debemos

olvidarnos que estas predicciones deben concordar de alguna manera con los datos experimentales existentes.

#### *Abundancia relativa de oligonucleótidos*

En el análisis global, se trabajó sobre las secuencias individuales completas utilizando las ecuaciones diseñadas por Ghiringhelli (2002). A continuación, los resultados se tabularon y/o graficaron para el análisis comparativo.

En el análisis asociado con la posición, se trabajo con ventanas de longitud definida por el usuario y se utilizaron las mismas ecuaciones anteriores para calcular las abundancias relativas para cada conjunto de residuos coincidente con la longitud de la ventana. Como se utilizó un esquema de ventanas adyacentes, este análisis permitió obtener un total de datos equivalente a  $\text{Long}_{\text{secuencia}}/\text{Long}_{\text{ventana}}$ .

Para minimizar los sesgos derivados del análisis de un número pequeño de datos, las ventanas deben ser grandes y guardar alguna relación con la longitud total de la secuencia; por ejemplo: para las secuencias de los RNAs S de arenavirus (longitud promedio ~3500 nt.) las ventanas a utilizar deberían ser  $\geq 200$  nucleótidos.

Como archivos de entrada se utilizaron las secuencias nucleotídicas en texto ASCII sin formato. En el análisis global, se procesaron las secuencias individuales completas con la rutina **ABRLOLIG** (Ghiringhelli, 2002). Los resultados se tabularon y/o graficaron para el análisis comparativo.

En el análisis asociado con la posición, se trabajo con ventanas de longitud definida por el usuario y se utilizó la misma rutina anterior para calcular las abundancias relativas para cada conjunto de residuos coincidente con la longitud de la ventana.

Por último, también se realizó el cálculo de abundancia relativa de dinucleótidos en regiones codificantes y no codificantes, por separado, utilizando la rutina **ABRDIN1** (Ghiringhelli, 2002). Los resultados se tabularon y/o graficaron para el análisis comparativo.

Los datos de abundancia relativa de di-, tri- y tetranucleótidos de cada secuencia se guardaron en un archivo ASCII (que puede ser importado con diversos programas de graficación). Todos los valores generados son positivos. Sin embargo, para facilitar la discriminación rápida entre sub- y sobre-representaciones y la visualización gráfica, el archivo original se modificó, llevando a 0 todos los valores comprendidos entre 0,78 y 1,23, asignando valor positivo a la diferencia:  $\text{valor} > 1,23 - 1,23$  y valor negativo a la diferencia:  $0,78 - \text{valor} < 0,78$ .

#### *Análisis comparativo de estructuras secundarias de RNA (óptimas y subóptimas) y determinación de la estructura más frecuente*

La predicción de estructuras secundarias de RNA consiste en el cálculo de todos los posibles apareamientos de bases (G-C, A-U y G-U), sujetos a algunas reglas simples.

Las predicciones se realizaron utilizando el programa **mFOLD** versión 3.1 (Zuker, 2003) (<http://www.bioinfo.rpi.edu/~zukerm/>). Para predecir la estructura óptima, este programa emplea una estrategia basada en minimizar la energía libre, utilizando las reglas desarrolladas por Turner *et al.* (1987, 1988, Mathews *et al.* 1999). Además, el **mFOLD** permite obtener una serie de estructuras subóptimas (Zuker, 1989; Zuker *et al.*, 1991).

Cuando se analizan las predicciones de estructura secundaria de RNAs relacionados filogenéticamente, es esperable encontrar una conservación de algunos motivos estructurales. En el caso de los arenavirus, estos motivos podrían estar relacionados con funciones regulatorias: señales de encapsidación, controles de replicación/transcripción, controles de traducción, etc.

El análisis comparativo de un conjunto de estructuras secundarias, la óptima (de mínima energía libre) y las subóptimas (hasta un 5% de disminución en la energía libre), debería permitir la detección de la estructura más frecuente. Esto último, junto con información adicional (datos experimentales, similitud con otros RNAs de la misma familia, etc.) avalaría la decisión de considerar una estructura subóptima como la potencialmente existente.

### *Perfil filogenético*

Los potenciales sitios de recombinación fueron analizados con el programa PHYLPRO (Weiller, 1998). El algoritmo que utiliza el programa permite mostrar el grado de concordancia de un set de secuencias alineadas denominado *perfil filogenético*.

El perfil filogenético constituye una forma de mostrar gráficamente la coherencia de las relaciones de secuencia a lo largo de la totalidad de un set de secuencias homólogas alineadas. Utilizando la técnica de ventanas deslizantes, el método determina las distancias de pares de todas las secuencias de las ventanas y evalúa, para cada secuencia, el grado de concordancia de los patrones de distancia de esas regiones. En base a los resultados, este método permite detectar posibles sitios de recombinación entre las secuencias analizadas. Las variables utilizadas en la construcción del perfil filogenético fueron: matriz de identidad, ventana 10 diferencias y medida de correlación.

### *Detección de puntos potenciales de recombinación en moléculas de RNA, construcción y selección de las moléculas recombinantes basado en criterios de presencia de marcos de lectura abiertos y variaciones en la longitud de las proteínas codificadas*

Existen varios programas que permiten evaluar la región potencial de entrecruzamiento entre dos moléculas parentales desconocidas que generaron un recombinante detectado en la naturaleza. Uno de estos programas es el rDP (Martin and Rybicki, 2000), el cual trabaja sobre un alineamiento múltiple de secuencias y, basado en un esquema de ventanas, realiza un análisis de tipo filogenético (*bootstrapping*) para evaluar la posible región de recombinación. La precisión de la predicción está acotada a la longitud de la ventana definida por el usuario.

Sin embargo, ninguno de los programas disponibles académicamente permite predecir la generación de recombinantes basado en el análisis de datos de homología local entre dos copias de una misma molécula o entre dos moléculas independientes.

La detección de repeticiones, perfectas o imperfectas, sirve como base para construir *in silico* potenciales recombinantes que, en la naturaleza, puedan ser generados por los mecanismos de *copy choice*, transesterificación o *primer alignment and extension*. El análisis simultáneo de la presencia de marcos de lectura abiertos y las variaciones en la

longitud de las proteínas codificadas habilitan la predicción de recombinantes que podrían dar lugar a virus emergentes.

La predicción se realizó con un paquete de rutinas diseñadas por Ghiringhelli (2002). El punto de partida es la búsqueda de regiones de homología, total o parcial, entre dos secuencias utilizando una versión para PC del programa **BLAST 2 SEQUENCES** (Karin y Altschul, 1990, 1993; Altschul *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998).

De esta manera, se detectan todas las regiones de homología existentes, con una longitud mínima de 7 residuos y 100 % de homología hasta la longitud máxima posible, acotada por la condición de que la homología debe ser igual o mayor a 60%.

El archivo de salida obtenido con el programa **BI2seq** se puede utilizar como archivo de entrada para diversas rutinas. Algunas de ellas tienen por finalidad analizar el archivo para seleccionar los recombinantes potencialmente viables y construir las moléculas de RNA S recombinantes, mientras que otras tienen por finalidad la visualización gráfica de todos los posibles puntos de recombinación.

En el caso de la selección y construcción de recombinantes, los datos deben ser procesados secuencialmente con las rutinas **ANPARCOD**, **ARMAREC4** y **REVTAB3**. El archivo de salida obtenido con la rutina **ANPARCOD** sirve de base para representar el mecanismo de generación del recombinante. Los archivos generados con la rutina **ARMAREC4** sirven de base para evaluar la continuidad de marcos de lectura y obtener los productos de traducción recombinantes, en el caso en que los puntos de entrecruzamiento correspondan a regiones codificantes; mientras que permite obtener las moléculas híbridas para efectuar predicciones de estructura, etc., en el caso en que los puntos de entrecruzamiento correspondan a regiones no codificantes. El archivo generado con la rutina **REVTAB3** presenta sintéticamente todos los recombinantes encontrados, potencialmente viables.

En el caso de la visualización gráfica, los datos deben ser procesados secuencialmente con las rutinas **DIVIDE**, **ANA2-1**, **PROCESA**, **PROCESA1**, **PROCESA2**, **JUNTA1**, **JUNTA2**, **JUNTA** y **HISTO**.

Dado que los datos mostrados corresponden a dos moléculas de RNA S en polaridad viral, todos los posibles puntos de entrecruzamiento detectados pueden ser utilizados para la generación de recombinantes mediante los mecanismos de *copy choice* o transesterificación. Para la evaluación de generación de recombinantes mediante el mecanismo de *primer alignment and extension*, el análisis debería realizarse entre una molécula en polaridad viral y la otra en polaridad viral complementaria.

## PARTE V

# CONCLUSIONES GENERALES

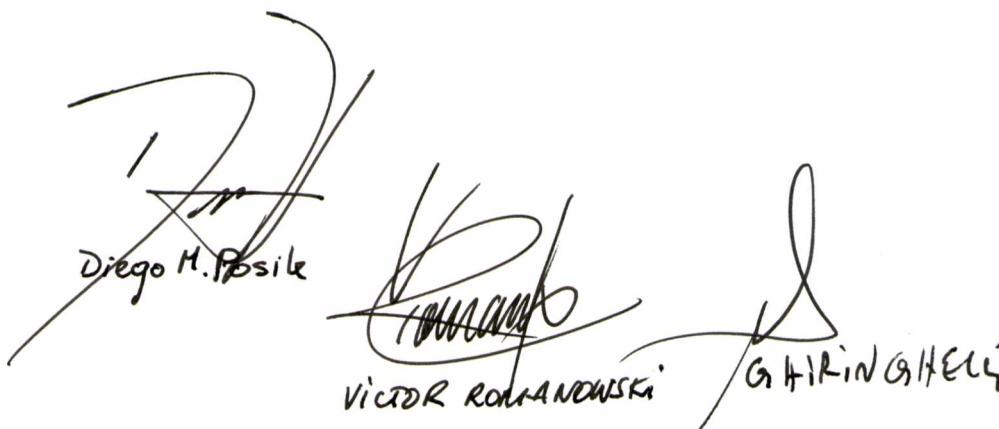
## CONCLUSIONES GENERALES

- En el presente trabajo de tesis se describieron diversos aspectos moleculares sobre el RNA S de las cepas prototipo de los tres patrones clínicos típicos de FHA (Espíndola, Ledesma y Romero) y se realizaron comparaciones con el resto de las cepas del virus Junín.
- Se purificó el RNA, se sintetizó el cDNA, se amplificó por PCR la totalidad del RNA S de las cepas Espíndola, Ledesma y Romero del virus Junín. Los fragmentos amplificados fueron clonados y se determinó la secuencia nucleotídica del RNA S completo de las tres cepas.
- Los tres RNAs poseen una longitud de 3411 nucleótidos. En ellos se identificaron dos marcos de lectura, uno en polaridad viral, que codifica para el precursor de las glicoproteínas virales (GPC), y uno en polaridad viral complementaria, que codifica para la proteína de la nucleocápside (N).
- En base al estudio bioinformático de los ácidos nucleicos se determinó la estructura secundaria potencial de los RNAs S de las cepas Espíndola, Ledesma y Romero.
- La predicción de la estructura secundaria de la región intergénica indicó la existencia de regiones autocomplementarias que forman tres estructuras tipo *hairpin-loop*. Los cambios nucleotídicos dentro de esta región están ubicados en los extremos de los *hairpins*, sin afectar la estabilidad de los mismos. La conservación de la estructura secundaria estaría relacionada con la función de terminador de la transcripción propuesta para la misma.
- Las regiones no codificantes de los extremos 5' y 3' del RNA S forman estructuras autocomplementarias tipo *panhandle*. La formación de esta estructura podría estar implicada en la regulación de la iniciación de los eventos de replicación y transcripción.
- El análisis de las abundancias relativas de secuencias de oligonucleótidos cortos (di- tri y tetranucleótidos) de los RNAs S de las diferentes cepas del virus Junín, permitió determinar un perfil que constituye su firma genómica (*genomic signature*). Además, fue posible correlacionar la abundancia relativa de los trinucleótidos identificados como diferenciales (sub y sobre-representaciones) con el grado de virulencia de las cepas.
- En las secuencias aminoacídicas deducidas, no se han encontrado diferencias en el péptido señal ni en el potencial sitio de clivaje proteolítico de las glicoproteínas de las cepas prototipo que puedan ser relacionadas con el comportamiento biológico diferencial de las mismas.
- Los análisis de homología relativa de aminoácidos entre distintos aislamientos del virus Junín mostraron diferentes regiones en la proteína GPC que podrían correlacionarse con los cambios en el patrón clínico.
- La sustitución de residuos aminoacídicos en el péptido fusogénico del extremo amino terminal de G2 y la zona adyacente a éste, podrían afectar el proceso de fusión de membranas y, por lo tanto, la infectividad de las cepas. Estos cambios también podrían

modificar la estructura tipo *coiled-coil* responsable de la interacción proteína-proteína que mantiene estabilizado al tetrámero formado por la proteína G2.

- Para poder llegar a conclusiones definitivas, los cambios de secuencia identificados en el presente proyecto deberán ser introducidos en forma dirigida en el genoma viral mediante genética reversa. Analizando las propiedades de los virus recombinantes generados podrán identificarse las regiones del genoma asociadas a los cambios de virulencia.
- Se construyeron patrones de homología relativa correspondientes al marco de lectura y a la proteína GPC. En base a éstos, se seleccionó una región altamente variable entre las cepas para utilizar como marcador molecular asociado al patrón clínico de la enfermedad.
- Se diseñaron *primers* para amplificar esta región por RT-PCR y se utilizaron los productos de amplificación para diseñar un sistema de identificación de las cepas por SSCP.
- Los patrones de SSCP de las cepas prototipo se compararon con aquellos obtenidos de pacientes con síndromes clínicos equivalentes, observándose una buena correlación entre el patrón clínico y el patrón de bandas de SSCP.
- Esta metodología puede ser de utilidad para analizar un gran número de muestras en estudios epidemiológicos y permite seleccionar aquellas muestras de mayor interés para un análisis más detallado por secuenciación nucleotídica.
- A partir de las secuencias nucleotídicas de los RNAs S de varios arenavirus, se realizaron alineamientos múltiples y sobre éstos, se identificaron regiones conservadas a partir de las cuales se sintetizaron *primers* generalizados para la familia Arenaviridae.
- Estos *primers* pueden utilizarse para amplificar por RT-PCR fragmentos que, solapados, abarcan la totalidad del RNA S. Esta metodología posibilita un rápido clonado y secuenciación del RNA S completo de cualquiera de los miembros de la familia.
- A partir de las secuencias disponibles en los bancos de datos para cada uno de los arenavirus, se determinó la secuencia de los posibles fragmentos de amplificación por RT-PCR utilizando el par de *primers* ARE/ARS16V. Para dichos fragmentos se calcularon los tamaños esperados por digestión con *Hinf* I, resultando en patrones de bandas únicos que permitieron distinguir a todos aquellos arenavirus cuya secuencia se encontraba disponible. Incluso fue posible diferenciar cepas dentro de las especies virales.
- Este ensayo de RT-PCR-RFLP fue probado sobre algunas muestras de RNA virales, resultando patrones idénticos a los predichos a partir de las secuencias nucleotídicas.
- El ensayo de RT-PCR-RFLP fue utilizado sobre muestras de tejidos obtenidos en un programa de captura de roedores que forma parte de estudios epidemiológicos de FHA llevados a cabo por el INEVH. Esta técnica permitió identificar a los arenavirus ya descritos como también a dos aislamientos de arenavirus desconocidos, que presentaron patrones de restricción diferentes a los ya conocidos.

- Las comparaciones de secuencias parciales del aislamiento denominado Pampa mostraron valores altos de homología con el virus Oliveros (93,7% de identidad aminoacídica), por lo que probablemente corresponda a una variante de éste último.
- Se determinó la secuencia nucleotídica de gran parte del RNA S del segundo aislamiento, denominado Río Carcarañá, a partir de fragmentos amplificados por RT-PCR y clonados.
- De acuerdo con comparaciones realizadas con el resto de los arenavirus, la mayor parte del RNA S resultó altamente homólogo con el virus Junín, mientras que los 585 nucleótidos del extremo 3' exhiben una alta homología con el virus Oliveros.
- En base al estudio bioinformático se determinó que Río Carcarañá es un recombinante interespecífico natural entre los virus Oliveros y Junín, con un sitio de recombinación ubicado dentro del marco de lectura que codifica para la proteína de la nucleocápside. Este sitio ha sido circunscripto a solamente dos nucleótidos.
- Se postularon los diferentes mecanismos moleculares (*copy choice*, recombinación por transesterificación y *primer alignment and extension*) por los cuales se podría haber generado la recombinación en el virus Río Carcarañá. Estas hipótesis deberán ser confirmadas con experimentos diseñados especialmente para ello.
- El análisis filogenético de la familia Arenaviridae permitió observar las relaciones de parentesco de los diferentes miembros de la familia y su agrupación en linajes, evidenciándose los cambios de agrupamiento que se producen con los virus recombinantes al analizar las proteínas GPC y N en forma independiente.
- La filogenia de la proteína N no muestra discrepancias con los análisis basados en datos serológicos y de biología molecular. En cambio, para la proteína GPC, los linajes A y C del Nuevo Mundo se encuentran asociados a los virus del Viejo Mundo y separados de los linajes B y R del nuevo Mundo.
- Esta discrepancia podría deberse a fenómenos de recombinación en especies virales ancestrales y la posterior acumulación de cambios durante la divergencia, que enmascaran su detección *in silico*.



Diego M. Posik

VÍCTOR ROMANOWSKI

GIRIN GHELLI

PARTE VI

BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

- Abelson H.T., Smith G.H., Hoffman H.A. and Rowe P.W. (1969). Use of enzyme-labelled antibody for electron microscope localization of LCM virus antigens in infected cell cultures. *Journal of National Cancer Institute*. **42**, 497-515.
- Agrest A., Avalos J.C.S. and Slepoy M.A. (1969). Fiebre hemorrágica argentina y coagulopatía por consumo. *Medicina (Buenos Aires)*. **29**, 194-201.
- Ahmed R., Salmi A., Butler L.D., Chiller J.M., Oldstone M.B. (1984) Selection of genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistently infected mice. Role in suppression of cytotoxic T lymphocyte response and viral persistence. *J. Exp. Med.* **160**, 521-40.
- Ahmed R., Oldstone M.B. (1988) Organ-specific selection of viral variants during chronic infection. *J. Exp. Med.* **167**, 1719-24.
- Ahmed R. and Steven J.G. (1990). Viral Persistence. In: *Virology, second edition*. (Fields B.N., Knipe D.M. et al. Eds). Raven Press, New York. pp. 243-265.
- Ahmed R., Hahn C.H., Somasundaram T., Villarete L., Matloubian M. and Strauss J.H. (1991). Molecular basis of organ-specific selection of viral variants during chronic infection. *Journal of Virology*. **65**, 4242-4247.
- Albariño C.G.; Ghiringhelli P.D.; Grau O. y Romanowski V. (1992). Análisis de los genes estructurales de variantes atenuadas del virus Junín genéticamente relacionadas. XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Huerta Grande, Córdoba, Argentina.
- Albariño C.G.; Ghiringhelli P.D.; Posik D.M.; Lozano M.E.; Ambrosio A.M.; Sánchez A.; Romanowski V. (1997) Molecular characterization of attenuated Junín virus strains. *Journal of General Virology*. **78**, 1605-10.
- Albariño C.G.; Posik D.M.; Ghiringhelli P.D.; Lozano M.E. and Romanowski V. (1998) Arenavirus phylogeny: a new insight. *Virus Genes*. **16** (1), 39-46.
- Albariño C.G. (1997). Caracterización molecular de variantes del virus Junín con diferentes grados de virulencia. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. **25**, 3389-3402.
- Ambrosio A., Enría D. and Maiztegui J.I. (1986). Junín virus isolation from lympho-mononuclear cells of patients with Argentine hemorrhagic fever. *Intervirology*. **25**, 97-102.
- Añón M.C., Grau O., Martínez Segovia Z.M. and Franze-Fernández M.T. (1976). RNA Composition of Junín virus. *Journal of Virology*. **18**, 833-838.
- Arata A.A. and Gratz (1975). The structure of rodents faunas associated with arenaviral infections. *Bulletin WHO*. **52**, 621-627.
- Archer A.M, and Rico-Hesse R. (2002) High genetic divergence and recombination in arenaviruses from the Americas. *Virology*. **304**, 274-281.
- Aribalzaga R.A. (1955). Una nueva enfermedad epidémica a germen desconocido: hipertermia nefrotóxica, leucopénica y enantemática. *Día Médico*. **27**, 1204-1210.
- Armstrong, C. and Lillie, R.D. (1934). Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. *Public Health Report*. **49**, 1019-1027.
- Armstrong C. and Sweet L.K. (1939). Lymphocytic choriomeningitis. Report of two cases, with recovery of the virus from gray mice (*Mus musculus*) trapped in the two infected households. *Public Health Report*. **54**, 673-684.
- Auperin D., Dimock K., Cash P., Rawls W.E. and Bishop D.H.L. (1982a). Analysis of the genome of prototype Pichinde arenavirus and a virulent derivative of Pichinde Munchique. Evidence for sequence conservation at the 3' termini of their viral RNA species. *Virology*. **116**, 363-367.
- Auperin D.D., Compans R.W. and Bishop D.H.L. (1982b). Nucleotide sequence conservation at the 3' termini of the virion RNA species of New World and Old World arenaviruses. *Virology*. **121**, 200-203.
- Auperin D.D., Galinski M.S. and Bishop D.H.L. (1984a). The sequences of the N protein gene and intergenic region of the S RNA of Pichinde arenavirus. *Virology*. **134**, 208-219.

- Auperin D.D.; Romanowski V.; Galinski M. S. and Bishop D.H.L. (1984b) Sequencing studies of Pichinde arenavirus S RNA indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S RNA. *Journal of Virology*. **52**, 987-904.
- Auperin D.D., Sasso D.R. and McCormick J.B. (1986) Nucleotide sequence of the glycoprotein gene and intergenic region of the Lassa virus S genome RNA. *Virology*. **154**, 155-167.
- Auperin D.D. and McCormick J.B. (1988). Nucleotide sequence of the Lassa virus (Josiah strain) S genome RNA and aminoacid sequence comparison of the N and GPC proteins to other arenaviruses. *Virology*. **168**, 421-425.
- Bairoch, A. (1993). The PROSITE dictionary of sites and patterns in proteins, its current status. *Nucleic Acids Research*. **21**, 3097-3103.
- Bandyopadhyay, P.K., Pritchard, A., Jensen, K. & Lipton, H.L.. (1993). A three-nucleotide insertion in the H stem-loop of the 5' untranslated region of Theiler's virus attenuates neurovirulence. *Journal of Virology* **67**, 3691-3695.
- Barrera Oro J.G. and Eddy G.A. (1982). Characteristics of candidate live attenuated Junín virus vaccine. Fourth International Conference on Comparative Virology, Banff, Alberta, Canadá 17-22 de octubre.
- Barrera Oro J.G., McKee Jr. K.T., Spisso J., Mahlandt B.G. and Maiztegui J.I. (1990). A refined complement-enhanced neutralization test for detecting antibodies to Junín virus. *Journal of Virological Methods*. **29**, 71-80.
- Berría M.I., Gutman Frugone L.F., Girda R. and Barrera Oro J.G. (1977). Estudios inmunológicos con virus Junín. I. Formación de anticuerpos en cobayos inoculados con virus vivos. *Medicina (Buenos Aires)*. **27**, 93.
- Barry M., Russi M., Armstrong L., Geller D., Tesh R., Dembry L., Gonzalez J.P., Khan A.S., Peters C.J. (1995) Brief report: treatment of a laboratory-acquired Sabiá virus infection. *N. Engl. J. Med.* **333**, 294-6.
- Beutler E., Gelbart T. and Kult W. (1990) Interference of heparin with the polimerase chain reaction. *Biotechniques*. **9** (2), 166.
- Beyer W., Popplau D., Garten W., von Laer D. And Lenz O. (2003) Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI1/S1P. *Journal of Virology*. **77**, 2866-2872.
- Byrd R., Cone L., Commess B., William-Herman D., Rowland J., Lee B., Fitzgibbons M., Glaser C. , Jay M., Fritz C., Ascher M., Cheung M., Kramer V., Reilly K., Vugia D., Fulhors C., Milazzo M. And Charrel R. (2000) Fatal illness asociated with a New World arenavirus – California, 1999 –2000. *MNWR*. **49**, 709 711.
- Bishop D.H.L. and Auperin D.D. (1987). Arenavirus gene structure and organization. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **133**, 41.
- Bishop D.H.L. (1990) Arenaviruses and their replication. En *Fields Virology*, Fields, B.N. and Knipe, D.M., Eds., Raven Press, New York, pp. 1231-1243.
- Blumberg B.M., Lepert M. and Kolakofsky D. (1981). Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication. *Cell*. **23**, 837-845.
- Boersma D.P., Saleh F., Nakamura K. and Compans R.W. (1982). Structure and glycosylation of Tacaribe viral glycoproteins. *Virology*. **123**, 452-456.
- Boersma D.P. and Compans R.W. (1985). Synthesis of Tacaribe virus polypeptides in an *in vitro* coupled transcription and translation system. *Virus Research*. **2**. 261-271.
- Bolivar F., Rodriguez R.L., Greene P.J., Betlach M.C., Heynker H.L., Boyer H.W., Crosa J.H., Falkow S. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Biotechnology*. **24**, 153-71.
- Borden K.; Campbell-Dwyer E.; Carile G.; Djavani M. and Salvato M. (1998). Two RING finger proteins, the oncoprotein PML and the arenavirus Z protein, colocalize with the nuclear fraction of the ribosomal P proteins. *Journal of Virology*. **72**, 3819-3826.
- Borrow P. and Oldstone M.B.A. (1992). Characterization of Lymphocytic Choriomeningitis Virus-Binding Protein(s): a Candidate Cellular Receptor for the Virus. *Journal of Virology*. **66**, 7270-7281.
- Borrow P. and Oldstone M.B.A. (1994). Mechanism of Lymphocytic Choriomeningitis Virus Entry into Cells. *Virology*. **198**, 1-9.
- Bowen M.D., Peters C.J., Mills J.N. and Nichol S.T. (1996a). Oliveros virus: a novel arenavirus from Argentina. *Virology*. **217**, 362-366.
- Bowen M.D., Peters C.J. and Nichol S.T. (1996b). The phylogeny of New World (Tacaribe Complex) Arenaviruses. *Virology*. **219**, 285-290.

- Bowen M.D., Peters C.J. and Nichol S.T. (1997). Phylogenetic analysis of the Arenaviridae: patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent hosts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **8**, 301-316.
- Bridgen A. and Elliott M. (1996). Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 15400-4.
- Bruno-Lobo G.G., Bruno-Lobo M., Johnson K.M., Webbs P.A. and De Paola V. (1968). Pathogenesis of Junin virus infection in the infant hamster. *Annals in Microbiology (Rio de Janeiro)*. **15**, 11-33.
- Bruns M., Cihak J., Müller G. and Lehmann-Grube F. (1983a). Lymphocytic choriomeningitis virus. VI. Isolation of a glycoprotein mediating neutralization. *Virology*. **130**, 247-251.
- Bruns M., Martinez Peralta L. and Lehmann-Grube F. (1983b). Lymphocytic choriomeningitis virus. III. Structural proteins of the virion. *Journal of General Virology*. **64**, 599-611.
- Bruns M., Zeller W., Rohdewohld H. and Lehmann-Grube F. (1986). Lymphocytic choriomeningitis virus. IX. Properties of the nucleocapsid. *Virology*. **151**, 77-85.
- Bruns M., Gessner A., Lother H., Lehmann-Grube F. (1988). Host cell dependent homologous interference in lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Virology*. **166**, 133-139.
- Bruns M., Kratzberg T., Zeller W. and Lehmann-Grube F. (1990). Mode of replication of lymphocytic choriomeningitis virus in persistently infected cultivated mouse L cells. *Virology*. **177**, 615-624.
- Buchmeier M.J., Gee S.R. and Rawls W.E. (1977). Antigens of Pichinde virus. I. Relationship of soluble antigens derived from infected BHK-21 cells to the structural components of the virion. *Journal of Virology*. **22**, 175-186.
- Buchmeier M.J. and Oldstone M.B.A. (1978). Identity of the viral protein responsible for serological cross-reactivity among the Tacaribe complex arenaviruses. En: *Negative Strand Viruses and the Host Cell* (Mahy, B.J.W. and Barry R.D. Eds.). Academic Press, Nueva York. pp: 91-97.
- Buchmeier, M.J., Elder, J.H. and Oldstone, M.B.A. (1978). Protein structure of lymphocytic choriomeningitis virus: identification of virus structural and cell-associated polypeptides. *Virology*. **89**, 133-145.
- Buchmeier M.J. and Oldstone M.B.A. (1979). Protein structure of lymphocytic choriomeningitis virus: evidence for a cell-associated precursor of the virion glycoproteins. *Virology*. **99**, 111-120.
- Buchmeier M.J. and Oldstone M.B.A. (1981). Molecular studies of LCM virus-induced immunopathology: development and characterization of monoclonal antibodies to LCM virus. En: *The replication of negative strand viruses*. (Bishop D.H.L. and Compans R.W. Eds.). Elsevier Press, Nueva York. pp: 71-78.
- Buchmeier M.J., Lewicki H.A., Tomori O. and Oldstone M.B.A. (1981). Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis and Pichinde viruses: generation, characterization and cross-reactivity with other arenaviruses. *Virology*. **113**, 73-85.
- Buchmeier M.J. and Parekh B.S. (1987). Protein structure and expression among arenaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **133**, 41-57.
- Buchmeier, M.J., Southern, P.J., Parekh, B.S., Wooddell, M.K. and Oldstone, M.B.A. (1987). Site-specific antibodies define a cleavage site conserved among arenaviruses GP-C glycoproteins. *Journal of Virology*. **61**, 982-985.
- Buchmeier M.J., Clegg J.C.S., Franze-Fernández M.T., Kolakofsky D., Peters C.J. and Southern P.J. (1995) In *"Virus Taxonomy Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses"*. Editado por Murphy, F.A. Fauquet. C.M. et al., Springer-Verlag, New York, pp. 319-323.
- Buchmeier MJ. (2002). Arenaviruses: protein structure and function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **262**, 159-73.
- Burge C., Campbell A.M. and Karlin S. (1992). Over- and Under- representation of short oligonucleotides in DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **89**, 1358-1362.
- Burns, J.W., Salvato, M. and Buchmeier, M.J. (1990). Molecular architecture of lymphocytic choriomeningitis virus. VIII International Congress of Virology, Berlin (RFA). Resumen W3-001.
- Burns J. and Buchmeier M. (1991). Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology*. **183**, 620-629.
- Burns J. and Buchmeier M. (1993). Glycoproteins of Arenaviruses. En: *The Arenaviridae*. Editado por Salvato M.S., Serie: *The Viruses* (Wagner R. and Frankel Conrat H. Eds.). New York. Plenum Press. pp: 17-35.
- Calderón G. E. (2004). Desarrollo de indicadores de riesgo de contraer la fiebre hemorrágica argentina (FHA), por medio del estudio de los roedores que actúan como reservorio de los arenavirus en Argentina. Tesis doctoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.
- Campbell A., Mrázek J. and Karlin S. (1999). Genome signature comparisons among prokaryote, plasmid, and mitochondrial DNA. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. **96**, 9184-9189.

- Campbell Dwyer E.J., Lai H., MacDonald R.C., Salvato M.S. and Borden K.L.B. (2000). The lymphocytic choriomeningitis virus RING protein Z associates with eukaryotic initiation factor 4E and selectively represses translation in a RING-dependent manner. *Journal of Virology*. **74**, 3293-3300.
- Cao W.; Henry M.; Borrow P.; Yamada H.; Elder J.; Ravkov E.; Nicho S.; Compans R.; Campbell K. and Oldstone M. (1998). Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science*. **282**, 2079-2081.
- Cardon L.R., Burge C. Clayton D.A. and Karlin S. (1994). Pervasive CpG suppression in animal mitochondrial genomes. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. **91**, 3799-3803.
- Carter M.F., Biswal N. and Rawls W.E. (1973). Characterization of nucleic acid of Pichinde virus. *Journal of Virology*. **11**, 61-68.
- Casals J., Buckley S.M. and Cedeno R. (1975). Antigenic properties of the arenaviruses. *Bulletin WHO*. **52**, 421-427.
- Casals J. (1977). Serological reactions with arenaviruses. *Medicina (Buenos Aires)*. **37**, 59-68.
- CDC. Center for Disease Control and Prevention. (2000a). Fatal illnesses Fatal Illnesses Associated With a New World Arenavirus --- California, 1999—2000. *Morb. Mortal. Wkly. Rep*. **49**, 709-711.
- CDC. Center for Disease Control and Prevention. (2000b). Biological and chemical terrorism: a plan for preparedness and response. Recommendation for the CDC Strategic Planning Workgroup. *Morb. Mortal. Wkly. Rep*. **49**, 1-14.
- Charrel R.N., de Lamballerie X. and Fulhorst C.F. (2001) The Whitewater Arroyo virus: natural evidence of genetic recombination among Tacaribe serocomplex viruses (family *Arenaviridae*). *Virology* **283**, 161-166.
- Charrel R.N., Feldmann H., Fulhorst C., Khelifa R., Chesse R. and de Lamballerie X. (2002). Phylogeny of New World arenaviruses based on the complete coding sequences of the small genomic segment identified an evolutionary lineage produced by intrasegmental recombination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **296**, 1118 –1124.
- Charrel R.N. and Lamballerie X. (2003). Arenaviruses other than Lassa virus. *Antiviral Research* **57**, 89-100.
- Chetverin, A.B., Chetverina, H.V., Demidenko, A.A. and Ugarov, V.I. (1997). Nonhomologous RNA recombination in a cell-free system: evidence for a transesterification mechanism guided by secondary structure. *Cell*. **88**, 503-513.
- Chetverin, A.B. (1999). The puzzle of RNA recombination. *FEBS letter*. **460**, 1-5.
- Chetverina H., Demidenko A., Ugarov V and Chetverin A. (1999) Spontaneous rearrangements in RNA sequences. *FEBS Letters*. **450**, 89-94.
- Child P.L., Mackenzie R.B., Valverde L.R. and Johnson K.M. (1967). Bolivian hemorrhagic fever. *Virchows Archives [A]*. **368**, 1-9.
- Childs J.E. and Peters C.J. (1993). Ecology and epidemiology of arenaviruses. In: *The Arenaviridae*. (Salvato M.S. Ed.), Serie: *The Viruses* (Wagner R. and Frankel Conrat H. Eds.). Plenum Press, Nueva York. pp: 325-384.
- Chinault D.N., Thompson H.A. and Gangemi J.D. (1981). Polypeptide synthesis catalyzed by components of Pichinde virus disrupted by detergent. *Journal. of General Virology*. **55**, 213-217.
- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Analyt. Biochem*. **162**, 156-159.
- Choppin P.W. and Scheid A. (1980). The role of viral glycoproteins in adsorption, penetration and pathogenicity of viruses. *Rev. Infect. Dis*. **2**, 40-61.
- Clegg J.C.S. and Lloyd G. (1983). Structural and cell-associated proteins of Lassa virus. *Journal of General Virology*. **64**, 1127-1136.
- Clegg J.C.S. and Oram J.D. (1985) Molecular cloning of Lassa-virus RNA: nucleotide sequence and expression of the nucleocapsid protein gene. *Virology*. **144**, 363-372.
- Clegg J.C.S., Wilson S.M. and Oram J.D. (1990). Nucleotide sequence of the S RNA of Lassa virus (Nigerian strain) and comparative analysis of arenavirus gene products. *Virus Research*. **18**, 151-164.
- Clegg, J.C.S., Wilson M. and Oram J. (1991). Nucleotide sequence of the S RNA of Lassa virus (Nigerian strain) and comparative analysis of arena-virus gene products. *Virus Res*. **18**, 151–164.
- Clegg J.C.S. (1993). Molecular phylogeny of the arenaviruses and guide to published sequence data. In: *The Arenaviridae*. (Salvato M.S. Ed.), Serie: *The Viruses* (Wagner R. and Frankel Conrat H. Eds.). Plenum Press, Nueva York. pp: 175-187.

- Clegg J.; Bowen M.; Buchmeier M.; Gonzalez J.; Lukashevich I.; Peters C.; Rico-Hesse R. and Romanowski V. (2000) Arenaviridae. In: Van Regenmortel M.H.V, Fauquet C.M., Bishop D.H.L. (Eds) *Virus Taxonomy*. 7<sup>th</sup> report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, CA, USA. pp 633-640.
- Cleg C. J. (2002) Molecular phylogeny of the arenaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **262**:1-24.
- Coimbra T.L.M., Nassar E.S. Burattini M.N., de Souza L.T.M., Ferreira I.B., Rocco I.M., Travassos da Rosa A.P.A., Vasconcelos P.F.C., Pinheiro F.P., LeDuc J.W., Rico Hesse R., Gonzalez J.P., Jahrling P.B. and Tesh R.B. (1994). New arenavirus isolated in Brazil. *Lancet.* **343**, 391-392.
- Collins P., Hill M., Camargo E., Grosfeld H., Chanock R.M., Murphy B.R. (1995). Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 11563-7.
- Compans R.W., Boersma D.P., Cash P. et al. (1981). Molecular and genetic studies of Tacaribe, Pichinde, and lymphocytic choriomeningitis virus. En: *The replication of negative strand viruses*. (Bishop D.H.L. and Compans R.W. Eds.). Elsevier Press, Nueva York. pp: 31-42. Elsevier, Nueva York.
- Compans R.W. and Bishop D.H.L. (1985). Biochemistry of arenaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* **114**, 153-177.
- Compans R. (1993). Arenavirus ultrastructure and morphogenesis. En *The Arenaviridae*, Editado por M. S. Salvato, Serie: The Viruses (Wagner R. and Frankel Conrat H. Eds.). Plenum Press, New York. pp. 51-83.
- Contigiani M.S. and Sabattini M.S. (1977). Virulencia diferencial de cepas del virus Junín por marcadores biológicos en ratones y en cobayos. *Medicina (Buenos Aires).* **37**, 244.
- Cooper P.D., Steiner-Prior A., Scotti P. and DeLong D. (1974) On the nature of the poliovirus genetic recombinants. *Journal of General Virology.* **23**, 41-49.
- Cossio P.M., Laguens R.P., Arana R.M., Segal A. and Maiztegui J.I. (1975). Ultrastructural and immunohistochemical study of the human kidney in Argentine hemorrhagic fever. *Virchows Archives.* **368**, 1.
- Coto C.E., Help G.I. and Tkaczewski L.Z. (1972). Biological properties of Junín virus purified from infected mouse brain. *Medicina (Buenos Aires).* **32**, 281-286.
- Coto C.E., León M.E., Martínez Peralta L., Help G.I. and Laguens P. (1979). Production of infectious virus and viral surface antigen in Vero cells persistently infected with Junín virus. En: *Humoral immunity in neurological diseases* (Karcher D., Lowenthal A. and Strosberg A.D. Eds.). Plenum Press, Nueva York. pp: 405-415.
- Coto C.E., Damonte E.B., Alche L.E. and Scolaro L. (1993). Genetic variation in Junín virus. In: *The Arenaviridae*. (Salvato, M.S. Ed.), Serie: The Viruses (Wagner R. and Frankel Conrat H. Eds.). Plenum Press, Nueva York. pp: 85-101.
- Coulon P. Rollin, P.E. and Flamand A. (1983). Molecular basis of rabies virus virulence. II. Identification of a site on the CVS glycoprotein associated with virulence. *Journal General Virology.* **64**, 693-696.
- Cresta B., Padula P. and Martínez Segovia Z.M. (1980). Biological properties of Junín virus proteins, I. identification of the immunogenic glycoprotein. *Intervirology.* **13**, 284-288.
- Cuervo N.S., Guillot S., Romanenkova N., Combiescu M., Aubert-Combiescu A., Seghier M., Caro V., Crainic R. and Delpeyroux F. (2001) Genomic features of intertypic recombinant Sabin poliovirus strains excreted by primary vaccinees. *J. Virol.* **75**, 5740-51.
- Cummins D., Molinas F.C., Lerer G., Maiztegui J.I., Faint R. and Machin S.J. (1990). A plasma inhibitor of platelet aggregation in patients with Argentine hemorrhagic fever. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* **42**, 470-475
- D'Aiutolo A.C. and Coto C.E. (1986). Vero cells persistently infected with Tacaribe virus: role of interfering particles in the establishment of the infection. *Virus Research.* **6**, 235-244.
- Dalton A.J.; Rowe W.P.; Smith G.H.; Wilsnack R.E. and Pugh W.E. (1968) Morphological and cytochemical studies on lymphocytic choriomeningitis virus, *Journal of Virology.* **2**, 1465.
- Davis, N.L., Brown, K.W., Greenwald, G.F., Zajac, A.J., Zacny, V.L., Smith, J.F. and Johnston, R.E. (1995). Attenuated mutants of Venezuelan equine encephalitis virus containing lethal mutations in the PE2 cleavage signal combined with a second-site suppressor mutation in E1. *Virology.* **212**, 102-110.
- de Bracco M.M, Rimoldi M.T., Cossio P.M., Rabinovich A., Maiztegui J.I., Carballal G. and Arana R.M. (1978). Argentine hemorrhagic fever: Alterations of the complement system and anti-Junin virus humoral response. *New England Journal of Medicine.* **299**, 216-221.
- De Mitri M.I. and Martínez Segovia Z. (1980). Biological activities of Junín virus proteins, II. Complement fixing polypeptides associated with the soluble antigen and purified virus particles. *Intervirology.* **14**, 84-90.

- De Mitri M.I. and Martínez Segovia Z.M. (1985) Polypeptide synthesis in Junín Virus infected BHK-21 cells, *Acta Virol.* **29**, 97.
- Deshpande, K.L., Fried, V.A., Ando, M. and Webster, R.G. (1987) Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **84**, 36-40.
- Di Simone C., Zandonatti M.A. and Buchmeier M.J. (1994). Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike. *Virology.* **198**, 455-465.
- Di Simone C. and Buchmeier M.J. (1995). Kinetics of pH dependence of acid-induced structural changes in the Lymphocytic Choriomeningitis Virus glycoprotein complex. *Virology.* **209**, 3-9.
- Dockter J, Evans CF, Tishon A, Oldstone MB. (1996) Competitive selection in vivo by a cell for one variant over another: implications for RNA virus quasispecies in vivo. *Journal of Virology.* **70**(3):1799-803.
- Doherty P., Huesca Contreras M., Dosch M. and Pan S. (1989) Rapid amplification of complementary DNA from small amounts of unfractionated RNA. *Analyt. Biochem.* **177**, 7-10.
- Domingo E., Escarmis C., Sevilla N., Moya A., Elena S.F., Quer J., Novella I.S., and Holland J.J. (1996) Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB Journal.* **10**, 859-864.
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**(13), 6127-45
- Dutko F.J., Wright E.A. and Pfau C.J. (1976). The RNAs of defective interfering Pichinde virus. *Journal of General Virology.* **31**, 417-427.
- Dutko F.J., Kennedy S.I. and Oldstone M.B.A. (1981). Genome structure of lymphocytic choriomeningitis virus: complementary termini. En: *The replication of negative strand viruses.* (Bishop D.H.L. and Compans R.W. Eds.). Elsevier Press, Nueva York. pp: 43-48.
- Duggal, R., Cuconati, A., Gromeier, M. and Wimmer, E. (1997). Genetic recombination of poliovirus in a cell-free system. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **94**, 13786-13791.
- Eddy G.A., Wagner F.S., Scott S.K. and Mahlaudt B.J. (1975). Protection of monkeys against Machupo virus by the passive administration of Bolivian hemorrhagic fever immunoglobulin (human origin). *Bulletin WHO.* **52**, 723-727.
- Eichler R., Strecker T., Kolesnikova L., ter Meulen J., Weissenhorn W., Becker S., Klenk H.D., Garten W. and Lenz O. (2004) Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP). *Virus Research.* **100**, 249-55.
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. and Wall, R. (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *Journal of Molecular Biology.* **179**, 125-142.
- Elliot R.M. (1990). Molecular biology of Bunyavirus. *Journal of General Virology.* **71**, 501-522.
- Ellis B., Mills J. Childs J., Muzzini M. McKee K. Jr, Enria D. and Glass G. (1997) Structure and floristics of habitats associated with five rodents species in an agroecosystem in Centarl Argentina. *J. Zool. Lond.* **243**, 437-460.
- Elsner B., Schwarz E., Mando O.G., Maiztegui J.I. and Vilches A. (1973). Pathology of 12 fatal cases of Argentinian hemorrhagic fever. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* **22**, 229-236.
- Enria DA, de Damilano AJ, Briggiler AM, Ambrosio AM, Fernandez NJ, Feuillade MR, Maiztegui JI. (1985) Late neurologic syndrome in patients with Argentinian hemorrhagic fever treated with immune plasma. *Medicina (B Aires).* **45**, 615-20.
- Enria D. and Feuillade M. (1998). Argentine haemorrhagic fever (Junín virus, Arenaviridae): a review on clinical, treatment and preventive aspects of the disease. In: travassos da Rosa A.P; Vasconcelos P.F.; Travasos da Rosa J.F. (Eds), An overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries, Instituto Evandro Chaggas, Belem, Brazil, pp. 219-232.
- Enria D.; García-Franco S.; Ambrosio A.; Vallejos D.; Levis S. and Maiztegui J.I. (1986) Current status of the treatment of Argentine Hemorrhagic Fever. *Med. Microbiol. Immunol.* **175**, 173-176.
- Enria D., Feuillade M., Briggiler A., Ambrosio A., Riera L., García J., Mocarbel N., López C., Befani J., Ternero M., Brazza M., Mangiaterra L. (2002) Informe para la XVIII Reunión Anual del Programa Nacional de Lucha contra la Fiebre Hemorrágica Argentina. Villa Gdor. Gálvez, Pcia. de Santa Fe, 28 de Junio de 2002.
- Epand E. (2003) Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochim. Biophys. Acta.* **1614**, 116-121.
- Falquet L., Pagni M., Bucher P., Hulo N., Sigrist C.J., Hofmann K., Bairoch A. (2002) The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.* **30**:235-238.
- Farber F.E. and Rawls W.E. (1975). Isolation of ribosome-like structures from Pichinde virus. *Journal of General Virology.* **26**, 21-31.

- Feldmann H., Klenk H.D. and Sanchez A. (1993). Molecular biology and evolution of filoviruses. *Archives in Virology Suppl.* **7**, 81-100.
- Felsenstein J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics.* **5**,164-166.
- Felsenstein J. 2002. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6a3. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Fenner F., Mc Auslan B.R., Mims C.A., Sambrook J and White D.D. (1974). The biology of animal viruses. Academic Press, Nueva York.
- Feuillade M. R., Briggiler A.M. y Enría D. (2004) Fiebre Hemorrágica Argentina. Ministerio de Salud de la Nación Boletín Epidemiológico Periódico. Abril de 2004.
- Frame J.D.; Baldwin J.M.; Gocke D.J.; Troup J.M. (1970) Lassa fever, a new virus disease of man from west Africa. I. Clinical description and pathological findings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **19**, 670-676.
- Francis S.J., Southern P.J., Valsamakis A. and Oldstone M.B.A. (1987). State of viral genome and protein during persistently lymphocytic choriomeningitis virus infections. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* **133**, 67-88.
- Franze-Fernandez M.T.; Zetina C.; Iapalucci S.; Lucero M.A.; Boissou C.; López R.; Rey O.; Daheli M.; Cohen G. and Zakin M. (1987) Molecular structure and early events in the replication of Tacaribe Arenavirus S RNA. *Virus Research.* **7**, 309-324.
- Franze-Fernández M. T., Iapalucci S., López N. Any Rossi C. (1993) Subgenomic RNAs of Tacaribe virus. In: Salvato M.S. (ed) The arenaviridae. Plenum Press, New York, pp. 113-132.
- Fuchs, R. (1991). MacPattern: protein pattern searching on the Apple Macintosh. *CABIOS.* **7**, 105-106.
- Fulhorst C., Bennett S., Milazzo M., Murray H.Jr., Webb, J.Jr., Cajimat M. And Bradley R. (2002). Bear Canyon Virus: An Arenavirus Naturally Associated with the California Mouse (*Peromyscus californicus*). *Emerging Infectious Diseases.* **8**, 717-721.
- Galliaro C. and Pardinas U. (2000) Taxonomy and distribution of the sigmodontine rodents of genus *Necomys* in central Argentina and Uruguay. *Acta Theriol.* **45**, 211-232.
- Gangemi J.D., Rosato R.R., Connell E.V., Johnson E.M. and Eddy G.A. (1978). Structural polypeptides of Machupo virus. *Journal of General Virology.* **41**, 183-188.
- Garay R.P. (1975). Patogenia de la encefalitis por virus Junín: estudios en ratón lactante. *Medicina (Buenos Aires).* **31**, 383-392.
- Gard G.P., Vezza A.C., Bishop D.H.L. and Compans R.W. (1977). Structural proteins of Tacaribe and Tamiami virions. *Virology.* **83**, 85-95.
- Garcin D. and Kolakofsky D. (1990). A novel mechanism for the initiation of Tacaribe arenavirus genome replication. *Journal of Virology.* **64**, 6196-6203.
- Garcin D. and Kolakofsky D. (1992). Tacaribe arenavirus RNA synthesis *in vitro* is primer dependent, and suggests an unusual model for the initiation of genome replication. *Journal of Virology.* **66**, 1370-1376.
- Garcin D., Rochat S. and Kolakofsky D. J. (1993). The Tacaribe arenavirus small zinc finger protein is required for both mRNA synthesis and genome replication. *Virology.* **67**, 807-812.
- Garnier J.; Osguthorpe D. J.; Robson B. (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *Journal Molecular Biology.* **120** (1), 97-120.
- Ghiringhelli P.D., Rivera Pomar R.V., Baro N.I., Rosas M.F., Grau O. and Romanowski V (1989). Nucleocapsid protein gene of Junín arenavirus (cDNA sequence). *Nucleic Acids Research.* **17**, 8001.
- Ghiringhelli P.D., Rivera Pomar R.V., Lozano M., Grau O. and Romanowski V. (1991) Molecular organization of Junín virus S RNA: complete nucleotide sequence, relationship with the other members of Arenaviridae and unusual secondary structures. *Journal General Virology.* **72**, 2129-2141.
- Ghiringhelli P.D.; Albariño C.G.; Pibooul M. and Romanowski V. (1997) The glycoprotein precursor gene of the attenuated Junín virus vaccine strain (Candid #1). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **56** (2), 216-225.
- Ghiringhelli P.D. (2002). Virus Junín: clonado molecular y análisis estructural y funcional del RNA S y sus productos génicos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Giménez H.B. and Compans R.W. (1980). Defective interfering Tacaribe virus and persistently infected cells. *Virology.* **107**, 229-239.
- Glushakova S.E. and Lukashevich I.S. (1989). Early events in arenavirus replication are sensitive to lysosomotropic compounds. *Archives in Virology.* **104**, 157.

- Glushakova S., Kukashevich I., Baratova A. (1990) Prediction of arenavirus fusion peptides on the basis of computer analysis of envelope protein sequences. *FEBS*. **269**, 145-147.
- Gmyl, A.P., Belousov, E.V., Maslova, S.V., Khitrina, E.V. Chetverin, A.B. and Agol, V.I. (1999). Nonreplicative RNA recombination in poliovirus. *Journal of Virology*. **73**, 8958-8965.
- González J.P., McCormick J.B., Saluzzo J.F. and Herve J.P. (1983). An arenavirus isolated from wild-caught rodents (*Pramys* species) in the Central African Republic. *Intervirology*. **19**, 105-112.
- Grau O., Franze Fernández M.T., Romanowski V., Rustici S.M. and Rosas M.F. (1981). Junín virus structure. En: *The replication of negative strand viruses*. (Bishop D.H.L. and Compans R.W. Eds.). Elsevier Press, Nueva York. pp: 11-14.
- Guerrero L.B., Weissenbacher M.C. and Parodi A.S. (1969). Inmunización contra FHA con una cepa atenuada del virus Junín. I. Estudio de una cepa modificada del virus Junín. Inmunización de cobayos. *Medicina (Buenos Aires)*. **29**, 1.
- Gyllesten U. B. and Erlich H. A. (1988). Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**, 7652-7656.
- Green D.E., Mahlandt B.G., McKee K.T. Jr. (1987) Experimental Argentine hemorrhagic fever in rhesus macaques: virus-specific variations in pathology. *Journal Med Virol*. **22** (2),113-33.
- Griffiths C.M., Wilson S.M. and Clegg J.C.S. (1992). Sequence of the nucleocapsid protein gene of Machupo virus: close relationship with another South American pathogenic arenavirus, Junín. *Archives in Virology*. **124**, 371-374.
- Gschwender H.H. and Lehmann-Grube F. (1973). Antigenic properties of the LCM virus: virion and complement-fixing antigen. In: *Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenaviruses*. (F. Lehmann-Grube, ed.). Springer-Verlag, Berlin. pp: 25-35.
- Hajjar, A.M. and Linial, M.L. (1993). A model system for nonhomologous recombination between retroviral and cellular RNA. *Journal of Virology*. **67**, 3845-3853.
- Hahn C.S., Dalrymple J.M., Strauss J.H., and Rice C.M. (1987). Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**, 2019-2023.
- Hahn C.S., Lustig S., Strauss E. and Strauss J. (1988) Western equine encephalitis virus is a recombinant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 5997-6001.
- Harnish D., Dimock K., Leung W.C., Rawls W. (1981a). Immunoprecipitable polypeptides in Pichinde virus infected BHK-21 cells. En: *The replication of negative strand viruses*. (Bishop D.H.L. and Compans R.W. Eds.). Elsevier Press, Nueva York. pp: 23-29.
- Harnish D.G., Leung W.C. and Rawls W.E. (1981b). Characterization of polypeptides immunoprecipitable from Pichinde virus infected BHK-21 cells. *Journal of Virology*. **38**, 840-848.
- Harnish D.G., Dimock K. and Bishop D.H.L. (1983). Gene mapping in Pichinde virus: assignment of viral polypeptides to genomic L and S RNAs. *Journal of Virology*. **46**, 638-641.
- Harnish D.G., Polyak S.J. and Rawls W.E. (1993). Arenavirus Replication. Molecular dissection of the role of viral protein and RNA. In: *The Arenaviridae*. (Salvato M.S. Ed.), Serie: *The Viruses* (Wagner R. and Frankel Conrat H. Eds.). Plenum Press, Nueva York. pp: 157-174.
- Harvala H, Kalimo H, Dahllund L, Santti J, Hughes P, Hyypia T, Stanway G. (2002) Mapping of tissue tropism determinants in coxsackievirus genomes. *J. Gen Virol*. **83**, 1697-706.
- Hausmann S., Jacques J.P. and Kolakofsky D. (1996) Paramyxovirus RNA editing and the requirement for hexamer genome length. *RNA*. **2**, 1033-45.
- Hayashi K. (1991) PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR meth. and Applic*. **1**, 34-38.
- Helenius A., Kielian M., Mellman I. and Schmid S. (1989). Entry of the enveloped animal viruses into their host cells. *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol*. **90**, 145-161.
- Help G.I., Coto C.E. and Tkaczewski L.Z. (1970). Evaluación de un método de purificación del virus Junín. *Medicina (Buenos Aires)*. **30**, 15-21.
- Higgins D. G.; Bleasby A. J.; and Fuchs R. (1991). CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *CABIOS*, vol. 8, 189-191.
- Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer. *Gene*. **73**, 237-244.
- Higgins D. G. and Sharp P. M. (1989). Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *CABIOS* **5**,151-153.

- Hirst G. K. (1962). Genetic recombination with Newcastle disease virus, poliovirus and influenza. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. **27**, 303-308.
- Holland J.J., Spindler K., Horodyski F., Grabau E., Nichol S. and Vanderpol S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science*. **215**, 1577-1585.
- Hongyo T.; Buzard G.; Calvert J. and Weghorst C. (1993) 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Research* **21** (16), 3637-3642.
- Hotchin J. (1974). The role of transient infection in Arenavirus persistence. *Progress in Medical Virology*. **18**, 81-93.
- Howard C. and Buchmeier M.J. (1983). A protein kinase activity in lymphocytic choriomeningitis virus and identification of the phosphorylated product using monoclonal antibody. *Virology*. **126**, 538-547.
- Howard C. (1993) Antigenic diversity among arenaviruses. In: Salvato MS (Ed.) *The arenaviridae*. In: Wagner R. and Frankel Conrat H. (Eds), Serie: The Viruses. Plenum, New York, pp 281-298.
- Huang A.S. and Baltimore D. (1970). Defective viral particles and viral disease processes. *Nature*. **226**, 325-327.
- Huang A.S. and Baltimore D. (1977). Defective interfering animal viruses. In: Comprehensive Virology (Fraenkel Conrat H. and Wagner R.R. Eds.). Plenum Press, Nueva York. Vol. **10**, pp: 73-116.
- Hugot J.P, Gonzalez J.P. and Denys C. (2001) Evolution of the Old World Arenaviridae and their rodent hosts: generalized host-transfer or association by descent? *Infection, Genetics and Evolution* **1**, 13–20.
- Hwang, C.K., Svarovskaia, E.S. and Pathak, V.K. (2001). Dynamic copy choice: steady state between murine leukemia virus polymerase and polymerase-dependent RNase H activity determines frequency of *in vivo* template switching. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. **98**, 12209-12214.
- Iapalucci S., López R., Rey O., López N., Franze-Fernández M.T., Cohen G.N., Lucero M., Ochoa A. and Zakin M.M. (1989a) Tacaribe virus L gene encodes a protein of 2210 amino acid residues. *Virology*. **170**, 40-47.
- Iapalucci S., López N., Rey O., Zakin M.M., Cohen G.N. and Franze-Fernandez M.T. (1989b) The 5' region of Tacaribe virus L RNA encodes a protein with a potential metal binding domain. *Virology*. **173**, 357-361.
- Iapalucci S., López N. and Franze Fernández M.T. (1991). The 3' end of the Tacaribe arenavirus subgenomic RNAs. *Virology*. **182**, 269-278.
- Iapalucci S.; Cheriñavsky A.; Rossi,C.; Burgin M. and Franze-Fernández M. (1994) Tacaribe virus gene expression in cytopathic and non-cytopathic infections. *Virology*. **200**, 613-22.
- Inokuchi Y. and Hirashima A. (1987). Interference with viral infection by defective RNA replicase. *Journal of Virology*. **61**, 3946-3949.
- Iwahana H. Yoshimoto K. and Itakura M. (1992) Detection of point mutations by SSCP of PCR-amplified DNA after endonuclease digestion. *Biotechniques*. **12** (1), 64-66.
- Jaeger, J.A., Turner, D.H. and Zuker, M. (1990). Predicting optimal and suboptimal secondary structure for RNA. En: Molecular Evolution: Computer analysis of protein and nucleic acids sequences (Methods in Enzymology, vol. 183). (Doolittle, R.F. ed.). Academic Press, San Diego, pp 281-306.
- Jacamo R., Lopez N., Wilda M. And Franze-Fernandez M.T. (2003) Tacaribe virus Z protein interacts with the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis. *J. Virol*. **77**, 10383-93.
- Jarvis, T. and Kirkegaard, K. (1992). Poliovirus RNA recombination: mechanistic studies in the absence of selection. *EMBO Journal*. **11**, 3135-3145.
- Johnson K.M., Wiebenga N.H., Mackenzie R.B., Juns M.L., Tauraso N.M., Shelokov A., Webb P.A., Justines G. and Beye H.K. (1965). Virus isolation from human cases of hemorrhagic fever in Bolivia. *Proceedings of Society in Experimental Biology and Medicine*. **118**, 113.
- Johnson K.M., Webb P.A. and Justines G. (1973). Biology of Tacaribe-complex viruses, En: Lymphocytic choriomeningitis virus and other arenaviruses (Lehmann Grube F. Ed.). Springer Verlag, Berlin. pp: 241-258.
- Johnson B.J.B., Kinney R.M., Kost C.L. and Trent D.W. (1986) Molecular determinants of alphavirus neurovirulence: nucleotide and deduced protein sequence changes during attenuation of Venezuelan equine encephalitis virus. *Journal General Virology*. **67**, 1951-1960.
- Justines G. and Johnson K.M. (1969). Immune tolerance in *Calomys callosus* infected with Machupo virus. *Nature*. **222**, 1090-1091.
- Karlin S. and Altschul S.F. (1990). Methods for Assessing the Statistical Significance of Molecular Sequence Features by Using General Scoring Schemes. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. **87**, 2264-2268.

- Karlin S., Blaisdell B.E. and Brendel V. (1990). Identification of significant sequence patterns in proteins. In: *Methods in enzymology*, vol. 183. (Doolittle R.F. Ed). Academic Press, New York. pp. 388-402.
- Karlin S. and Altschul S.F. (1993). Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. **90**, 5873-5877.
- Karlin, S. and Cardon, L.R. (1994). Computational DNA sequence analysis. *Annual Review in Microbiology*. **48**, 619-654.
- Karlin S., Mocarski E.S. and Schachtel G.A. (1994a). Molecular evolution of herpesvirus: genomic and protein sequence comparisons. *Journal of Virology*. **68**, 1886-1902.
- Karlin S., Doerfler W. and Cardon L.R. (1994b). Why is CpG suppressed in the genomes of virtually all small eukaryotic viruses but not in those of large eukaryotic viruses. *Journal of Virology*. **68**, 2889-2897.
- Karlin S., Ladunga I. and Blaisdell B.E. (1994c). Heterogeneity of genomes: measures and values. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. **91**, 12837-12841.
- Karlin S. and Ladunga I. (1994). Comparisons of eukaryotic genomic sequences. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. **91**, 12832-12836.
- Karlin S. and Burge C. (1996). Trinucleotide repeats and long homopeptides in genes and proteins associated with nervous system disease and development. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. **93**, 1560-1565.
- Karlin S., Mrázek J. and Campbell A.M. (1997). Compositional biases of bacterial genomes and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology*. **179**, 3899-3913.
- Karlin S. and Mrázek J. (1997). Compositional differences within and between eukaryotic genomes. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. **94**, 10227-10232.
- Karlin S., Brocchieri L., Mrázek J. Campbell A.M. and Spormann A.M. (1999). A chimeric prokaryotic ancestry of mitochondria and primitive eukaryotes. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. **96**, 9190-9195.
- Kenyon R.H, Green D.E., Maiztegui J.I. and Peters C.J. (1988) Viral strain dependent differences in experimental Argentine hemorrhagic fever (Junin virus) infection of guinea pig. *Intervirology*. **29**, 133-143.
- Kirkegaard, K. and Baltimore, D. (1986). The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell*. **47**, 433-443.
- Kiley M.P., Tomori O., Regnery R.L. and Johnson K.M. (1981). Characterization of the Arenaviruses Lassa and Mozambique. En: *The replication of negative strand viruses*. (Bishop D.H.L. and Compans R.W. Eds.). Elsevier Press, Nueva York. pp: 11-14.
- Kiley M.P., Wilusz J., McCormick J.B. and Keene J.D. (1986). Conservation of the 3' terminal nucleotide sequences of Ebola and Marburg virus. *Virology*. **149**, 251-254.
- Kiley M., Lange J., and Johnson K. (1979) Protection of rhesus monkeys from Lassa virus by immunisation with closely related arenavirus. *Lancet*. **2**, 738.
- Kim M. and Kao C. (2001) Factors regulating template switch *in vitro* by viral RNA-dependent RNA polymerases: implications for RNA-RNA recombination. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. **98**, 4972-4977.
- Klavinskis L.S. and Oldstone M.B.A. (1989). Lymphocytic choriomeningitis virus selectively alters differentiated but no housekeeping functions: block in the expression of growth hormone gene is at the level of transcription initiation. *Virology*. **168**, 232-235.
- Klein, P., Kanehisa, M. and De Lisi, C. (1985). The detection and classification of membrane-spanning proteins. *Biochimie et Biophysic Acta*. **815**, 468-476.
- Klenerman P.; Hengartner H. and Zinkernagel R. (1997). A non-retroviral RNA virus persists in DNA form. *Nature*. **390**, 298-301.
- Kobiler D, Rice CM, Brodie C, Shahar A, Dubuisson J, Halevy M, Lustig S. (1999) A Single nucleotide change in the 5' noncoding region of Sindbis Virus confers neurovirulence in rats. *Journal of Virology*. **73**(12):10440-6.
- Kozak M. (1978). How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA?. *Cell*. **15**, 1109-1123.
- Kozak M. (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eukaryotes and organelles. *Microbiological Reviews*. **47**, 1-45.
- Kozak M. (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Research*. **12**, 857-872.
- Krug R.M. (1981). Priming of Influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **93**, 125-149.

- Kuhn, R.J., Griffin, D.E., Zhang, H., Niesters, H.G. & Strauss, J.H. (1992) Attenuation of Sindbis virus neurovirulence by using defined mutations in nontranslated regions of the genome RNA. *Journal of Virology* **66**, 7121-7127.
- Kuiken T., Fouchier R., Rimmelzwaan G. and Osterhaus A. (2003). Emerging viral infections in a rapidly changing world. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 641-6.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., and Nei M. (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* **17**:1244-1245.
- Kunkel T.A. and Eckert K.A. (1989) Fidelity of DNA polymerases used in polymerase chain reaction. In: *Polymerase Chain Reaction, Current Communications in Molecular Biology* (Erich H.A, Gibbs R and Kazazian H.H. Jr., eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kunz S., Borrow P., Oldstone M.B. (2002) Receptor structure, binding, and cell entry of arenaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **262**, 111-37.
- Kyte J. and Doolittle R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal Mol. Biol.* **157**(1), 105-32.
- Lai M.M.C. (1996) Recombination in large RNA viruses: coronaviruses. *Seminars in Virology.* **7**, 381-388.
- Lascano E.F. and Berría M.I. (1970). Microscopía electrónica de cultivos primarios de fibroblastos de ratón inoculados con virus Junín. *Medicina (Buenos Aires).* **29**, 487-493.
- Lascano E.F. and Berría M.I. (1974). Ultrastructure of Junín virus in mouse whole brain and mouse brain tissue culture. *Journal of Virology.* **14**, 965-974.
- Lascano E.F., Berría M.I. and Candurra N.A. (1981). Diagnosis of Junín virus in cell cultures by immunoperoxidase staining. *Archives in Virology.* **70**, 79-82.
- Ledinko N. (1963) Genetic recombination with poliovirus type 1: studies of crosses between a normal horse serum-resistant mutant and several guanidine-resistant mutants of the same strain. *Virology.* **20**, 107-119.
- Lee K.J., Novella I.S., Teng M.N., Oldstone M.B.A. and de la Torre J.C. (2000). NP and L proteins of Lymphocytic Choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *Journal of Virology.* **74**, 3470-3477.
- Lee K.J. y de la Torre J.C. (2002) Reverse genetics of arenaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **262**, 175-193.
- Lehmann Grube F., Martínez Peralta L., Bruns M. and Löhler J. (1983). Persistent infection of mice with the lymphocytic choriomeningitis virus. En: *Comprehensive Virology* (Fraenkel Conrat H. and Wagner R.R. Eds.). Plenum Press, Nueva York. Vol. **18**, pp: 43-103.
- Lenz O., ter Meulen J., Klenk H.D., Seidah N.G., Garten W. (2001). The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 12701-5.
- Lepine P., Mollaret P. and Kreis B. (1937). Receptivite de l'homme au virus murin de la choriomeningite lymphocytaire. Reproduction experimentale de la meningite lymphocytaire benigne. *C.R. Academy of Science Paris.* **204**, 1846-1848.
- Leung W.C. and Rawls W.E. (1977) Virion associated ribosomes are not required for the replication of Pichindé virus. *Virology.* **81**,174-176.
- Leung W.C., Leung M.F.K.L. and Rawls W.E. (1979). Distinctive RNA transcriptase, polyadenylic acid polymerase and polyuridilic acid polymerase activities associated with Pichinde virus. *Journal of Virology.* **30**, 98-107.
- Leung W.C., Harnish D., Ramsingh A., Dimock K. and Rawls W.E. (1981). Gene mapping in Pichinde virus. En: *The replication of negative strand viruses.* (Bishop D.H.L. and Compans R.W. Eds.). Elsevier Press, Nueva York. pp: 51-57.
- Levis S.C., Saavedra M.C., Ceccoli E. et al. (1984). Endogenous interferon in Argentine hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Disease.* **149**, 428-433.
- Levis S.C., Saavedra M.C., Ceccoli C., Feuillade M.R., Enría D.A., Maiztegui J.I. and Falcoff R. (1985). Correlation between endogenous interferon and the clinical evolution of patients with Argentine hemorrhagic fever. *Journal of Interferon Research.* **5**, 383-389.
- Lewin B. (1997). Chapter 31: Catalytic RNA. In *Genes VI* (Benjamin Lewin Ed.). Oxford University Press, New York.
- Li J., Zhang L.B., Yoneyama T., Yoshida H., Shimizu H., Yoshii K., Hara M., Nomura T., Yoshikura H., Miyamura T. and Hagiwara A. (1996) Genetic basis of the neurovirulence of type 1 polioviruses isolated from vaccine-associated paralytic patients. *Arch. Virol.* **141**, 1047-54.

- Li K.S., Xu K.M., Peiris J.S., Poon L.L., Yu K.Z., Yuen K.Y., Shortridge K.F., Webster R.G. and Guan Y. (2003) Characterization of H9 subtype influenza viruses from the ducks of southern China: a candidate for the next influenza pandemic in humans? *J. Virol.* **77**, 6988-94.
- Lisieux T.; Coimbra T.L.M.; Nassar E.S.; Burattini M.N.; de Souza L.T.M.; Ferreira I.B.; Rocco I.M.; Travassos da Rosa A.P.A.; Vasconcelos P.F.C.; Pinheiro F.P.; LeDuc J.W.; Rico-Hesse R.; González J.P.; Jahrling P.B. and Tesh R.B. (1994) New arenavirus isolated in Brazil. *Lancet* **343**, 8894, 391-392.
- Liu Q and Sommer S. (1994) Parameters affecting the sensitivities of dideoxy fingerprinting and SSCP. *PCR meth. and Applic.* **4**, 97-108.
- Lozano M.E., Grau O. and Romanowski V. (1993a). A whole blood RNA isolation method for reliable RT-PCR amplifications. *Trends in Genetics* . **9**: 296.
- Lozano M. E., Ghiringhelli P. D., Romanowski V. and Grau O. (1993b). A simple nucleic acid amplification assay for the rapid detection of Junín virus in whole blood samples. *Virus Research*. **27**, 37-53.
- Lozano M.E. (1995). Desarrollo de un método de diagnóstico rápido para la fiebre hemorrágica argentina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Univ. Nacional de La Plata.
- Lozano M.E.; Posik D.M.; Albariño C.G.; Schujman G.; Ghiringhelli P.D.; Calderón G.; Sabattini M. and Romanowski V. (1997) Characterization of arenaviruses using a family-specific primer set for RT-PCR amplification and RFLP analysis. Its potential use for detection of uncharacterized arenaviruses. *Virus Research*. **49** (1), 79-89.
- Lupi O. (2003) Tropical dermatology: viral tropical diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology*. **49**, 979 – 1000.
- Luytjes W.; Krystal M.; Enami M.; Parvin J.D. and Palese P. (1989) Amplification, expression, and packaging of a foreign gene by influenza virus. *Cell*. **59**, 1107-1113.
- Macadam, A.J., Ferguson, G., Burlison, J., Stone, D., Skuce, R., Almond, J.W. & Minor, P.D. (1992). Correlation of RNA secondary structure and attenuation of Sabin vaccine strains of poliovirus in tissue culture. *Virology* **189**, 415-22.
- Mackenzie R.B. (1965) Epidemiology of Machupo virus infection. I. Pattern of human infection, San Joaquin, Bolivia, 1962-1964. *Am J Trop Med Hyg.* **14**(5), 808-13.
- Mackenzie R.B., Beye H.K., Valverde C.L. and Garrón H. (1964). Epidemic hemorrhagic fever in Bolivia. 1. A preliminary report of the epidemiologic and clinical findings in a new epidemic area in South America. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **13**, 620.
- Maiztegui J.I., Sabattini M.S. and Barrera Oro J.G. (1972). Actividad del virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM) en el área endémica de Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA). 1. Estudios serológicos en roedores capturados en la ciudad de Pergamino. *Medicina (Buenos Aires)*. **32**, 131-137.
- Maiztegui J.I., Voeffrey J.R., Fernández N.J. and Barrera Oro J.G. (1973). Aislamiento de virus Junín a partir de leche materna. *Medicina (Buenos Aires)*. **33**, 659.
- Maiztegui J.I. (1975). Clinical and epidemiological patterns of Argentine hemorrhagic fever. *Bull WHO*. **52**, 657-575.
- Maiztegui J.I. and Sabattini M.S. (1977). Extensión progresiva del area endémica de fiebre hemorrágica argentina. *Medicina (Buenos Aires)*. **37** Supl. 3, 162-166.
- Maiztegui J.I., Fernández N.J. and de Damilano A.J. (1979). Efficacy of immune plasma in treatment of Argentine hemorrhagic fever and association between treatment and a late neurological syndrome. *Lancet*. **2**, 1216-1217.
- Maiztegui J.I., Feuillade M., and Briggiler A. (1986). Progressive extension of the endemic area and changing incidence of AHF. *Med. Microbiol. Immunol.* **175**, 73-78.
- Maiztegui J.I., Barrera Oro J.G., Feuillade M.R., Peters C.J., Vallejos D. and McKee K.T. (1990). Inoculation of human volunteers with Candid #1, a live attenuated Junín virus vaccine candidate. VIIIth International Congress of Virology, Berlin, Germany. Abstracts Book, pp. 111.
- 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.* **177**(2):277-83.
- Mando O.G. (1977). Hepatic and enzymatic alterations in Argentine hemorrhagic fever. *Medicina (Buenos Aires)*. **37**, 190-192.
- Mannweiler K. and Lehmann Grube F. (1973). Electron microscopy of LCM virus-infected L cells. En: Lymphocytic choriomeningitis virus and other arenaviruses (Lehmann Grube F. Ed.). Springer Verlag, Berlin. pp: 37-48.

- Marsh M. and Helenius A. (1989). Virus entry into animal cells. *Advances in Virus Research*. **36**, 107-151.
- Martin D. and Rybicki E. (2000) RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*. **16**, 562-3.
- Martínez Peralta L.A.; Coto C.E.; Weissenbacher M.C. (1993) The Tacaribe complex. The close relationship between a pathogenic (Junin) and non pathogenic (Tacaribe) arenavirus. In: Salvato M.S. (Ed), *The Arenaviridae*, In: Wagner R. and Frankel Conrat H. (Eds), Serie: The Viruses. Plenum, New York, pp 281-298.
- Martínez Segovia Z.M. and Díaz A. (1968). Purification of Junin virus by an aqueous biphasic polymer system. *Applied Microbiology*. **15**, 1602-1604.
- Martínez Segovia Z.M. and Grazioli F. (1969). The nucleic acid of Junin virus. *Acta Virologica*. **13**, 264-268.
- Martínez Segovia Z.M. and De Mitri M.I. (1977). Junin virus structural proteins. *Journal of Virology*. **21**, 579-583.
- Massoia E. y Pardinás U. (1993) El estado sistemático de algunos muroideos estudiados por Ameghino en 1889. Revalidación del género *Necromys* (Mammalia, Rodentia, Cricetidae) *Ameghiniana*. **30**, 407-418.
- Mathews D.H.; Sabina J.; Zuker M. and Turner D.H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure *J. Mol. Biol.* **288**, 911-940.
- Matloubian M., Somasundaram T., Kolhekar S.P., Selvakumar R. and Ahmed R. (1990). Genetic basis of viral persistence: single amino acid change in the viral glycoprotein affects ability of Lymphocytic Choriomeningitis virus to persist in adult mice. *Journal of Experimental Medicine*. **172**, 1043-1048.
- Matloubian M., Kolhekar S.P., Somasundaram T. and Ahmed R. (1993). Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of Lymphocytic Choriomeningitis virus. *Journal of Virology*. **67**, 7340-7349.
- McCormick J.B. (1990) Arenaviruses. En *Fields Virology*, Fields B.N. and Knipe D.M., Eds., Raven Press, New York, pp. 1245-1267.
- McCormick J.B. (1990). Arenaviruses. In: *Virology*, second edition. (Fields B.N., Knipe D.M. et al. Eds). Raven Press, Nueva York. pp: 1245-1267.
- McKee K.T. Jr Mahlandt, B.G. Maiztegui J.I., Green D.E., Eddy G.A. and Peters C.J. (1985). Experimental Argentine haemorrhagic fever in rhesus macaques: virus strain-dependent clinical response. *J. Infect. Dis.* **152**, 218-221.
- McKee K.T. Jr, Mahlandt B.G., Green D.E. and Peters C.J. (1987). Virus-specific factors in experimental Argentine haemorrhagic fever in rhesus macaques. *Journal Med. Virol.* **22**, 99-111.
- Meegan J., LeDue J., García Franco S. and Maiztegui J.I. (1986). An ELISA test for IgG and IgM antibodies to Junin virus. II Congreso Argentino de Virología. Córdoba. Libro de resúmenes, comunicación 161.
- Melcon M.O. and Herskovits E. (1981). Late neurological complications of Argentine hemorrhagic fever. *Medicina (Buenos Aires)*. **41**, 137.
- Messing J. (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* **110**, 20-78.
- Mettler N.; Casals J. and Shope R. (1963). Study of antigenic relationship between Junin virus, the etiological agent of Argentine hemorrhagic fever, and other arthropode borne viruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **12**, 647-652.
- Meyer B.J. and Southern P.J. (1994). Sequence heterogeneity in the termini of Lymphocytic Choriomeningitis virus genomic and antigenomic RNAs. *Journal of Virology*. **68**, 7659-7664.
- Meyer B.J. and Southern P.J. (1997). A novel type of defective viral genome suggests a unique strategy to establish and maintain persistent Lymphocytic Choriomeningitis virus infections. *Journal of Virology*. **71**, 6757-6764.
- Miller, W.A., Dinesh-Kumar, S.P. and Paul, C.P. (1995) *Crit. Rev. Plant Sci.* **14**, 179-211
- Miller W.A. and Koev G. (1998) Getting a handle on RNA virus recombination. *Trends in microbiology*. **6**, 421-423.
- Mills J.N.; Ellis B.A.; McKee Jr K.T.; Ksiazek T.G.; Barrera Oro J.G.; Maiztegui J.I.; Calderón G.E.; Peters C.J.; Childs J.E. (1991) Junin virus activity in rodents from endemic and nonendemic loci in central Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **44**, 589-597.
- Mills J.N., Ellis B.A., Childs J.E., McKee K.T. Jr, Maiztegui J.I., Peters C.J., Ksiazek T.G., Jahrling P.B. (1994). Prevalence of infection with Junin virus in rodent populations in the epidemic area of Argentine hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* **51** (5), 554-62.

- Mills J., Barrera Oro J., Bressler D., Childs J., Tesh R., Smith J., Enria D., Geisbert T., McKee K. Jr, Bowen M., Peters C.J. and Jahrling P. (1996) Characterization of Oliveros virus, a new member of the Tacaribe complex (Arenaviridae: Arenavirus). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **54**, 399-404.
- Mohabeer A.; Hiti, A. and Martin W. J. (1991) Non-radioactive single strand conformation polymorphism (SSCP) using the Pharmacia 'PhastSystem'. *Nucleic Acids Research.* **19** (11), 3154.
- Molinas F.C.; Maiztegui J.I. (1981) Factor VIII: C and factor VIII R: Ag in Argentine hemorrhagic fever. *Thromb Haemost.* **46**(2), 525-7.
- Monath T.P. (1975) Lassa fever: review of epidemiology and epizootiology. *Bull WHO.* **52**, 577-592.
- Moncayo A.C. Hice C.L., Watts D.M. Travassos de Rosa A.P., Guzman H. Russell K.L., Calampa C., Gozalo A., Popov V.L., Weaver S.C., Tesh R.B. (2001) Allpahuayo virus: a newly recognized arenavirus (Arenaviridae) from arboreal rice rats (*Oecomys bicolor* and *Oecomys paricola*) in northeastern peru. *Virology.* **284** (2), 277-286.
- Morens D.M., Folkers G.K., Fauci A.S. (2004) The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature.* **430**, 242-249.
- Mrázek J. and Karlin S. (1998). Strand compositional asymmetry in bacterial and large viral genomes. *Proceedings of National Academy of Sciences USA.* **95**, 3720-3725.
- Murphy F. A., Webb P. A., Johnson K.M., Whitfield S. G., Chappell W.A. (1970) Arenavirus in Vero cells: Ultrastructural studies. *Journal of Virology.* **6**, 507.
- Murphy F.A., Whitfield S.G., Webb P.A. and Johnson K.M. (1973). Ultrastructural studies of arenaviruses. En: Lymphocytic choriomeningitis virus and other arenaviruses (Lehmann Grube F. Ed.). Springer Verlag, Berlin. pp: 273-285.
- Murphy F.A. and Walker D.H. (1975). Arenaviruses: Persistent infection and viral survival in reservoir host. In: Viruses and Environment. (E. Kurstat and K. Maramorosch, eds.). Academic Press, New York. pp.: 155-180.
- Murphy F.A. and Whitfield S.G. (1975). Morphology and morphogenesis of arena-viruses. *Bulletin WHO.* **52**, 409-419.
- Nagy, P. and Bujarski, J. (1995). Efficient system of homologous RNA recombination in brome mosaic virus: sequence and structure requirements and accuracy of crossovers. *Journal of Virology.* **69**, 131-140.
- Nagy, P. and Bujarski, J. (1998). Silencing homologous RNA recombination hot spots with GC-rich sequences in brome mosaic virus. *Journal of Virology.* **72**, 1122-1130.
- Nagy, P., Zhang, C. and Simon, A. (1998). Dissecting RNA recombination in vitro: role of RNA sequences and the viral replicase. *EMBO Journal.* **17**, 2392-2403.
- Nagy P. and Simon A. (1997) New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology.* **235**, 1-9.
- Nagy P. Ogiela C. and Bujarski J. (1999) Mapping sequence active in homologous RNA recombination in Brome Mosaic Virus: Predicción of recombination hot spots. *Virology.* **254**, 92-104.
- Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, Hughes M, Perez DR, Donis R, Hoffmann E, Hobom G, Kawaoka Y. (1999) Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 9345-50.
- Nomoto A., Omata T., Toyoda H. et al. (1982). Complete nucleotide sequence of the attenuated poliovirus Sabin 1 strain genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 5793-5797.
- Nomoto A., Kohara M., Kuge S. et al. (1987). Study on virulence of poliovirus type 1 using in vitro modified viruses. In: Brinton M.A., Ruckert R.R., eds. *Positive strand RNA viruses.* New York: Alan R. Liss, 437-452.
- Oldstone M.B.A. and Dixon F. (1969) Pathogenesis of chronic disease associated with persistent lymphocytic choriomeningitis viral infection. I. Relationship of antibody production to disease in neonatally infected mice. *J Exp Med.* **129**, 483-505.
- Oldstone M.B.A., Holmstoen J. and Welsh R.M. Jr (1977). Alteration in acetylcholine enzymes in neuroblastoma cells persistently infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of Cellular Physiology.* **91**, 459-472.
- Oldstone M.B.A. and Buchmeier M.J. (1982). Restricted expression of viral glycoproteins in cells of persistently infected mice. *Nature (Londres).* **300**, 360-362.
- Oldstone M.B.A. (1987a). Arenaviruses: biology and immunotherapy (edit). *Current Topics in Microbiology and Immunology.* **134**, 1.
- Oldstone M.B.A. (1987b). Immunotherapy for virus infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* **134**, 211-229.

- Oldstone M.B.A., Salvato M., Tishon A. and Lewicki H. (1988). Virus-Lymphocytic interactions. III. Biologic parameters of a virus variant that fails to generate CTL and establishes persistent infection in immunocompetent hosts. *Virology*. **164**, 507-516.
- Orita M.; Iwahana H.; Kanazawa H.; Hayashi, K. and Sekiya T. (1989) Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**, 2766-2770.
- Ou J.H., Strauss E.G. and Strauss J.H. (1981). Comparative studies of the 3'-terminal sequences of several alpha virus RNAs. *Virology*. **109**, 281-289.
- Padula P.J., Miguel S. and De Mitri M.I. (1996). Relación de las glicoproteínas estructurales del virus Junín con el gen de su precursor. V Congreso Argentino de Virología – II Encuentro de Virólogos Latinoamericanos. Tandil, 24-27 de abril de 1996.
- Page R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**, 357-358.
- Palmer E., Obijeski J., Webb P. and Johnson K. (1977) The circular, segmented nucleocapside of an arenavirus-Tacaribe virus. *J. Gen. Virol.* **36**, 541.
- Parker L. T.; Deng Q., Zakeri H.; Carlson C.; Nickerson D.A. and Quok P.Y. (1995) Peak height variations in automated sequencing of PCR products using Taq dye terminator chemistry. *Biotechniques*. **19**, 116-121.
- Parodi A.S., Greenway D.J., Rugiero H.R., Rivero E., Frigerio M.J., Mettler N.E., Garzon 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.
- Parodi A.S., Rugiero H.R., Greenway D.J., Mettler N.E. and Boxaca M. (1961). El aislamiento del virus Junín en roedores de zonas no epidémicas. *Prensa Médica Argentina*. **48**, 2321.
- Pedersen I.R. (1970). Density gradient centrifugation studies on Lymphocytic Choriomeningitis virus and on viral ribonucleic acid. *Journal of Virology*. **6**, 414-420.
- Pedersen I.R. (1971). Lymphocytic Choriomeningitis virus RNAs. *Nature*. **234**, 112-114.
- Pedersen I.R. (1973). LCM virus: its purification and its chemical and physical properties. En: *Lymphocytic choriomeningitis virus and other arenaviruses*. (Lehmann Grube F. Ed.). Springer Verlag, Berlin. pp: 13-23.
- Pedersen I.R. and Königshofer E.P. (1976). Characterization of ribonucleoproteins and ribosomes isolated from Lymphocytic Choriomeningitis virus. *Journal of Virology*. **20**, 14-21.
- Peng H.; Du M.; Isaacson P. and Pan L. (1995) High-resolution SSCP analysis using poliacrilamida agarose composite gel and a background-free silver staining method. *Biotechniques*. **19** (3), 411-414.
- Perez M. and de la Torre J.C. (2003). Characterization of the Genomic Promoter of the Prototypic Arenavirus Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *Journal of virology*. **77**, 1184-1194.
- Peters C.J., Webb P.A. and Johnson K.M. (1973). Measurement of antibodies to Machupo virus by the indirect fluorescent technique. *Proceedings of the Society in Experimental Biology and Medicine*. **142**, 526-531.
- Peters C.J., Kuehne R.W., Mercado R.R., Le Bow R.H., Spertzel R.O. and Webb P.A. (1974). Hemorrhagic fever in Cochabamba, Bolivia, 1971. *American Journal of Epidemiology*. **99**, 425.
- Peters C.J., Jahrling P.B., Liu C.T., Kenyon R.H., McKee Jr., K.T. and Barrera Oro J.G. (1987). Experimental studies of arenaviral hemorrhagic fevers. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **134**, 5-68.
- Peters C.J.; Buchmeier M.; Pollin P.; Ksiazek T.G. (1996) Arenaviruses. In: "Virology", 3<sup>rd</sup> edition, (Fields B.N.; Knipe D.M.; Howley P.M. et al. Eds.) New York. Lippincott-Raven Publishers, pp. 1521-1552.
- Pfau C.J. (1974). Biochemical and biophysical properties of the arenaviruses. *Progress in Medical Virology*. **18**, 64-80.
- Pierangeli, A., Bucci, M., Forzan, M., Pagnotti, P., Equestre, M. and Pérez Bercoff, R. (1999). Primer alignment-and-extension: a novel mechanism of viral RNA recombination responsible for the rescue of inactivated poliovirus cDNA clones. *Journal of General Virology*. **80**, 1889-1897.
- Pinschewer D.D., Perez M., Sanchez A.B., de la Torre J.C. (2003) Recombinant lymphocytic choriomeningitis virus expressing vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 7895-900.
- Pircher H., Moskophidis D., Rohrer U., Bürki K., Hengartner H. and Zinkernagel R.M. (1990). Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant virus variants *in vivo*. *Nature*. **346**, 629-633.
- Pirosky I., Zuccarini J., Molinelli E.A., Di Pietro A., Martini P., Ferreyra B., Gutman Frugone L.F. and Vazquez T. (1959). Virosis hemorrágica del noroeste bonaerense. Endemoepidémica, febril, enantemática y leucopénica. I. La primera inoculación experimental al hombre. *Orientación Médica*. **8**, 144-148.

- Popescu M. and Lehmann-Grube F. (1977). Defective interfering particles in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology*. **77**, 78-83.
- Posik D.M., Albariño C.G., Lozano M.E., Ghiringhelli P.D., Romanowski V. (1995). Análisis filogenético molecular de arenavirus y ubicación de regiones conservadas para la detección de arenavirus emergentes. XXXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular. Villa Giardino, Córdoba, Argentina.
- Prehaud C., Coulon P., Lafay F., Thiers C. and Flamand A. (1988) Antigenic site I of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. *Journal of Virology*. **62**, 1-7.
- Racaniello V.R., and Baltimore D. (1981) Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science*. **214**, 916-919.
- Radecke F., Spielhofer P., Schneider H., Kaelin K., Huber M., Dotsch C., Christiansen G., Billeter M.A. (1995) Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J*. **14**, 5773-84
- Raju R., Raju L., Hacker D. Garcin D., Compans R.W. and Kolakofsky D. (1990). Non templated bases at the 5' ends of Tacaribe virus mRNAs. *Virology*. **174**, 53-59.
- Raju R, Subramaniam S.V. and Hajjou M. (1995) Genesis of Sindbis Virus by In Vivo Recombination of Nonreplicative RNA Precursors. *Journal of virology*. **69**, 7391-7401.
- Ramos B.A., Courtney R.J. and Rawls W.E. (1972). The structural proteins of Pichinde virus. *Journal of Virology*. **10**, 661-667.
- Rao, M.J.K. and Argos, P. (1986). A conformational preference parameter to predict helices in integral membrane proteins. *Biochimie et Biophysic Acta*. **869**, 197-214.
- Rawls W.E., Chan M.A. and Gee S.R. (1981). Mechanism of persistence in arenavirus infections: a brief review. *Canadian Journal of Microbiology*. **27**, 568-574.
- Ramsingh A.I., Dimock K., Rawls W.E. and Leung W.C. (1980). Size estimation of Pichinde virus RNA by gel electrophoresis under denaturing conditions. *Intervirology*. **14**, 31-36.
- Rey O., Rossi J.P.F.C., López R., Iapalucci-Espinoza S. and Franze Fernández M.T. (1988). Tacaribe virus infections may induce inhibition of the activity host cell Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pumps. *Journal of General Virology*. **69**, 951-954.
- Rey O. (1990). Efecto temprano en la interacción del virus Tacaribe con la célula hospedadora y mecanismos implicados. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
- Rice, P.M., Elliston, K. and Gribskov, M. (1991). Similarity and homology. In: *Sequence Analysis Primer*. (M. Gribskov and J. Deveraux, eds.). Serie: UWBC Biotechnical Resource Series (R.R. Burgess, ed.). Stockton Press, New York, pp.: 1-59.
- Rivera Pomar R. V., Manzella E.M., Ghiringhelli P.D., Grau O., and Romanowski V. (1991) Patterns of transient expression of the arenavirus nucleocapsid protein gene in transfected cells. *Microscop. Electron. Biol. Cel*. **15**, 41.
- Rivera Pomar R.V., Lozano M.E., Albariño C.G., Ghiringhelli P.D., Grau O. and Romanowski V. (1993). *In vivo* antiterminator activity of Junin arenavirus N protein. IXth International Congress of Virology. Glasgow, Escocia.
- Rivers T.M. and Scott T.F.M. (1935). Meningitis in man caused by a filterable virus. *Science*. **81**, 439-440.
- Riviere Y., Ahmed R., Southern P.J., Buchmeier M.J., Dutko F.J. and Oldstone M.B.A. (1985a). The S RNA segment of lymphocytic choriomeningitis virus codes for the nucleoprotein and the glycoproteins 1 and 2. *Journal of Virology*. **53**, 966-968.
- Riviere Y., Ahmed R., Southern P.J., Buchmeier M.J. and Oldstone M.B.A. (1985b). Genetic mapping of lymphocytic choriomeningitis virus pathogenicity: virulence in guinea pigs is associated with the L RNA segment. *Journal of Virology*. **55**, 704-709.
- Romanowski V. (1981). Estructura bioquímica del virus Junin. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Romanowski V. and Bishop D.H.L. (1983). The formation of Arenaviruses that are genetically diploid. *Virology*. **126**, 87-95.
- Romanowski V. And Bishop D.H.L. (1985) Conserved sequence and coding of two strains of lymphocytic choriomeningitis virus (WE and ARM) and Pichinde arenavirus. *Virus Research*. **3**, 101-114.
- Romanowski V., Matsuura Y. and Bishop D.H.L. (1985). Complete sequence of the S RNA of lymphocytic choriomeningitis virus (WE strain) compared to that of Pichinde arenavirus. *Virus Research*. **3**, 101-114.

- Romanowski V. and Bishop D.H.L. (1983) The formation of Arenaviruses that are genetically diploid. *Virology*. **126**, 87-95.
- Romanowski V.; Matsuura Y. and Bishop D.H.L. (1985) Complete sequence of the S RNA of lymphocytic choriomeningitis virus (WE strain) compared to that of Pichinde arenavirus. *Virus Research*. **3**, 101-114.
- Romanowski V (1993) Genetic organization of Junín virus, the etiological agent of argentine hemorrhagic fever. In: Salvato M.S. (Ed), *The Arenaviridae*, In: Wagner R. and Frankel Conrat H. (Eds), Serie: The Viruses. Plenum, New York, pp 51-83.
- Rost B. and Sander C. (1993) Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy *J. of Molecular Biology*, **232**:584-599.
- Rost B. and Sander C. (1994a). Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins*, **19**, 55-77.
- Rost B. and Sander C. (1994b). Conservation and prediction of solvent accessibility in protein families. *Proteins*, **20**, 216-226.
- Rost, B., Casadio, R., Fariselli, P. and Sander, C. (1995). Prediction of helical transmembrane segments at 95% accuracy. *Protein Science*. **4**, 521-533.
- Rost B. (1996). PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks. *Methods in Enzymology*, **266**, 525-539.
- Rost B, Fariselli P and Casadio R (1996) Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy *Protein Science* **7**:1704-1718.
- Rowe W.P., Pugh W.F., Webb P.A. and Peters C.J. (1970a). Serological relationships of the Tacaribe complex of viruses to lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of Virology*. **5**, 289-292.
- Rowe W.P.; Murphy F.A.; Bergold G.C.; Casals; Hotchin J.; Johnson K.M.; Lehmann-Grube; Mims C.A.; Traub E.; Webb P.A. (1970b) Arenaviruses: proposed name for a newly defined virus group. *Journal of Virology*. **5**, 651.
- Rueckert R. (1990) Picornavirus and their multiplication. En: *Virology 2ª edición* (Fields, B. y Knipe D. Eds). New York: Raven Press, pp 507-548.
- Ruggiero H.R., Cintora A., Libonatti E., Magnoni C., Castiglione E. and Locisera R. (1960). Formas nerviosas de la fiebre hemorrágica epidémica. *Prensa Med. Argentina*. **47**, 1845.
- Ruggiero H.R., Parodi A.S., Ruggiero H.G., Mettler N., Boxaca M., de Guerrero A.L., Cintora A., Magnoni C., Milani H., Maglio F., Gonzalez Cambaceres C., Astarloa L., Squassi G., Fernández D. and Giacosa A. (1964a). Fiebre hemorrágica argentina. I. Periodo de incubación e invasión. *Revista de la Asociación Médica Argentina*. **78**, 221.
- Ruggiero H.R., Cintora A., Magnoni C., Ruggiero H.G., Gonzalez Cambaceres C., Maglio F., Astarloa L., Squassi G. and Fernández D. (1964b). Fiebre hemorrágica argentina. III. Aparato cardiovascular. *Revista de la Asociación Médica Argentina*. **78**, 360-371.
- Ruggiero H.R., Cintora A., Ruggiero H.G., Mettler N., Boxaca M., de Guerrero A.L., Cintora A., Magnoni C., Milani H., Maglio F., Gonzalez Cambaceres C., Astarloa L., Squassi G., Fernández D. (1964c). Fiebre hemorrágica argentina. IV. Formas clínicas. *Revista de la Asociación Médica Argentina*. **78**, 500.
- Ruo S.L., Mitchell S.W., Kiley M.P., Roumillat L.F., Fisherhoch S.P. and McCormick J.B. (1991). Antigenic relatedness between arenaviruses defined at the epitope level by monoclonal antibodies. *Journal of General Virology*. **72**, 549-555.
- Sabattini M.S., Gonzalez de Ríos L.E., Díaz G. and Vega V.R. (1977). Infección natural y experimental de roedores con virus Junín. *Medicina (Buenos Aires)*. **37** Supl. 3, 149-161.
- Sabin, A.B., Hennesen, W.A., and Winsser, J. (1954). Studies on variants of poliomyelitis virus. *J. Exp. Med.* **99**, 551-576.
- Sacramento D., Bourhy H. and N. Tordo. (1991). PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Molecular and cellular Probes*. **5**, 229-240.
- Salazar-Bravo J., Ruedas L.A., Yates T.L. (2002). Mammalian reservoirs of arenaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **262**, 25-63.
- Salas R.; Manzione N.; Tesh R.B.; Rico-Hesse R.; Shope R.; Betancourt A.; Godoy O.; Bruzual R.; Pacheco M.; Ramos B.; Taibo M.E.; García Tamayo J.; Jaimés E.; Vasquez C.; Araoz F. and Querales J. (1991) Venezuelan haemorrhagic fever. *Lancet*. **338**, 1033-1036.
- Saleh F., Gard G.P. and Compans R.W. (1979). Synthesis of Tacaribe viral proteins. *Virology*. **93**, 369-376.

- Salvato M., Shimomaye E., Southern P. and Oldstone M.B.A. (1988). Virus-Lymphocyte interactions. IV. Molecular characterization of LCMV Armstrong (CTL<sup>+</sup>) small genomic segment and that of its variant, Clone 13 (CTL<sup>-</sup>). *Virology*. **164**, 517-522.
- Salvato M., Shimomaye E. and Oldstone M.B.A. (1989) The primary structure of the lymphocytic choriomeningitis virus L gene encodes a putative RNA polymerase. *Virology*. **169**, 377-384.
- Salvato M. and Shimomaye E.M. (1989) The completed sequence of lymphocytic choriomeningitis virus reveals a unique RNA structure and a gene for a zinc finger protein. *Virology*. **173**, 1-10.
- Salvato M., Borrow P., Shimomaye E. and Oldstone M.B.A. (1991). Molecular basis of viral persistence: a single amino acid change in the glycoprotein of Lymphocytic Choriomeningitis virus es associated with supression of the antiviral cytotoxic T.Lymphocyte response and establishment of persistence. *Journal of Virology*. **65**, 1863-1869.
- Salvato M.S., Schweighofer K.J., Burns J.W. and Shimomaye E.S. (1992). Biochemical and immunological evidence that the 11 kDa zinc-binding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus. *Virus Research*. **22**, 185.
- Salvato M.S. (Ed.) (1993). Molecular biology of the prototype arenavirus, lymphocytic chorio-meningitis virus. In: The Arenaviridae. (Salvato M.S. Ed.), Serie: The Viruses (Wagner R. and Frankel Conrat H. Eds.). Plenum Press, Nueva York. pp: 133-156.
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbord, New York.
- Sanchez A., Pifat D.Y., Kenyon R.H., Peters C.J., McCormick J.B. and Kiley M.P. (1989). Junin virus monoclonal antibodies: characterization and crossreactivity with other arenaviruses. *Journal of General Virology*. **70**, 1125-1132.
- Sanchez A., Trappier S.G., Mahy B.W., Peters C.J. and Nichol S.T. (1996) The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **93**, 3602-7.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **74**, 5463-5466.
- Sarkar G.; Yoon H. and Sommer S. (1992) Screening for mutation by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison whit DNA-SSCP. *Nucleic Acids Research*. **20** (4), 871-878.
- Schwartz R. M., and Dayhoff M. O. (1979). *Atlas of protein sequence and structure* (Dayhoff M. O., Ed.), pp 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington D.C.
- Scolaro L. A. ; Mersich S. E. and Damonte S. E. (1990) A mouse attenuated mutant of Junin virus with an altered envelope glycoprotein. *Arch. Virol*. **111**, 257.
- Schneider-Schaulies J. (2000). Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. *Journal of General Virology*. **81**, 413-1429.
- Schneider-Schaulies J, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. (2001) Measles virus interactions with cellular receptors: consequences for viral pathogenesis. *J Neurovirol*. **7**(5):391-9.
- Sekiguchi H., Tacahashi Y. and Uyeda I. (2003) The 3' terminal region is strictly required for clover yellow vein virus genome replication. *Arch Virol*. **148**, 759-72.
- Simon A.E. and Bujarski J.J. (1994) *Annu. Rev. Phytopathol*. **32**, 337-362.
- Simon, A. and Nagy, P. (1996). RNA recombination in turnip crinkle virus: its role in formation of chimeric RNAs, multimers, and in 3'-end repair. *Seminars in Virology*. **7**, 373-379.
- Schnell M., Mebatsion T. and Conzelmann K. (1994). Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J*. **13**, 4195-4203.
- Snyder, M.H., Betts, R.F., DeBorde, D., Tierney, E.L., Clements, M.L., Herrington, D., Sears, S.D., Dolin, R., Maassab, H.F. and Murphy, B.R. (1988). Four viral genes independently contribute to attenuation of live influenza A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) cold-adapted reassortant virus vaccines. *Journal of Virology*. **62**, 488-95.
- Southern P. (1996). *Arenaviridae: The viruses and their replication*. In: "Virology", 3<sup>rd</sup> edition, (Fields B.N.; Knipe D.M.; Howley P.M. et al. Eds.) New York. Lippincott-Raven Publishers, pp. 1505-1520.
- Spinardi L.; Mazars R. and Theillet Ch. (1991) Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic acids Research*. **19** (14), 4009.
- Spriggs D.R., and Fields B.N. (1982). Attenuated reovirus type 3 strains generated by selection of haemagglutinin antigenic variants. *Nature*. **297**, 68-70.

- Spriggs D.R., Bronson R.T. and Fields B.N. (1983). Haemagglutinin variants of reovirus type 3 have altered central nervous system tropism. *Science*. **220**, 505-507.
- Staneck L.D., Trowbridge R.S., Welsh R.M., Wright E.A. and Pfau C.J. (1972). Arenaviruses: cellular response to long-term *in vivo* infection with Parana and lymphocytic choriomeningitis viruses. *Infect. Immun.* **6**, 444-450.
- Staneck L.D. and Pfau C.J. (1974). Interfering particles from a culture persistently infected with Parana virus. *Journal of General Virology*. **22**, 437-440.
- Stephens E.B. and Compans R.W. (1988). Assembly of animal viruses at cellular membranes. *Annual Review in Microbiology*. **42**, 489.
- Stocker C., Martinez Peralta L., Kratzberg T., Lohmann F. and Bruns M. (1994). Characterization of a virus variant produced by L cells persistently infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of General Virology*. **75**, 3431-3439.
- Stoker, M.G.P. and Mc Pherson, I.A. (1961). Studies on transformation of hamster cells by polyoma virus *in vitro*. *Virology*. **14**, 631-641.
- Svarovskaia, E.S., Delviks, K.A., Hwang, C.K. and Pathak, V.K. (2000). Structural determinants of murine leukemia virus reverse transcriptase that affect the frequency of template switching. *Journal of Virology*. **74**, 7171-7178.
- Sved J. and Bird A. (1990). The expected equilibrium of the CpG dinucleotide in vertebrate genomes under a mutation model. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. **87**, 4692-4696.
- Tashiro, M., Yamakawa, K., Tobita, K., Klenk, H.D., Rott, R., and Seto, J.T. (1990). Organ tropism of Sendai virus in mice: proteolytic activation of the fusion glycoprotein in mouse organs and budding site at the bronchial epithelium. *Journal of Virology*. **64**, 3627-3634.
- Teng M.; Borrow P; Oldstone M. and de la Torre J. (1996). A single amino acid change in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is associated with the ability to cause growth hormone deficiency syndrome. *Journal of Virology*. **70**, 8438-8443.
- ter Meulen J., Badusche M., Satoguina J., Strecker T., Lenz O., Loeliger C., Sakho M., Koulemou K., Koivogui L., Hoerauf A. (2004). Old and New World arenaviruses share a highly conserved epitope in the fusion domain of the glycoprotein 2, which is recognized by Lassa virus-specific human CD4+ T-cell clones. *Virology*. **321**, 134-143.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **24**, 4876-4882.
- Tinoco I Jr, Borer PN, Dengler B, Levin MD, Uhlenbeck OC, Crothers DM, Bralla J. (1973) Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. *Nat. New Biol.* **246**(150):40-1.
- Tkaczewski L.Z. and Boxaca M.C. (1970). Cambios citoquímicos en células Vero infectadas con algunos virus del grupo Tacaribe. *Medicina (Buenos Aires)*. **30**, 28-37.
- Tkaczewski L.Z. and Correa J. (1972). Cytopathogenic process in Junín virus infected Vero cells. *Medicina (Buenos Aires)*. **32**, 293-301.
- Tortorici M.A.; Albariño C.G.; Posik D.M.; Ghiringhelli P.D.; Lozano M.E. Rivera Pomar R.; Romanowski V. (2001) Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity *in vivo*. *Virus Research*. **73**, 41-55.
- Traub E. (1935). A filterable virus recovered from white mice. *Science*. **81**, 198-299.
- Tucker T.J., Smuts H., Eickhaus P., Robson S.C. and Kirsch R.E. (1999) Molecular characterization of the 5' non-coding region of South African GBV-C/HGV isolates: major deletion and evidence for a fourth genotype. *J. Med Virol.* **59**, 52-9.
- Turner, D.H.; Sugimoto, N.; Jaeger, J.A.; Longfellow, C.E.; Freier, S.M. and Kierzek, R. (1987). Improved parameters for prediction of rna structure. *CSH Symposia in Quantitative Biology*. **52**, 123-133.
- Turner, D.H. and Sugimoto, N. (1988). Rna structure prediction. *Annual Review in Biophysical Chemistry*. **17**, 167-192.
- Valdovinos MR y Gómez B. (2003) Establishment of respiratory syncytial virus persistence in cell lines: association with defective interfering particles. *Intervirol.* **46**, 190-8.
- Van Regenmortel M. and Mahyt B. (2004) Emerging Issues in Virus Taxonomy. *Emerging Infectious Diseases*. **10**, 8-13.
- Van der Zeijst B.A.M., Bleumink N., Crawford L.V., Swyryd A. and Stark G.R. (1983). Viral proteins and RNAs in BHK cells persistently infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of Virology*. **48**, 262-270.

- Veza A.C.; Gard G.P.; Compans R.W.; Bishop D.H.L. (1977) Structural components of the arenavirus Pichinde. *Journal of Virology*. **23**, 776-786.
- Veza A.C., Clewley J.P., Gard G.P., Abraham N.Z., Compans R.W. and Bishop D.H.L. (1978). Virion RNA species of the arenaviruses Pichinde, Tacaribe and Tamiami. *Journal of Virology*. **26**, 485-497.
- Vitullo A.D.; Hodara V.L.; Merani M.S. (1987) Effect of persistent infection with Junin virus on growth and reproduction of its natural reservoir, *Calomys musculus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **37**, 663-669.
- Vitullo A.D.; Merani M.S.; (1988) Is vertical transmission sufficient to maintain Junin virus in nature? *Journal of General Virology*. **69**, 1437-1440.
- Vidal-Puig A. and Moller D. (1995) Comparative sensitivity of alternative single strand conformation polymorphism (SSCP) methods. *Biotechniques*. **17** (3), 490-496.
- Vieth S, Torda AE, Asper M, Schmitz H, Gunther S. (2004) Sequence analysis of L RNA of Lassa virus. *Virology*. **318**, 153-68.
- Volchkov V.E., Becker S., Volchkova V.A., Ternovoj V.A., Kotov A.N., Netesov S.V. and Klenk H.D. (1995) GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. *Virology*. **214**, 421-30.
- Volchkov V.E., Volchkova V.A., Muhlberger E., Kolesnikova L.V., Weik M., Dolnik O. and Klenk HD. (2001) Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science*. **291**, 1965-9.
- Waker D., Johnson K., Lange J. Gardner J., Kiley M and McCormick J. (1982) Experimental infection of rhesus monkeys with Lassa virus and a closely related arenavirus, Mozambique virus. *J. Infect. Dis.* **146**, 360-368.
- Walsh P.S.; Metzger D.A. and Higuchi R. (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. **10** (4), 506.
- Ward, C.W. (1993). Progress towards a higher taxonomy of viruses. *Research in Virology*. **144**, 419-453.
- Webb P.A., Johnson K.M. and MacKensie R.B. (1969). The measurement of specific antibodies in Bolivian hemorrhagic fever by neutralization of virus plaques. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **130**, 1013-1016.
- Webb, P.A., Justines, G. and Johnson, K.M. (1975). Infection of wild and laboratory animals with Machupo and Latino viruses. *Bulletin WHO*. **52**, 493-499.
- Weissenbacher M.C., de Guerrero L.B. and Boxaca M.C. (1975). Experimental biology and pathogenesis of Junin virus infection in animals and man. *Bulletin WHO*. **52**, 507-515.
- Weissenbacher M.C. and Damonte E.B. (1983). Fiebre hemorrágica argentina. En: *Adel. Microbiol. Enf. Infec.* (Coto C., Esparza J. and de Torres R.A. Eds.). Buenos Aires-Caracas. Vol. **2**, pp: 119-171.
- Weissenbacher M.C., Caiello M.A., Carballal G., Planes N., de la Vega M.T. and Kravetz F. (1985). Actividad del virus Junin en humanos y roedores de áreas no endémicas de la Provincia de Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)*. **45**, 263-268.
- Weissenbacher M.C., Laguens R.P. and Coto C.E. (1987). Argentine hemorrhagic fever. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Vol. **134**. (M. Oldstone ed.). Springer-Verlag, Berlin. pp.: 80-116.
- Welsh R.M. and Oldstone M.B.A. (1977). Inhibition of immunologic injury of cultured cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus: role of defective interfering virus in regulating viral antigen expression. *Journal of Experimental Medicine*. **145**, 1449-1468.
- Weish R.M. (1978) Cytotoxic cells induced during lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. I. Characterization of natural killer cell induction. *J. Exp. Med.* **148**, 163-181.
- Weish R.M. and Buchmeier M.J. (1979). Protein analysis of defective interfering lymphocytic choriomeningitis virus and persistently infected cells. *Virology*. **96**, 503-515.
- Whitaker-Dowling P. and Youngner J.S. (1987). Viral interference-dominance of mutant viruses over wild-type virus in mixed infections. *Microbiol. Rev.* **51**, 179-191.
- Whitton J.L., Gebhardt J.R., Lewicki H., Tishon A. and Oldstone M.B.A. (1988a). Molecular definition of a major Cytotoxic T-lymphocyte epitope in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of Virology*. **62**, 687-695.
- Whitton J.L., Southern P.J. and Oldstone M.B.A. (1988b). Analyses of the Cytotoxic T-lymphocyte responses to glycoprotein and nucleoprotein components of lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology*. **162**, 321-327.
- Weiller G.F. (1998) Phylogenetic Profiles: A graphical method for detecting genetic recombinations in homologous sequences. *Mol. Biol. Evol.* **15**(3):326-335.

- Wilson S.M. and Clegg J.C.S. (1991) Sequence analysis of the S RNA of the African Arenavirus Mopeia: an unusual secondary structure feature in the intergenic region. *Virology* 180, 543-552.
- Wimmer E., Hellen C.U., Cao X. (1993) Genetics of poliovirus. *Annu. Rev. Genet.* 27, 353-436.
- Worobey M. and Holmes E. (1999) Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology*. 80, 2535-2543.
- Wright, K.E., Spiro, R.C., Burns, J.W. and Buchmeier, J.M. (1990). Post-translational processing of the glycoproteins of lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology*. 177, 175-183.
- Wulff H., Lange J.V., and Webb P.A. (1978). Interrelationship among arenaviruses measured by indirect immunofluorescence. *Intervirology*. 9, 344-350.
- Yasumura, Y. and Kawatika, Y. (1963). Studies on SV40 virus in tissue culture cells. *Nippon Rinsho*. 21, 1201-1215.
- York J., Romanowski V., Lu M. and Numberg J. (2004) The signal peptide of Junin arenavirus envelope glycoprotein is mistoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex. *Journal of Virology*. 78, 10783-10792.
- Yoshida H, Horie H, Matsuura K, Miyamura T.(2000). Characterisation of vaccine-derived polioviruses isolated from sewage and river water in Japan. *Lancet*. 356, 1461-3.
- Young P.R., Chanas A.C. and Howard C.R. (1981). Analysis of the structure and function of Pichinde virus polypeptides. En: The replication of negative strand viruses. (Bishop D.H.L. and Compans R.W. Eds.). Elsevier Press, New York. pp: 11-14.
- Young P.R. and Howard. C. (1983). Fine structure analysis of Pichinde virus nucleocapsids. *J. of General Virology*. 64, 833-842.
- Young P.R., Chanas A.C., Lee S.R. and Howard C.R. (1987). Localization of an arenavirus protein in the nuclei of infected cells. *Journal of General Virology*. 68, 2465-2470.
- Yu M., Miller R.H., Emerson S., Purcell R.H. (1996). A hydrophobic heptad repeat of the core protein of woodchuck hepatitis virus is required for capsid assembly. *J. Virol.* 70, 7085-91.
- Zhang M, Zeng CQ, Dong Y, Ball JM, Saif LJ, Morris AP, Estes MK. (1998a) Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. *Journal of Virology*. 72, 3666-72.
- Zhang, Z., Schäffer, A.A., Miller, W., Madden, T.L., Lipman, D.J., Koonin, E.V. and Altschul, S.F. (1998b). Protein sequence similarity searches using patterns as seeds. *Nucleic Acids Research*. 26,3986-3990.
- Zhang, J. and Sapp, C.M. (1999a). Recombination between two identical sequences within the same retroviral RNA molecule. *Journal of Virology*. 73, 5912-5917.
- Zhang L., Marriott K.A, Aronson J.F. (1999b). Sequence analysis of the small RNA segment of guinea pig-passaged Pichinde virus variants. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 220-5.
- Zhang L., Marriott K.A., Harnish D.G. and Aronson J.F. (2001) Reassortant analysis of guinea pig virulence of Pichinde virus variants. *Virology*. 290 (1), 30-38.
- Zheng, D.X., Dickens, L., Liu, T.Y. and Nakhasi, H.L. (1989). Nucleotide sequence of the 24S subgenomic messenger RNA of a vaccine strain (HPV77) of rubella virus: comparison with a wild-type strain (M33). *Gene*. 82, 343-9.
- Zinkernagel R.M. and Doherty P.C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis virus within a synergic or semiallogenic system. *Nature*. 248, 701-702.
- Zinkernagel R.M. and Doherty P.C. (1977). Major transplantation antigens, viruses and specificity of surveillance T cells. *Cont. Topics in Immunobiology*. 7, 179-220.
- Zinkernagel R.M., First T., Hengrtner H. and Althage A. (1982). Suceptibility to lymphocytic choriomeningitis virus isolates correlates directly wiht early and high cytotoxic T-cell activity, as well as footpad swelling reaction, and all these are regulated by H-2D. *Journal of Experimental Medicine*. 162, 2125-2141.
- Zeller W., Bruns M. and Lehmann-Grube F. (1986). Viral nucleoprotein can be demonstrated on the surface of lymphocytic choriomeningitis virus-infected cells. *Medical Microbiology and Immunology*. 175, 89.
- Zeller W.; Bruns M. and Lehmann-Grube F. (1988). Lymphocytic choriomeningitis virus. X. Demonstration of the nucleoprotein on the surface of infected cells. *Virology*. 162, 90-97.
- Zuker, M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science*. 244, 48-52.
- Zuker M. (1991). Suboptimal sequence alignment in molecular biology. Alignment with error analysis. *J Mol Biol*. 221, 403-20.

Zuker M.; Mathews D.H. and Turner D.H. (1999) Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: A practical guide In *RNA Biochemistry and Biotechnology*, 11-43, J. Barciszewski and B.F.C. Clark eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers.

Zuker M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31** (13), 3406-15.

PARTE VII

APÉNDICES

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
Esp UGCAGUAAGGGGAUCCUAGGCGAUUUUGGUAACGCUUAUUAUUGAGACUGUUUCUGUUUGGACAACAUCAAAAUCAUCUUAUUGCACAUGGGGCAAUUCAU  
Led UGCAGUAAGGGGAUCCUAGGCGAUUUUGGUCACGCUUAUUAUUGAGACUGUUUCUGUUUGGACAACAUCAAAAUCAUCUUAUUGCACAUGGGGCAAGUUCU  
Rom UGCAGUAAGGGGAUCCUAGGCGAUUUUGGUCACGCUUAUUAUUGAGACUUAUUUCUGUUUGGACAACCCUGAAAAUCAUCUUAUUGCACAUGGGGCAAGUUCU  
\*\*\*\*\*

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
Esp UAGCUUCAUGCAAGAAAUACCAACUUUUUGCAGGAGGCUUGAACAUUGCUCUUGUAGCAGUCAGUCUUAUUGCCAUCAUUAAGGGUAUAGUGAACUUG  
Led UAGUUUCAUGCAAGAAAUACCAACUUUUUGCAGGAGGCUUGAACAUUGCUCUUGUAGCAGUCAGUCUUAUUGCCAUCAUUAAGGGUGUGGUAACUUG  
Rom UAGCUUCAUGCAAGAAAUACCAACUUUUUGCAGGAGGCUUGAACAUUGCUCUUGUAGCAGUCAGUCUUAUUGCCAUCAUUAAGGGUAUAGUGAACUUG  
\*\*\*

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300  
Esp UACAAAAGUGGUUUAUUCCAAUUCUUGUAUUCUAGCGCUUGCAGGAAGAUCCUGCAGAGAAGAAGCUUUUCAAUUCGGACUGCAUCAGAGUUCAGCA  
Led UACAAAAGUGGUUUAUUCCAAUUCUUGUAUUCUAGCGCUUGCAGGAAGAUCCUGCAGAGAAGAAGCUUUUCAAUUCGGGCGCACACUGAGUUCAGCA  
Rom UACAAAAGUGGUUUAUUCCAAUUCUUGUAUUCUAGCGCUUGCAGGAAGAUCCUGCAGAGAAGAAGCUUUUCAAUUCGGACUGCACACUGAGUUCAGCA  
\*\*\*\*\*

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400  
Esp CUGUGUCCUUCUCAAUGGGGUCUCUUUCCAACAUCACAUAGACCUACCUUUGUUGUUAACUUAACAAGAGCCAUUUUACAUAUAAAGGGGGGCAA  
Led CUGUGUCCUUCUCAAUGGGGUCUCUUUCCAACAUCACAUAGACCUACCUUUGUUGUUAACUUAACAAGAGCCAUUUUACAUAUAAAGGGGGGCAA  
Rom CUGUGUCCUUCUCAAUGGGGUCUCUUUCCAACAUCACAUAGACCUACCUUUGUUGUUAACUUAACAAGAGCCAUUUUACAUAUAAAGGGGGGCAA  
\*\*\*\*\*

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500  
Esp UGCUUCAUUUUGAUCAAGUUGAUGAUUUGCAGUUGUUAUACACAGUUAUGAUUUAUUAACAACUCCGGCAGAUUAGCUGGUGUUCUAAAAGU  
Led UGCUUCAUUUUGAUCAAGUUGAUGAUUUGCAGUUAUUGUUAUUAUUAACAACUCCGGCAGAUUAGCUGGUGUUCUAAAAGU  
Rom UGCUUCAUUUUGAUCAAGUUGAUGAUUUGAAGUACUUGUUAUUAUUAACAACUCCAGCAGACUAGCUGGUGUUCUAAAAGU  
\*\*\*\*\*

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600  
Esp GAUGAUCAAUUUGUUGUCUCAAGGUUCAUGAAUGCUGGGGACAUUUGGCAUCUAGACCCACUUAUCUGUAGGAACCGUACAAGACAGAAAG  
Led GAUGAUCAAUUUGUUGUCUCAAGGUUCAUGAAUGCUGGGGACAUUUGGCAUCUAGACCCACUUAUCUGUAGGAACCGUACAAGACAGAAAG  
Rom GAUGAUCAAUUUGUUGUCUCAAGGUUCAUGAAUGCUGGGGACAUUUGGCAUCUAGACCCACUUAUCUGUAGGAACCGUACAAGACAGAAAG  
\*\*\*\*\*

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700  
Esp GCUUCAUCUUUUAAGUACAACCCUCAAAGACUGGUGUUAUUGAAACUUAUGCUAAGAAUUAAGACUGGCAUCUUAUUAUAGAGAAUUAUUCUGA  
Led GCUUCAUCUUUUAAGUACAACCCUCAAAGACUGGUGUUAUUGAAACUUAUGCUAAGAAUUAAGACUGGCAUCUUAUUAUAGAGAAUUAUUCUGA  
Rom GCUUCAUCUUUUAAGUACAACCCUCAAAGACUGGUGUUAUUGAAACUUAUGCUAAGAAUUAAGACUGGCAUCUUAUUAUAGAGAAUUAUUCUGA  
\*\*\*\*\*

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800  
Esp CUCUUGCUUGAAGGCAACUGUUGUUAUUGAAGGCAACCCACCAGUUGGCUUCUCCAAUGUCCACUCGACCAUGUUAACAUUAUUCUUAACA  
Led CUCUUGCUUGAAGGCAACUGUUGUUAUUGAAGGCAACCCACCAGUUGGCUUCUCCAAUGUCCACUCGACCAUGUUAACAUUAUUCUUAACA  
Rom CUCUUGCUUGAAGGCAACUGUUGUUAUUGAAGGCAACCCACCAGUUGGCUUCUCCAAUGUCCACUCGACCAUGUUAACAUUAUUCUUAACA  
\*\*\*\*\*

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900  
Esp AGAGGCAAAAUAUUAACUUCCAAGGAGGUCCUUGAAAGCAUUCUUCUCCUGGUCUUAUGACAGACUUAUCCGGCAAGGAUACCCUGGAGGCUUAUUGU  
Led AGAGGCAAAAUAUUAACUUCCAAGGAGGUCCUUGAAAGCAUUCUUCUCCUGGUCUUAUGACAGACUUAUCCGGCAAGGAUACCCUGGAGGCUUAUUGU  
Rom AGAGGCAAAAUAUUAACUUCCAAGGAGGUCCUUGAAAGCAUUCUUCUCCUGGUCUUAUGACAGACUUAUCCGGCAAGGAUACCCUGGAGGCUUAUUGU  
\*\*\*\*\*

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000  
Esp UGGAAGAGUGGAGUCUCGUGGCGAGCCAAAUGAAGUUGUUGGCAUACUGCUGUAGCAAAAUGCAAUUUGAAUCAUGACUCUGAAUUCUGUGACUUGU  
Led UAGAGGAGUGGAGUCUCGUGGCGAGCCAAAUGAAGUUGUUGGCAUACUGCUGUAGCAAAAUGCAAUUUGAAUCAUGACUCUGAAUUCUGUGACUUGU  
Rom UAGAGAGUGGAGUCUCGUGGCGAGCCAAAUAUUGUUGGCAUACUGCUGUAGCAAAAUGCAAUUUGAAUCAUGACUCUGAAUUCUGUGACUUGU  
\* \*\*

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100  
Esp GAGGCUUUUUGAUUACCAAAAUGCCAUAAAACCCUAAAUGAUGAAACAAAGAAACAAUUAUUGGAGGCGAGCAAAUACUAGCCUUGAUUAUCU  
Led GAGGCUUUUUGAUUACCAAAAUGCCAUAAAACCCUAAAUGAUGAAACAAAGAAACAAUUAUUGGAGGCGAGCAAAUACUAGCCUUGAUUAUCU  
Rom GAGGCUUUUUGAUUACCAAAAUGCCAUAAAACCCUAAAUGAUGAAACAAAGAAACAAUUAUUGGAGGCGAGCAAAUACUAGCCUUGAUUAUCU  
\*\*\*

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200  
Esp GACAAUUUAUUGAUGAAAAACAAAUAAGGGAACUGAUGAGUCCUUCUGCAAAUUAACAAAAUUUGGUAUGUCAACCCACACUUCAGGACAAC  
Led GACAAUUUAUUGAUGAAAAACAAAUAAGGGAACUGAUGAGUCCUUCUGCAAAUUAACAAAAUUUGGUAUGUCAACCCACACUUCAGGACAAC  
Rom GACAAUUUAUUGAUGAAAAACAAAUAAGGGAACUGAUGAGUCCUUCUGCAAAUUAACAAAAUUUGGUAUGUCAACCCACACUUCAGGACAAC  
\*\*\*\*\*

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300  
Esp ACUCAUUACCAAGGUGCUGGUUAUUAUAAAACACAGCUUAUUUAACAUCUCUGACUUCGUAUUGACUGGAUUAUUGGAGAGUACUUCUUAUUCUGA  
Led ACUCAUUACCAAGGUGCUGGUUAUUAUAAAACACAGCUUAUUUAACAUCUCUGACUUCGUAUUGACUGGAUUAUUGGAGAGUACUUCUUAUUCUGA  
Rom ACUCAUUACCAAGGUGCUGGUUAUUAUAAAACACAGCUUAUUUAACAUCUCUGACUUCGUAUUGACUGGAUUAUUGGAGAGUACUUCUUAUUCUGA  
\*\*\*\*\*

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400  
Esp AAUGCUAAGCAAGAGUAUUCGGACAGCAGGGUAUAAACUCCUUGACUUAUUGAUGACUUGUUUUGGAGCACAGUAUUUUUACAGCGUCACUUC  
Led AAUGCUAAGCAAGAGUAUUCGGACAGCAGGGUAUAAACUCCUUGACUUAUUGAUGACUUGUUUUGGAGCACAGUAUUUUUACAGCGUCACUUC  
Rom AAUGCUAAGCAAGAGUAUUCGGACAGCAGGGUAUAAACUCCUUGACUUAUUGAUGACUUGUUUUGGAGCACAGUAUUUUUACAGCGUCACUUC  
\*\*\*\*\*



```

                2810      2820      2830      2840      2850      2860      2870      2880      2890      2900
Esp  AAUGCAGGAACAGAGCCAAUUGAUUGUUUAGCUUUGAAGGGUCUUUAAUCAUCCAUACCCUACCCACACCACCUUCCUCAUCCCUUGCUGUUGAAUUC
Led  AAUGCAGGAACAGAACCAAACUGAUUGUUUAGUUUUGAAGGAUCUUUAAUCAUCCAUACCCUACCCACACCACCUUCCCUUCCCUUGCUGUUGAAUUC
Rom  AAUGCAGGAACAGAGCCAAACUGAUUGUUUAGCUUUGAAGGGUCUUUAAUCAUCCAUACCCUACCCACACCACCUUCCCUUCCCUUGCUGUUGAAUUC
*****
                2910      2920      2930      2940      2950      2960      2970      2980      2990      3000
Esp  CCAGUGUUCUCAAUUAUCUCUGAUCUUUUAGCAAGUUGUGACUGGGACAAAUUACCCAUGUAAACCCCUUGAGAGCCUGUCUCUCUCUCUUAUCUUGUU
Led  CCAGUGUUCUCAAUUAUCUCUGAUCUUUUAGCAAGUUGUGACUGGGACAAAUUACCCAUGUAAACCCCUUGAGAGCCUGUCUCUCUCUCUUAUCUUGUU
Rom  CCAGUGUUCUCAAUUAUCUCUGAUCUUUUAGCAAGUUGUGACUGGGACAAAUUACCCAUGUAAACCCCUUGAGAGCCUGUCUCUCUCUCUUAUCUUGUU
*****
                3010      3020      3030      3040      3050      3060      3070      3080      3090      3100
Esp  UUUUAAUUUCUCAAGGUCAGAGCCAACUCCAUCAGUUCUCCUCCCGAGUUCUCCACCUUGAAAACUGUGUUUCGUUGAACACUCCUCAUGGACAUA
Led  UUUUAAUUUCUCAAGGUCAGAGCCAACUCCAUCAGUUCUCCUCCCGAGUUCUCCACCUUGAAAACUGUGUUUCGUUGAACACUCCUCAUGGACAUA
Rom  UUUUAAUUUCUCAAGGUCAGAGCCAACUCCAUCAGUUCUCCUCCCGAGUUCUCCACCUUGAAAACUGUGUUUCGUUGAACACUCCUCAUGGACAUA
*****
                3110      3120      3130      3140      3150      3160      3170      3180      3190      3200
Esp  AGUCUGUCAACCUCUUUGUUCAGAUCCCUCAACUUAUUGAGGUCUUCUCCUCCCUUUUGGUCUUUCUGAGUGCCCGUCACCUGGCCACUUGGUUGA
Led  AGUCUGUCAACCUCUUUAUUCAGGUCUCCUACUUAUUGAGGUCUUCUCCUCCCUUUUGGUCUUUCUGAGUGCCCGUCACCUGGCCACUUGGUUGA
Rom  AGUCUGUCAACCUCUUUAUUCAGGUCUCCUACUUAUUGAGGUCUUCUCCUCCCUUUUGGUCUUUCUGAGUGCCCGUCACCUGGCCACUUGGUUGA
*****
                3210      3220      3230      3240      3250      3260      3270      3280      3290      3300
Esp  AGUCAUUGCUGUCAGCAAUUGCUUUGGCGUCCUUAACAAUCUGACUUGACAGUCUGAGUGAAUUGACUCAAACCUCCUUAAGGACUGAGUCCAUCU
Led  AGUCAUUGCUGUCAGCAAUUGCUUUGGCGUCCUUAACAAUCUGACUUGACAGUCUGAGUGAAUUGACUCAAACCUCCUUAAGGACUGAGUCCAUCU
Rom  AGUCAUUGCUGUCAGCAAUUGCUUUGGCGUCCUUAACAAUCUGACUUGACAGUCUGAGUGAAUUGACUCAAACCUCCUUAAGGACUGAGUCCAUCU
*****
                3310      3320      3330      3340      3350      3360      3370      3380      3390      3400
Esp  AAAGCUUGGAACCUCCUUGGAGUGGCAUGCCAGAAGUUCUGUGAUUUUGAUCUAGGGUAGAGUUGCUCAGUGAAAGUGUUAGACACUAUGCCUAGGA
Led  AAAGCUUGGAACCUCCUUGGAGUGGCAUGCCAGAAGUUCUGGUGAUUUUGAUCUAGGGUAGAGUUGCUCAGUGAAAGUGUUAGACACUAUGCCUAGGA
Rom  AAAGCUUGGGACCUCCUUGGAGUGGCAUGCCAGAAGUUCUGGUGAUUUUGAUCUAGGGUAGAGUUGCUCAGUGAAAGUGUUAGACACUAUGCCUAGGA
*****
                3410
Esp  UCCACUGUGCG
Led  UCCACUGUGCG
Rom  UCCACUGUGCG
*****

```

**Apéndice 1**

**Alineamiento múltiple de los RNA S de las cepas prototipo del virus Junín.**

El alineamiento fue realizado con el programa CLUSTALX. Los asteriscos representan identidad de nucleótidos entre las secuencias. Los codones de iniciación y terminación del gen GPC, así como los tripletes complementarios a los codones de iniciación y terminación del gen N están sombreados en amarillo. Las regiones autocomplementarias correspondientes a los *hairpins* están sombreadas: en verde el primero; en rojo el segundo y en azul el tercero. Esp, cepa Espíndola; Led cepa Ledesma; Rom, cepa Romero del virus Junín.

|      |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|      | 1           |             |             |             |             |             |             |             | 90          | 100         |
| Esp  | -UGCAGUAAG  | GGGAUCCUAG  | GCGAUUUUUG  | UAACGCUAUA  | A-UUGUGACU  | GUUUACUGUU  | UGGACAACAU  | C-AAAACAUC  | UAUUGCACAA  | UGGGGCAAUU  |
| Led  | .....U..... | .....C..... | .....A..... | .....U..... | .....A..... | .....U..... | .....C..... | .....G..... | .....A..... | .....G..... |
| Rom  | .....C..... | .....U..... | .....A..... | .....U..... | .....U..... | .....C..... | .....G..... | .....C..... | .....C..... | .....G..... |
| Par  | .....U..... | .....U..... | .....A..... | .....U..... | .....U..... | .....C..... | .....A..... | .....C..... | .....C..... | .....G..... |
| XJ44 | .....U..... | .....U..... | .....U..... | .....U..... | .....U..... | .....U..... | .....A..... | .....C..... | .....C..... | .....G..... |
| Can  | .....C..... | .....G..... | .....G..... | .....U..... | .....C..... | .....U..... | .....A..... | .....C..... | .....U..... | .....G..... |
|      | 101         |             |             |             |             |             |             |             |             | 200         |
| Esp  | CAUUAGCUUC  | AUGCAAGAAA  | UACCAACUUU  | UUUGCAGGAG  | GCUCUGAACA  | UUGCUCUUGU  | AGCAGUCAGU  | CUCAUUGCCA  | UCAUUAAGGG  | GAUAGUGAAC  |
| Led  | .....U..... | .....C..... | .....C..... | .....U..... | .....U..... | .....U..... | .....U..... | .....U..... | .....A..... | .....G..... |
| Rom  | .....C..... | .....U..... | .....C..... | .....A..... | .....U..... | .....U..... | .....U..... | .....U..... | .....A..... | .....U..... |
| Par  | .....C..... | .....U..... | .....C..... | .....A..... | .....U..... | .....U..... | .....U..... | .....U..... | .....A..... | .....U..... |
| XJ44 | .....C..... | .....U..... | .....C..... | .....A..... | .....U..... | .....U..... | .....U..... | .....U..... | .....A..... | .....U..... |
| Can  | .....C..... | .....U..... | .....C..... | .....A..... | .....U..... | .....U..... | .....U..... | .....U..... | .....A..... | .....U..... |
|      | 201         |             |             |             |             |             |             |             |             | 300         |
| Esp  | UUGUACAAAA  | GUGGUUUUUU  | CCAAUUCUUU  | GUUUUCCUAG  | CGCUUGCAGG  | AAGAUCCUGC  | ACAGAAGAAG  | CUUUCAAAAU  | CGGACUGCAU  | ACUGAGUUC   |
| Led  | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....U..... | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....C..... |
| Rom  | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....U..... | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....C..... |
| Par  | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....U..... | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....C..... |
| XJ44 | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....U..... | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....C..... |
| Can  | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....U..... | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....G..... | .....C..... |
|      | 301         |             |             |             |             |             |             |             |             | 400         |
| Esp  | AGACUGUGUC  | CUUCUCAAUG  | GUGGGUCUCU  | UUUCCAACAA  | UCCACAUGAC  | CUACCUUUGU  | UGUGUACCUU  | AAACAAGAGC  | CAUCUUUACA  | UUUAGGGGGG  |
| Led  | .....U..... |
| Rom  | .....U..... |
| Par  | .....U..... |
| XJ44 | .....U..... |
| Can  | .....U..... |
|      | 401         |             |             |             |             |             |             |             |             | 500         |
| Esp  | CAAUGCUUCA  | UUUAUGAUCA  | GCUUUGAUGA  | UAUUGCAGUG  | UUGUUACCAC  | AGUAUGAUGU  | UAUAAUACAA  | CAUCCGGCAG  | AUAUGAGCUG  | GUGUUUCUAAA |
| Led  | .....A..... |
| Rom  | .....A..... |
| Par  | .....A..... |
| XJ44 | .....A..... |
| Can  | .....A..... |
|      | 501         |             |             |             |             |             |             |             |             | 600         |
| Esp  | AGUGAUGAUC  | AAAUUUGGUU  | GUCUCAAUGG  | UUUAUGAAUG  | CUGUGGGACA  | UGAUUGGCAU  | CUAGACCCAC  | CAUUUCUGUG  | UAGGAACCGU  | ACAAGACAG   |
| Led  | .....U..... |
| Rom  | .....U..... |
| Par  | .....U..... |
| XJ44 | .....U..... |
| Can  | .....U..... |
|      | 601         |             |             |             |             |             |             |             |             | 700         |
| Esp  | AAGGCUUCAU  | CUUUCAGUC   | AACACCUCCA  | AGACUGGUGU  | UAAUGAAAAC  | UAUGCUAAGA  | AGUUUAAGAC  | UGGCAUGCAU  | CAUUUUUAUA  | GAGAAUUAUC  |
| Led  | .....U..... |
| Rom  | .....U..... |
| Par  | .....U..... |
| XJ44 | .....U..... |
| Can  | .....U..... |
|      | 701         |             |             |             |             |             |             |             |             | 800         |
| Esp  | UGACUCUUGC  | UUUGAUGGCA  | AACUGUGUUU  | AAUGAAGGCA  | CAACCCACCA  | GUUGGCCUCU  | CCAAUGUCCA  | CUCGACCAUG  | UUAACACAUI  | ACAUUUCCUU  |
| Led  | .....C..... |
| Rom  | .....C..... |
| Par  | .....C..... |
| XJ44 | .....C..... |
| Can  | .....C..... |
|      | 801         |             |             |             |             |             |             |             |             | 900         |
| Esp  | ACAAGAGGCA  | AAAAUAUUCA  | ACUCCAAGG   | AGGUCCUUGA  | AAGCAUUCUU  | CUCCUGGUCU  | UUGACAGACU  | CAUCCGGCAA  | GGGUACCCCU  | GGAGGCUAAU  |
| Led  | .....C..... |
| Rom  | .....C..... |
| Par  | .....C..... |
| XJ44 | .....C..... |
| Can  | .....C..... |
|      | 901         |             |             |             |             |             |             |             |             | 1000        |
| Esp  | GUGUGGAAGA  | GUGGAUGCUC  | GUGGCAGCCA  | AAAUGAAGUG  | UUUUGGCAAU  | ACUGCUGUAG  | CAAAAUGCAA  | UUUGAAUCAU  | GACUCUGAAU  | UCUGUGACAU  |
| Led  | .....C..... |
| Rom  | .....C..... |
| Par  | .....C..... |
| XJ44 | .....C..... |
| Can  | .....C..... |
|      | 1001        |             |             |             |             |             |             |             |             | 1100        |
| Esp  | GUUGAGGCUU  | UUUGAUUACC  | ACCAAAAUGC  | CAUCAAAAACC | CUAAAUGAUG  | AAACAAGAA   | ACAAGUAAAU  | CUGAUGGGGC  | AGACAUCAU   | UGCCUUGAAU  |
| Led  | .....A..... |
| Rom  | .....A..... |
| Par  | .....A..... |
| XJ44 | .....A..... |
| Can  | .....A..... |

1101 1200  
 Esp UCUGACAAUU UAUUGAUGAA AAACAAAUU AGGGAACUGA UGAGUGUCCC CUACUGCAAU UACACAAAU UUUGGUAUGU CAACCACACA CUUUCAGGAC  
 Led .....C.....CC.....  
 Rom .....U.U.....  
 Par .....U.....  
 XJ44 .....U.....  
 Can .....U.....

1201 1300  
 Esp AACACUCAUU ACCAAGGUGC UGGUUAUUAA AAAACAACAG CUAUUUGAAC AUCUCUGACU UCCGUAAUGA CUGGAUUAUG GAGAGUGACU UCUUAAUUUC  
 Led .....C.....A.....  
 Rom .....U.....G.....  
 Par .....A.A.....  
 XJ44 .....U.....C.A.A.....  
 Can .....A.A.....

1301 1400  
 Esp UGAAAUGCUA AGCAAAGAGU AUUCGGACAG ACAGGGUAAA ACUCCUUUGA CUUUAGUUGA CAUCUGUUUU UGGAGCACAG UAUUUUUCAC AGCGUCACUC  
 Led .....G.....C.....A.....  
 Rom .....C.....C.....  
 Par .....G.....C.....  
 XJ44 .....G.C.....C.....  
 Can .....G.....A.....C.....

1401 1500  
 Esp UUCUUCUAUU UGGUGGGCAU ACCUACCCAC AGACACAUCA GGGGCGAAGC AUGCCCUUUG CCACACAGGU UGAACAGCUU GGGUGGUUGC AGAUGUGGUA  
 Led .....C.A.A.....C.....A.....  
 Rom .....C.A.....U.....  
 Par .....C.....U.....  
 XJ44 .....C.....U.G.....A.G.....C.C.C.A.U.....  
 Can .....C.....U.....CU.....

1501 1545 1600  
 Esp AGUACCCCAA UCUAAGAAA CCAACAGUUU GGCGUAGAAG ACACUAAGAC CUCCUGAGGG UCCCCACCAG CCCGGGCACU GCCCGGGCUG GUGUGGCCCC  
 Led .....U.....C.G.....C.A.....U.....  
 Rom .....G.....C.....  
 Par .....G.....  
 XJ44 .....G.....  
 Can .....G.....

1601 1639 1700  
 Esp CCAGUCCGCG GCCUAGCCGC GGACUGGGGA GGCACUGCUU ACAGUGCAUA GGCUGCCUUC GGGAGGAACA GCAAGCUUGA UGGCAAUAGA GGUGUAAGUU  
 Led .....G.....G.....  
 Rom .....G.....C.G.....U.....G.....  
 Par .....G.....C.G.....U.....  
 XJ44 .....G.....C.G.....U.....  
 Can .....G.....C.G.....U.....

1701 1800  
 Esp CCUCCUCAUA GAGUUUCCCA UCCAACACUG ACUGAAACAU UAUGCAGUCU AGCAGAGCAC AGUGUGGUUC ACUAGAGGCC AACUUGAAGG GAGUGUCCUU  
 Led .....C.....U.....G.....  
 Rom .....C.....U.....C.....  
 Par .....U.U.....C.....G.....A.....A.U.....  
 XJ44 .....U.U.....C.....C.....G.....A.....CA.....  
 Can .....U.U.....C.....C.....G.....A.....CA.....

1801 1900  
 Esp AUCUCUCUUU UUCUUAUUGA CAACCACUCC AUUGUGAUUU UUGCAUAGGU GACCAUAUUU CUCCCAGACC UGUUGAUCAA ACUGCCUGGC UUGUUCAGAU  
 Led .....C.....G.....U.....  
 Rom .....C.....C.....  
 Par .....GC.....G.A.....G.....U.....  
 XJ44 .....GC.....G.A.....G.....U.....  
 Can .....GC.....G.A.....G.....U.....

1901 2000  
 Esp GUAAGCCUAA CAUCAACCAG UUUUAGAUCU CUUCUUCUUA GGAGGUCAAA CAGCUUCCUG AUGUCAUCGG AUCCUGAGU AGUCACAACC AUGUCUGGAG  
 Led .....G.....U.....  
 Rom .....C.....U.....  
 Par .....C.....A.....C.U.....G.....C.....  
 XJ44 .....C.....A.....C.U.....G.....C.....  
 Can .....C.....A.....C.U.....G.....C.....

2001 2100  
 Esp GCAGUAAGCC GAUCACAUAU CUAAGAACUC CUGGCAUUGC AUCUUCUAUG UCCUUCAUUA AGAUGCCGUG AGAGUGUCUG CUACCAUUUU UAAACCCUUU  
 Led .....G.....G.....  
 Rom .....G.....U.....  
 Par .....C.A.....G.....  
 XJ44 .....C.A.....G.....  
 Can .....C.A.....G.....

2101 2200  
 Esp CUCAUCAUGU GGUUUUCUGA AGCAGUGAAU GUACUGCUUA CCUGCAGGUU GGAACAAUGC CAUCUCAACA GGGUCAGUGG CUGGUCCUUC AAUGUCAAGC  
 Led .....U.G.....  
 Rom .....C.....G.....  
 Par .....A.....C.....C.....A.....  
 XJ44 .....A.....C.....C.....A.....  
 Can .....A.....C.....C.....A.....

|      |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 2201 |          |          |          |          |          |          |           |          |           | 2300     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Esp  | CAAAGGGU | UGGUGGGG | GAGUUUCC | ACUGCCUC | UGAUGACG | UUCUUGUA | UCUGUCAAG | UAGCCAAU | CAAAUUCG  | CCGUUUUU |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Led  |          |          |          |          |          |          |           | U        |           | C        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Rom  |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Par  |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| XJ44 |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Can  |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2301 |          |          |          |          |          |          |           |          |           | 2400     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Esp  | CCGGUUGU | AGGACCAG | ACUGGUUU | UUGUCAGA | AAUACUUG | UUGUCCAU | ACCUGCCU  | GAUUUGGA | CUAGAACC  | UAUAAGGC |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Led  |          |          |          |          | G        |          |           | C        | U         | G        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Rom  |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Par  |          | U        |          |          |          |          |           | A        | U         | G        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| XJ44 |          | U        |          |          |          |          |           | A        | U         | G        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Can  |          | U        |          |          |          |          |           | A        | U         | G        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2401 |          |          |          |          |          |          |           |          |           | 2500     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Esp  | ACCAUCGC | GAAAGACA | GUUUGUAC | AAGGUUUU | UAAGGAUU | UAUUGCCU | UUUCUCAU  | AUAAACAU | CUUCUCU   | UUUAACCU |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Led  |          |          |          |          |          |          |           |          |           | U        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Rom  |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Par  |          | G        |          | G        |          | G        |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| XJ44 |          | G        |          | G        |          | G        |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Can  |          | G        |          | G        |          | G        |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2501 |          |          |          |          |          |          |           |          |           | 2600     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Esp  | AUGGUUGA | UUAUGAGG | AGAGAAGU | UCUGGGUG | CUCUGAUU | UCCAACA  | UUUCCACC  | CAAGAAUA | UGCUCAGC  | UUUACUGC |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Led  |          |          |          |          |          | C        | A         |          | G         | A        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Rom  |          | C        |          | A        | A        |          | A         |          | G         | A        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Par  |          |          |          | A        | A        |          | A         |          | C         | A        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| XJ44 |          |          |          | A        | A        |          | A         |          | C         | A        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Can  |          |          |          | A        | A        |          | A         |          | C         | A        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2601 |          |          |          |          |          |          |           |          |           | 2700     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Esp  | CUGAGAG  | GAAGUUGA | CCAGAAUG | UGAUGGAG | UUAUCCUU | GUCACAAU | GAAGGCAG  | AUGUCCUG | GUCAGUCU  | CAAGGUCU |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Led  | A        | A        | G        |          |          |          | G         |          | A         |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Rom  |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Par  | A        | A        | G        |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| XJ44 | A        | A        | G        |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Can  | A        | A        | G        |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2701 |          |          |          |          |          |          |           |          |           | 2800     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Esp  | UAAGUUUG | UACUUCAC | UGUAUAGA | CCCAAGAG | GUUAAAGC | GUUAGACA | GUUUAUUG  | UCACCUCC | GAACAGUC  | GCAUGCAA |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Led  | C        |          |          |          |          | C        | C         |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Rom  |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Par  | C        |          |          |          |          | C        | C         |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| XJ44 | C        |          |          |          |          | C        | C         |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Can  | C        |          |          |          |          | C        | C         |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2801 |          |          |          |          |          |          |           |          |           | 2900     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Esp  | GUCAAUGC | GAACAGAG | AAAUGAUU | UUUAGCUU | AAGGUCUU | AACAUCCU | ACCCUCAC  | CACCACU  | UCCAUCCU  | UGCUGU   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Led  |          | A        | C        | A        | U        | A        |           |          | U         | G        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Rom  |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Par  |          | A        | C        | A        | U        | A        |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| XJ44 |          | A        | C        | A        | U        | A        |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Can  |          | A        | C        | A        | U        | A        |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2901 |          |          |          |          |          |          |           |          |           | 3000     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Esp  | AUCCAGUG | UCUCAUAU | UCUGAUUU | UAGCAAGU | UGACUGGC | AAAUACCA | UGUAAACCC | UUGAGAGC | GUCUCUGC  | UUCUUAUC |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Led  |          |          |          |          |          | G        |           | C        |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Rom  |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Par  |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| XJ44 |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Can  |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 3001 |          |          |          |          |          |          |           |          |           | 3100     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Esp  | GUUUUUAA | UUCUCAAG | CAGACGCC | CUCCAUCU | UCAUCCUC | CCAGAUCC | CACCUGAA  | ACUGUUUU | GUUGAACU  | CCUCAUGG |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Led  |          |          | U        |          |          |          | U         |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Rom  |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Par  |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| XJ44 |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Can  | G        |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 3101 |          |          |          |          |          |          |           |          |           | 3200     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Esp  | AUAAGUCU | CAACCUCU | GUUCAGAU | CUCAACUU | UGAGGUCU | UCCCCCU  | UUGGUCUU  | UGAGUGCC | CUGCACCU  | GCCACUUG |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Led  |          |          | A        | G        |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Rom  |          |          | A        | G        |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Par  | G        |          | A        | G        |          |          | U         |          | C         |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| XJ44 | G        |          | A        | G        |          |          | U         |          | C         |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Can  | G        |          | A        | G        |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 3201 |          |          |          |          |          |          |           |          |           | 3300     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Esp  | UGAAGUCA | GCUGUCAG | AUUAGCUU | CGUCCUUA | AACAUCUG | UUGACAGU | GAGUGAAU  | ACUCAAAC | CUCCUUAAG | ACUGAGUC |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Led  |          |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Rom  |          |          | C        |          | G        |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Par  | G        |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| XJ44 | G        |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Can  | G        |          |          |          |          |          |           |          |           |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

```

3301                               3331                               3400
Esp  UCUAAAGCUU  GGAACCUCCU  UGGAGUGUGC  CAUGCCAGAA  GUUCUAGUGA  UUUUGAUCUA  GGGUAGAGUU  GCUCAGUGAA  AGUGUUAGAC  ACUAUGCCUA
Led  .....
Rom  .....G.....
Par  .....
XJ44 .....U.....
Can  .....U.....

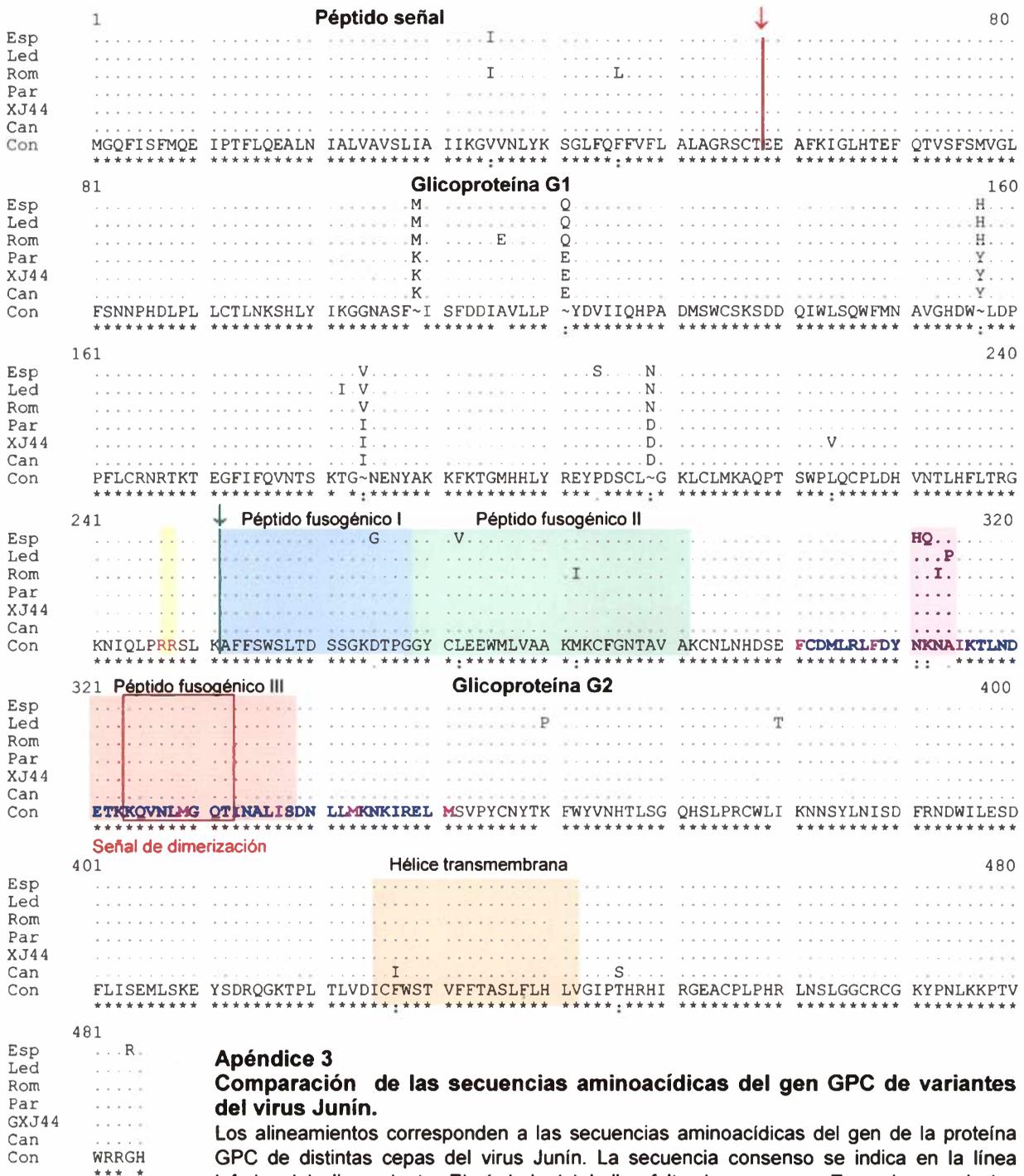
3401                               3414
Esp  GGAUCCACUG  UGCG
Led  .....
Rom  .....
Par  .....
XJ44 .....
Can  .....

```

## Apéndice 2

### Alineamiento múltiple de los RNA S de las diferentes cepas del virus Junín.

El alineamiento fue realizado con el programa Clustal V. Los puntos representan identidad de secuencia con respecto a la secuencia de la cepa Espíndola tomada como referencia. Los codones de iniciación y terminación del gen GPC así como los tripletes complementarios a los codones de iniciación y terminación del gen N están sombreados en amarillo. Las regiones autocomplementarias correspondientes a los *hairpins* están sombreadas e indicadas con flechas: en verde el primero; en rojo el segundo y en azul el tercero. En color salmón está indicada la región de 217 pb utilizada para el SSCP. Esp, cepa Espíndola; Led cepa Ledesma; Rom, cepa Romero; Par, cepa Parodi; XJ44, cepa XJ44; Can, cepa Candid #1 del virus Junín.



**Apéndice 3  
 Comparación de las secuencias aminoacídicas del gen GPC de variantes del virus Junín.**

Los alineamientos corresponden a las secuencias aminoacídicas del gen de la proteína GPC de distintas cepas del virus Junín. La secuencia consenso se indica en la línea inferior del alineamiento. El símbolo (~) indica falta de consenso. En cada una de las secuencias alineadas sólo se muestran los residuos de aminoácidos que difieren de la secuencia consenso.

Por debajo de la secuencia consenso, los asteriscos (\*) representan identidad de aminoácidos, los dos puntos (:) posiciones fuertemente conservadas, los puntos (.) posiciones débilmente conservadas y los espacios en blanco ( ) posiciones no conservadas de acuerdo a la matriz de sustitución Gonnet Pam250.

La flecha y la línea roja indica el sitio de clivaje del péptido señal. El sombreado en amarillo indica las dos argininas adyacentes próximas al posible sitio de clivaje proteolítico, indicado con la flecha y la línea verde. En lila se resaltan los sitios altamente variables del fragmento de 217 pb analizado en el capítulo 6.

Sombreado en colores celeste, verde y rosa se indican los potenciales péptidos fusogénicos I, II y III. El recuadro color rojo, señala la posible señal de dimerización. La secuencia resaltada en color azul corresponde a la hélice de la proteína G2 que participa del *coiled-coil*, con los aminoácidos hidrofóbicos repetidos cada siete residuos (*heptad repeats*) resaltados en color fucsia. En color naranja pálido está señalada la secuencia de la hélice transmembrana.

Esp, cepa Espíndola; Led cepa Ledesma; Rom, cepa Romero; Par, cepa XJ-Parodi; XJ44, cepa XJ44; Cd1, cepa Candid #1 del virus Junín.

|      |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|      | 1          |            |            |            |            |            |            | 80         |
| Esp  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Led  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Rom  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Par  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| XJ44 | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Can  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Con  | MAHSKEVPSF | RWTQSLRRGL | SQFTQTVKSD | VLKDAKLIAD | SIDFNQVAQV | QRALRKTRKG | EEDLNKLRDL | NKEVDRLMSM |
|      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      |
|      | 81         |            |            |            |            |            |            | 160        |
| Esp  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Led  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Rom  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Par  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| XJ44 | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Can  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Con  | RSVQRNTVFK | VGDLGRDELM | ELASDLEKLK | NKIRRAETGS | QGVYMGNSLQ | SQLAKRSEIL | RTLGFQQQGT | GGNGVVRVWD |
|      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      |
|      | 161        |            |            |            |            |            |            | 240        |
| Esp  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Led  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Rom  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Par  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| XJ44 | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Can  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Con  | VKDPSKLNQ  | FGSVPALTIA | CMTVQGGETM | NSVIQALTSL | GLLYTVKYPN | LSDLDRLTQE | HDCLQIVTKD | ESSINISGYN |
|      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      |
|      | 241        |            |            |            |            |            |            | 320        |
| Esp  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Led  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Rom  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Par  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| XJ44 | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Can  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Con  | FLSAAVKAG  | ASILDGGNML | ETIRVTPDNF | SSLIKSTIQV | KRREGMFIDE | KPGNRNPYEN | LLYKLCLSGD | GWPYIGRSQ  |
|      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      |
|      | 321        |            |            |            |            |            |            | 400        |
| Esp  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Led  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Rom  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Par  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| XJ44 | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Can  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Con  | I~GRSWDNTS | IDLTRKPVAG | PROPEKNGQN | LRLANLTEIQ | EAVIREAVGK | LDPTNTLWLD | IEGPATDPVE | MALFQPAGKQ |
|      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      |
|      | 401        |            |            |            |            |            |            | 480        |
| Esp  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Led  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Rom  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Par  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| XJ44 | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Can  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Con  | YIHCFRKPHD | EKGFKNGSRH | SHGILMKDIE | DAMPGVLSYV | IGLLPPDMVV | TTQGSDDIRK | LFDLHGRRDL | KLVDVRLTSE |
|      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      |
|      | 481        |            |            |            |            |            |            | 560        |
| Esp  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Led  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Rom  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Par  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| XJ44 | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Can  | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      | .....      |
| Con  | QARQFDQVW  | EK~GHLCK~H | NGVVV~KKKR | DKD~PFKLAS | SEPHCALLDC | IMFQSVLDGK | LYEEELTPLL | PPSLLFLPKA |
|      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      |
|      | 561        |            |            |            |            |            |            |            |

**Apéndice 4**

**Comparación de las secuencias aminoacídicas del gen N de distintas variantes del virus Junín.**

Los alineamientos corresponden a las secuencias aminoacídicas del gen de la proteína N de distintas cepas del virus Junín. Las comparaciones se hicieron utilizando el programa PRETTY del paquete de programas del GCG. La secuencia consenso se indica en la línea inferior del alineamiento. El símbolo (~) indica falta de consenso. Solamente están representados los cambios de aminoácidos que difieren de la secuencia consenso. Por debajo de la secuencia consenso, los asteriscos (\*) representan identidad de aminoácidos, los dos puntos (:) posiciones fuertemente conservadas, los puntos (.) posiciones débilmente conservadas y los espacios en blanco ( ) posiciones no conservadas de acuerdo a la matriz de sustitución Gonnet Pam250. Esp, cepa Espindola; Led cepa Ledesma; Rom, cepa Romero; Par, cepa XJ-Parodi; XJ44, cepa XJ44; Cd1, cepa Candid #1 del virus Junín.

| Denominación         | Secuencia                    | Posición |
|----------------------|------------------------------|----------|
| ARE (ArS1V - ArS19C) | 5' CGCACAGTGGATCCTAGGC 3'    | 1 y 3647 |
| ArS3V (G_AR1.V)      | 5' CATGACKMTGAATTYTGAGACA 3' | 1117     |
| ArS3C (G_AR3.C)      | 5' TCAAAGAGCKCAGCRTGTC 3'    | 1154     |
| ArS4C                | 5' ATAGCATTYTTGTTGWAATC 3'   | 1172     |
| ArS5V                | 5' AAYTACACMAARTTTTGGTA 3'   | 1297     |
| ArS6V                | 5' RAGAGRCAGGGGARAACICC 3'   | 1465     |
| ArS6C (G_AR2.C)      | 5' AATGGAGTGYTRCCCTGCCT 3'   | 1487     |
| ArS7V                | 5' ATACCAACTCAYAGRCACAT 3'   | 1558     |
| ArS7C                | 5' ATGTGYCTRTGAGTTGG 3'      | 1577     |
| ArS8V                | 5' ATRCAGTCWAKCAGTGCACA 3'   | 1918     |
| ArS8C1               | 5' CTGMTGGACTGCATMATGTT 3'   | 1931     |
| ArS8C2               | 5' GTTGMCCCTCACTGTGCWYT 3'   | 1949     |
| ArS9V                | 5' CTGATGTCATCWGAMCCTTG 3'   | 2134     |
| ArS10C               | 5' GCTSCCTCMGRARATGGT 3'     | 2181     |
| ArS13V               | 5' TCMACWATHGTGTTTTCCCA 3'   | 2546     |
| ArS14C               | 5' AKAGRAAYCCTTATGAAAA 3'    | 2650     |
| ArS16V               | 5' GGCATWGANCCAACTGATT 3'    | 3007     |
| ArS16C               | 5' CAAYTKAACAATCARTTTGG 3'   | 3035     |
| ArS17V               | 5' TCCCAKAYCCTYACCACACC 3'   | 3051     |
| ArS17C               | 5' GGTGTTGTRAGRGTGTTGGGA 3'  | 3071     |

### Apéndice 5

#### Primers conservados para el RNA S de Arenavirus

El número indica la ubicación del extremo 5' del primer, en el alineamiento múltiple de secuencias del RNA S de diferentes arenavirus. El primer ARE es totalmente complementario con el extremo 3' de la secuencia genómica del RNA S y parcialmente complementario al extremo 3' de la forma antígenómica del RNA S. Los siguientes símbolos fueron usados para mezcla de bases: Y=C/T, R=A/G, S=C/G, M=A/C, W=A/T, K=G/T, H=A/C/T, N=A/C/G/T



Biblioteca Central  
Fac. Cs. Exactas  
U.N.L.P.

DONACION.....  
 Fecha 07-04-05.....  
 Inv. B..... Inv..... B. 57391



