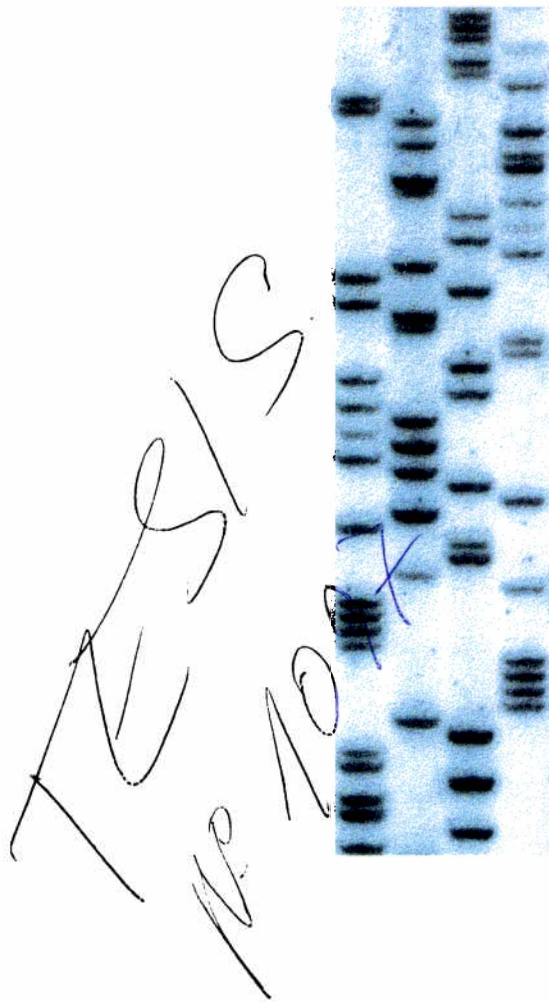


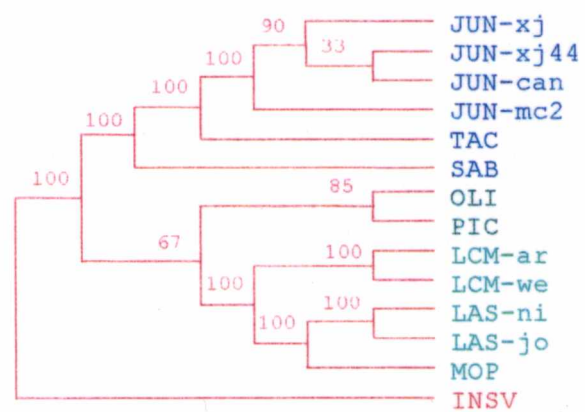


Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas

Caracterización molecular de variantes del virus Junín con diferentes grados de virulencia



	1	35
JUN-mc2	MGQFISFMQEIP	PTFLQEALNIALVAVSLIAI
JUN-xj	MGQFISFMQEIP	PTFLQEALNIALVAVSLIAI
JUN-xj44	MGQFISFMQEIP	PTFLQEALNIALVAVSLIAI
JUN-can	MGQFISFMQEIP	PTFLQEALNIALVAVSLIAI
TAC	MGQFISFMQEIP	IFLQEALNIALVAVSLICIVKGL
SAB	MGQLFSFFEEVPNI	IHEAINIALIAVSLIAALKGM
OLI	MGQVIGFFQSLPNI	INEALNIALICVALIAILKGI
PIC	MGQIVTLIQSIP	EVLPQEVFNVALIIVSVLCIVKGF
MOP	MGQIVTFFQEVPHI	LEEVMNIVLMTLSILAILKGI
LAS-jo	MGQIVTFFQEVPHVI	EEVMNIVLIALSVLAVLKGL
LAS-ni	MGQIVTFFQEVPHVI	EEVMNIVLIALSILAILKGL
LCM-ar	MGQIVTMFEALPHI	IDEVINIVIIIVLIVITGIKAV
LCM-we	MGQIVTMFEALPHI	IDEVINIVIIIVLIIITSIKAV



César G. Albariño
Tesis Doctoral
La Plata, 1997

Este trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM), de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Víctor Romanowski.

A mi familia

Agradecimientos

En primer lugar le agradezco a mis padres y a mi tía por su eterna paciencia. Su apoyo incondicional me permite seguir adelante.

Asimismo, le agradezco a Evelina por su ternura y comprensión; y a mis amigos de toda la vida, Fernando, Walter y Alejandro por los momentos inolvidables que he compartido con ellos.

En cuanto a mi decisión vocacional, le agradezco especialmente al Dr. Oscar Grau por haber captado mi atención hacia el fascinante área de la biología molecular. Del mismo modo, le agradezco a Oscar por abrirme las puertas del laboratorio de Química Biológica en 1989.

Con respecto al área profesional, le agradezco enormemente al Dr. Víctor Romanowski por la formación científica y académica que obtuve trabajando bajo su dirección. Además, le agradezco a Víctor por haber logrado que las labores diarias resulten agradables debido, en gran parte, a sus refinadas cualidades personales. En este sentido, cabe destacar su brillante inteligencia, su modestia y su calidez humana. Actualmente, considero un honor haber trabajado a su lado durante todos estos años.

Del mismo modo, agradezco la colaboración excepcional que recibí de mis compañeros de laboratorio Daniel, Diego, Mario y Rolando. La interacción profesional y personal con todos ellos tuvo una gran influencia en mi formación científica y en el desarrollo de esta investigación. Además, creo que hemos llegado a formar un excelente equipo de trabajo.

Por supuesto, no me puedo olvidar de Catalina, Carlitos y Ruben, que siempre me han ayudado en todo lo que pudieron. Actualmente, puedo asegurar que el funcionamiento de todos los laboratorios del IBBM está relacionado con el trabajo cotidiano de Carlitos. También, le agradezco a Martín y a Silvia por el tiempo que me brindaron en mis comienzos; y a mis nuevos compañeros de laboratorio, las dos Alejandras y Alejo, por su colaboración y buena predisposición.

Finalmente, le agradezco a mis alumnos de la Universidad Nacional de Quilmes por haberme ayudado a perfeccionar mis aptitudes docentes.

INDICE

	Página
Indice	i
Objetivos	iii
Presentación	iv
Abreviaturas	vi
Capítulo 1: Introducción	1
Capítulo 2: Materiales y Métodos	
Primera sección	15
Segunda sección	37
Tercera sección	39
Cuarta sección	43
Capítulo 3: Estudio sobre la Atenuación de la Virulencia en el Virus Junín	
Introducción	46
Resultados	48
Discusión	63
Capítulo 4: Análisis Filogenético en la Familia de los Arenavirus	
Introducción	68
Resultados	69
Discusión	80

Capítulo 5:	
Caracterización Molecular de Nuevos Arenavirus	
Introducción	84
Resultados	85
Discusión	92
Capítulo 6:	
Estudio sobre la Regulación de la Transcripción	
Introducción	95
Resultados	96
Discusión	102
Capítulo 7:	
Conclusiones Generales	107
Capítulo 8:	
Referencias Bibliográficas	109

OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS

- El objetivo principal de este trabajo, consistió en el estudio de la información contenida en el genoma del virus Junín, en relación al fenómeno de atenuación de la virulencia.
- Como objetivo secundario, se estudió la filogenia en la familia de los arenavirus y se analizaron las relaciones evolutivas entre los mismos.
- Además, se diseñó un método para la detección de nuevos arenavirus a nivel molecular, en base al análisis de secuencias mencionado arriba.
- Finalmente, se estudió el papel de la proteína de la nucleocápside en la regulación de los procesos de transcripción y replicación en el virus Junín.

PRESENTACIÓN DE LA INFORMACIÓN

Con el fin de organizar el contenido y favorecer la presentación de este estudio resultó conveniente la división en capítulos, a saber: introducción, materiales y métodos, análisis y discusión de los resultados, conclusiones generales y referencias bibliográficas. A continuación, se resume brevemente el contenido de cada capítulo.

1. En el primer capítulo, se realiza una descripción introductoria sobre la estructura del virus Junín y su relación con la fiebre hemorrágica. En particular, se analiza la información disponible y los antecedentes bibliográficos que forman el contexto para el desarrollo de este estudio.
2. En el segundo capítulo se describen los materiales y los métodos utilizados en el transcurso de este estudio.
3. En el tercer capítulo se aborda específicamente, el problema de la atenuación de la virulencia en las cepas relacionadas genealógicamente con el virus vacunal, Junín Candid #1.
4. En el cuarto capítulo, se analiza la filogenia en la familia de los arenavirus y las posibles relaciones evolutivas entre los mismos.
5. En el quinto capítulo, se describe el diseño de un procedimiento experimental que permitió caracterizar un nuevo arenavirus. Este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. M.E. Lozano y el Lic. D.M. Posik.
6. En el sexto capítulo, se analiza el control de la transcripción en el virus Junín. Este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. R.V. Rivera Pomar y el Dr. M.E. Lozano.
7. En el séptimo capítulo, se establecen las conclusiones generales del presente estudio.
8. En el último capítulo, se listan las referencias bibliográficas relacionadas con los capítulos anteriores.

Una parte de este trabajo de tesis fue propuesta para su publicación en revistas científicas. Los artículos se listan a continuación:

ALBARIÑO, C.G.; GHIRINGHELLI, P.D.; POSIK, D.M.; LOZANO, M.E. AMBROSIO, A.M.; SANCHEZ, A. & ROMANOWSKI, V. (1997) Molecular characterization of attenuated Junin virus strains. *Journal of General Virology* **78**, 1605-1610.

ALBARIÑO, C.G.; POSIK, D.M.; GHIRINGHELLI, P.D.; LOZANO, M.E. & ROMANOWSKI, V. (1997). Arenavirus phylogeny: a new insight. *Virus Genes*. En prensa.

LOZANO, M.E.; POSIK, D.M.; ALBARIÑO, C.G. SCHUJMAN, G.; GHIRINGHELLI, P.D., CALDERÓN, G.; SABATTINI, M. & 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**, 78-79.

RIVERA POMAR, R.V., LOZANO, M.E., ALBARIÑO, C.G., GHIRINGHELLI, P.D. AND ROMANOWSKI, V. (1997). Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity *in vivo*. En consideración.

Abreviaturas utilizadas en este trabajo

% p/v	porcentaje peso en volumen
% v/v	porcentaje volumen en volumen
A	absorbancia
aa	aminoácidos
ATP	adenosina 5' trifosfato
BSA	seroalbúmina bovina
cDNA	DNA copia
Ci	curie
Da	daltons
dATP	2' desoxiadenosina 5' trifosfato
dCTP	2' desoxicitosina 5' trifosfato
dGTP	2' desoxiguanosina 5' trifosfato
DNA	ácido 2' desoxirribonucleico
DNA pol	polimerasa de DNA
dNTP	2' desoxirribonucleósidos 5' trifosfatos
dpi	días pos-infección
dpm	desintegraciones por minuto
dTTP	2' desoxitimidina 5' trifosfato
EDTA	ácido etilen diamino tetracético
h	horas
HAc	ácido acético
HEPES	ácido N-[2-hidroxietil] piperazin-N'-etanosulfónico
hpi	horas pos-infección
IPTG	isopropil-tio-β-D-galactósido
KAc	acetato de potasio
kDa	kilodaltons
kpb	kilopares de bases
log	logaritmo de base 10
M	molar
μCi	microcurie
mCi	milicurie
mdi	multiplicidad de infección
μg	microgramo
mg	miligramo
min	minutos
μl	microlitro

ml	mililitro
μ M	micromolar
mM	milimolar
mRNA	RNA mensajero
NaAc	acetato de sodio
ng	nanogramo
nm	nanómetros
nt	nucleótidos
NTP	ribonucleósidos trifosfatos
N _{xg}	número multiplicado por la aceleración de la gravedad
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PAL	poliacrilamida lineal
pb	pares de bases
PBS	buffer fosfato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PIPES	ácido piperazin-N,N'-bis [2-etanosulfónico]
PM	peso molecular
RNA	ácido ribonucleico
RNA pol	polimerasa de RNA
Rnasa	ribonucleasa
RNA _v	RNA de polaridad viral
RNA _{vc}	RNA de polaridad viral complementaria
rpm	revoluciones por minuto
RT	transcripción reversa
SBF	suero bovino fetal
SDS	dodecil sulfato de sodio
seg	segundos
TCG	isotiocianato de guanidinio
Tris	tris-(hidroximetil)- aminometano
tRNA	RNA de transferencia
ufp	unidades formadoras de placas
ufp/cel	ufp por célula
UV	ultravioleta
V	volts
W	wats
X-gal	5-bromo-4cloro-3-indolil- β -D-galactósido

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. Arenavirus

Los arenavirus pertenecen a la familia *Arenaviridae* y reciben su nombre (del latín *arenosus*) debido al aspecto granuloso que presentan los viriones, observados al microscopio electrónico. Esta familia está compuesta por un número creciente de virus, incluyendo hasta el momento 18 miembros reconocidos por el Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus (ICTV, *International Committee for the Taxonomy of Viruses*).

De acuerdo al sitio geográfico de aislamiento, la reactividad serológica cruzada y la información genética, los arenavirus fueron clasificados en dos grandes grupos. Estos grupos se podrían homologar con géneros incluidos en la familia.

La división separa a los arenavirus del Viejo Mundo de aquellos del Nuevo Mundo (Wulff *et al.*, 1978; Buchmeier *et al.*, 1995). El grupo de los arenavirus del Viejo Mundo incluye al virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM) y a los virus Ippy, Lassa, Mobala y Mopeia (McCormick, 1990). Por otra parte, el grupo de los arenavirus del Nuevo Mundo comprende a los virus Amapari, Flexal, Guanarito, Junín, Latino, Machupo, Oliveros, Paraná, Pichindé, Sabiá, Tacaribe, Tamiami y Whitewater Arroyo (McCormick, 1990; Salas *et al.*, 1991; Coimbra *et al.*, 1994; Bowen *et al.*, 1996).

El virus LCM es el prototipo de esta familia y es el único arenavirus que posee una distribución amplia en todo el mundo. En cambio, el resto de los miembros de la familia están restringidos geográficamente. Es interesante notar que el área de dispersión de los arenavirus está en relación con la distribución geográfica de los hospedadores y es probable que este sea un factor determinante en la co-evolución de los mismos. En este sentido, todas las especies de arenavirus tienen como reservorios naturales a los roedores; con excepción del virus Tacaribe, cuyo reservorio es un quiróptero.

Un aspecto importante de esta familia de virus, es que algunos de sus miembros son altamente patógenos para el hombre, por ejemplo: Lassa, Junín, Machupo, Guanarito y Sabiá, (McCormick, 1990; Salas *et al.*, 1991; Coimbra *et al.*, 1994). En particular, los arenavirus Junín, Machupo y Guanarito producen fiebres hemorrágicas severas, con características endemo-epidémicas en



Argentina, Bolivia y Venezuela, respectivamente. El virus Sabiá también produce una fiebre hemorrágica en humanos, pero el número escaso de infecciones reportadas no permite asociarlo con una enfermedad epidémica.

1.2. Fiebre Hemorrágica Argentina

Los primeros casos de la fiebre hemorrágica argentina (FHA) se registraron en la década del '50 en el norte de la provincia de Buenos Aires. Desde entonces la enfermedad se ha extendido hacia las provincias de Santa Fé, Córdoba y La Pampa (Maiztegui y Sabattini, 1977). En la actualidad, el área endémica cubre aproximadamente 150.000 km² de la zona agrícola-ganadera más importante de la Argentina. Esta región está habitada por 3,5 millones de personas y la población en riesgo se compone principalmente por trabajadores rurales (Maiztegui *et al.*, 1986).

La FHA es una enfermedad caracterizada por un conjunto de síntomas clínicos, incluyendo alteraciones hematológicas, inmunológicas, cardiovascular, renales y neurológicas. Además, se reconocen formas clínicas leves y graves de la FHA. A su vez, las formas graves pueden presentar características predominantes hemorrágicas, neurológicas o renales; aunque también pueden presentar características mixtas.

La ruptura de capilares en el sistema vascular es responsable de las hemorragias severas; de este modo, la disfunción generalizada del endotelio produce un colapso vascular, shock hipotensivo y edema pulmonar. Además, los pacientes de FHA sufren otras complicaciones frecuentes, originadas por infecciones bacterianas y micóticas oportunistas que producen una sepsis generalizada y pueden elevar la tasa de mortalidad hasta un 30%.

En este sentido, la replicación viral no ha sido detectada en los tejidos del sistema vascular; sin embargo, se ha demostrado que los linfocitos y monocitos de sangre periférica constituyen el sitio primario de la replicación del virus Junín (Ambrosio *et al.*, 1986).

Por otra parte, en algunos pacientes la respuesta inmune resulta muy efectiva en la eliminación del virus durante la enfermedad y podría ser suficiente para proteger contra futuras infecciones. Sin embargo, el rol de la respuesta inmune celular en la eliminación del virus y la protección subsiguiente es desconocido.

1.2.1. Relación de la enfermedad con el virus Junín

La etiología de la FHA fue establecida en el Hospital Regional de la ciudad de Junín, donde se efectuaron los primeros aislamientos del virus en muestras de sangre y órganos obtenidos por necropsias (Parodi *et al.*, 1958; Pirotsky *et al.*, 1959). De este modo, el virus recibió su nombre por la ciudad donde se produjo su aislamiento.

Los principales reservorios naturales para el virus Junín son roedores de hábitos rurales, de las especies *Calomys musculinus* y *Calomys laucha*; aunque también ha sido aislado de *Akodon azarae* y *Orizomys flavescens* (Maiztegui, 1975). Ocasionalmente, el virus ha sido detectado en roedores de hábitos urbanos como *Mus musculus* (Sabattini *et al.*, 1977). Este roedor constituye el principal hospedador natural del virus LCM, que también fue aislado en la región endémica del virus Junín.

Los roedores infectados por arenavirus sufren infecciones crónicas y liberan virus al medio ambiente persistentemente, cumpliendo, de este modo, con el ciclo de mantenimiento en la naturaleza. Los seres humanos se cree que son infectados a través de cortes o abrasiones en la piel o por inhalación de aerosoles o polvo contaminado con orina, saliva o sangre de ratones infectados (Maiztegui *et al.*, 1986). El contagio interhumano se ha registrado en muy pocos casos y se debió principalmente al contacto íntimo con el enfermo.

Por otra parte, la patogénesis de la FHA se estudió en infecciones experimentales de ratones lactantes, cobayos y monos macacos. La infección en los animales produce diferentes patrones de enfermedad dependiendo de la vía de entrada del virus y la edad del animal (Buchmeier *et al.*, 1980). Sin embargo, la infección en los monos produce alteraciones fisiológicas y patológicas que se correlacionan mejor con las manifestaciones de la enfermedad en humanos. Con posterioridad, se reportó que los diferentes aislamientos del virus Junín presentan un alto grado de variación en la virulencia y patrones clínicos, cuando son ensayados en macacos (McKee *et al.*, 1985).

1.2.2. Tratamiento y prevención de la enfermedad

Entre los 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.

En el marco de los estudios posteriores, llevados a cabo en el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH, Pergamino, Argentina), se estableció la eficacia de la administración de plasma inmune (plasma de pacientes convalecientes) en la fase convaleciente de la FHA. En este sentido, la eficacia del tratamiento está directamente relacionada con el título de anticuerpos neutralizantes en el plasma suministrado a los pacientes. El tratamiento neutraliza la viremia, disminuye las alteraciones fisiológicas y reduce la incidencia de las infecciones oportunistas. La aplicación de esta terapia durante los primeros 8 días de infección resultó en una disminución de la tasa de mortalidad, hasta el 1% de los pacientes afectados (Maiztegui *et al.*, 1979; Enría *et al.*, 1986).

Con respecto a la prevención de la enfermedad se ha desarrollado una vacuna, como resultado de un proyecto de colaboración entre el Ministerio de Salud Pública de la República Argentina y los laboratorios del USAMRIID (*United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases*) en Maryland, EEUU (Barrera Oro & Eddy, 1982).

La cepa vacunal Junín Candid #1 (*candidate 1*) presenta virulencia atenuada 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 EEUU y en Argentina. De hecho, la vacunación de los trabajadores rurales en la zona endémica redujo la incidencia de la enfermedad durante los últimos años (Maiztegui, 1990).

Sin embargo, los riesgos implícitos de las vacunas a virus vivos no pueden ser descartados. En este sentido, se debe considerar la alta tasa de mutación propia de los genomas a RNA y las posibilidades de recombinación y reasociación que presentan los virus con genomas segmentados.

1.2.3. Diagnóstico

El diagnóstico para establecer la terapia específica está basado en el examen clínico de los pacientes y en los ensayos de laboratorio. Para determinar el diagnóstico etiológico se emplean métodos inmunológicos

corrientes, tales como ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), IFA (*immunofluorescence assay*) y ensayos de neutralización.

Teniendo en cuenta que la conversión serológica ocurre tardiamente durante el transcurso de la infección, estos ensayos no pueden ser usados como marcadores sensibles en las etapas tempranas de la enfermedad. Además, el bajo título de virus en sangre impide el uso del ELISA para la detección de los antígenos virales. En este sentido, el co-cultivo de linfocitos de sangre periférica de los pacientes con células Vero, mejora el resultado de la determinación. Sin embargo, estos procedimientos implican manipulaciones riesgosas del virus Junín, requieren condiciones de seguridad apropiadas y el resultado se obtiene en 14-20 días.

Recientemente en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM), se ha desarrollado una prueba diagnóstica de laboratorio, basado en la detección de los ácidos nucleicos del virus. El procedimiento permite inactivar el agente patógeno después de la extracción de sangre y disminuye notablemente los riesgos de la manipulación (Lozano *et al.*, 1993b). En principio, la detección de los ácidos nucleicos del virus se obtiene en una reacción catalizada por la transcriptasa reversa y seguida por la amplificación por PCR (RT-PCR). Esta técnica de detección 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).

1.3. Características de los arenavirus

Los arenavirus comparten una serie de propiedades morfológicas y moleculares. Las partículas virales poseen formas esféricas o pleomórficas con un diámetro de 50 a 300 nm (Compans, R.W., 1993). En el caso del virus Junín el diámetro promedio de sus partículas virales es de 120 nm (Lascano y Berría, 1970) y su densidad de flotación en gradientes de CsCl fue calculada en 1,20 g/cm³ (Romanowski, 1981 y 1993).

Durante la brotación en las células infectadas, los viriones se rodean de una envoltura lipoproteica, arrastrando parte del citoplasma adyacente. La envoltura viral, contiene espículas proteicas insertadas en la bicapa lipídica, visibles por microscopía electrónica (Figura 1.1).

En el interior de los viriones se observa una materia amorfa constituida principalmente por el resto del citoplasma celular, las nucleocápsides y un número variable de ribosomas. La presencia de estos últimos le da un aspecto granuloso o arenoso a los viriones, originando el nombre de esta familia. La incorporación de los ribosomas provenientes de la célula huésped, podría ser el resultado de un proceso de encapsidación no específico y tal vez se relacione con los mRNAs virales, que estaban siendo traducidos en el momento de la brotación. En cualquiera de estos casos, el rol de los mismos en el ciclo de replicación viral no ha sido aclarado.



Figura 1.1. Microscopía electrónica de arenavirus. En A se observan viriones del virus LCM brotando de células BHK 21 y en B (ángulo superior derecho) se muestra un virión con mayor aumento. Los viriones típicos miden 110 nm y contienen partículas electrodensas de 20 nm en su interior; la barra representa 100 nm (Burns & Buchmeier, 1993).

1.3.1. Estructura de las nucleocápsides

Aparte de la presencia de los ribosomas, los detalles estructurales internos de las partículas virales no han podido ser resueltos en los viriones intactos. La obtención de las nucleocápsides se logra con el tratamiento de los viriones con detergentes no iónicos, para eliminar su envoltura. A continuación, las nucleocápsides purificadas por centrifugación en gradientes de CsCl pudieron ser observadas por microscopía electrónica (Young y

Howard, 1983). Actualmente, las formas circulares aparentes que adoptan las nucleocápsides se atribuyen a la presencia de secuencias complementarias en los extremos de ambos RNA genómicos (Figura 1.2).

Las nucleocápsides son complejos de ribonucleoproteínas y están integradas principalmente por la proteína N (63 kDa), asociada a las moléculas de RNA genómicos S y L. La distribución de tamaños de las estructuras circulares reveló dos clases predominantes de 640 y 1300 nm de longitud, correspondientes a los complejos formados por la proteína N y los RNAs S y L, respectivamente (Compans, 1993).

Además, los RNAs virales se encuentran asociadas a las proteínas L y Z, en menor proporción que la proteína N. La proteína L (200 kDa) constituye la RNA polimerasa viral y la proteína Z (11 kDa), denominada de este modo por la presencia de motivos estructurales tipo *zinc-finger*, no posee una función biológica conocida hasta el momento.

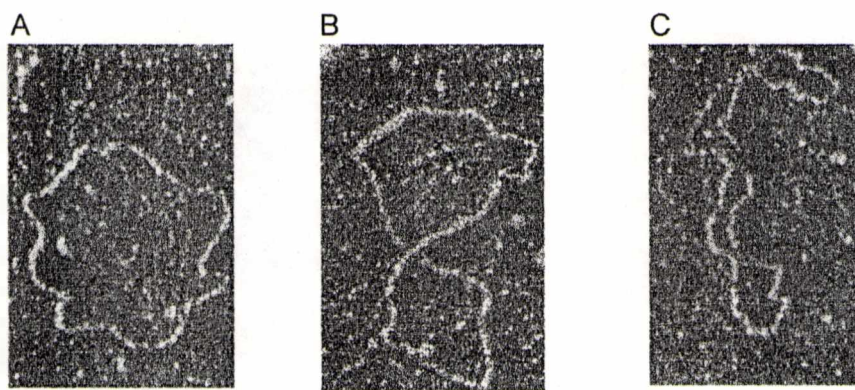


Figura 1.2. Micrografías electrónicas de nucleocápsides. Las nucleocápsides purificadas del virus Pichindé fueron sombreadas, por rotación en un ángulo de 10°; con Au-Pd en A y B; y con Pt-C en C (Young y Howard, 1983). Las nucleocápsides observadas en A, B y C presentan diferentes grados de superenrollamiento.

1.3.2. Propiedades moleculares de los viriones

Las espículas de la cubierta viral están formadas por los polipéptidos G1 y G2, originados durante el clivaje proteolítico del precursor de las glicoproteínas de la envoltura, GPC de 57 kDa aprox. (Figura 1.3). Las moléculas del polipeptido G1 forman tetrámeros globulares en el exterior del virión; mientras que los tetrámeros del polipéptido G2 atraviesan la bicapa lipídica. El dominio N-terminal de G2 se encuentra en el exterior del virión y el C-terminal, en su interior. Además, el tetrámero transmembrana (G2) se conecta en el exterior del virión con los tetrámeros globulares (G1) y, en el interior con las nucleocápsides (Figura 1.4).

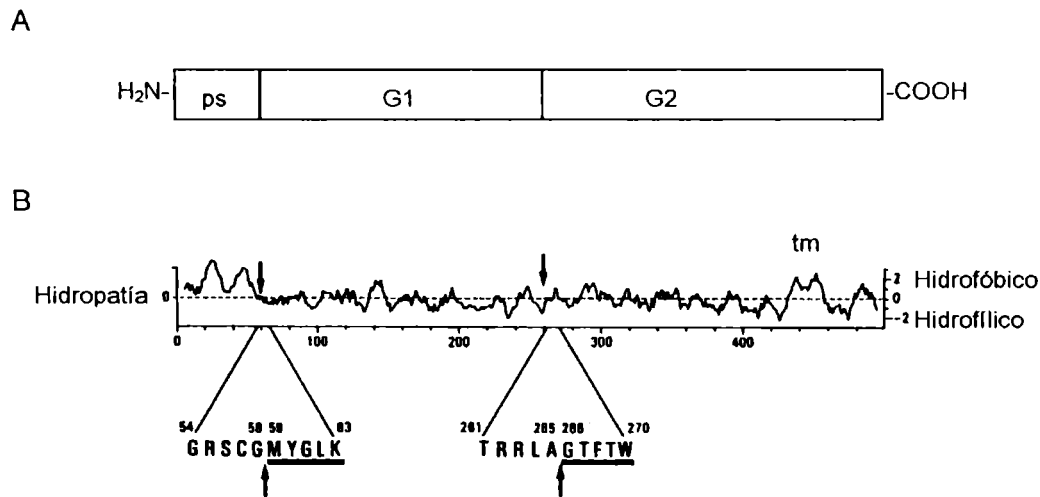


Figura 1.3. Estructura del precursor de las glicoproteínas. En A se muestra un esquema del precursor GPC; se indica la ubicación del péptido señal (ps) y de los polipéptidos G1 y G2. En B se muestra el gráfico de hidropatía para la proteína GPC del virus LCM Armstrong (Burns & Buchmeier, 1993). Arriba del gráfico se indican los sitios de clivaje (flechas) y el dominio transmembrana (tm) de G2. Debajo del gráfico se indican las secuencias cercanas a los sitios de clivaje de la peptidasa señal y de la proteasa asociada al aparato de Golgi.

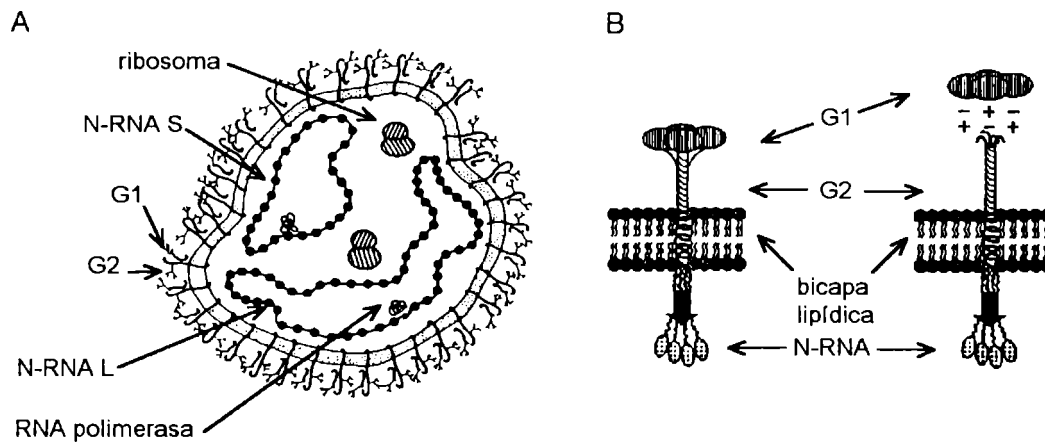


Figura 1.4. Partícula viral de los arenavirus. En A se representa esquemáticamente las estructuras presentes en la partícula viral (Bishop, 1990). Se puede observar la envoltura viral con las glicoproteínas asociadas, las nucleocápsides (N-RNA S y N-RNA L) y los ribosomas incluidos. En B se representa la estructura de las espículas claviformes constituidas por tetrámeros de los polipéptidos G1 y G2 (Burns & Buchmeier, 1993). También se muestran las interacciones entre los tetrámeros y las nucleocápsides (complejos N-RNA).

1.4. Estructura genómica

Los arenavirus poseen un genoma segmentado compuesto por dos moléculas de RNA de simple cadena, denominadas S (*small*) y L (*large*), con un tamaño promedio aproximado de 3,5 y 7 kb, respectivamente (Bishop, 1990). Dentro de los viriones, se ha encontrado una proporción variable de cada una de las moléculas de RNA genómico, aunque frecuentemente la cantidad del RNA S es mayor que la cantidad de RNA L. De hecho, se ha demostrado experimentalmente la formación de viriones diploides para el RNA S (Romanowski y Bishop, 1983).

Durante las últimas décadas se han realizado numerosos estudios sobre la biología molecular de los arenavirus y se ha determinado la secuencia nucleotídica de los RNAs genómicos de algunos de ellos. La información publicada sobre la secuencia del RNA L, está limitada a los virus LCM, Tacaribe, Lassa y Pichindé (Salvato y Shimomaye, 1989, Salvato *et al.*, 1989; Iapalucci *et al.*, 1989a, 1989b; Lukashevich *et al.*, 1997; Harnish, comunicación personal). En contraste, la información sobre el RNA S es abundante y se ha reportado la secuencia completa correspondiente a los virus Pichindé (Auperin *et al.*, 1984), LCM (Romanowski *et al.*, 1985), Tacaribe (Franze Fernández *et*

al., 1987), Lassa (Auperin y McCormick, 1989; Clegg *et al.*, 1990), Junín MC2 (Ghiringhelli *et al.*, 1991), Mopeia (Wilson y Clegg, 1991), Oliveros (Bowen *et al.*, 1996a) y Sabiá (Gonzalez *et al.*, 1996). Además, se han reportado secuencias parciales del RNA S de los virus Machupo, Amapari, Flexal, Latino, Paraná, Tamiami, Guanarito, Whitewater Arroyo y Pampa (Griffiths *et al.*, 1992; Bowen *et al.*, 1996b; Gonzalez *et al.*, 1995; Fulhorst *et al.*, 1996; Lozano *et al.* 1997).

Cada uno de los RNAs genómicos S y L, posee dos marcos de lectura abiertos (ORFs, *open reading frames*) no solapados, con orientaciones opuestas. La disposición de los genes, denominada *ambisense*, constituye la estrategia de codificación característica de los arenavirus (Auperin *et al.* 1984); aunque también se manifiesta en algunos géneros de la familia *Bunyaviridae*. Los ORFs se hallan separados por una región no codificante que contiene secuencias autocomplementarias (Figura 1.5). Esta característica les confiere la potencialidad de formar una estructura secundaria muy estable, compuesta por una o dos horquillas, denominadas *hairpin-loops* (Romanowski, 1993; Salvato, 1993).

Como se mencionó anteriormente, la disposición de los ORFs es semejante en ambas moléculas genómicas. En la mitad 5' del RNA S se halla codificado el gen del precursor de las glicoproteínas de la envoltura (GPC), con sentido genómico o viral; mientras que en la mitad 3', se halla codificado el gen de la proteína de la nucleocápside (N), con sentido antígenómico o viral complementario. Por otra parte, en la mitad 5' del RNA L se halla codificado el gen de la proteína Z (*zinc-finger-like protein*), en sentido viral; mientras que en la mitad 3' de la misma molécula, se halla codificado el gen de la RNA polimerasa viral (L), en sentido viral complementario (Franze Fernández, 1993).

De acuerdo a la estrategia de codificación, las proteínas N y L se traducen, en las células infectadas, a partir de RNA mensajeros (mRNAs) con sentido antígenómico (viral complementario); mientras que las proteínas GPC y Z se traducen de mRNAs con sentido genómico (viral).

Los extremos 5' y 3' del RNA S poseen secuencias nucleotídicas complementarias que podrían formar una estructura de doble cadena, denominada *panhandle* (Figura 1.5). El apareamiento en los extremos resultaría en una estructura pseudocircular, que permite explicar la forma de las nucleocápsides observadas al microscopio electrónico (ver Figura 1.2). De acuerdo al análisis de secuencia, sería esperable que se forme una estructura semejante en los extremos del RNA L.

La secuencia de los extremos del RNA S se halla muy conservada en los arenavirus, lo cual sugiere la posibilidad que la RNA polimerasa viral reconozca estos sitios durante el inicio de la replicación (Bishop, 1990). Sin embargo, se han reportado datos sobre la heterogeneidad de esta secuencia en el virus LCM, en aparente contradicción con la hipótesis anterior (Meyer y Southern, 1994).

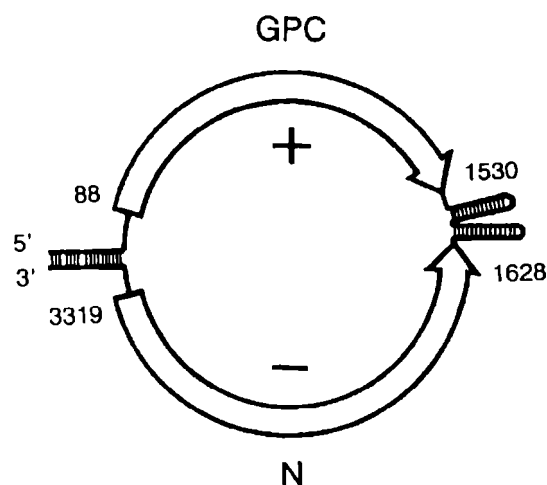


Figura 1.5. Organización molecular en el RNA S del virus Junín. El esquema resume la organización genómica y molecular deducida a partir del análisis de las secuencias nucleotídicas del RNA S (Romanowski, 1993). Las secuencias de la región intergénica son autocomplementarias y estabilizan la estructura secundaria de los *hairpins*. El apareamiento de las secuencias complementarias en los extremos del RNA S, producen la estructura secundaria del *panhandle*. Las regiones de los *hairpins* y del *panhandle* no están representadas en escala. La numeración comienza en el extremo 5' del RNA S y se indica la disposición *ambisense* de los genes GPC y N.

1.5. Estrategia de transcripción/replicación

El ciclo de infección viral comienza con la adsorción de los viriones en la superficie de la célula blanco, con la colaboración de receptores específicos que no han sido identificados hasta el momento. El proceso continúa con la fusión de la envoltura viral a la membrana plasmática y el pasaje al interior de la célula, de las nucleocápsides y las proteínas asociadas (Z y L). Posteriormente, se inicia una serie de eventos en la célula infectada, que incluye la transcripción de los genes virales, la traducción de los mRNAs, la

replicación del RNA genómico, el ensamblado de las nucleocápsides y la brotación de los nuevos virus.

Dentro de la célula infectada, la RNA polimerasa viral comienza la transcripción, utilizando los RNAs genómicos S y L, como molde. En este sentido, la actividad de esta enzima fue detectada en extractos citoplasmáticos de células infectadas con los virus Tacaribe (Garcin y Kolakofski, 1992) y LCM (Fuller-Pace y Southern, 1989).

La transcripción del RNA S genera dos moléculas de polaridad antigenómica o viral complementaria: el mRNA de la proteína N y una copia de longitud completa del RNA S (RNA S vc); de 1,8 kb y 3,4 kb respectivamente. A su vez, el RNA S vc es utilizado como molde para la transcripción del mRNA de la proteína GPC y constituye la forma replicativa del virus, a partir del cual se transcribe el RNA S viral (Figura 1.6). Considerando la información disponible sobre el RNA L, se podría afirmar que esta molécula se transcribe y replica, de acuerdo a un modelo semejante al descrito para el RNA S (Franze Fernández *et al.*, 1993).

Es interesante notar que el RNA S y su copia complementaria, el RNA S vc, contienen un ORF que no es traducido por los ribosomas de las células infectadas y tampoco es utilizado en los sistemas de síntesis de proteínas *in vitro*. Sin embargo, los codones de iniciación de los ORFs están en un entorno adecuado, de acuerdo a las secuencias consenso de los mRNAs eucarióticos (Kozak, 1984). El hecho que la secuencia 3' no codificante de los RNAs virales está compartida por los mRNAs de igual polaridad, hace suponer que habría factores adicionales que influyen en el reconocimiento de los mRNAs por parte de los ribosomas.

Con el objeto de precisar el sitio donde termina la transcripción del mRNA para la proteína N, se realizaron ensayos de protección a RNAsas a partir de la hibridación de sondas específicas sobre RNA total proveniente de células infectadas con los virus Tacaribe (Iapalucci *et al.*, 1991) y Junín (Rivera Pomar, 1991). Los resultados de los ensayos indicaron que la RNA polimerasa viral interrumpe su actividad en la región intergénica y genera el mRNA para la proteína N, con una copia del primer *hairpin-loop* en su extremo 3'.

De acuerdo a los resultados mencionados, se desprende la existencia de un mecanismo molecular que impide la terminación de la transcripción en la región intergénica y permite la generación de las copias antigenómicas completas del RNA S (RNA S vc, *full-length*). El mecanismo molecular de antiterminación cambiaría la modalidad desde la transcripción hacia la

replicación durante el transcurso de la infección viral. A partir de esta conclusión, se puede especular la existencia de un mecanismo similar de antiterminación sobre el RNA S vc, que permita alternar la generación del mRNA para la proteína GPC, con la generación del RNA S viral *full-length*. Además, habría que considerar la existencia de un mecanismo homólogo que opere sobre el RNA L viral y su copia complementaria (RNA L vc).

Por otra parte, los extremos 5' de los mRNAs contienen varios nucleótidos que no se encuentran en el RNA molde, lo cual llevó a proponer un mecanismo de iniciación por *cap-snatching* para la iniciación de la transcripción (Garcin y Kolakofsky, 1992; Raju *et al.*, 1990; Rivera Pomar, 1991), semejante al descrito inicialmente para el virus Influenza (Krug, 1981).

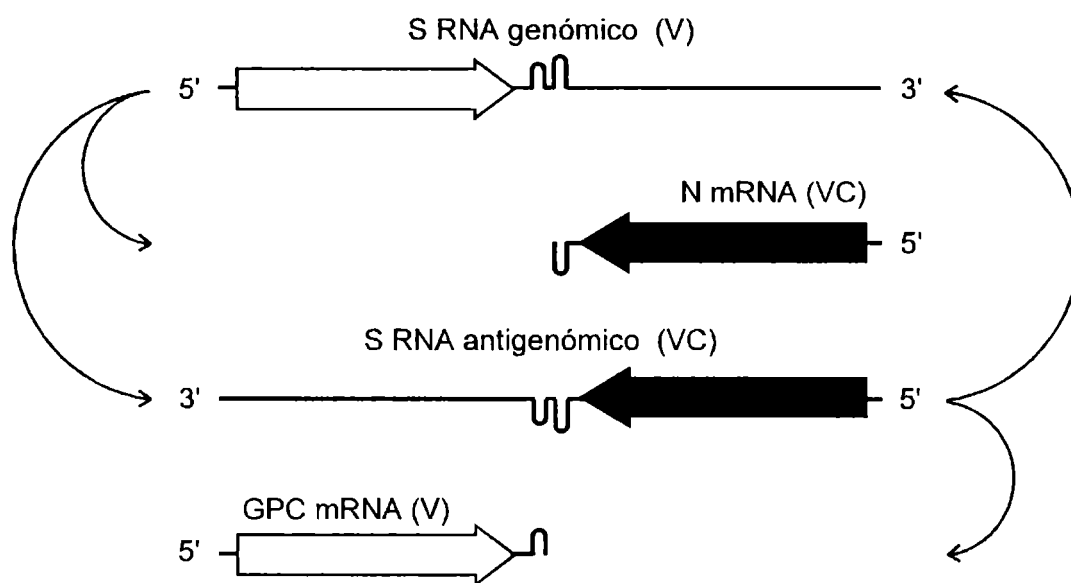


Figura 1.6. Estrategia de transcripción/replicación del RNA S de los arenavirus. El esquema muestra la codificación *ambisense* en el RNA S del virus Junín. El gen GPC (rectángulo vacío) está codificado en sentido genómico y el gen N (rectángulo lleno) en sentido antígenómico. Las especies de RNA con polaridad genómica o viral se indica como V y las de polaridad antígenómica 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 curvas indican explícitamente, las relaciones entre las diferentes especies de RNA.

1.6. Efectos de la infección a nivel celular

La propagación de los arenavirus en cultivo de células puede provocar un efecto citopático e 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 de numerosos cuerpos de inclusión y vacuolas en el citoplasma celular.

El efecto citopático conduce a la lisis en líneas susceptibles como Vero, CV-1 y HeLa. En cambio, estas alteraciones no se manifiestan en otras líneas como BHK-21. 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.

Además, la supervivencia de células que no sufren los efectos citopáticos característicos, resulta en una línea celular infectada persistentemente que puede ser cultivada en forma indefinida (Welsh & Buchmeier, 1979).

Por otra parte, las células infectadas por virus liberan viriones funcionales así como viriones mutantes. Los mutantes no pueden replicarse por sí mismos y por lo general, poseen deleciones importantes en su genoma. En ciertos casos, los mutantes interfieren con la multiplicación de las viriones funcionales y por este motivo fueron denominados partículas interferentes defectivas. Este fenómeno, también se manifiesta en las infecciones por arenavirus, en particular, cuando se utilizan multiplicidades de infección (mdi) mayores que 1 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).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

Este capítulo fue dividido en cuatro secciones para describir las metodologías utilizadas en cada etapa de este trabajo.

Primera sección

En esta sección se describen las metodologías utilizadas durante el estudio sobre la atenuación de la virulencia en el virus Junín. Las técnicas generales fueron empleadas anteriormente por los investigadores del laboratorio del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (I.B.B.M.) y otras fueron desarrolladas durante el presente trabajo para solucionar problemas nuevos o para simplificar procedimientos técnicos.

1.1. Productos químicos y enzimáticos

Durante el desarrollo del presente trabajo se utilizaron reactivos de grado analítico o de grado biología molecular suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, USA) y Carlo Erba (Milano, Italia). Las enzimas utilizadas fueron provistas por las empresas Stratagene (LaJolla, USA), Promega (Madison, USA) y New England Biolabs (Beverly, 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). El agua utilizada fue destilada, desionizada y esterilizada por autoclave a 120 °C, dado el requerimiento de una máxima calidad y pureza en los protocolos de biología molecular.

1.2. Materiales radioactivos

El dosaje del material radioactivo, principalmente ^{32}P , se realizó por medición con un contador de centelleo líquido y con un contador Geiger. Las

autorradiografías se realizaron utilizando películas X-Omat™ de Kodak (Rochester, USA) o su equivalente de otra marca.

La generación de sondas radioactivas y las reacciones de secuencia de nucleótidos se realizaron por incorporación de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$. La marcación de *primers* se realizó por incorporación de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. En ambos casos, los nucleótidos fueron sintetizados a partir de $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-H}_3\text{PO}_4$, suministrado por NEN (New England Nuclear, USA).

1.3. Síntesis de los nucleótidos radioactivos

La síntesis de nucleótidos radioactivos se realizó de acuerdo a la modificación (Ghiringhelli *et al.*, 1985) del método original de Walseth y Johnson (1979). El $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-H}_3\text{PO}_4$ constituye el sustrato para la síntesis de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, el cual a su vez, es el sustrato para la síntesis de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ y $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$. La síntesis de estos últimos se realizó en paralelo, a través de un conjunto de reacciones muy similares.

La primer etapa consistió en la síntesis de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, a partir de $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-H}_3\text{PO}_4$ y ADP. La reacción está catalizada por un conjunto de enzimas (glicerofosfato deshidrogenasa, trifosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, 3-fosfoglicerato quinasa y lactato deshidrogenasa), en presencia de piruvato y cisteína.

En la etapa siguiente el grupo fosfato radioactivo del $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ se transfirió a una molécula de 3' AMP, para formar 3',5' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ADP}$; en una reacción catalizada por la enzima polinucleótido quinasa. En una reacción paralela, se usó el precursor 3' dAMP para formar 3',5' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dADP}$. En las etapas siguientes se detallan los productos de la síntesis del $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, ya que los obtenidos en la síntesis de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ son análogos.

Posteriormente, se utilizó la nucleasa P1 para hidrolizar específicamente el fosfato 3', no radioactivo, del ADP y obtener 5' $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-AMP}$. El pH utilizado en esta etapa es crítico, ya que la nucleasa P1 posee su actividad máxima a diferentes pHs, si en la reacción se utilizan ribonucleótidos (pH 7 a 9) o deoxiribonucleótidos (pH 4,5 a 6).

La última etapa consistió en la fosforilación del 5' $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-AMP}$ para rendir $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Esta reacción está catalizada por las enzimas piruvato quinasa y mioquinasa y se realizó en presencia de fosfoenolpiruvato, que representa la molécula dadora de fosfatos.

El rendimiento de cada una de las etapas se analizó por medio de una cromatografía en papel de PEI-celulosa, utilizando ácido fosfórico 0,33M como fase móvil. En general, el rendimiento total de la síntesis varió entre 50 y 90 % según la fuente del ^{32}P y el tipo de nucleótido sintetizado.

1.4. Cultivo de células

Las células BHK21 c13 (ATCC, CRL8544, C1008) fueron cultivadas en el medio DMEM (Dulbecco's minimal essential medium, cat. 430-1600, Gibco) suplementado con L-glutamina (Gln, 2mM), glucosa (4,5 g/l) y suero bovino fetal (SBF, 10%). Las células Vero E6 (ATCC, CRL1586) y Vero (ATCC, CCL81) fueron cultivadas en medio MEM (minimal essential medium, cat. 410-1500, Gibco), incluyendo una mezcla de aminoácidos no esenciales y suplementado con Gln (2mM) y de SBF (10%). Ambos medios de cultivo (DMEM y MEM) fueron preparados con el agregado de anfotericina B (1,5 $\mu\text{g/ml}$) y gentamicina (50 $\mu\text{g/ml}$). Los medios utilizados en cultivos bajo atmósfera de 5% de CO_2 tuvieron el agregado adicional de NaHCO_3 (22mM) y HEPES pH 7,5 (10mM).

Los frascos y cajas de Petri utilizados en los cultivos fueron reutilizados, luego de ser lavados con una solución diluida de Triton X100 y enjuagados abundantemente con agua destilada y bidestilada. Finalmente, el material seco fue esterilizado en un horno de microondas durante 3 ciclos de 5 minutos con la máxima potencia.

Los repiques celulares se realizaron por desprendimiento de las células y pasaje a nuevos frascos (o cajas) usando diferentes diluciones, de acuerdo a la línea celular. Brevemente, las células se lavaron con PBS (NaCl 8g/l; KCl 0,2g/l; Na_2HPO_4 1,15 g/l; KH_2PO_4 0,2g/l) y se trataron con un volumen mínimo para cubrir la monocapa, de una solución de tripsina (tripsina 0,25%; Na_2EDTA 0,02%; rojo fenol 0,001% y glucosa 0,1%, en PBS 1x). Luego de este tratamiento por 2 minutos aproximadamente, se agregó el volumen necesario de medio de cultivo para realizar el pasaje a los nuevos frascos o cajas. En estas condiciones, se inhibió por completo la actividad enzimática de la tripsina, por efecto de la presencia de iones Ca^{++} y Mg^{++} en el medio de cultivo.

1.5. Propagación de los virus

El virus junín XJ#44 fue suministrado por J.G. Barrera Oro (USAMRIID) como un homogenado de cerebro de ratón y fue propagado infectando monocapas de células en cultivo. Con el inóculo original se infectó una monocapa de células BHK 21 crecidas hasta un 50% de confluencia en un frasco de 75 cm², con una multiplicidad de infección (mdi) = 0,01 ufp/cel (unidades formadoras de placas por célula). La mdi se eligió para evitar el ingreso simultáneo en una célula, de partículas defectivas interferentes junto con una partícula infecciosa estándar. Después de la adsorción de los virus por 1h a 37 °C, las monocapas se lavaron con PBS y se mantuvieron en cultivo por 72 hs en el medio DMEM suplementado con 2% de SBF. El sobrenadante de este cultivo se utilizó como inóculo, para infectar monocapas de células BHK 21, cultivadas en frascos de 175 cm² y posteriormente en un *Cell Factory* (Nunc) de 6300 cm².

Los virus Junín MC2, Tacaribe y LCM-WE fueron propagados infectando monocapas de células BHK 21 en condiciones semejantes a las descritas anteriormente. La propagación de la cepa XJ#44 y los virus mencionados anteriormente, se realizó en un laboratorio de bioseguridad. El laboratorio está compuesto por una primer cámara con las estufas de cultivo, una segunda cámara con las centrifugas y una antecámara de entrada. Durante el trabajo con materiales infectivos, se activó un sistema que produce presión negativa en el laboratorio y esteriliza el aire extraído. Además, al finalizar el trabajo, todos los cuartos fueron irradiados con luz ultravioleta y los materiales potencialmente infectivos fueron descartados en soluciones con detergentes o hipoclorito de sodio. La vestimenta de seguridad utilizada consistió en un guardapolvo, bata de cirugía, guantes de látex, cofia, barbijo, máscara de protección facial y bolsas de protección del calzado.

La cepa más virulenta XJ (prototipo) fue propagada en el laboratorio de máxima seguridad biológica (*BSL4, BioSafety Level 4*) del CDC (*Centers for Disease Control, Atlanta, USA*) y fue suministrada por C.J. Peters (CDC) como un lisado de células infectadas inactivado con isotiocianato de guanidinio (Lozano *et al.*, 1993a).

1.6. Titulación de virus

El título del virus en el medio de cultivo sobrenadante se determinó por ensayo de placas (Rustici, 1984). Las células Vero E6 se cultivaron en

monocapa, en cajas de 35 mm de diámetro o en policubetas (6 x 35mm), y se infectaron usando 100 μ l de las diferentes diluciones de los sobrenadantes (10^3 a 10^{-7}). Luego de 1 h de adsorción a 37°C, se eliminó el inóculo y se lavaron las monocapas con PBS; a continuación las células se cubrieron con una capa compuesta por agarosa 1% en PBS y MEM 1X. Las placas de lisis se detectaron, al 5° día pos-infección (dpi), por tinción de las monocapas con rojo neutro (0,5% en PBS). Alternativamente, las monocapas se fijaron con formaldehído (3,7%) y se colorearon con cristal violeta (0,5%) o con azul de metileno (0,5%).

1.7. Purificación de viriones

El medio de los cultivos infectados fue cambiado diariamente a partir del 3° día pos-infección (dpi) y los viriones fueron recuperados y purificados a partir del medio de cultivo sobrenadante, recogido al 3°, 4° y 5° dpi. La purificación comenzó con una clarificación del sobrenadante por centrifugación a 8.000xg por 15 min, para descartar los restos celulares, seguido de una ultracentrifugación a 150.000xg para sedimentar los viriones en un rotor #70Ti (Beckman Inst., New Jersey, USA). En esta etapa se descartó el sobrenadante y se recuperaron los viriones para ser utilizados como inóculos o para la extracción de RNA. La obtención de inóculos concentrados se obtuvo resuspendiendo el pellet en 1/100 del volumen inicial, con medio de cultivo.

1.8. Extracción de RNA viral

La extracción de RNA a partir de los viriones se realizó por el método de Chomczynski y Sacchi (1987). El pellet de viriones correspondiente a 25 ml de sobrenadante, se resuspendió en 250 μ l de 1xTCG (isotiocianato de guanidinio 4M, citrato de sodio 25mM, sarkosyl 0,5% y 2-mercaptoetanol 90mM). Sobre esta solución se realizaron dos extracciones: con fenol ácido (pH 4) y con cloroformo:isoamilico (24:1), en ese orden. El RNA viral se obtuvo de la fase acuosa por precipitación en presencia de NaAc 0,3 M y 2,5 vols. de etanol. El pellet de RNA se resuspendió en agua y se guardó a -70 °C.

Por otra parte, las células infectadas fueron cosechadas al 5° dpi, para obtener RNA total a partir de las mismas. Brevemente, las monocapas se lavaron con PBS 1X y las células se lisaron por el agregado de 1 volumen de una solución de 4xTCG (Lozano *et al.*, 1993a, 1993b). El proceso de

extracción de RNA a partir del lisado de células, se realizó con el procedimiento descrito anteriormente.

El RNA fue analizado por electroforesis en geles de agarosa desnaturalizante, en presencia de hidróxido de metil mercurio (Bayley & Davidson, 1976). Posteriormente, el gel fue transferido por capilaridad a una membrana de nylon para detectar específicamente los RNA virales por hibridación con sondas radioactivas (*Northern blot*).

1.9. Preparación de sondas radioactivas

Las sondas radioactivas fueron sintetizadas por la técnica de *multipriming* (Sambrook *et al.*, 1989) sobre moldes de DNA de doble cadena. Estas reacciones se realizaron sobre un molde constituido por fragmentos clonados del cDNA de la cepa MC2 (Ghiringhelli *et al.*, 1991), en presencia del fragmento mayor de la DNA pol I (Klenow) y [$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP. En principio se desnaturalizó el DNA molde por calentamiento a 100 °C por 3 min, en presencia de una mezcla de hexanucleótidos (pdN₆) con secuencias al azar (*random primers*). A continuación, se enfrió la mezcla a 0 °C para permitir el apareamiento de los *primers* con el molde y luego, se agregaron los dNTPs, la enzima y su buffer específico (Tris-HCl 50mM pH 7,5; NaCl 50mM; MgCl₂ 10mM; DTT 5mM), de acuerdo al siguiente protocolo:

DNA (100ng/ μl)	1 μl
pdN ₆ (100ng/ μl)	1 μl
Agua	16,5 μl
buffer 10X	2,5 μl
3 dNTPs -dATP (1 mM de c/u)	1 μl
$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (20 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)	2 μl
Klenow (5 U/ μl)	1 μl

La reacción se incubó a 37 °C durante 2 hs para permitir la extensión de los *primers* y se detuvo con el agregado de EDTA (20 mM final). Posteriormente, la mezcla de reacción fue diluída a 100 μl y las sondas radioactivas se purificaron por cromatografía de exclusión molecular para remover el exceso de los dNTPs. La purificación se realizó en columnas conteniendo la resina Sephadex G-50 (*Nick columns*TM, Pharmacia, Upsala,

Suecia) y la elución de las mismas se obtuvo con una solución de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8).

1.10. Northern Blot

Una vez terminada la electroforesis, se fotografió el gel y se eliminaron las partes innecesarias del mismo. Luego, se lavó el gel con agua bidestilada estéril y con en el buffer de transferencia SSC 20X (NaCl 3M, citrato de sodio 0,3 M pH 7) durante 10 minutos. Para realizar la transferencia por capilaridad, se armó un dispositivo en una cuba con el buffer de transferencia y un soporte para sostener un papel de filtro mojado en el buffer y el gel sobre este último. Encima del gel se colocó una membrana de nitrocelulosa (o nylon) y un apilamiento de toallas de papel, del mismo tamaño que la membrana y el gel. Una vez realizada la transferencia durante toda la noche, se lavó la membrana con SSC 6X para eliminar los restos de agarosa y se la dejó secar sobre papel de filtro a temperatura ambiente. La fijación del RNA se obtuvo horneando la membrana durante 2 horas a 80 °C.

A continuación, se bloquearon los sitios inespecíficos sobre la membrana, incubandola con 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de la solución de pre-hibridación (SSC 6X, SDS 1%, formamida 50%, tRNA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en bolsitas de nylon selladas. Luego del bloqueo durante 2 hs a 42 °C, la sonda desnaturalizada por calentamiento (100 °C por 3 min; 0° C por 3 min) fue agregada a las bolsitas. Finalizada la hibridación durante toda la noche, se realizaron tres lavados sobre la membrana de 3 min con 50 ml de las siguientes soluciones, en este orden: SSC 2x, SDS 0,1% p/v; SSC 0,2x, SDS 0,1% p/v y SSC 0,16x, SDS 0,1% p/v. Dependiendo de la marca retenida en la membrana se realizó un lavado con la última solución por 15 min a 50 °C. La detección de los híbridos sobre la membrana se logró exponiendo la membrana con una película radiográfica con una pantalla amplificadora, durante toda una noche a -70 °C.

1.11. Síntesis de cDNA

Para iniciar la síntesis de cDNA se usaron diferentes oligonucleótidos sintéticos (*primers*) complementarios a la secuencia del RNA S de Junín MC2 (Ghiringhelli *et al.*, 1991). Con el objeto de facilitar el clonado de los

fragmentos amplificados, se agregó el sitio de reconocimiento para la enzima *Bam HI* en el extremo 5' de algunos de estos *primers*.

<i>Primers</i> utilizados	
sentido V	sentido VC
88 - 104	196 - 215
436 - 457	805 - 820
788 - 811	843 - 866
819 - 834	1226 - 1250
1161 - 1189	1517 - 1534
1471 - 1498	1661 - 1680
1625 - 1642	2536 - 2555
2501 - 2520	2906 - 2923
2872 - 2889	3302 - 3319
3216 - 3232	3382 - 3400

Tabla 1.1. Lista de *primers* utilizados en la síntesis de cDNA y su posterior amplificación por PCR. La numeración indica la ubicación de los *primers* de acuerdo a la secuencia del RNA S del virus Junín MC2. También, se indica la polaridad de los *primers*: V por viral y VC por viral complementario. Los *primers* con sentido VC se usaron para iniciar la síntesis de cDNA sobre el RNA S viral de las cepas XJ y XJ#44.

Las muestras de RNA (1-5 μ g) fueron calentadas a 95 °C por 5 min en presencia de los *primers* (concentración final 2 μ M) y desnaturalizados con hidróxido de metil mercurio (II) en una concentración final de 10mM por 5 min antes de iniciar la transcripción reversa. Después del agregado de 2-mercaptoetanol (14 mM) para inactivar el agente desnaturalizante, la síntesis de la primer cadena de cDNA se realizó en un volumen final de 10 μ l conteniendo RNA total, 60 mM KCl, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,5 mM de cada dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 7,5 U de RNasin (Promega) y 4 U de la transcriptasa reversa del virus AMV (*Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase*, Promega, USA).

La mezcla de reacción fue incubada por 1 h a 42 °C y luego fue precipitada con 2,5 vols. de etanol, 100mM de NaAc y 2,5 μ g de PAL (poliacrilamida lineal) y finalmente disuelta en 10 μ l de agua. La segunda cadena se sintetizó con una mezcla de enzimas que contiene RNasa H, DNA

pol I y T4 DNA ligasa en los *buffers* correspondientes, según las recomendaciones del fabricante (Promega, Madison, USA).

1.12. Amplificación por PCR

Con el objeto de aumentar la eficiencia del clonado de cDNA y compensar los bajos rendimientos de RNA viral, se amplificaron por PCR regiones seleccionadas del RNA S de las cepas XJ y XJ#44. Después de la síntesis de la primer cadena de cDNA, se amplificó la secuencia blanco usando los *primers* flanqueantes y DNA polimerasa termoestable de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu DNA pol*, Stratagene, La Jolla, USA). Esta enzima, a diferencia de la *Taq DNA pol*, posee la capacidad de lectura de prueba (actividad exonucleasa 3'-5') que le confiere una menor frecuencia de errores a sus productos.

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en el buffer específico (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂ y 0,01% de gelatina), de acuerdo al protocolo descrito a continuación:

cDNA (primer cadena)	1 μl
buffer 10X	1 μl
4 dNTPs (1mM de c/u)	1 μl
<i>primers</i> (5μM)	1 μl
Agua	5,9 μl
Pfu DNA pol (5 U/μl)	0,1 μl

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. Inicialmente, las amplificaciones por PCR se realizaron cambiando manualmente el tubo de reacción en 3 bloques sólidos con temperaturas fijas (94, 50 y 72 °C). Posteriormente, las reacciones se realizaron en un ciclador diseñado en el laboratorio (Lozano *et al.*, 1993b) y finalmente en un ciclador térmico comercial (Hybaid, Teddington, UK). A continuación se describe el programa usado en el ciclador comercial para amplificar fragmentos con un tamaño aproximado de 500 pares de bases.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Etapa
1	92	60	inicio
35	92	30	desnaturalización
	50	30	apareamiento
	72	30	síntesis
1	72	300	fin

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 y el tamaño de los fragmentos esperados.

1.13. Purificación del cDNA amplificado

Los fragmentos de cDNA amplificados fueron analizados por electroforesis a 80 volts en geles de agarosa (1,5%) en buffer TAE (Tris 40mM, HAc 0,114%, EDTA 1 mM pH 8). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y la detección se realizó por transiluminación con luz UV. La región del gel conteniendo el DNA de interés, se cortó con bisturí y se separó en un tubo. A continuación, el DNA fue purificado usando el método del polvo de vidrio (*GeneClean*, Bio101, La Jolla, USA). Brevemente, el fragmento de agarosa se disolvió en 1 volumen de una solución de NaI (6M) a 55 °C y luego, se agregó la matriz de sílica, permitiendo la adsorción del DNA durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión se centrifugó y se lavó el sedimento 3 veces, con una solución concentrada de NaCl y Tris-HCl pH 8 en etanol (50%). Finalmente, el DNA se eluyó en agua a 55 °C por 15 min.

Los fragmentos de cDNA amplificados y purificados, recibieron un tratamiento previo al clonado por ligación de extremos romos en vectores plasmídicos. De acuerdo a este sistema, el plásmido pUC19 fue cortado con enzimas de restricción, que dejan extremos romos (p.ej *EcoR* V o *Hinc* II), y posteriormente desfosforilados con una fosfatasa alcalina (*CIP*, *calf intestine phosphatase*). De este modo se impide la religación del vector, a menos que se haya insertado un fragmento fosforilado entre sus extremos. Para ello, los fragmentos amplificados fueron tratados simultáneamente con el fragmento mayor de la DNA pol I (*Klenow*) y polinucleótido quinasa (PNK) con el objeto

de reparar y fosforilar sus extremos. Esta reacción se realizó en presencia de los 4 dNTPs y ATP, en el buffer específico (Tris-HCl 50mM pH 7,5; NaCl 50mM; MgCl₂ 10mM; DTT 5mM), incluido en el kit SureClone™ (Pharmacia, Uppsala, Suecia). A continuación se describe un protocolo usado para reparar y fosforilar extremos en los fragmentos de PCR:

producto de PCR	10 µl
buffer de reparación 10X	2 µl
4 dNTPs (1mM de c/u)	1 µl
ATP (1mM)	1 µl
PNK (5 U/µl)	1 µl
Klenow (5 U/µl)	1 µl
Agua	4 µl

En forma alternativa, los productos amplificados fueron digeridos con *Bam HI*, cuyos sitio de reconocimiento fue incluido en la secuencia de algunos *primers* usados en la reacción de PCR. Posteriormente, los productos tratados con la enzima de restricción fueron clonados por ligación de extremos cohesivos en el plásmido pUC19, digerido con la misma enzima.

1.14. Reacciones de ligación

La ligación de extremos cohesivos se llevó a cabo en el buffer específico (Tris.HCl pH 7,6 20 mM; MgCl₂ 5 mM, DTT 5 mM, BSA 50 mg/ml), en presencia de 500µM de ATP y 1U Weiss de T4 DNA ligasa. En las reacciones de ligación de extremos romos se utilizó ATP en una concentración final de 50µM y 5U Weiss de ligasa. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo habitualmente, a 16 °C durante 16 hs o a 22 °C durante 4 hs. A continuación se describe un protocolo usado para ligar un fragmento de DNA de 0,5 kpb en un vector plasmídico de 2,5 kpb.

fragmento (1 ng/ μ l)	2 μ l
vector (5 ng/ μ l)	2 μ l
Buffer de ligación 10X	1 μ l
ATP 5 mM	1 μ l
Agua	3 μ l
DNA ligasa del fago T4 (1U Weiss/ μ l)	1 μ l

Para lograr la mayor eficiencia en la reacción de ligación, se ajustó experimentalmente la relación molar entre el vector y el inserto; si bien la relación óptima resultó ser 1:1, en la mayoría de los casos. Además, es importante tener en cuenta la definición de las unidades de T4 DNA ligasa, debido a que las compañías comerciales utilizan distintas formas de dosar las mismas. La mayoría de las compañías utilizan las unidades Weiss, que indica la cantidad de enzima que cataliza el intercambio de 1 nmol de 32 P del pirofosfato al ATP en 20 min a 37 °C. Una unidad Weiss corresponde a 67 unidades de la compañía *New England Biolabs*; definidas en base a la ligación de 1 μ g de DNA del fago λ digerido con la enzima *Hind* III, en 20 min a 16 °C.

1.15. Preparación de bacterias competentes

Por lo general, se usaron 5 μ l de las reacciones de ligación para transformar bacterias competentes *Escherichia coli* DH5 α F' y SURE. El genotipo de estas cepas se detalla a continuación:

DH5 α F' {endA1, hsdR17(rk⁻, mk⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, Δ lacU169 F'[f80 lacZ Δ M15]}. Hanahan (1983); BRL (1986).

SURE {mcrA, mcrB, mrr, endA1, supE44, recA1, Γ , thi, gyrA96, umuC::Tn5 (kan^r), cbcC201, uvrC, lac⁻, relA1, recB, recJ, Δ (hsdRMS), F'[proAB, lacI^q, lacZ Δ M15, Tn10 (tet^r)]}. StratageneTM (1989).

Previamente a su transformación, las bacterias se llevaron a un estado de competencia que facilita la incorporación de DNA, por el método de Hanahan (1983). Para llevar a cabo este procedimiento, se utilizó el medio de cultivo PsiB y las soluciones TfbI y TfbII. El medio PsiB está compuesto por extracto

de levadura (5 g/l), triptona (20 g/l) y $MgSO_4$ (5 g/l), ajustado a pH 7,6 con KOH. La solución Tfb I está compuesta por KAc (30 mM), KCl (100 mM), $CaCl_2$ (10 mM), $MnCl_2$ (50 mM), glicerol (15%), ajustando la mezcla a pH 5,8 con ácido acético (HAc). La solución Tfb II está compuesta por PIPES (10 mM), $CaCl_2$ (75 mM), KCl (10 mM), glicerol (15%), ajustando la mezcla a pH 6,5 con KOH. El medio PsiB fue esterilizado por autoclave y las soluciones Tfb I y II por filtración.

Para desarrollar la competencia, las bacterias se sembraron en medio PsiB y se incubaron a 37 °C durante toda una noche, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Al día siguiente, el cultivo fue diluido (1/100) en medio PsiB fresco y se continuó la incubación a 37 °C hasta llegar a la fase logarítmica media del crecimiento. Al cabo de 2h 30 min el cultivo alcanzó valores de A_{500nm} cercanos a 0,5 ; en ese momento, se detuvo su crecimiento colocando el cultivo en baño de agua-hielo (0 °C).

Las bacterias fueron recolectadas por centrifugación a 3.000xg durante 5 min a 4 °C, en un rotor SS34 de una centrífuga Sorvall,. El pellet de bacterias se resuspendió en la mitad del volumen original en la solución Tfb I preenfriada a 0 °C. En estas condiciones, se dejaron reposar 5 min y luego se centrifugaron por 5 min a 3.000xg. Por último, las bacterias se resuspendieron en 1/10 del volumen anterior, en la solución Tfb II y se mantuvieron a 0 °C durante 15 min. Posteriormente, la suspensión de bacterias competentes se fraccionó en alícuotas de 200 μ l y se mantuvieron en una congeladora a -135 °C hasta su utilización.

1.16. Transformación de bacterias competentes

A continuación se describe el protocolo utilizado para la transformación de bacterias competentes (Sambrook *et al.*, 1989). En principio, se descongeló un tubo de bacterias competentes e, inmediatamente, se fraccionaron 50 μ l en tubos eppendorf preenfriados a 0 °C. Las bacterias se dejaron reposar 5 min y se mezclaron con el DNA plasmídico o la mezcla de ligación; cuidando que estas soluciones no excedieran el 10% de volumen inicial de bacterias competentes.

Los tubos se conservaron durante 30 min a 0 °C y luego las bacterias se sometieron a un shock térmico durante 2 min a 42 °C, tomando con precisión la temperatura y el tiempo, ya que ésta etapa es crítica en la transformación. Inmediatamente, se enfrió la mezcla a 0 °C durante 2 min, se agregó 200 μ l de

medio LB y se incubó a 37°C durante 1 h para que las bacterias adquirieran la resistencia al antibiótico. En este caso, las bacterias transformadas adquieren resistencia a la ampicilina, ya que los plásmidos utilizados codifican el gen de la β -lactamasa.

Finalmente, la mezcla de transformación se sembró en cajas de Petri, conteniendo LB sólido (1,5% agar en LB) con Ampicilina (100 μ g/ml) y se incubó a 37 °C durante 16 hs. El medio LB está compuesto por extracto de levadura (5 g/l), triptona (10 g/l), NaCl (10 g/l), ajustado a pH 7,6 con NaOH y esterilizado por autoclave.

Para estimar la eficiencia del procedimiento se transformaron bacterias competentes con 0,1, 1, 10 y 100 ng de un DNA plasmídico superenrollado. En particular, nosotros utilizamos DNA del plásmido pUC19 para transformar las bacterias competentes. La eficiencia de transformación se expresó como el número unidades formadoras de colonias (ufc) crecidas en el medio selectivo, correspondientes a bacterias transformadas por μ g de DNA plasmídico utilizado. Generalmente, se alcanzaron valores de eficiencia entre 10^6 y 10^7 ufc/ μ g de DNA.

1.17. Selección de clones recombinantes

En este trabajo se utilizaron sistemas de clonado que permiten la detección de clones recombinantes mediante el ensayo de α -complementación. Estos sistemas utilizan vectores que codifican la región de los 146 aminoácidos del extremo amino (fragmento α) del gen de la β -galactosidasa de *E. coli* (*lacZ*). En este sentido, se utilizaron los plásmidos de la serie pUC y la forma replicativa del fago M13 como vectores; en los cuales el sitio de clonado está ubicado en la región codificante para el fragmento α . De esta manera, las secuencias insertadas en el vector interrumpen el marco de lectura del fragmento α e impiden su expresión. Estos vectores se utilizan para transformar bacterias que codifican la región carboxiterminal del gen de la β -galactosidasa (genotipo *lacZ* Δ M15). La combinación de los fragmentos N terminal y C terminal de la β -galactosidasa posee actividad biológica, lo que permite discriminar entre las bacterias transformadas con vectores con o sin inserto.

De acuerdo a este sistema, las bacterias transformadas con la mezcla de ligación fueron cultivadas en presencia de IPTG (isopropil tiogalactósido), como inductor gratuito del operón Lac, y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-

galactósido) como sustrato sintético de la β -galactosidasa. En este sentido, se prepararon cajas de Petri conteniendo LB-agar (medio LB, agar 1,5%), ampicilina (100 μ g/ml) y adicionadas con X-gal (40 μ g/ml) e IPTG (0,5 mM). Luego de incubar las cajas a 37 °C por 16 hs aproximadamente, se observaron colonias azules y blancas. Las colonias azules corresponden a bacterias que incorporaron el plásmido sin inserto (α -complementación positiva) y las colonias blancas corresponden a bacterias que incorporaron el plásmido recombinante (α -complementación negativa).

1.18. Extracción y purificación de los plásmidos recombinantes

Los clones seleccionados (colonias blancas) fueron sembradas en 10 ml de medio LB-ampicilina y se cultivaron durante toda la noche con agitación, a 37°C. Los plásmidos recombinantes se aislaron por lisis alcalina de las bacterias y precipitación con etanol (Sambrook *et al.*, 1989). El protocolo de *minipreps* (minipreparación) utilizado para la obtención del DNA plasmídico se describe a continuación.

La primer etapa consiste en separar las bacterias del medio de cultivo. Para ello, el cultivo saturado fue transferido a un tubo tipo eppendorf (1,5 ml) y fue centrifugado a 14.000xg por 30 segundos en una microcentrífuga. A continuación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento de bacterias en 100 μ l de solución I (Tris-HCl pH 8 50 mM, glucosa 50 mM y EDTA 5 mM). Para eliminar los restos del medio de cultivo se repitieron los pasos anteriores.

La segunda etapa consiste en producir la lisis de las bacterias. Con este propósito, se agregaron 200 μ l de solución II (NaOH 0,2M y SDS 1%) y se mezclaron suavemente por inversión, hasta que se observó la pérdida de turbidez.

La tercer etapa consiste en separar el DNA cromosomal que permanece asociado a los restos de la membrana plasmática y la pared celular. Para lograr este objetivo, se agregaron 150 μ l de solución III (KAc 3M, ajustado a pH 5,3 con HAc), se mezclaron suavemente por inversión y se incubaron por 5 minutos a 0 °C. Luego, la mezcla fue centrifugada durante 5 minutos y el sobrenadante fue transferido a otro tubo eppendorf.

La cuarta etapa consiste en purificar y concentrar el DNA plasmídico presente en el extracto citoplasmático. Para llevar a cabo la precipitación del DNA, se agregaron 2 volúmenes de etanol 96%, se mezclaron con vortex y se

incubó por 5 min a temperatura ambiente. Luego la mezcla fue centrifugada durante 5 min en microcentrífuga y se descartó el sobrenadante. Seguidamente, el precipitado fue lavado con 1 ml de etanol 70%, se repitió la centrifugación y el descarte del sobrenadante. El tubo abierto se mantuvo a 50 °C durante pocos min para secar el precipitado y eliminar los restos de etanol. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 20 μ l de agua bidestilada estéril.

Con el objeto de obtener una preparación de plásmidos con un grado mayor de pureza, se agregó RNasaA (20 μ g/ml) al sobrenadante transferido en el tercer paso y se incubó durante 30 min para degradar los RNA celulares. Posteriormente, se realizó una extracción de proteínas con una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Para ello, se agregó 1 volumen de esta solución, se mezcló vigorosamente con vortex y se centrifugó durante 5 min. A continuación, se transfiere la fase acuosa a otro tubo y el DNA se concentró por precipitación en presencia de etanol (70%) y NaAc (0,3M). Finalmente, la preparación de DNA, se analizó por electroforesis en geles de agarosa (0,8-1%), en presencia de buffer TAE. Ocasionalmente, los clones se cultivaron en 10 o 100 ml de LB y los plásmidos se aislaron con el mismo protocolo realizado a mayor escala (*midipreps* o *maxipreps*).

1.19. Digestión con enzimas de restricción

La identidad de los clones recombinantes fue confirmada analizando los patrones de restricción para diferentes enzimas. Por lo general, se utilizaron enzimas cuyos sitios de corte se hallan en el sitio múltiple de clonado (*multiple cloning site* o *polylinker*), flanqueando al inserto. Un protocolo típico para digerir plásmidos con enzimas de restricción se detalla a continuación.

DNA plasmídico 1 μ g/ μ l	10 μ l
Buffer de restricción 10X	2 μ l
Enzima de restricción 10 U/ μ l	1 μ l
Agua	7 μ l

La mayoría de las enzimas de restricción funcionan en forma óptima a 37°C y la incubación se realiza durante 2 horas, en el buffer específico para cada enzima. La cantidad de enzima que se utiliza por reacción se calcula de acuerdo a la definición de las unidades enzimáticas: 1U enzimática digiere 1 μ g de DNA en 1 hora.

Los productos de la digestión se analizaron por electroforesis en geles de agarosa nativos. La concentración de los fragmentos de DNA, se estima, en forma aproximada, comparando la intensidad de fluorescencia de los fragmentos de los patrones de peso molecular de concentración conocida.

1.20. Subclonado en M13

En algunos casos el tamaño del cDNA insertado en los plásmidos, hizo necesaria el subclonado para facilitar la secuenciación del mismo. El subclonado se realizó en un vector plasmídico (pUC18) o alternativamente, en los vectores derivados del fago M13 (M13mp18). El genoma de los fagos filamentosos, como el M13, está constituido por una molécula de DNA de simple cadena (+), pero en las bacterias infectadas generan la forma replicativa de doble cadena (RF, +/-) que sirve como molde para la transcripción y la replicación. La principal ventaja del sistema, consiste en que las molécula de DNA de simple cadena resultan un molde óptimo para la reacción de secuencia por el método de Sanger.

Brevemente, el fragmento de cDNA se ligó a las RFs del fago M13; y la mezcla de ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5 α F'. Seguidamente, las bacterias transformadas se mezclaron en un tubo conteniendo 3ml de *top-agar* fundido (medio LB, agar 0,8%), IPTG (0,5mM), X-gal (40 μ g/ml) y 150 μ l de un cultivo saturado de bacterias *E. coli* DH5 α F'. El contenido del tubo se mezcló por vortex, se volcó en cajas con LB-agar y se incubó a 37°C. Al cabo de 18hs. de incubación se observaron placas de retardo de crecimiento blancas (recombinantes) y azules (vectores sin inserto).

Los fagos recombinantes, aislados de las placas blancas, se usaron para infectar cultivos líquidos en fase exponencial, de la misma cepa bacteriana. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron para separar las bacterias infectadas del sobrenadante. Las RFs se purificaron a partir de las bacterias por el método de *minipreps* y la identidad de los clones recombinantes se comprobó por su patrón de restricción. Los fagos se aislaron a partir del sobrenadante, por precipitación en presencia de PEG₈₀₀₀ (5%) y NaCl (0,5M). El DNA genómico se purificó a partir de los fagos, por medio de una extracción fenólica y precipitación en presencia de NaAc (0,3M) y etanol (70%). Finalmente, el DNA de simple cadena obtenido en el pellet se resuspendió en 20 μ l de agua.

1.21. Secuenciación de DNA

Los plásmidos y la forma genómica de los fagos M13 recibieron tratamientos diferentes para ser utilizados como molde, en las reacciones de secuenciación. El DNA de simple cadena se desnaturalizó por calentamiento a 80 °C por 5 min para ser incorporado en la reacción. En cambio, los plásmidos fueron desnaturalizados, previamente, en presencia de NaOH 0,4M y purificados por cromatografía en columna en la resina de exclusión molecular Sepharosa CL-4B (*Miniprep Spun Column*, Pharmacia, Suecia).

Las secuencias nucleotídicas se determinaron por el método de terminación de cadenas (Sanger *et al.*, 1977), usando una forma modificada de la DNA polimerasa del fago T7 (Sequenase™, USB, Cleveland, USA). En el caso de la secuenciación de los fragmentos de DNA clonado, se utilizaron los *primers* "universales" directo y reverso complementarios al sitio de clonado múltiple de los plásmidos pUC y la RF del fago M13. En otros casos, se utilizaron *primers* específicos, diseñados de acuerdo a la secuencia del RNA S del virus Junín MC2; p.ej. para la determinación directa de la secuencia de fragmentos amplificados por PCR.

A continuación se describe un protocolo estándar para la reacción de secuenciación. En principio se mezcló el molde con los *primers* y se incubó durante 2 minutos a 95 °C.

DNA (1µg)	3µl
buffer de reacción 5X	1µl
<i>primer</i> (10ng/µl)	1µl

La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente por 30 min para permitir la asociación de los *primers* con el DNA molde. Durante ese tiempo se preparó la solución de marcación, conteniendo la enzima, los 4 dNTPS (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) y el α [³²P]-dATP.

DTT (0,1M)	2µl
dNTPs (7,5 mM de c/u)	0,8µl
buffer de dilución de la enzima	3,7µl
T7 DNA pol (1,6 U/µl)	0,5µl
α ³² P dATP (400 Ci/mmol, 1µCi/µl)	4µl

La reacción se inició con el agregado de la solución de marcación y continuó, incubando la mezcla durante 2 min a temperatura ambiente.

mezcla de apareamiento	5 μ l
solución de marcación	2,75 μ l

La mezcla de reacción se separa en alícuotas de 1,75 μ l, en cuatro tubos conteniendo 1,25 μ l de cada solución de terminación. Cada una de estas soluciones contiene uno de los 2'3'-dideoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP). La reacción continúa durante 5 minutos a 37°C y luego se detiene con el agregado de 4 μ l solución de finalización (formamida 95%, EDTA 20mM, azul de bromofenol 0,05%, xilen-cianol 0,05%).

Las reacciones de secuencia se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (6%) y urea (50%), en presencia del buffer TBE (Tris 0,9M; ácido bórico 0,9M, EDTA 2 mM pH 8). Las condiciones de la corrida se establecen a una potencia constante de 80W para geles de 60cm de largo. Finalmente, las secuencias se detectan por autorradiografía. Con este objeto, los geles son cubiertos con una película de polietileno y se ponen en contacto con una película radiográfica a -70 °C durante toda la noche, utilizando una pantalla intensificadora. La fijación y el revelado se realizaron en condiciones estándar.

1.22. Reacciones de secuencia con ciclado térmico

Alternativamente, las secuencias nucleotídicas se determinaron por el método de terminación de cadenas en una reacción de ciclado, en presencia de *Taq DNA pol* (fmol™ DNA Sequencing System, Promega, USA). Esta reacción fue utilizada sobre moldes de DNA plasmídico, aislados por el procedimiento de *minipreps* y purificados por precipitación en presencia de PEG₈₀₀₀ (5%) y NaCl (0,5M). Además, este procedimiento fue utilizado para determinar la secuencia nucleotídica de fragmentos de cDNA amplificados por PCR, analizados por electroforesis en geles de agarosa y purificados por el método de adsorción y elución con polvo de vidrio (Geneclean, Bio101, La Jolla, USA).

A continuación se describe un protocolo estándar para llevar a cabo estas reacciones. En comienzo, se preparó una mezcla conteniendo el DNA molde y los *primers*, en presencia de la enzima (*Taq DNA pol*, de grado secuencia) y su buffer específico (Tris HCl 50mM pH 7,5; MgCl₂ 2mM).

DNA molde (0,5µg/µl)	2µl
primer (20ng/µl)	1µl
buffer de marcación 5x	4µl
α ³² PdATP (400 Ci/mmol, 1µCi/µl)	4µl
Taq DNA pol (5U/µl)	1µl
agua	4µl

La mezcla de reacción se separó en alícuotas de 4µl, en cuatro tubos conteniendo 2µl de cada solución de terminación. Cada una de estas soluciones contienen, uno de los 2'3'-dideoxynucleótidos (ddATP 350µM, ddGTP 30µM, ddCTP 200µM, ddTTP 600µM), los 4 dNTPs (20µM) y 7-deaza-dGTP (20µM). Las reacciones se cubrieron con una gota de aceite mineral y se inició el ciclado térmico, de acuerdo al siguiente perfil:

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Etapas
1	92	120	inicio
30	92	30	desnaturalización
	50	60	apareamiento
	72	60	síntesis

Cuando termina el ciclado, las reacciones se completan con el agregado de 3µl de la solución de finalización (NaOH 10mM, formamida 95%, azul de bromofenol 0,05%, xilen cianol 0,05%). Las reacciones se analizaron por electroforesis en geles desnaturizantes y se revelaron por autorradiografía, como se describió anteriormente.

1.23. Clonado de los extremos 5' no codificantes de la cepa XJ#44

La estrategia utilizada consistió en sintetizar el cDNA a partir de RNA viral con AMV-RT, utilizando *primers* específicos marcados en el extremo 5' en presencia de PNK y [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP. El cDNA del tamaño esperado se aisló por electroforesis en geles de poliacrilamida 6% y urea 50%, cortando la banda identificada por autorradiografía y eluyendo del gel por difusión en agua. El cDNA purificado fue tratado con deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) y dCTP, generando una extensión de poli-dC en su extremo 3'. El cDNA extendido se amplificó por PCR con un oligo-dG y el *primer* usado en la extensión. Posteriormente, los fragmentos amplificados se purificaron y se clonaron en el plásmido pUC19. Finalmente, los clones recombinantes se aislaron y purificaron con los procedimientos descritos previamente.

1.24. Análisis y procesamiento de los datos de secuencia

La reconstrucción de la secuencia nucleotídica del RNA S a partir de la secuencia de clones solapados de cDNA pertenecientes a las cepas XJ y XJ#44 se realizó con el programa DNASIS (Hitachi Co., Japón) en una computadora personal.

Su posterior análisis se realizó en una computadora MicroVax 3100 (Digital) con la aplicación de diferentes rutinas del conjunto de programas GCG (Genetics Computer Group, Sequence Analysis Package, Version 7.1, University of Wisconsin, Madison, USA).

Los marcos de lectura abiertos (ORF, *open reading frames*) dentro de las secuencias genómicas fueron ubicados con el programa MAP y la traducción de las secuencias nucleotídicas se obtuvo con el programa TRANSLATE. La predicción de las estructuras secundarias de las proteínas fueron calculadas con el algoritmo de Garnier, Osguthorpe y Robson (G.O.R.) y los datos de hidrofobicidad/hidrofilicidad fueron calculados por el método de Kyte-Doolittle, ambos incluidos en el programa PEPTIDESTRUCTURE y graficados con el programa PLOTSTRUCTURE.

La comparación de las secuencias nucleotídica o aminoácidas, tomadas de a pares, se realizó con el programa GAP. El algoritmo de este programa genera un alineamiento y presenta los valores de similitud e identidad del par de secuencias analizado. En el caso de las secuencias de aminoácidos también se obtiene un valor de similitud entre los polipéptidos analizados

teniendo en cuenta los cambios de aminoácidos según la tabla de PAM y Dayhoff. La comparación simultánea de las secuencias se realizó con el programa PILEUP incorporando *gaps* para optimizar el alineamiento de las secuencias. El número y la longitud de los *gaps* incorporados fueron controlados utilizando los parámetros sugeridos por defecto. Con el objeto de mostrar claramente los alineamientos de secuencias, los mismos fueron procesados con un programa gráfico desarrollado por P.D. Ghiringhelli (no publicado).

Segunda sección

En esta sección se describen las técnicas utilizadas en el análisis filogenético de la familia de los arenavirus. Aparte de las técnicas específicas, se utilizaron otras que fueron descritas en la sección previa, p.ej.: ubicación de los marcos de lectura abiertos, comparación de a pares y múltiples de secuencias.

2.1. Secuencias de arenavirus

Las secuencias nucleotídicas del genoma de los siguientes arenavirus se obtuvieron del GenBank (*National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA*): Machupo (MAC), Tacaribe (TAC), Sabiá (SAB), Pichindé (PIC), Oliveros (OLI), LCM, cepas WE y Armstrong (LCM-we y LCM-ar); Lassa, cepas Nigeria y Josiah (LAS-ni y LAS-jo), Mopeia (MOP). También se obtuvieron las secuencias de los bunyavirus INSV y RVFV, en la misma base de datos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas son: JUN-mc2, D10072; PIC, K02734; TAC, M20304, M65834; MAC, X62616; SAB, U41071; OLI, U34248; LCM-we, M22138; LCM-ar, M20869; LAS-ni, X52400; LAS-jo, J04324; MOP, M33879; INSV, M74904, L20886; RVFV, M11157, X53771. Las secuencias nucleotídicas de las cepas MC2 (JUN-mc2), Candid #1 (JUN-can), XJ (JUN-xj) y XJ#44 (JUN-xj#44) del virus Junín, fueron obtenidas en el laboratorio.

El análisis previo de las secuencias se realizó en una computadora MicroVax 3100 (Digital) con la aplicación de diferentes rutinas del conjunto de programas GCG (Genetics Computer Group, Sequence Analysis Package, Version 7.1, University of Wisconsin, Madison, USA).

Metodológicamente, la primer etapa consiste en la comparación simultánea de las secuencias, correspondientes a las regiones seleccionadas para el análisis. La obtención de alineamientos múltiples se realizó con el programa PILEUP. Inicialmente, se realizó un alineamiento de la secuencia nucleotídica del RNA S de aquellos arenavirus para los cuales se había reportado la secuencia completa: JUN-xj, JUN-xj#44 y JUN-mc2, TAC, SAB, OLI, PIC, LCM-ar, LCM-we, LAS-ni, LAS-jo y MOP. En paralelo, se realizaron alineamientos de la secuencia de aminoácidos deducida para las proteínas N, GPC y sus productos proteolíticos, G1 y G2. El programa PILEUP, además de construir los alineamientos múltiples, genera una representación gráfica (dendrograma), basada en la similitud general, que muestra las relaciones entre las secuencias analizadas.

La comparación de secuencias nucleotídicas o aminoacídicas, tomadas de a pares, se realizó con el programa GAP. Este programa permitió la obtención de los valores de identidad entre las secuencias nucleotídicas del RNA S de los arenavirus. Además, se obtuvieron los valores de identidad y similitud entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas N, GPC y los polipéptidos G1 y G2.

2.2. Análisis filogenético

El análisis filogenético utilizando el enfoque cladista, fue elaborado usando diferentes rutinas del conjunto de programas PHYLIP (Phylogeny Inferencing Package, Version 3.5) sobre los alineamientos de secuencias, en una computadora personal. La secuencia del virus INSV (*Impatiens Necrotic Spot Virus*), un tospovirus de la familia *Bunyaviridae*, fue elegido como grupo de referencia externo (*outgroup*). Alternativamente, se utilizó como *outgroup*, la secuencia del virus RVFV (*Rift Valley Fever Virus*), un phlebovirus de la misma familia. El muestreo sobre los alineamientos de secuencias se realizó por el método de *bootstrapping* con el programa SEQBOOT, durante 100 ciclos consecutivos.

El análisis de parsimonia sobre los alineamientos de secuencias de aminoácidos, se realizó con el programa PROTPARS. Alternativamente, estos alineamientos se analizaron con el programa de construcción de matrices de distancias, PROTDIST, de acuerdo a la tabla de similitudes de aminoácidos de Dayhoff-PAM. A partir del alineamiento de la secuencia nucleotídica del RNA S, se construyó una matriz de distancias con el programa DNADIST, calculadas de acuerdo al modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura. El análisis de parsimonia sobre las matrices de distancia y la generación de los cladogramas correspondientes fue realizado con los programas FITCH y NEIGHBOR. En todos los casos el árbol de consenso se obtuvo por la regla de la mayoría con el programa CONSENSE.

Tercera sección

En esta sección se describen las técnicas utilizadas durante la caracterización molecular de nuevos arenavirus. En esta etapa del trabajo se utilizaron técnicas específicas y otras que fueron descritas en secciones previas, p.ej.: extracción de RNA, síntesis de cDNA, reacciones de PCR, electroforesis de ácidos nucleicos, digestión con enzimas de restricción, clonado y secuenciación de DNA.

3.1. Diseño del RT-PCR-RFLP

Las secuencias nucleotídicas de los RNAs S de los arenavirus Machupo (MAC), Tacaribe (TAC), Sabiá (SAB), Pichindé (PIC), Oliveros (OLI), LCM (LCM-we y LCM-ar), Lassa (LAS-ni y LAS-jo) y Mopeia (MOP) se obtuvieron del GenBank (*National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA*). Los números de acceso en esta base de datos se listaron en la sección anterior.

El análisis previo de las secuencias se realizó con la aplicación de diferentes rutinas del conjunto de programas GCG (Genetics Computer Group, Sequence Analysis Package, Version 7.1, University of Wisconsin, Madison, USA). A partir de la secuencia nucleotídica del RNA S de los arenavirus JUN-mc2 (Junín MC2), JUN-xj (Junín XJ), SAB, TAC, OLI, PIC, LCM-we, LCM-ar, LAS-ni, LAS-jo y MOP; se realizó un alineamiento múltiple con el programa PILEUP. Los parámetros por defecto (Gap Weight = 5, Gap Length Weight = 0.3) fueron utilizados para construir el alineamiento. La secuencia consenso se obtuvo a partir de los alineamientos, con el programa PRETTY.

La determinación de regiones conservadas en el alineamiento múltiple se realizó a partir de la secuencia consenso. Posteriormente, las regiones conservadas fueron utilizadas para diseñar *primers* generalizados para los arenavirus. Los mapas de restricción correspondientes a los fragmentos de amplificación predichos, se calcularon con el programa MAPSORT, para las enzimas *AvaI*, *DdeI*, *DraI*, *HaeIII* y *HinfI*.

3.2. RT-PCR

A partir de las muestras de RNA de los virus JUN-mc2, LCM-we, TAC PAM se sintetizó el cDNA en presencia de los *primers* ARS1, ARS8V y

ARS6C. Los *primers* se listan en la Tabla 1 de la sección de resultados correspondiente.

El ciclado en la PCR para los *primers* ARS1/ARS16V y ARS6C/ARS3V fue como sigue: 2 min a 92 °C, seguido por 35-40 ciclos de 30 seg a 92 °C, 30 seg a 55 °C y 1 min a 72 °C en un ciclador térmico Hybaid (Teddington, UK). Los parámetros de ciclado fueron optimizados para los pares de *primers* ARS16C/ARS8V, ARS8C/ARS6V, ARS6C/ARS3V y ARS3C/ARS1.

Una alícuota de 4 µl de la reacción de PCR se analizó por electroforesis en geles de agarosa (1,5%), teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y fotografiados con una película Polaroid 667.

Denominación	Secuencia (5' → 3')*	⁺ Localización
ARS1	CGCACCGGGGATCCTAGGC	1 y 3647 [‡]
ARS3V	CATGACKMTGAATTYTGTGACA	1117
ARS3C	TCAAAGAGCCKCAGCRTGTC	1154
ARS4C	ATAGCATTYTTGTTGWAATC	1172
ARS5V	AAYTACACMAARTTTTGGTA	1297
ARS6V	RAGAGRCAGGGGARAACCTCC	1465
ARS6C	AATGGAGTGYTRCCCTGCCT	1487
ARS7V	ATACCAACTCAYAGRCACAT	1558
ARS7C	ATGTGYCTRTGAGTTGG	1577
ARS8V	ATRCAGTCWAKCAGTGCACA	1918
ARS8C1	CTGMTGGACTGCATMATGTT	1931
ARS8C2	GTTGMCCCTCACTGTGC	1949
ARS9V	CTGATGTCATCWGAMCCTTG	2134
ARS10C	GCTSCCTCMGRARATGGT	2181
ARS13V	TCMACWATHGTGTTTTCCCA	2546
ARS14C	AKAGRAAYCCTTATGAAA	2650
ARS16V	GGCATWGANCCAACTGATT	3007
ARS16C	CAAYTKAACAATCARTTTGG	3035
ARS17C	GGTGTGTRAGRGTGTTGGGA	3071

Tabla 1.3. *Primers* generalizados para 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 ARS1 es totalmente complementario al extremo 3' de la secuencia genómica del RNA S y parcialmente complementario al extremo 3' de la forma antígenica 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

3.3. RFLP

Los fragmentos de cDNA amplificados fueron fraccionados por tamaño por electroforesis en geles de agarosa y purificados con Nal y adsorción en polvo de vidrio (GeneClean™, Bio101, La Jolla, CA). Los fragmentos eluidos fueron digeridos con la enzima *Hinf* I o, alternativamente, la digestión fue llevada a cabo sobre la reacción de amplificación, ajustando la concentración de MgCl₂ de acuerdo al requerimiento de la enzima. Los productos digeridos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa (4%), teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y fotografiados con transiluminación UV, usando una película Polaroid 667 .

3.4. Clonado y secuenciación

El fragmento amplificado correspondiente al virus Pampa fue insertado por ligación, en un vector pBS KS⁺ modificado (Bluescript™ KS⁺, Stratagene, La Jolla, CA). El pBS KS⁺ fue modificado por digestión con *Hinc* II y tratamiento con *Taq* DNA pol en presencia de dTTP para extender sus extremos 3'. La T extendida en el vector forma un apareamiento con la A no templada presente en el extremo 3' de los fragmentos amplificados por PCR. Las reacciones de ligación se realizaron en presencia de T4 DNA ligase y fueron utilizadas para transformar bacterias *E. coli* DH5 α F'. La selección se llevó a cabo en cajas de LB-agar con Ampicilina, IPTG y X-gal. La secuencia nucleotídica de 5 clones se determinó por el método de Sanger *et al.* (1977) usando *T7* DNA pol (Sequenase™ 2.0, USB, Cleveland, OH) y α³²P-dATP en la mezcla de reacción.

3.5. Aislamiento de virus a partir de roedores capturados

Un programa de captura de roedores está siendo llevado a cabo por el INEVH (Instituto Nacional de Estudio de Enfermedades Virales Humanas, Pergamino, Prov. Buenos Aires) con el objeto de realizar un estudio endemo-epidémico de las enfermedades producidas por arenavirus. En este contexto, se extrajeron muestras de sangre, hígado y cerebro de roedores capturados en el campo, pertenecientes a diferentes especies (*Calomys musculinus*, *Bolomys* sp., *Akodon azarae*, *Mus musculus*, *Oligoryzomys flavescens*). Las muestras se analizan por inmunofluorescencia (IFA) y ELISA dependiendo de las características de las muestras.

En una muestra de tejidos de un roedor *Bolomys sp.*, capturado en Maciel (Prov. de Santa Fé) fue detectado un arenavirus por (IFA) y posteriormente aislado en cultivo de células Vero CCL81 (Calderón *et al.*, 1996). Las células infectadas se lisaron en 1xTCG (Chomczynski y Sacchi, 1987) y las muestras de tejidos fueron homogeneizadas en una solución de 2xTCG (Lozano *et al.*, 1993a, 1993b). Las muestras de RNA en TCG fueron enviadas al IBBM donde se realizaron las últimas etapas de la purificación. Brevemente, el RNA se extrajo por extracciones con fenol, con cloroformo/isoamílico y posterior precipitación con etanol. Esta preparación fue utilizada en las reacciones de RT-PCR-RFLP según los protocolos descritos anteriormente (3.2 y 3.3).

3.6. Análisis de las secuencias

La secuencia nucleotídica del fragmento comprendida entre los *primers* ARS1/ARS16V del aislamiento Pampa fue comparada con la región homóloga de los arenavirus JUN-xj, JUN-mc2, TAC, SAB, OLI, PIC, LCM-ar, LCM-we, LAS-ni, LAS-jo y MOP. Estas comparaciones se realizaron con el programa GAP y se obtuvieron los valores de identidad con cada una de ellas.

Por otra parte, se realizó un alineamiento múltiple de estas secuencias con el programa PILEUP y se generó el dendrograma asociado. De forma semejante, se realizó un alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos deducida para esta región.

El análisis filogenético utilizando el enfoque cladista se realizó procesando los alineamientos generados por el PILEUP, con la aplicación del programa PROTPARS, del conjunto de programas PHYLIP (Phylogeny Inferencing Package, Version 3.5), en una computadora personal.

Cuarta sección

En esta sección se describen las técnicas utilizadas durante el estudio sobre la regulación de la transcripción. En esta etapa del trabajo se utilizaron técnicas específicas y otras que fueron descritas en secciones previas, p.ej.: cultivo de células, propagación de virus, extracción de RNA, síntesis de cDNA, reacciones de PCR y electroforesis de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

4.1. Inhibición de la síntesis de proteínas

Para medir la síntesis de proteínas *in vivo*, se utilizaron ^3H -leucina (^3H -Leu) y ^{35}S -metionina (^{35}S -Met); suministrados por NEN (New England Nuclear, USA). Las células BHK21 se cultivaron en cajas de 10 cm² hasta que la monocapa llegó a ocupar un 50% de la superficie disponible. Los antibióticos puromicina y pactamicina, se adicionaron al medio de cultivo en diferentes concentraciones (100 a 600 µg/ml final) y al cabo de 30 min se adicionaron los aminoácidos marcados radioactivamente (5 µCi/caja).

A diferentes tiempos posteriores al inicio del tratamiento (1, 2, y 8 hpi) se obtuvo el lisado de las monocapas con el agregado de 1ml de SDS 1%. Las proteínas se precipitaron en presencia de 5% de ácido tricloroacético (TCA) y se pasaron a través de filtros de nitrato de celulosa de 45µm. La incorporación de los aminoácidos marcados se detectó por medición de la radioactividad retenida en los filtros, con un contador de centelleo líquido.

4.2. Ensayo de antiterminación *in vivo*

Con el objeto de expresar el gen N en células eucariotas, se construyó el plásmido recombinante pKG4/N, incluyendo el marco de lectura abierto del gen N y las regiones no codificantes, que flanquean al gen en 5' y 3'. La transfección de células BHK21 con el plásmido pKG4/N, permitió la selección de clones (BHK/N-JUN), por su resistencia al antibiótico G418, análogo de la neomicina (Rivera Pomar *et al*, 1991).

Las células BHK21 y BHK/N-JUN fueron cultivadas hasta cubrir un 70% de la superficie disponible, previamente a iniciar el ensayo. Para inhibir la síntesis de proteínas en ambas líneas celulares, se utilizó el antibiótico puromicina en una concentración final de 400 µg/ml. El antibiótico se agregó a

los cultivos 30 minutos antes de la infección y se mantuvo durante el transcurso del experimento. En estas condiciones se obtuvo un 99% de inhibición de la síntesis de proteínas, medido por incorporación de ^{35}S -metionina.

A continuación, las células BHK21 y BHK21/N-JUN tratadas y sin tratar con puromicina, fueron infectadas con el virus Junín MC2. En este ensayo se utilizó una $\text{moi} \approx 10$, para que la infección se desarrolle en forma sincrónica en todas las células de la monocapa.

4.3. Análisis de la transcripción-replicación por RT-PCR

Las células BHK21 y BHK/N-JUN se cosecharon, a varios tiempos pos-infección, para extraer RNA total de las mismas, por el método del isotiocianato de guanidinio (Chomczynski & Sacchi; 1987). En la síntesis de cDNA se usaron los *primers* N1 y G1, de sentido viral (V). En las reacciones de PCR se usaron N1 y G1 en combinación con los *primers* N2 y G2, de sentido viral complementario (VC). La secuencia de los *primers* se describe a continuación:

N1 (5' GGCATCCTTCAGAACAT 3')	V
G1 (5' GAGATCTGGATCCATGGGGCAATTCATCAG 3')	V
N2 (5' CGCACAGTGGATCCTAGGC 3')	VC
G2 (5' CCCCTTAATGTAAACATGGC 3')	VC

Las reacciones de síntesis y amplificación de cDNA por RT-PCR fueron realizadas de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente (Lozano *et al.*, 1993a). Brevemente, las muestras de RNA fueron hervidas en presencia de los *primers* N1 o G1 y sirvieron como molde para la síntesis de la primer cadena de cDNA. La mezcla de reacción se precipitó en presencia de etanol (70%), acetato de sodio (0,2 M) y PAL (2,5 μg). Luego de la centrifugación a 14.000 xg por 15 min, el pellet de cDNA se resuspendió en 10 μl de agua estéril.

Las amplificaciones por PCR se realizaron con los pares de *primers* N1-N2 y G1-G2, incorporando 1/10 de la reacción de cDNA en un volumen final de 10 μl . El perfil de ciclado consistió en 45 ciclos de 15 seg a 92 °C, 30 seg a 50 °C y 90 seg a 72 °C.

Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en un gel desnaturante de poliacrilamida (6%) y urea (50%), en buffer 1xTBE,

sembrando alícuotas de 4 μ l de cada reacción. Los productos se resolvieron luego de 2h a 70 V y se detectaron por tinción con plata (Bassam *et al.*, 1991). De acuerdo a este protocolo, el gel se fija en presencia de HAc (10%), se tiñe en una solución de nitrato de plata y formaldehído (AgNO_3 1g/l, 1,5 ml/l H_2CO) y se revela en presencia de carbonato de sodio, tiosulfato de sodio y formaldehído (Na_2CO_3 30 g/l, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 2 mg/l, H_2CO 1,5 ml/l). Finalmente, el desarrollo de color se detuvo con la solución de fijación y el gel se fotografió con una película Polaroid 667, por transiluminación con luz blanca.

CAPÍTULO 3

ESTUDIO SOBRE LA ATENUACIÓN DE LA VIRULENCIA EN EL VIRUS JUNÍN

INTRODUCCIÓN

Con el objeto de obtener una vacuna para la FHA, se llevó a cabo un proyecto de colaboración entre los gobiernos de Argentina y EEUU, que condujo a la producción de una variante del virus Junín con virulencia altamente atenuada (Barrera Oro & Eddy, 1982). La cepa vacunal, denominada Candid#1, fue probada en numerosos ensayos biológicos y se demostró la ausencia de efectos adversos en monos *Rhesus* (McKee *et al.*, 1985), particularmente, de indicios de neurovirulencia. Posteriormente, pasó exitosamente una serie de ensayos clínicos muy rigurosos realizados en voluntarios, en los EEUU y en la zona endémica de la FHA (Maiztegui *et al.*, 1990). Actualmente, la prevención obtenida por la vacunación y el tratamiento de los pacientes con suero inmune han reducido notablemente la incidencia y la mortalidad de esta enfermedad.

La cepa vacunal se obtuvo a partir del virus Junín XJ (XJ prototipo), aislado de un paciente de FHA, en la ciudad de Junín, Provincia de Buenos Aires (Parodi *et al.*, en 1958). La historia de pasajes de la cepa XJ y la obtención del virus Junín Candid #1 se muestra en la Figura 3.1. La información sobre los pasajes provienen de los registros del Dr. J. Casals (Yale Arbovirus Research Unit, New Haven, Connecticut, USA) y del Dr. J.G. Barrera Oro (USAMRIID, Frederick, Maryland, USA).

La caracterización molecular de la cepa vacunal y de sus antecesores más virulentos, XJ (prototipo) y XJ#44, permite una aproximación sistemática al estudio de las bases de la virulencia en el virus Junín. Este trabajo se enfocó principalmente en el análisis y comparación de la secuencia del RNA S de las cepas relacionadas genealógicamente y de la cepa salvaje MC2, con virulencia intermedia (Ghiringhelli *et al.*, 1991).

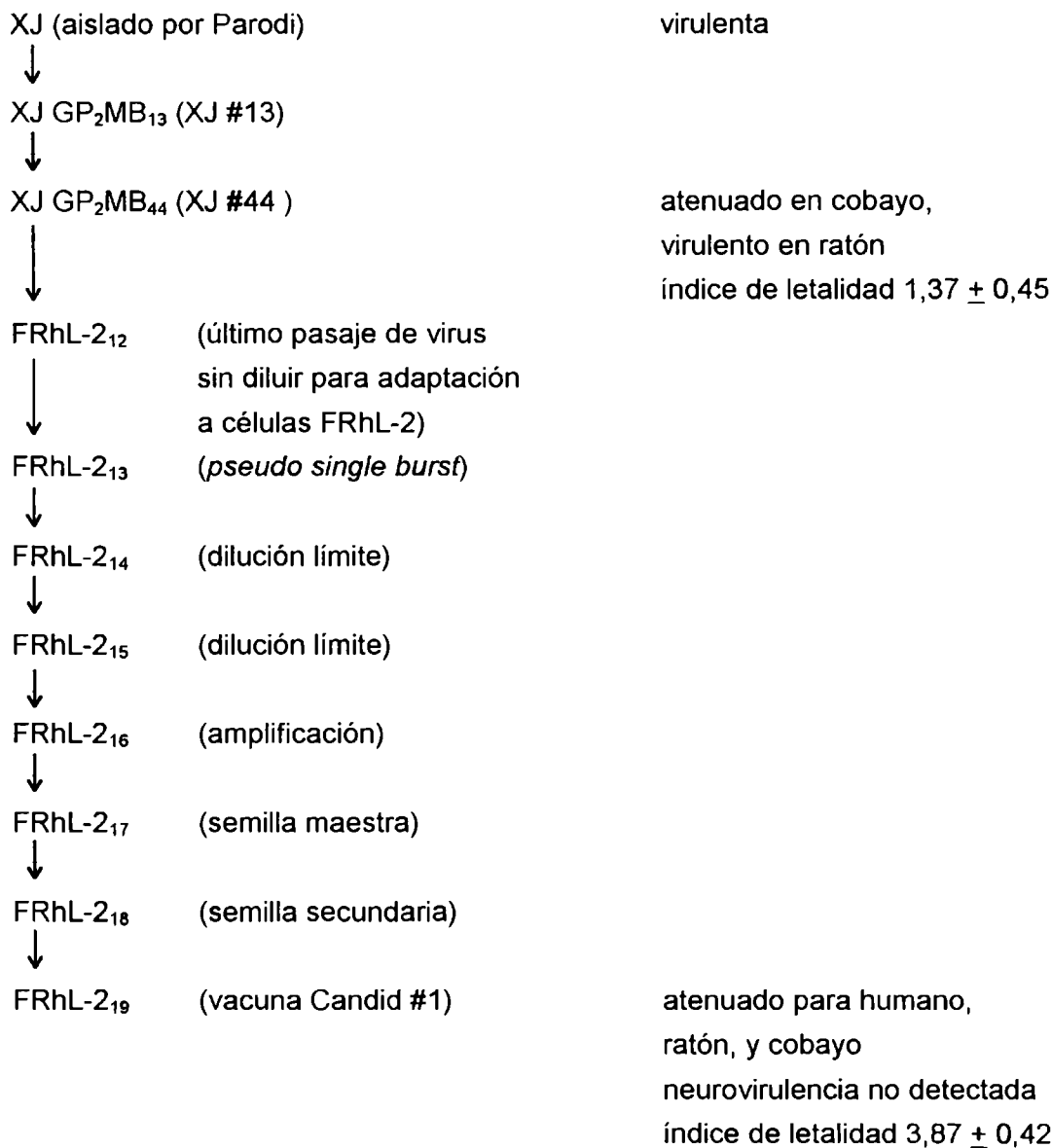


Figura 3.1. Historia de pasajes de la cepa Candid #1. La cepa XJ fué sometida a dos pasajes en hamster (GP₂, *guinea pigs*) y 43 pasajes en cerebro de ratón (MB₄₃, *mouse brain*). El pasaje 43 fué amplificado por inyección en cerebro de ratón, resultando la cepa XJ#44. Este homogenado de cerebro fué usado para infectar células FRhL-2. Después de 12 pasajes, se llevó a cabo una amplificación del inóculo en un ciclo de replicación aproximadamente (*pseudo single burst*), seguido de dos etapas de clonado por dilución terminal. Luego de dos rondas de amplificación sucesivas se obtuvieron la "semilla maestra" y la "semilla secundaria", respectivamente. Finalmente, el *stock* de la vacuna (Candid #1) se obtuvo por una sola amplificación de la semilla secundaria. El índice de letalidad fué calculado como el log₁₀ ufp (unidades formadoras de placas) que producen una DL₅₀ (dosis letal 50%) por inoculación intracerebral en ratón.

RESULTADOS

3.1. Clonado y secuencia nucleotídica del RNA S de las cepas XJ y XJ#44

Durante el desarrollo de este estudio se tomaron precauciones especiales para evitar variaciones genéticas espurias que podrían oscurecer los cambios relevantes para la atenuación de la virulencia. Considerando que los arnavirus son notorios por las variaciones en sus propiedades biológicas basadas en su historia de pasajes (Ahmed *et al.*, 1984), los estudios moleculares sobre las cepas analizadas se llevaron a cabo sobre viriones que poseen un tratamiento semejante al *stock* de la vacuna. Las propiedades podrían cambiar debido a la acumulación de mutaciones en cada pasaje o a la selección de genotipos particulares, cuando los virus se propagan en líneas celulares diferentes.

Por otra parte, la amplificación del cDNA viral por PCR se llevó a cabo utilizando la DNA polimerasa termoestable de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu* DNA pol), debido a su capacidad de corrección de errores de incorporación (actividad exonucleasa 3'-5') incrementada con respecto a la enzima homóloga de *Termus aquaticus* (*Taq* DNA pol). Además, la determinación de las secuencias nucleotídicas por el método de terminación de cadenas, se efectuó sobre un mínimo de dos clones independientes del cDNA.

El RNA de la cepa XJ#44, aislado de los viriones y de células infectadas, fue utilizado en reacciones de amplificación por la técnica de RT-PCR con *primers* específicos. Posteriormente, las reacciones de ligación entre los fragmentos amplificados de cDNA y los vectores plasmídicos, fueron usadas para transformar bacterias. De este modo se obtuvieron clones correspondientes a los genes completos GPC y N (1458 y 1695 pb, respectivamente). También, se obtuvieron clones solapados de menor tamaño (entre 300 y 900 pb) cubriendo la longitud total del RNA S de la misma cepa. Los clones de las regiones no codificantes de los extremos del RNA S, fueron generados a partir del cDNA extendido con poli-dC en su extremo 3' y amplificado por PCR, según se describió en el capítulo de Materiales y Métodos.

Con respecto a la cepa XJ, se obtuvieron varios clones solapados cubriendo el gen GPC y la mitad 3' del gen N mediante la metodología descrita. En cambio, la mitad 5' del gen N y las regiones no codificantes del RNA S de la cepa XJ se obtuvieron por secuenciación directa de los fragmentos de cDNA amplificados por PCR.

También, se aplicó la secuenciación directa de un fragmento amplificado del gen GPC de la cepa XJ#44, para confirmar la información obtenida a partir de dos clones diferentes.

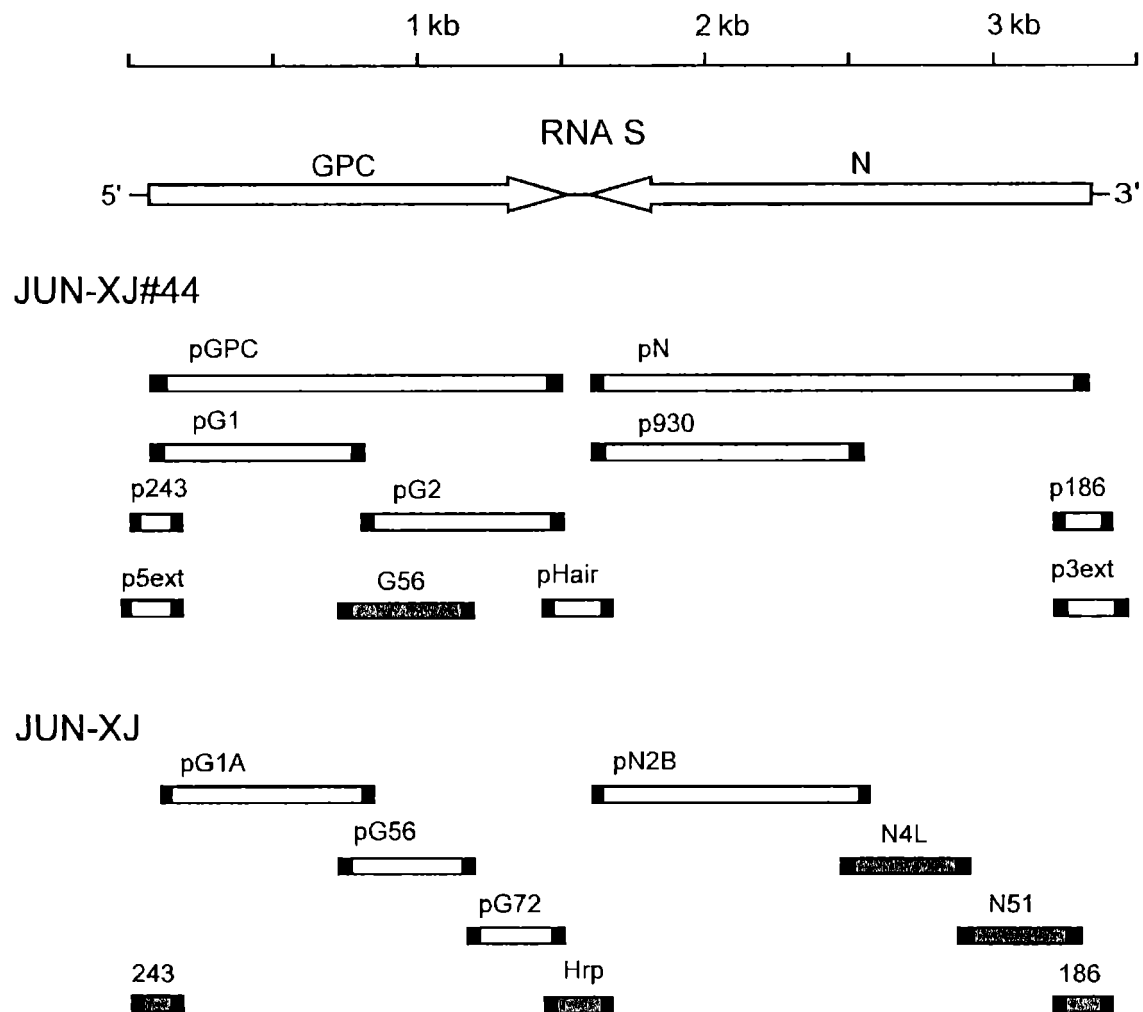


Figura 3.2. Estrategia de clonado y secuenciación del RNA S de las cepas XJ y XJ#44 del virus Junin. El RNA S está representado en sentido viral, con los ORF de N y GPC, indicados por flechas abiertas. Los *primers* usados en la síntesis y amplificación del cDNA se muestran como áreas oscuras en los extremos de cada región amplificada. Los clones de cDNA, amplificados por RT-PCR y secuenciados, están indicados por rectángulos blancos. Además, fueron secuenciados varios clones, similares a los indicados, y subclones de cada región. Los rectángulos sombreados indican fragmentos de cDNA amplificados por RT-PCR y secuenciados en forma directa.

3.2. Comparación de los genes GPC correspondientes a las cepas del virus Junín y otros arenavirus

El alineamiento de la secuencia de nucleótidos correspondientes al marco de lectura abierto (ORF, *open reading frame*) del gen GPC de las cepas XJ (JUN-xj), XJ#44 (JUN-xj44), Candid #1 (JUN-can) y MC2 (JUN-mc2) se muestra en la Figura 3.3. En la Figura 3.4 se muestra el alineamiento de la secuencia deducida para la proteína GPC de las cepas del virus Junín y de los arenavirus Tacaribe (TAC), Pichindé (PIC), Oliveros (OLI), LCM cepas WE y Armstrong (LCM-we, LCM-ar), Lassa cepas Nigeria y Josiah (LAS-ni, LAS-jo) y Mopeia (MOP). Las alteraciones más importantes en las secuencias nucleotídica y aminoacídica, se resumen en la Tabla 3.1 y se describen a continuación.

Las cepas relacionadas cercanamente (XJ, XJ#44 y Candid #1) comparten un patrón común de inserciones y deleciones en la región amino terminal de la GPC (Figuras 3.3 y 3.4), con respecto a la secuencia previamente reportada de la cepa MC2 (Ghiringhelli *et al.*, 1991). El patrón común consiste en 6 inserciones de un nucleótido que cambian la secuencia de aminoácidos de la cepa MC2 (₄₇CSILD → ₄₃LFQFFVF) y una inserción de un bloque de 6 nucleótidos resultando en la inserción de 2 aminoácidos (₅₀LA). Más adelante, 1 transversión y tres inserciones de un nucleótido, cambian la secuencia de aminoácidos (₅₈PR → ₅₈TEE). Otros cambios mayores resultan de tres deleciones de un nucleótido que desplazan el marco de lectura, alterando la secuencia de MC2 en el resto de las cepas (₇₁VPDCVLLQWWVS → ₇₁FQTVSMVGL).

Además, se detectaron 28 sustituciones silenciosas (24 transiciones y 4 transversiones) entre las secuencias comparadas y 4 transversiones que resultan en 4 cambios de aminoácidos propios de cada cepa. Uno de estos cambios (₁₄₈W → R) está compartido por las cepas relacionadas (XJ, XJ#44 y Candid #1), 2 son particulares de Candid #1 (₄₇₃I → F y ₄₉₂S → T) y uno de XJ#44 (₂₆₇L → V). Tres de estos cambios se consideran semi-conservativos de acuerdo a la matriz de Schwartz y Dayhoff (GCG Package).

Como se muestra en la Tabla 3.1, los cambios de nucleótidos entre las cepas relacionadas y MC2 están dispersos en todo el ORF del gen GPC. En contraste, los cambios de aminoácidos se concentran en la región amino proximal de G1. A pesar de que las sustituciones de nucleótidos en G2 no alteran la secuencia de aminoácidos, la presencia de dos cambios de aminoácidos (₄₇₃I y ₄₉₂S) en la región hidrofóbica de G2 en Candid #1 provocan

la pérdida de 4 giros β en la estructura secundaria predicha, cuando se compara con el resto de las cepas (Figura 3.5).

Por otra parte, los cambios de aminoácidos entre las cepas analizadas del virus Junín, no produjeron alteración en los 8 sitios potenciales de N-glicosilación (NX{T/S}), aunque no se conoce si todos ellos son utilizados dentro de las células para la unión de cadenas laterales de oligosacáridos.

Considerando que la proteína GPC del virus LCM es procesada proteolíticamente en la cercanía de $_{262}RR$ (Burns y Buchmeier, 1991), generando los polipéptidos G1 (mitad amino terminal) y G2 (mitad carboxilo terminal), se pueden deducir los sitios homólogos de las cepas del virus Junín, cercanos al $_{293}RR$. En el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los arenavirus (Figura 3.4) se observa que G1 y G2 exhiben grados muy diferentes de homología. Mientras que en G1 hay pocas regiones de secuencia conservada, en G2 hay un alto grado de homología entre los diferentes arenavirus.

(En la página siguiente)

Tabla 3.1. Cambios de nucleótidos y aminoácidos en los genes GPC de las cepas del virus Junín. Se muestran los cambios de nucleótidos y aminoácidos particulares a cada cepa y aquellos compartidos por algunas de ellas. Los cambios de nucleótidos dentro de los codones se indican en negrita. Las inserciones y deleciones de nucleótidos en el extremo 5' del gen GPC son responsables de la secuencia particular en la cepa MC2. El patrón de cambios de la cepa MC2 con respecto a Candid #1 fue asociado, preliminarmente, al fenómeno de atenuación de la virulencia en esta última. El análisis de las secuencias correspondientes a las cepas XJ y XJ#44 permitió desechar la hipótesis mencionada.

Tabla 3.1.

Posición			Nucleótido				Codón				Aminoácido			
mc2	can	xj44 y xj	mc2	can	xj44	xj	mc2	can	xj44	xj	mc2	can	xj44	xj
214	216	215			U									
218	221	220			C									
225	229	228	--		ins. U		--				CSILD			LFQFFVF
226	231	230			U									
228	234	233			U									
229	236	235			C									
234	242	241	--		(ins. bloque)		--				--			LA
235	243	242			CUCGCA									
247	260	259	C		A									
248	262	261			A						PR			TEE
250	265	264	--		ins. A									
252	268	267			A									
280	295	294	G								VPDC			FQTV
300	314	313	U		del.						VLLQ			SFSM
319	332	331	U								WWVS			VGL
502	515	514	A		U		AGG		UGG		R			W
745	758	757		C	G	C	CUC		GUC	CUC		L		V L
822	835	834			U	C	UCU		UCC					S
825	838	837			A	G	UUA		UUG					L
837	850	849			U	C	UUU		UUC					S
847	860	859			C	U	CUG		UUG					L
870	883	882			C	U	GAC		GAU					D
909	922	921			U	A	GUU		GUA					V
958	971	970			C	U	CUG		UUG					L
988	1001	1000			C	U	CUG		UUG					L
1027	1040	1039			U	C	UUA		CUA					L
1065	1078	1077			A	G	GGA		GGG					G
1080	1093	1092			G	C	GCG		GCC					A
1123	1136	1135		U	C	U	C	UUG	CUG	UUG	CUG			L
1239	1252	1251		U	C	U	C	AUU	AUC	AUU	AUC			I
1264	1277	1276		C	U	C	U	CUA	UUA	CUA	UUA			L
1323	1336	1335		C	U	C	U	GGC	GGU	GGC	GGU			G
1332	1345	1344		C	U	C	U	CCC	CCU	CCC	CCU			E
1354	1367	1366		U	A	U		UUU	AUU	UUU		F	I	F
1383	1396	1395		C	A	C	A	UCC	UCA	UCC	UCA			S
1404	1417	1416		C	U	C	U	GGC	GGU	GGC	GGU			G
1411	1424	1423		A	U	A		ACC	UCC	ACC		T	S	T
1416	1429	1428		U	C	U	C	CAU	CAC	CAU	CAC			H
1419	1432	1431		G	A	G	A	AGG	AGA	AGG	AGA			R
1428	1441	1440		A	G	A	G	AGA	AGG	AGA	AGG			R
1434	1447	1446		G	A	G	A	GAG	GAA	GAG	GAA			E
1444	1457	1456		C	U	C	U	CUG	UUG	CUG	UUG			L
1449	1462	1461		C	A	C	A	CCC	CCA	CCC	CCA			P
1456	1469	1468		C	U	C	U	CUA	UUG	CUA	UUG			L
1458	1471	1470		A	G	A	G							
1461	1474	1473		U	C	U	C	AAU	AAC	AAU	AAC			N
1521	1534	1533		C	U			CGC		CGU				R

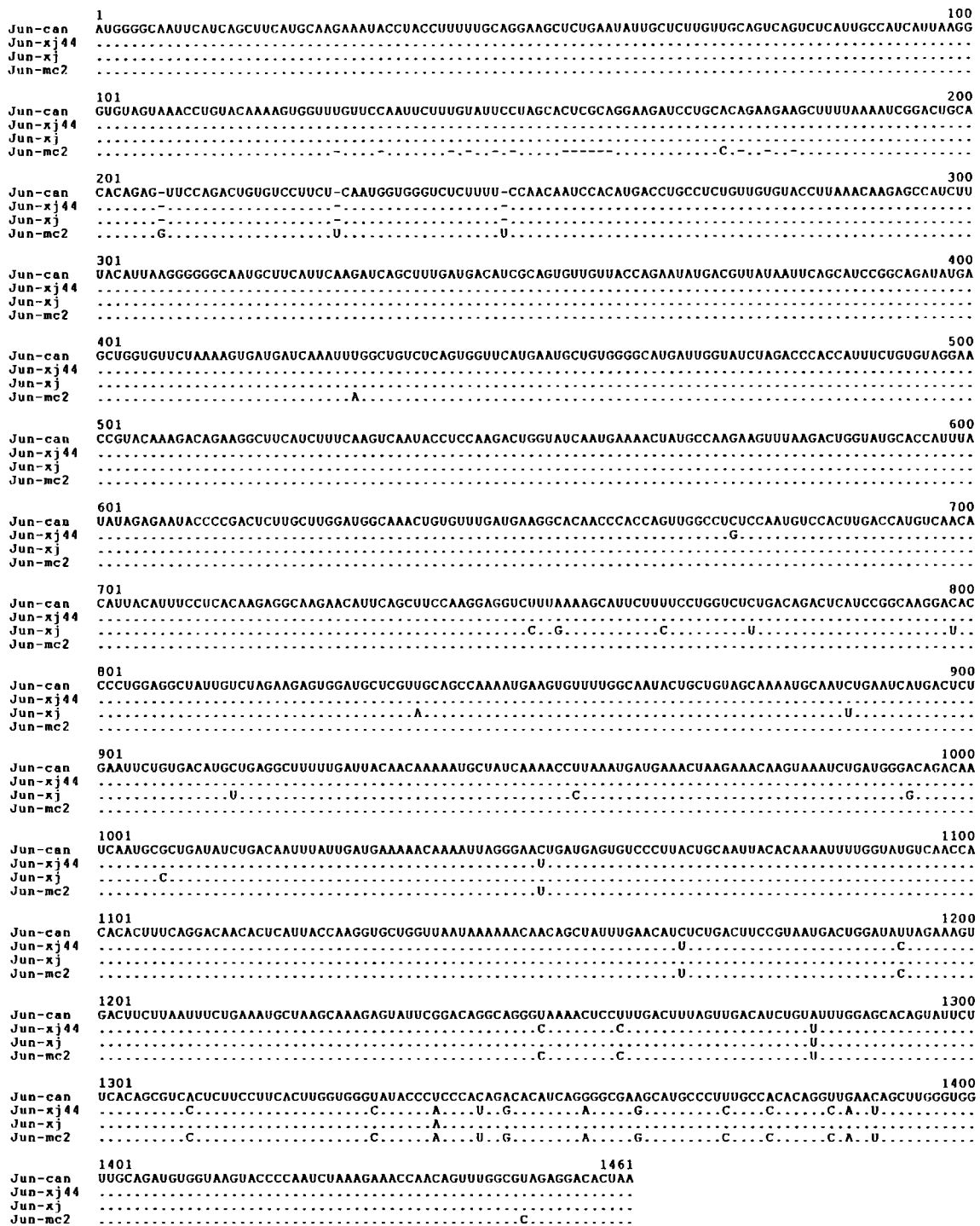


Figura 3.3. Comparación de la secuencia nucleotídica del gen GPC de las cepas del virus Junín. Las secuencias de las cepas Candid #1, XJ44, XJ y MC2, fueron alineadas en sentido viral, desde el codón de iniciación hasta el codón de terminación. La secuencia de Candid #1 fué utilizada como referencia; los nucleótidos homólogos en las otras secuencias están indicados por puntos y solamente se muestran los cambios. En la región 5' del gen GPC se puede notar el patrón común de inserciones y deleciones en la secuencia de las cepas relacionadas genealógicamente (XJ, XJ44 y Candid #1).

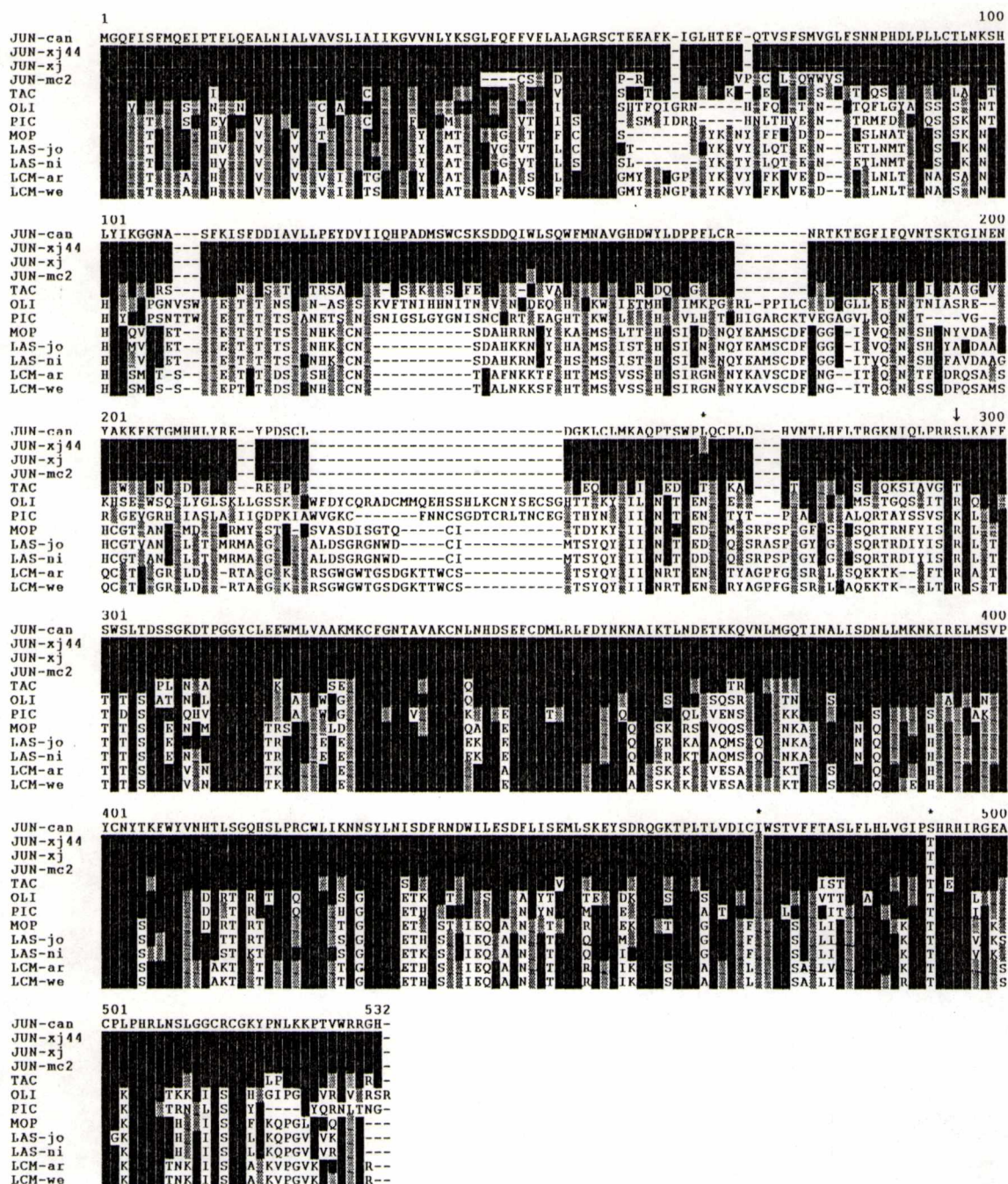


Figura 3.4. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína GPC de los arenavirus. La secuencia de Candid #1 fué utilizada como referencia para resaltar los cambios de XJ#44 y XJ con respecto a la misma. Los aminoácidos idénticos a aquellos de la secuencia de referencia son indicados por bloques negros y aquellos que representan cambios conservativos se muestran como áreas sombreadas. La posición aproximada del sitio de clivaje proteolítico está indicado por una flecha (↓). Los asteriscos indican diferencias en las secuencias de las cepas del virus Junín. En la región NH₂ de la proteína GPC se puede notar el patrón común en

la secuencia de las cepas del virus Junín relacionadas genealógicamente. En general, se puede observar un grado mayor de homología en la región G2.

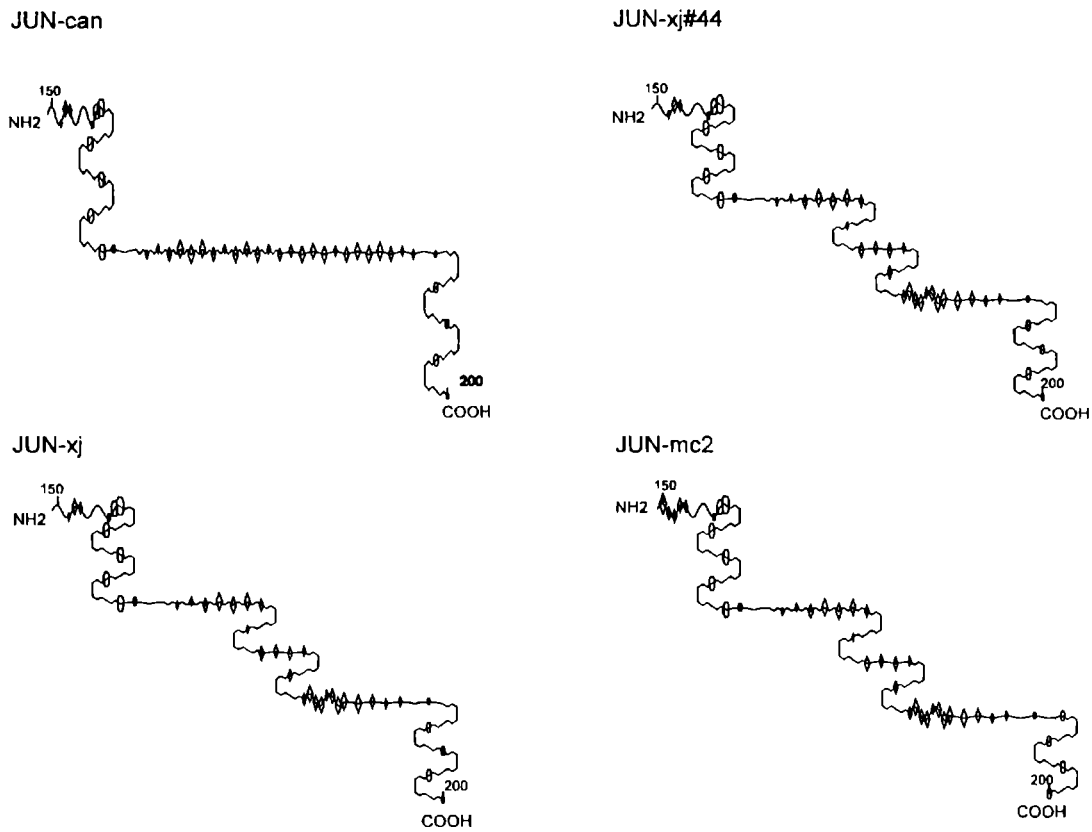


Figura 3.5. Cambios estructurales en la proteína G2 de las cepas del virus Junín. La estructura secundaria fue calculada con el algoritmo de Garnier-Osguthorpe-Robson (GCG Version 7.0). El gráfico presenta la región entre los residuos 150 y 200 de G2 de las cepas Candid #1, XJ#44, XJ y MC2. Los rombos y los octágonos indican residuos aminoacídicos hidrofóbicos e hidrofílicos, respectivamente. El cambio en la topología del gráfico de Candid #1 se debe a la ausencia de cuatro girqs β , que se hallan presentes en las otras. La misma región es abundante en residuos hidrofóbicos y se postula su asociación transmembrana.

3.3. Comparación de los genes N de las cepas del virus Junín y otros arenavirus

El alineamiento de la secuencia de nucleótidos correspondientes al marco de lectura abierto (ORF, *open reading frame*) del gen N de las cepas del virus Junín (JUN-xj, JUN-xj#44, JUN-can y JUN-mc2) se muestra en la Figura 3.6. Las alteraciones en las secuencias nucleotídica y aminoacídica se resumen en la Tabla 3.2 y se describen a continuación.

En el alineamiento de las secuencias codificantes para el gen N de las cepas del virus Junín no se detectaron inserciones o deleciones de nucleótidos (Figura 3.6). No obstante se pueden observar 15 sustituciones silenciosas de nucleótidos (14 transiciones y 1 transversión) y 15 sustituciones adicionales (6 transiciones y 9 transversiones) que resultan en 13 cambios específicos de aminoácidos (Figura 3.7). Nueve de estos cambios son compartidos por las tres cepas relacionadas dos son particulares de XJ ($_{59}R \rightarrow K$ y $_{91}A \rightarrow V$), uno es compartido por XJ y XJ#44 ($_{111}T \rightarrow N$) y uno es específico de Candid #1 ($_{47}E \rightarrow V$). Cinco de estos cambios son considerados semiconservativos de acuerdo a la tabla de Schwartz y Dayhoff.

Por otra parte, la carga positiva de la proteína N (p.ej. +12 para MC2) es un reflejo de la abundancia relativa de los aminoácidos básicos K y R, dispersos en su estructura primaria. En este sentido, la carga eléctrica neta a pH 7 cambia de +10 en XJ y XJ#44 a +9 en Candid #1.

En la Figura 3.7 se muestra el alineamiento de la secuencia deducida para la proteína N de las cepas del virus Junín (JUN-xj, JUN-xj#44, JUN-can y JUN-mc2) y del resto de los arenavirus (Machupo, MAC; TAC; PIC; OLI; LCM-we; LCM-ar; LAS-ni; LAS-jo; MOP). En este alineamiento se observan varias regiones bien conservadas, lo cual refleja la extensa reactividad inmunológica cruzada de este antígeno de grupo.

El cambio de aminoácidos específico de Candid #1 en la región amino terminal de la proteína N resulta en la pérdida de 2 giros β en la estructura secundaria predicha, cuando se compara con el resto de las cepas (Figura 3.8).

Posición				Codón				Aminoácido			
mc2	can	xj#44	xj	mc2	can	xj#44	xj	mc2	can	xj#44	xj
	96				AAA		AAG				K
	144				AGU		AGC				S
	150				UUU		UUC				F
	168				UCG		UCA				L
	175				CUG		UUG				L
	207				AUU		AUC				I
	221				GUG	GAG	GUG	V	E		V
	257				AGG		AAG		R		K
	342				ACG	ACA					T
	353				GCG		GUG		A		V
	371				GUU	GAU		V			D
	375				GAG		GAA				E
	377				CGG	CUG		R			L
	395				CGG	GAC		G			D
	401				GGG	GAG		G			E
	405				AAU	AAA		N			K
	413				ACC	AAC			T		N
	418 / 420				UUU	AUU	AUA	F			I
	444				CAA	CAG					Q
	468				UCU	UCC					S
	471				CAG	CAA	CAG				Q
	480				CUG	CUU					L
	483				GCC	GCU					A
	486				AAG	AAA					K
	848				GAU	GGU		D			G
	1277 / 1278				AGC	AAG		S			K
	1279				AAG	CAG		K			Q
	1536				UUC	UUU					F
Carga neta a pH 7								+12	+9		+10

Tabla 3.2. Cambios de nucleótidos y aminoácidos en los genes N de las cepas del virus Junín. Se muestran los cambios de nucleótidos y aminoácidos particulares a cada cepa y aquellos compartidos por algunas de ellas. Los cambios de nucleótidos dentro de los codones se indican en negrita. Se puede notar la ausencia de inserciones y deleciones de nucleótidos en este gen y las sustituciones de aminoácidos que provocan los cambios en la carga neta.

(En la página siguiente)

Figura 3.6. Comparación de la secuencia nucleotídica del gen N de las cepas del virus Junín. Las secuencias de las cepas Candid #1, XJ#44, XJ y MC2, fueron alineadas en sentido viral, desde el codón de iniciación hasta el codón de terminación. La secuencia de Candid #1 fué utilizada como referencia; los nucleótidos homólogos y los cambios se muestran como en la figura 2.

```

1 100
Jun-can AUGGCACACUCCAAAGAGGUUCCAAGCUUUAGAUGGACUCAGUCCUU AAGGAGAGGUUUGAGUCAUUUACUCAGACUGUCAAGUCGGAUGUUCUGAAGG
Jun-xj 44 .....G.....C.....C.....A.....U.....
Jun-xj .....G.....C.....C.....A.....U.....
Jun-mc2 .....G.....C.....C.....A.....U.....

101 200
Jun-can AUGCCAAGCUAAUUGCUGACAGCAUUGACUUAACCAAGAGGCACAGGUGCAGCGGGCACUCAGAAAGACUAAAAGGGGGGAAGAAGACCUCUAUUAAGUU
Jun-xj 44 .....U.....A.....
Jun-xj .....C.....C.....U.....A.....
Jun-mc2 .....U.....U.....A.....

201 300
Jun-can GAGGGACCUGAAUAAAGAGGUUGACAGACUCAUGUCCAUAGGAGUGUUAACGAAACACAGUUUCAAGGCGGGAGAUUGGGGAGGAUGAGCUGAUG
Jun-xj 44 .....U.....A.....
Jun-xj .....C.....C.....U.....A.....
Jun-mc2 .....G.....U.....A.....

301 400
Jun-can GAGUUGGCGUCGACCUUGAGAAAUAAAAACCAAGAUUAGAAGACAGAGACAGGCUCUCAAGGGGUUACAUUGGUAAUCUUGUCUAAUCACAAUCGG
Jun-xj 44 .....A.....G.....
Jun-xj .....G.....A.....A.....G.....C.....G.....U.....
Jun-mc2 .....G.....G.....U.....A.....U.....G.....

401 500
Jun-can CCAAGAGAUACAGAUUUGAGAACACUGGGAUUUACAGCAAGGAACUGGGGAAUUGGUGGAGGGUUAUGGAUGUUAAAGAUCCUUCAAAACU
Jun-xj 44 .....U.....A.....
Jun-xj .....U.....A.....
Jun-mc2 .....U.....A.....

501 600
Jun-can UAAACAUCAGUUUGGUUCUGUCCUGCAUUGACAUUGCAUUGCAUGACUGUUAAGGAGGUGAGACAUAAGACAGUGUCAACAGGCUUUAACCCUCUCU
Jun-xj 44 .....
Jun-xj .....
Jun-mc2 .....

601 700
Jun-can GGGCUUCUUAUACACUGUAGUAUCCAAAUCUUGAGUGACCUUGACAGAUUGACUCAGGAACAUAGACUGCCUCCAGAUUGUGACUAAGGAUGAAAGCUCCA
Jun-xj 44 .....
Jun-xj .....
Jun-mc2 .....

701 800
Jun-can UCAACAUUUCUGGCUACAACUUAUAGUCUUUACAGCUGCAGUAAAGGCGUGGCAUCCAUUUGAUGGUGGAAAUUUGUUGGAGACAUCAGAGUCACCC
Jun-xj 44 .....
Jun-xj .....
Jun-mc2 .....A.....

801 900
Jun-can AGAAUACUUUUCUCCCUCAUAAAAUCAACCAUUCAGGUUAAACGAAGAGAAGGCAUGUUUAUUGAUGAGAAACCAGGCAUAGAAACCCUUUAUGAAAAC
Jun-xj 44 .....
Jun-xj .....
Jun-mc2 .....

901 1000
Jun-can CUUCUGUACAAACUUGCCUUCUGGCGAUGGUUGGCCUUUAUUAUUGGUUCCAGAUACAAAUCAUAGGCAGGUCAUGGGACAACAAAGUUAUUGAUCUGA
Jun-xj 44 .....
Jun-xj .....
Jun-mc2 .....

1001 1100
Jun-can CARGGAAACCAGUUGCUGGACCUAGACAACCGGAAAAGAACGGUCAGAAUUGAGAUUGGCUAACUUGACAGAGAUACAAGAAGCUGUCAUCAGAGAGGC
Jun-xj 44 .....
Jun-xj .....
Jun-mc2 .....

1101 1200
Jun-can AGUGGGAAACUCGACCCCAAAUACCCUUGGCCUCGACAUUGAAGGACCGUACUCAGCCUUGUUGAUGGGGUUGUCCAGCCUCAGGUAAAGCAG
Jun-xj 44 .....
Jun-xj .....
Jun-mc2 .....GCA..

1201 1300
Jun-can UAUUUUACUGCUUCAGAAAACCAUGAUGAGAAAGGUUUAAAAUUGUAGCAGACUCUCAGGCAUCUUAAUGAAAGACAUAGAAGUCCAUUGC
Jun-xj 44 .....
Jun-xj .....
Jun-mc2 .....

1301 1400
Jun-can CAGGAGUUCUUAAGUACGUGAUUGGCUUGCUGCCUCGGACAUGGUUGGACCAUAGGGUCCGAGACAUAGGAAGUUGUUGACCUCUAGGAAAG
Jun-xj 44 .....
Jun-xj .....
Jun-mc2 .....

1401 1500
Jun-can AAGAGAUUUUAGCUGGUUGAUUGUAGGCUUACAUACAGAACAAAGCCAGGCAUUGACCAACAGGUCUGGGAGAAAUUUGGCCACCUAUGCAAACUAC
Jun-xj 44 .....
Jun-xj .....
Jun-mc2 .....C.....

1501 1600
Jun-can AAUGGAGUGGUUGUCAGCAAGAAAAGAGAGAUUAGGAUGCUCUCCUUUAAGUUGGCCUCCAGUAGCCACACUGUGCUCUGUAGACUGCAUUAUGUUUC
Jun-xj 44 .....
Jun-xj .....
Jun-mc2 .....

1601 1695
Jun-can AGUCAGUUGGAGGGGAGCUCUAUGAAGAAGAACUACACCUCUUAUUACCACCGAGCUGUUGCCUCCCGAAGGCAGCCUUAUGCACUGUAA
Jun-xj 44 .....
Jun-xj .....
Jun-mc2 .....

```

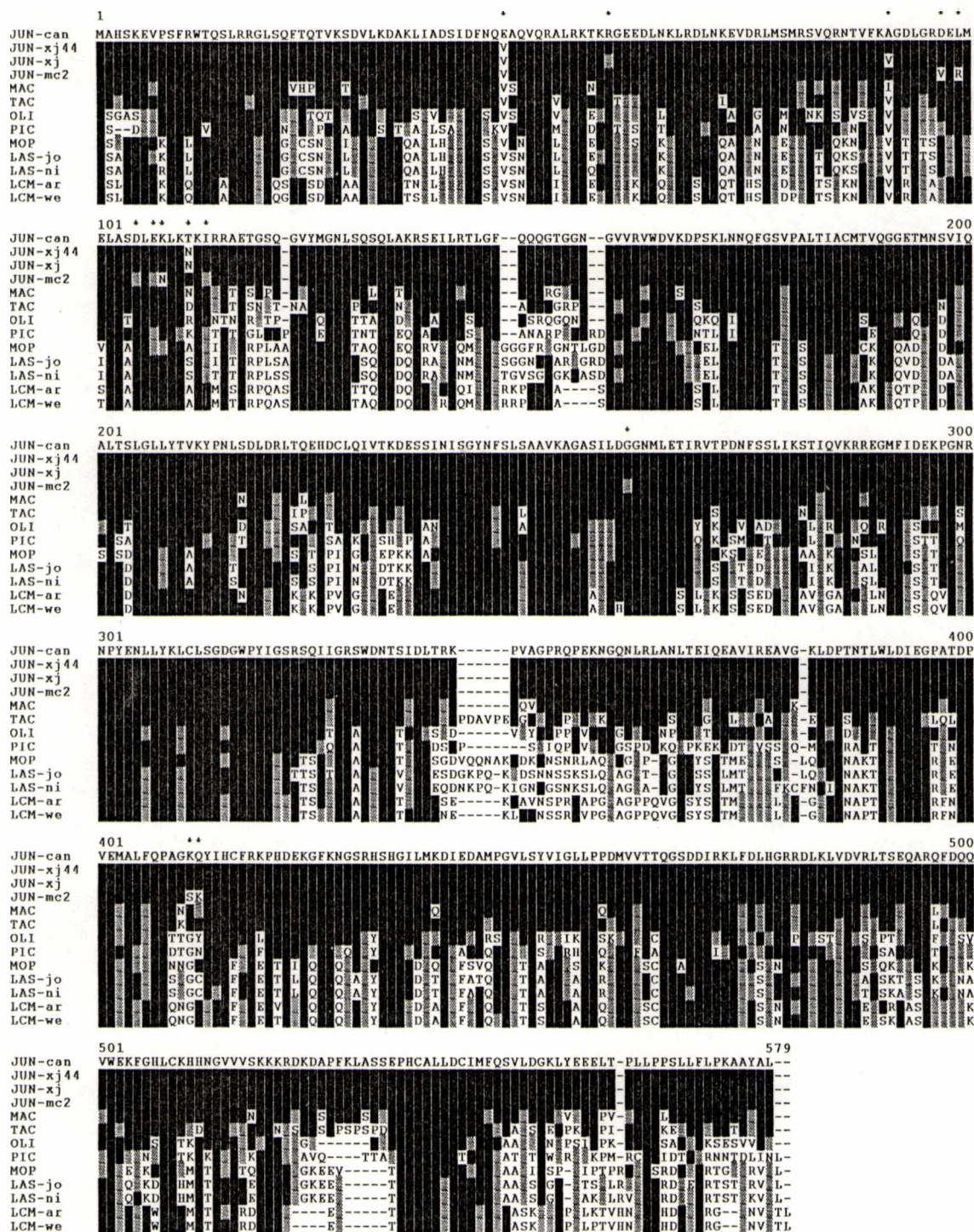


Figura 3.7. Comparación de la secuencia de la proteína N de los arenavirus. La secuencia de Candid #1 fué utilizada como referencia para resaltar los cambios de XJ#44 y XJ con respecto a la misma. Las identidades y homologías con respecto a la secuencia de referencia se indican como en la figura 3. Los asteriscos indican diferencias en las secuencias de las cepas del virus Junín. Se puede observar un alto grado de homología entre los arenavirus a través de toda la proteína N.

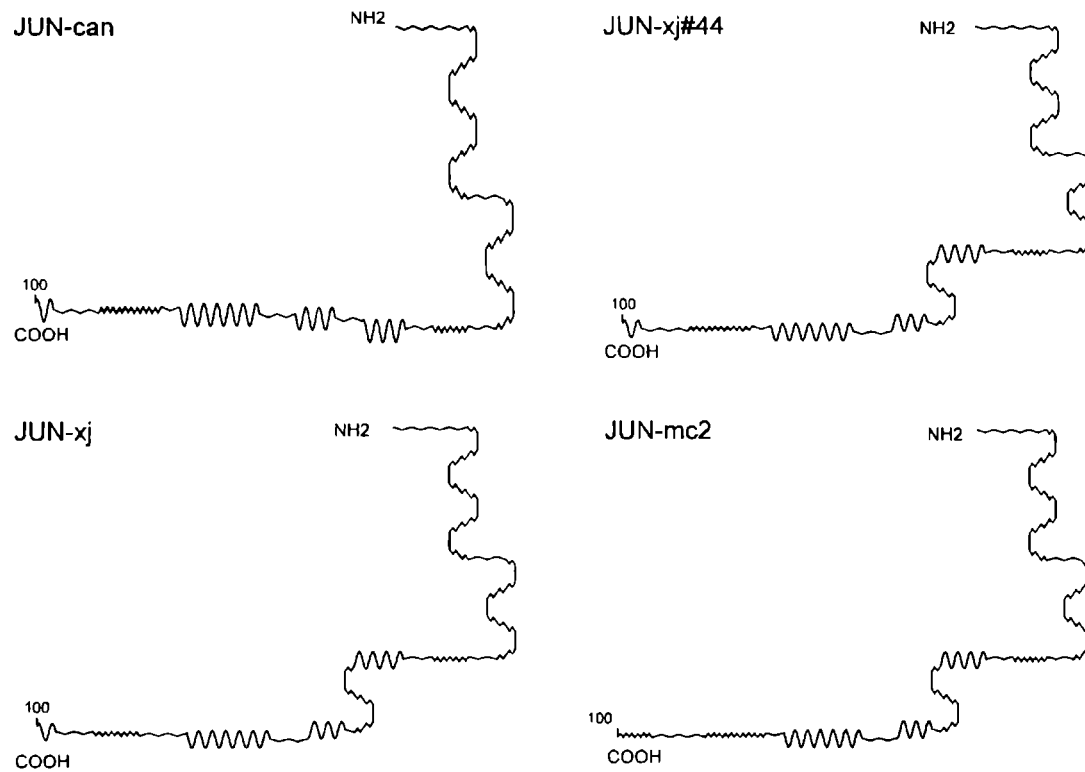


Figura 3.8. Cambios estructurales predichos para la proteína N de las cepas del virus Junín. La estructura secundaria fue predicha con el algoritmo de Garnier-Osguthorpe-Robson (GCG Version 7.0). El gráfico presenta los aminoácidos entre los residuos 1 al 100 de la región G2 de las cepas Candid #1, XJ44, XJ y MC2. El cambio en la topología del plot de Candid #1 se debe a la ausencia de dos giros β , que se hallan presentes en las otras.

3.4. Comparación de las regiones no codificantes

El análisis de la secuencia nucleotídica de la región intergénica del RNA S reveló un 100% de homología entre las cepas XJ y Candid #1 del virus Junín. Por lo tanto, el rol de esta región en el fenómeno de atenuación del grupo de virus analizado fue descartado. Además, ninguno de los cambios menores entre la secuencia de estas cepas con respecto a MC2, alteran la estabilidad termodinámica de la estructura secundaria (doble *hairpin-loop*) predicha para esta región.

Por otra parte, cuando se analizó la región 5' no codificante del RNA S de a la cepa XJ#44, se observaron variaciones menores en la secuencia de clones independientes (Figura 3.9). Con el objeto de simplificar el análisis, se generó la secuencia consenso para esta región de la cepa XJ#44, y se incluyó en un alineamiento múltiple junto con las secuencias correspondientes al resto de las cepas (Figura 3.10). La secuencia de XJ reveló un 100% de homología con el consenso de XJ#44; mientras que Cd#1 se diferencia de las anteriores, por una transición y una delección.

En este punto cabe recordar el procedimiento técnico utilizado en la obtención de las secuencias de los extremos del RNA S correspondientes a las cepas XJ#44 y XJ. Como se describe en la sección de materiales y métodos, el cDNA correspondiente a los extremos 5' y 3' del RNA S de la cepa XJ#44, fue sintetizado por extensión de *primers* y tratado posteriormente, con transferasa terminal, para agregar una cola de poli-dC (*tailing*). Posteriormente, el cDNA fue amplificado con un *primer* específico y un poli-dG; a su vez los fragmentos amplificados fueron clonados en vectores plasmídicos. De este modo, la información sobre esta región se obtuvo a partir de la secuencia de clones independientes. En cambio, la información sobre los extremos del RNA S de la cepa XJ, fue obtenida por secuenciación directa de los fragmentos amplificados por RT-PCR, utilizando solamente, *primers* específicos.

Asimismo, cuando se analizó la región 3' no codificante del RNA S, se observaron variaciones en la secuencia de clones de la cepa XJ #44 y diferencias de una cepa a otra. Examinando la secuencia de dos clones de la cepa XJ#44, uno de ellos resulta idéntico a la cepa XJ y el otro a la cepa MC2 (Figura 3.11).

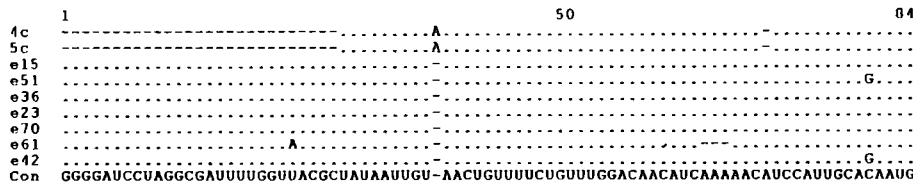


Figura 3.9. Análisis de la secuencia de la región 5' no codificante de XJ#44. El alineamiento múltiple de las secuencias 5' no codificante, obtenidas a partir de clones independientes, permite obtener el consenso para esta región. Las secuencias cuya denominación comienza con "e" corresponden a moléculas de cDNA extendido por *tailing*, amplificado por PCR y clonado. El resto corresponde a clones de cDNA, sin extender, que fueron amplificados con *primers* específicos.

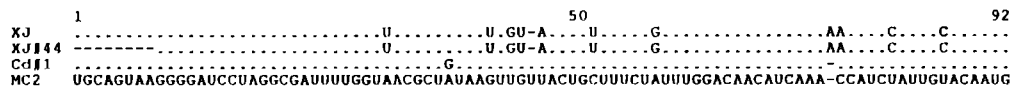


Figura 3.10. Comparación de la secuencia nucleotídica de la región 5' no codificante. En esta comparación de las secuencias correspondientes a las cepas del virus Junín, se puede observar la identidad completa entre el consenso de XJ#44 y la secuencia de la cepa XJ.

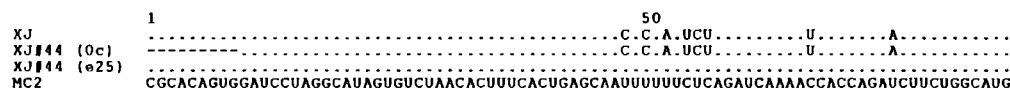


Figura 3.11. Comparación de la secuencia nucleotídica de la región 3' no codificante. En esta comparación de las secuencias correspondientes a las cepas del virus Junín, se pueden observar diferencias importantes en dos clones de la cepa XJ#44.

DISCUSIÓN

Este trabajo se enfocó principalmente, en la obtención y el análisis de la secuencia nucleotídica del RNA S de las cepas XJ y XJ#44 del virus Junín. La caracterización molecular de estas cepas con diferente grado de virulencia y su comparación con la información disponible sobre la cepa vacunal, Candid #1 y la cepa salvaje, MC2, permitiría una aproximación sistemática en la determinación de las bases de la virulencia.

Hasta el momento, no se ha establecido con claridad 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 la infectividad, en general, y el tropismo tisular, en particular.

En este sentido, cuando se comparó la secuencia de aminoácidos de la región cercana al extremo amino del polipéptido G1, de la cepa Candid #1 y la cepa salvaje MC2, se encontró un conjunto de alteraciones importantes. Estos cambios en la secuencia de la cepa vacunal fueron correlacionados, tentativamente, con su fenotipo atenuado (Ghiringhelli *et al.*, 1996). Las evidencias obtenidas en el presente estudio, mostraron que las cepas virulentas (XJ y XJ#44) comparten el patrón de secuencia en esta región, con la cepa atenuada Candid #1. Consecuentemente, el marcador de atenuación propuesto, inicialmente, ha sido descartado.

Sin embargo, la sustitución de, tan sólo, dos aminoácidos en el polipéptido G2 provoca un cambio notable en la estructura secundaria predicha para esta proteína de la cepa vacunal. Este dato podría ser considerado como un marcador genético de la cepa Candid #1, que probablemente se relacione con su fenotipo característico. Esta consideración no excluye posibles cambios en otras regiones genómicas no analizadas en este trabajo.

Coincidentemente con los reportes sobre otros sistemas virales, los resultados preliminares de este estudio sugieren la participación de las glicoproteínas de superficie en la atenuación de la virulencia. En este sentido, se han obtenido evidencias experimentales sobre la relación entre la alteración de las proteínas de superficie y la atenuación de la virulencia para las cepas vacunales, Sabin tipo1 y 3, del virus de la polio y 17D, del virus de la fiebre

amarilla (Hahn *et al.*, 1987; Tatem *et al.*, 1992). Del mismo modo, se encuentran numerosos reportes en la literatura, sobre los efectos profundos en la virulencia y el tropismo tisular provocados por sustituciones de aminoácidos en las proteínas de la envoltura de reo, rhabdo, toga, bunya y picornavirus (Spriggs *et al.*, 1983; Vрати *et al.*, 1986; Takehara *et al.*, 1989; Prehaud *et al.*, 1990; Polo *et al.*, 1991; Jensen *et al.*, 1993). Además, la literatura indica que el clivaje proteolítico de la glicoproteína de superficie se relaciona el tropismo y la virulencia en parmyxo 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 ortomyxo y togavirus, y el fenómeno de atenuación (Despande *et al.*, 1987; Zheng *et al.*, 1989).

En este sentido, no se han observado cambios de aminoácidos cercanos al sitio de clivaje del precursor de las glicoproteínas, en las cepas del virus Junín. Por otra parte, las cepas del virus Junín presentan un grado de conservación muy estricto en los sitios de N-glicosilación de esta proteína. Por lo tanto, se puede concluir que el clivaje del precursor GPC y su patrón de glicosilación no se relacionan con la atenuación de la virulencia en las cepas estudiadas.

Por otro lado, las diferencias en la secuencia de aminoácidos de la proteína N entre las cepas del virus Junín, son menos notorios que aquellos en G1 y G2. No obstante, los cambios de aminoácidos provocan efectos importantes sobre la carga eléctrica neta y sobre la estructura secundaria calculada para la proteína N. En particular, la cepa Candid #1 presenta un patrón distintivo en la estructura secundaria de la región cercana al extremo amino de la proteína N y una disminución en su carga neta, como resultado de la sustitución de aminoácidos ácidos por hidrofóbicos.

La trascendencia de estos resultados no se ha establecido aún, si bien es posible que el efecto de los cambios estructurales ocurra a nivel de las interacciones de la proteína N con el RNA viral, con el polipéptido G2 o con la proteína Z. Por otra parte, teniendo en cuenta la función de antiterminador de la transcripción propuesta para la proteína N una alteración en la interacción N-RNA podría afectar la regulación del proceso de transcripción-replicación (discutida en el Capítulo 6). Alternativamente o en forma simultánea, los cambios en las interacciones N-RNA y N-G2, también podrían afectar el ensamblado de los viriones en las células infectadas.

La participación de las regiones no codificantes en el proceso de atenuación de la virulencia ha sido reportada abundantemente en la literatura de picorna y togavirus (Macadam *et al.*, 1992; Kuhn *et al.*, 1992;

Bandyopadhyay *et al.*, 1993). También, se ha sugerido que los cambios en la región intergénica podrían tener un papel en el proceso de atenuación de los arnavirus (Wilson & Clegg, 1991). Sin embargo, el análisis de las secuencias de la región intergénica de las cepas XJ y Candid #1 del virus Junín, reveló un 100% de conservación y sugirió la presencia de una restricción evolutiva importante. El hecho que los cambios de nucleótidos no sean tolerados, probablemente está relacionado con la función de terminador de transcripción, propuesta para la estructura secundaria, tipo doble *hairpin-loop*, de esta región (Franze-Fernández *et al.*, 1993; Romanowski, 1993).

Con respecto a la variabilidad en la secuencia de los extremos no codificantes del RNA S, detectada en clones independientes de la cepa XJ#44; también fué observada en las cepas MC2 y Candid #1 del virus Junín (P.D. Ghiringhelli, comunicación personal). La heterogeneidad podría generarse por un mecanismo de edición de los productos de transcripción, similar al reportado para el virus Tacaribe (Garcin & Kolakofski, 1992). De todos modos, la participación de las regiones no codificantes del RNA S en el proceso de atenuación, aún no ha sido evaluada. Desde el punto de vista experimental, cabe destacar que la secuencia consenso del extremo 5' no codificante del RNA S, obtenida a partir de clones independientes de la cepa XJ#44, resultó idéntica a la secuencia del fragmento amplificado perteneciente a la cepa XJ. En este sentido, la determinación directa de la secuencia de un fragmento amplificado por PCR, representa la secuencia promedio dentro de las existentes o al menos la más abundante. Estos datos sugieren que la obtención directa de la secuencia de un fragmento amplificado por PCR constituye la metodología más apropiada, cuando se estudien virus con genoma a RNA, caracterizados por sus altas tasas de mutación.

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 (Kohara *et al.*, 1986; Duke *et al.*, 1990). Brevemente, este proceso se inicia con la construcción de un vector recombinante incluyendo al cDNA viral, bajo el control de transcripción de un promotor/enhancer adecuado. A partir del vector transfectado en las células blanco, se sintetiza una molécula de RNA viral y comienza el ciclo de infección. Alternativamente, los RNAs virales se transcriben *in vitro* y se utilizan para transfectar células, en combinación con las proteínas virales.

El enfoque de la "genética reversa" ha resultado muy productivo, al permitir la modificación del cDNA viral, por mutagénesis dirigida, y el análisis de los fenotipos resultantes. Sin embargo, la aplicación de esta metodología a

sistemas de virus con genomas segmentados de RNA con polaridad negativa, ha sido limitada (Luytjes *et al.*, 1989; Collins *et al.*, 1995).

En este sentido, la genética reversa no ha podido ser aprovechada como herramienta en el estudio de los arenavirus, hasta el momento. En principio, la transcripción *in vivo* del cDNA y la síntesis del RNA genómico viral no representan un impedimento infranqueable. En este punto, es necesario recordar que los RNAs genómicos de polaridad negativa o *ambisense*, no son traducidos por los ribosomas de la célula huésped; y en consecuencia, la transcripción y replicación posterior dependen de las proteínas aportadas por el virión. Una posible aproximación para solucionar este problema, consiste en transfectar el cDNA viral en una línea celular que sintetice las proteínas aportadas por el virión, durante el proceso de infección. Este requerimiento sería satisfecho con la expresión del gen L y N en las células transfectadas; aunque, seguramente será necesaria la expresión adicional de Z dentro de las mismas. De este modo, el procedimiento resultaría relativamente complejo y tal vez, deba ser considerado cuando se logre el clonado del RNA L completo del virus Junín.

Considerando las dificultades metodológicas mencionadas anteriormente, se utilizó un enfoque clásico durante el desarrollo de este estudio, basado en el análisis de la información de las secuencias disponibles. Esta información sobre el RNA S se obtuvo a partir de mutantes generados espontáneamente, cuyos fenotipos se distinguen por su virulencia. En este punto, se deben considerar al menos, cuatro posibles consecuencias resultantes de la presencia de mutaciones en una molécula genómica de RNA. La primera consecuencia deducible, sería la alteración del nivel de expresión de los genes codificados en esta molécula. La segunda, estaría relacionada con los cambios estructurales y/o funcionales que podrían sufrir las proteínas codificadas. La tercera sería la alteración en la velocidad de síntesis de proteínas, relacionada con el cambio de codones para un mismo aminoácido y la abundancia de los aminoacil-tRNA disponibles en la célula (*codon usage*). Por último, habría que considerar que los cambios en la secuencia del RNA viral podrían afectar su estructura secundaria y/o su interacción con las proteínas virales o celulares.

En resumen, este trabajo debe ser considerado como la primera etapa en la identificación de regiones en el genoma del virus Junín relacionadas a un patrón de virulencia particular. Teniendo en cuenta que el análisis fué restringido al RNA S, no se puede descartar el rol de los posibles cambios en el RNA L o sus productos génicos en el proceso de atenuación de la virulencia. 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).

La información acumulada por el análisis de las secuencias de los genomas virales constituye el punto de partida para el estudio del complejo fenómeno biológico de la atenuación de la virulencia. Además, esta información será de gran utilidad cuando se haya desarrollado efectivamente, la metodología de la genética reversa para el sistema de los arenavirus.

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS FILOGENÉTICO EN LA FAMILIA DE LOS ARENAVIRUS

INTRODUCCIÓN

La familia *Arenaviridae* está compuesta hasta el momento, por 18 miembros distribuidos por todo el mundo. De acuerdo al sitio geográfico de aislamiento, la reactividad serológica cruzada y la información genética, los arenavirus fueron clasificados en dos grandes grupos (Wulff *et al.*, 1978; Buchmeier *et al.*, 1995). Esta división separa a los arenavirus aislados en el Viejo Mundo (LCM, Ippy, Lassa, Mobala y Mopeia), de aquellos aislados en el Nuevo Mundo (Amapari, Flexal, Guanarito, Junín, Latino, Machupo, Oliveros, Paraná, Pichindé, Sabiá, Tacaribe, Tamiami y Whitewater Arroyo).

En el presente estudio se examinó la relación filogenética entre los arenavirus, usando la secuencia de nucleótidos completa del RNA S, la secuencia de aminoácidos de las proteínas N, GPC y de sus productos proteolíticos, G1 y G2. Inicialmente, se aplicó un enfoque clásico, considerando los valores de similitud globales. A continuación, se utilizó el enfoque cladista, enfatizando la construcción de grupos monofiléticos, con la incorporación de un grupo de referencia externo y la aplicación de técnicas de muestreo al azar. En este sentido, se emplearon programas que operan directamente sobre los alineamientos y otros que generan una matriz de distancia para la construcción de los cladogramas. Coincidentemente, los resultados sugieren un posible parentesco entre los virus Oliveros y Pichindé, aislados en el continente americano, con los arenavirus del Viejo Mundo. Este análisis apunta a establecer las relaciones evolutivas entre los arenavirus de América y podría ser usado para evaluar las diferentes hipótesis sobre su origen, en relación a la historia evolutiva de sus reservorios.

RESULTADOS

4.1. Similitud entre los arenavirus

Las relaciones entre las secuencias analizadas se pueden apreciar en los dendrogramas generados con el programa PILEUP. En este punto, cabe destacar que la construcción de los dendrogramas está basada en la similitud general, pero éstos no constituyen un análisis filogenético. El algoritmo del PILEUP calcula los valores de identidad (de nucleótidos y aminoácidos) y similitud (de aminoácidos) a partir de la comparación de las secuencias, tomadas de a pares. Luego, utiliza los valores calculados para generar un orden de agrupamiento; comenzando por el o los pares de secuencias más relacionados y agrupando sucesivamente el resto de las secuencias.

En el dendrograma correspondiente a la secuencia nucleotídica del RNA S se puede notar la división de esta familia de virus en dos grandes grupos (Figura 4.1). Uno de ellos incluye a los arenavirus del Nuevo Mundo (JUN-xj, JUN-xj44, JUN-mc2, TAC, SAB, OLI y PIC) y el otro a los arenavirus del Viejo Mundo (LCM-ar, LCM-we, LAS-ni, LAS-jo y MOP). Estas relaciones también se aprecian en la Tabla 4.1, donde se presentan los valores de identidad entre las secuencias.

El dendrograma correspondiente a la secuencia de aminoácidos de la proteína N, también muestra la misma distribución de los arenavirus en dos grandes grupos (Figura 4.1, izquierda). Las secuencias disponibles, correspondientes a los virus Machupo y virus Junín Candid #1 fueron incorporadas en este análisis. En contraste con los resultados anteriores, los virus OLI y PIC aparecen relacionados con los arenavirus del Viejo Mundo en el dendrograma de la secuencia de aminoácidos de la proteína GPC (Figura 4.1).

La discrepancia observada en los dendrogramas, sobre la relación de OLI y PIC con el resto de los arenavirus, es coincidente con los valores de similitud obtenidos en la comparación de los pares de secuencias (Tabla 4.2). La observación de la tabla se puede simplificar examinando los valores promedio de similitud. La secuencia de aminoácidos de la proteína N de PIC presenta una similitud promedio del 72% con los arenavirus del Nuevo Mundo y un valor menor (68%) con aquellos del Viejo Mundo. Cuando se analiza la proteína GPC, la similitud promedio de PIC con respecto a los arenavirus del Nuevo Mundo (64%) y Viejo Mundo (66%) sugiere su inclusión en el último grupo. Resultados muy similares se observan para el agrupamiento del virus OLI.

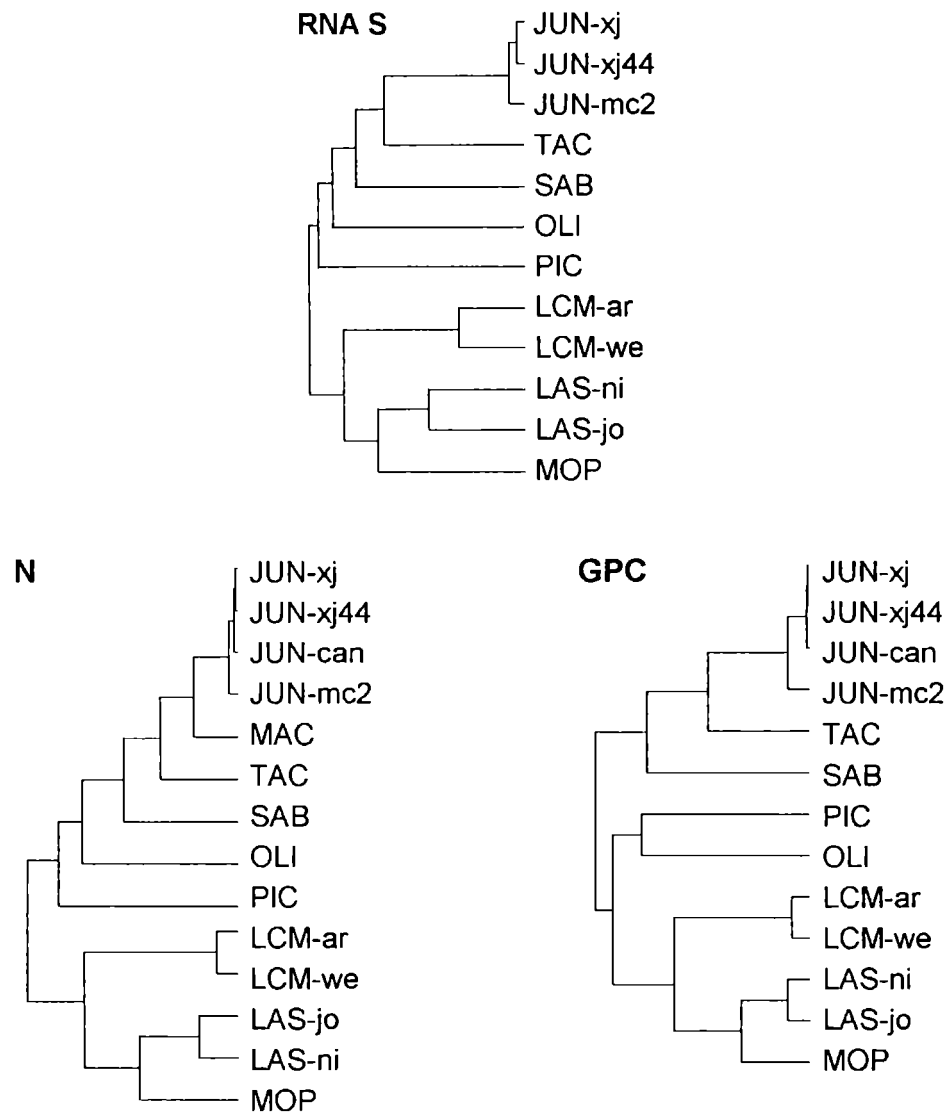


Figura 4.1. Similitud general en las secuencias de los arenavirus. La secuencia nucleotídica completa del RNA S fue considerada en el cladograma de arriba; mientras que la secuencia de aminoácidos de las proteínas N y GPC fueron consideradas en los de abajo. En los dendrograma generados por el PILEUP, la longitud de las ramas horizontales es inversamente proporcional a la similitud entre las secuencias analizadas.

	JUN xj	JUN xj44	JUN can	JUN mc2	TAC	SAB	OLI	PIC	LCM ar	LCM we	LAS ni	LAS jo
JUN-xj44	99											
JUN-can	99	99										
JUN-mc2	97	98	98									
TAC	69	69	69	68								
SAB	64	64	63	63	62							
OLI	58	58	58	58	57	58						
PIC	54	54	54	53	56	56	58					
LCM-ar	52	52	52	52	53	54	55	54				
LCM-we	53	52	52	52	52	53	55	54	84			
LAS-ni	54	54	54	54	55	54	55	55	61	61		
LAS-jo	54	55	54	54	54	54	55	55	63	62	78	
MOP	52	52	52	52	53	52	55	56	62	62	68	69

Tabla 4.1. Identidad en la secuencia de nucleótidos del RNA S completo. Los valores fueron obtenidos en la comparación de secuencias tomadas de a pares con el programa GAP. Los datos resaltados fueron usados para obtener el promedio de identidad de PIC con el resto de los arenavirus. PIC presenta una similitud promedio del 54,5% (**fila**) con los arenavirus del Nuevo Mundo; y del 54,8% (**columna**) con los arenavirus del Viejo Mundo. OLI fue excluido en el cálculo del promedio debido a su relación cercana con PIC.

	JUN xj	JUN xj44	JUN can	JUN mc2	MAC	TAC	SAB	OLI	PIC	LCM ar	LCM we	LAS ni	LAS jo	MOP
JUN-xj		99	99	98	94	90	85	77	73	68	68	68	68	68
JUN-xj44	100		99	99	94	90	84	77	72	68	68	68	68	68
JUN-can	99	99		99	94	89	84	77	72	68	67	68	68	68
JUN-mc2	97	97	97		93	88	84	77	72	67	67	68	67	67
MAC	*	*	*	*		89	85	77	73	69	68	68	68	68
TAC	83	83	82	81	*		82	76	73	68	68	69	68	67
SAB	73	73	73	72	*	73		74	72	69	68	69	68	71
OLI	65	65	65	65	*	66	69		75	67	67	69	69	67
PIC	64	64	64	64	*	64	65	71		68	67	69	69	69
LCM-ar	60	60	59	58	*	58	63	68	66		97	77	76	79
LCM-we	59	59	59	58	*	60	64	67	64	97		78	77	79
LAS-ni	63	63	63	62	*	62	64	66	67	77	77		94	85
LAS-jo	62	62	62	62	*	59	63	67	66	76	77	96		85
MOP	64	64	64	63	*	61	62	67	67	77	77	89	88	

Tabla 4.2. Similitud en la secuencia de aminoácidos de las proteínas N y GPC. Los valores de similitud y los promedios fueron calculados en forma similar a la Tabla 4.1. Considerando la proteína N (triángulo derecho), PIC presenta una similitud promedio del 72% con los arenavirus del Nuevo Mundo (**columna**); y del 68% con los arenavirus del Viejo Mundo (**fila**). Examinando la proteína GPC (triángulo izquierdo), PIC presenta una similitud promedio del 64% con los arenavirus del Nuevo Mundo (**fila**); y del 66% con los arenavirus Viejo Mundo (**columna**). *La secuencias de la GPC correspondientes al virus Machupo no han sido reportadas aún.

Otra discrepancia interesante se observa cuando se examinan los valores de similitud de los polipéptidos G1 y G2 (Tabla 4.3). En este punto la secuencia de los polipéptidos fue definida de acuerdo al sitio de clivaje entre los mismos (Burns & Buchmeier, 1993). Analizando la región G1, PIC presenta una similitud del 56% con los arnavirus del Nuevo Mundo y un valor mayor con los del Viejo Mundo (60%). Sin embargo, cuando se examina la región G2, la similitud promedio de PIC, indica una relación diferente con los virus del Nuevo (75%) y Viejo Mundo (72%).

	JUN xj	JUN xj44	JUN can	JUN mc2	TAC	SAB	OLI	PIC	LCM ar	LCM we	LAS ni	LAS jo	MOP		
JUN-xj	100	100	95	75	60	57	55	50	48	55	55	58		G1	
JUN-xj44	99	100	95	75	60	57	55	50	48	55	55	58			
JUN-can	99	99	95	75	60	57	55	50	48	55	55	58			
JUN-mc2	99	99	99	71	57	56	55	47	46	54	54	56			
TAC	91	91	91	91	59	59	55	47	50	55	50	54			
SAB	88	88	87	88	88	63	59	53	56	58	56	54			
OLI	74	74	73	74	74	75	65	63	61	60	63	62			
PIC	76	76	75	76	73	72	77	60	57	62	60	62			
LCM-ar	71	71	71	71	70	72	73	72	95	71	70	69			
LCM-we	71	71	70	71	70	72	73	72	99	72	70	69			
LAS-ni	70	70	70	70	69	71	73	72	84	84	96	87			
LAS-jo	69	70	69	69	68	70	71	72	84	84	97	88			
MOP	69	69	69	69	69	70	73	72	85	85	90	89			
	G2														

Tabla 4.3. Similitud en la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos G1 y G2. Los valores de similitud y los promedios fueron calculados en forma similar a la Tabla 4.1. Considerando el péptido G1 (triángulo derecho), se obtiene una similitud promedio del 55,6% entre PIC y los arnavirus Nuevo Mundo (**columna**); mientras que PIC y los arnavirus del Viejo Mundo presentan una similitud promedio del 60,2% (**fila**). Considerando el péptido G2 (triángulo izquierdo), se obtiene una similitud promedio del 74,6% entre PIC y los arnavirus del Nuevo Mundo (**fila**); mientras que PIC y los arnavirus Viejo Mundo presentan una similitud promedio del 72% (**columna**).

4.2. Reconstrucción filogenética

Con el objeto de evaluar la probable relación de OLI y PIC con los arnavirus del Viejo Mundo, se realizó un análisis filogenético, usando el enfoque propuesto por el cladismo o sistemática filogenética. Este análisis permite obtener una clasificación que refleja las relaciones genealógicas, estableciendo una reconstrucción hipotética de la filogenia. Con este propósito, se emplearon diferentes rutinas de computación del paquete de programas PHYLIP. En particular, se usaron algoritmos que operan directamente sobre los alineamientos de secuencias para reconstruir la filogenia y otros que elaboran matrices de distancias como paso previo.

El enfoque cladista se basa en el criterio de la máxima parsimonia, asumiendo que los procesos evolutivos naturales (de organismos o secuencias), ocurren con la máxima economía posible de pasos o etapas. Los algoritmos matemáticos determinan el número mínimo de cambios genéticos (sustituciones de nucleótidos o cambios de aminoácidos) requeridos para transformar una secuencia en su vecina más cercana y, de ese modo, infieren el árbol filogenético más parsimonioso. En otras palabras, el árbol filogenético (cladograma) elegido es el que involucra menor número de cambios. Por lo general, no se dispone de suficiente información biológica para asignarle una raíz al cladograma y tampoco para asumir la existencia de un reloj evolutivo que permita calibrar la secuencia de eventos.

El análisis cladista indica la incorporación de un grupo de referencia externo (*outgroup*), con el objeto de normalizar las ramas del cladograma. Además, se emplean procedimientos de muestreo, para evaluar estadísticamente la topología general del cladograma y la consistencia de los puntos de ramificación (nodos). La secuencia del tospovirus INSV (familia *Bunyaviridae*) fue seleccionada como *outgroup*, basado en su relativa similitud con los arnavirus, en cuanto a la estructura genómica y su estrategia de codificación. El genoma de los bunyavirus está compuesto por tres moléculas de RNA de simple cadena, S, M y L (*small, medium y large*). Los genes del INSV están codificados en forma *ambisense* en los RNA S y M; y en sentido negativo en el RNA L (Law *et al.*, 1992; Dewey, 1995). En el RNA L se halla codificada la RNA polimerasa viral; en el RNA S, la nucleoproteína (N) y una proteína no estructural (NSs); y en el RNA M, el precursor de las glicoproteínas (GPC) y otra proteína no estructural (NSm).

El muestreo por el método de *bootstrapping*, genera un conjunto de alineamientos con reemplazos de columnas al azar, sin cambiar su longitud original. A continuación, los alineamientos resultantes fueron analizados por el criterio de parsimonia, generando un cladograma de consenso por la regla de la mayoría. La frecuencia en la que se presenta cada grupo monofilético (valor de consenso) se indica sobre las ramas del cladograma, aunque la longitud de las mismas carece de significado.

El primer análisis cladista se realizó aplicando el programa PROTPARS (*Protein Sequence Parsimony Method*) sobre los alineamientos de secuencias de aminoácidos. Este programa calcula el número de cambios de nucleótidos asociados al cambio de cada aminoácido, de acuerdo al código genético. Posteriormente, el algoritmo evalúa la sumatoria de los cambios de nucleótidos necesarios para convertir una secuencia en cada una de las otras y agrupa las secuencias más relacionadas.

Examinando el cladograma correspondiente a la proteína N (Figura 4.2, izquierda), se observa que los arenavirus del Nuevo y Viejo Mundo están claramente separados. Sin embargo, en el cladograma de la proteína GPC (Figura 4.2, derecha), los virus OLI y PIC fueron agrupados con los arenavirus del Viejo Mundo (consenso = 67%). En ambos casos, la topología de los cladogramas resulta similar a los dendrogramas correspondientes (Figura 4.1, abajo).

En análisis posteriores, las secuencias de los polipéptidos G1 y G2 fueron definidas de acuerdo a los sitios de clivaje proteolítico (Figura 1.3, Capítulo 1) reportados para el precursor GPC del virus LCM (Burns & Buchmeier, 1993). El cladograma correspondiente al polipéptido G1 (sin el péptido señal) presenta un valor de consenso más significativo (82%) para el agrupamiento de OLI y PIC con los arenavirus del Viejo Mundo (Figura 4.2, izquierda). Cuando se examinó la secuencia de aminoácidos del polipéptido G2 con este enfoque (Figura 4.2, derecha), se obtuvo un agrupamiento semejante de OLI y PIC, pero con un valor de consenso menor (61%).

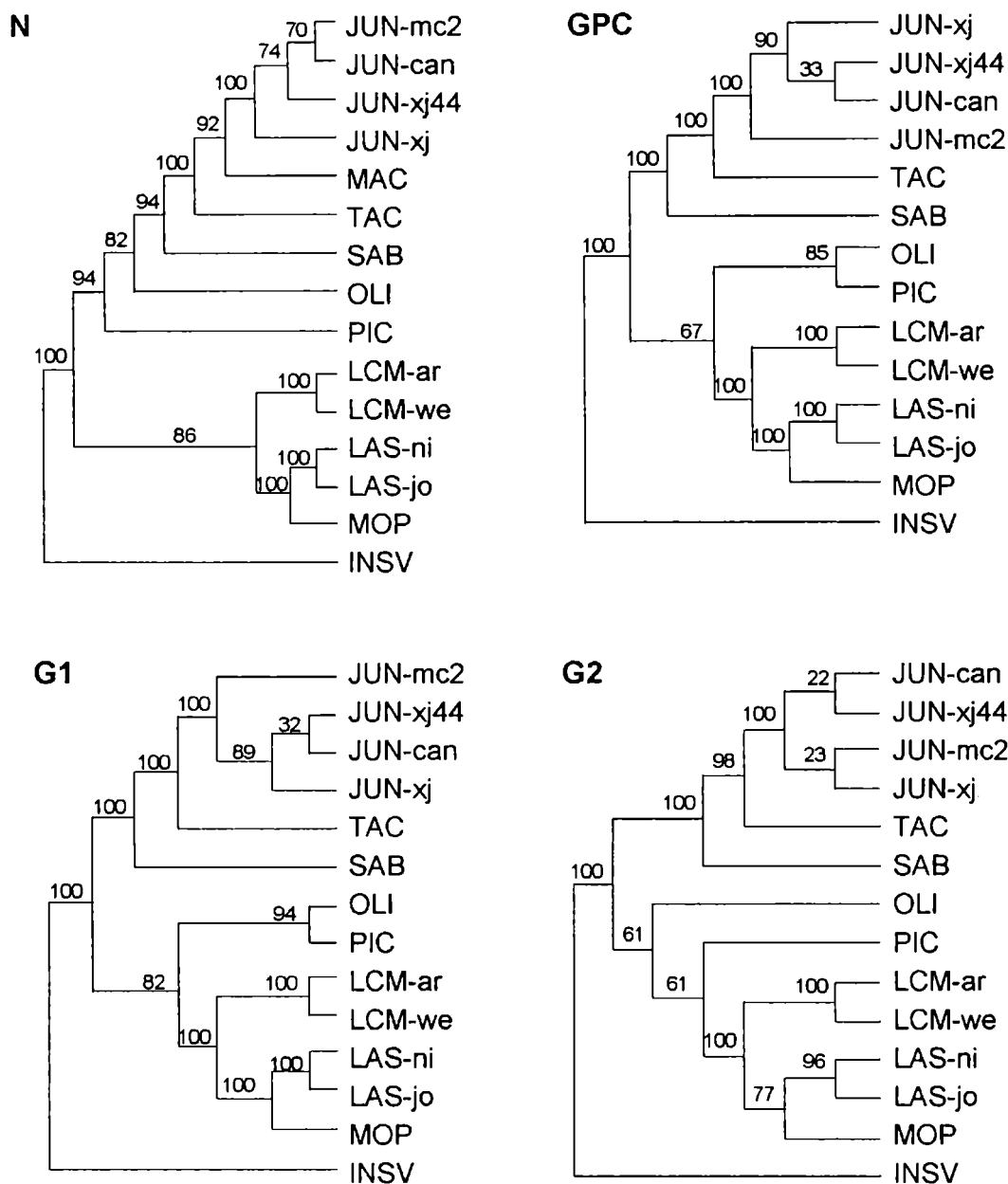


Figura 4.2. Relaciones filogenéticas entre los arenavirus. Los cladograma de consenso fueron generados con los programas PROTPARS y CONSENSE del conjunto PHYLIP. La secuencia de aminoácidos de las proteínas N y GPC fueron consideradas en los cladogramas de arriba y las secuencias correspondientes a los polipéptidos G1 y G2, en los de abajo. Los valores de consenso se muestran sobre las ramas del árbol e indican la consistencia del nodo; mientras que la longitud de las ramas carece de significado.

4.3. Análisis filogenético usando matrices de distancia

Con el objeto de confirmar los resultados previos, se analizó la filogenia del grupo mediante programas adicionales que generan matrices de distancia para establecer la filogenia del grupo. Estos algoritmos comparan cada par de secuencias dentro del alineamiento y obtienen un valor de distancia de acuerdo a la tabla de homologías utilizada. El programa PROTDIST construye la matriz de distancias entre secuencias peptídicas, de acuerdo a la tabla de similitudes de aminoácidos de Dayhoff-PAM. Las distancias entre secuencias de nucleótidos se calcularon con el programa DNADIST, de acuerdo al modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura. El modelo considera probabilidades diferentes para la ocurrencia de transiciones y transversiones. Los cladogramas se obtuvieron a partir de las matrices, por el método de los cuadrados mínimos de Fitch y Margoliash, empleando el programa FITCH. En ambos casos, el cladograma de consenso se obtuvo por la regla de la mayoría con el programa CONSENSE.

El cladograma de consenso para la secuencia nucleotídica completa del RNA S (datos no mostrados) presentó una topología similar al dendrograma correspondiente (Figura 4.1A), con una clara separación entre los virus del Viejo y Nuevo Mundo. Del mismo modo, los cladogramas de consenso para las proteínas N, GPC y los polipéptidos G1 y G2 (Figuras 4.3), presentan una topología semejante a los cladogramas correspondientes construidos con el programa PROTPARS (Figura 4.2). La relación de OLI y PIC con los arnavirus del Viejo Mundo se observa en los cladogramas correspondientes a la proteína GPC y al polipéptido G1 (sin péptido señal), con un consenso de 76% y 98% (Figuras 4.3). El cladograma de G2, también presenta la misma distribución pero con un consenso más bajo (45%) para el mismo grupo (Figura 4.3, abajo, derecha). En el cladograma de G1 también se observa la inclusión de SAB en el grupo citado con un consenso bajo (60%).

Además, se aplicó el programa NEIGHBOR sobre las matrices de distancia, que realiza un agrupamiento sucesivo de linajes de acuerdo al método de *Neighbor-Joining* para construir cladogramas de consenso. Los cladogramas de consenso resultantes (datos no mostrados) presentaron la misma topología que la obtenida anteriormente con el programa FITCH. En resumen, la topología general de los árboles filogenéticos se conserva tanto en los dendrogramas, como en los cladogramas de consenso, generados por diferentes programas.

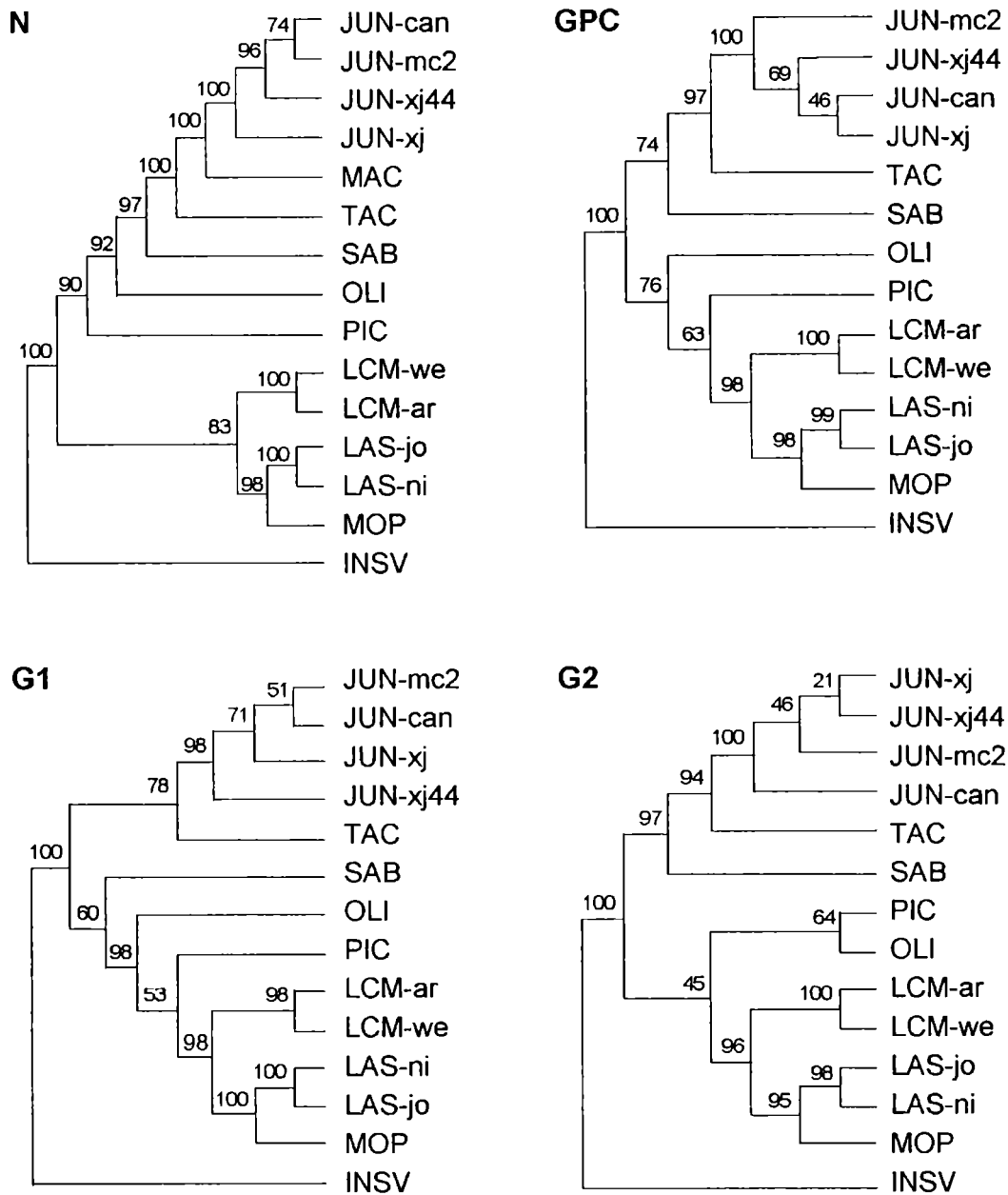


Figura 4.3. Relaciones filogenéticas entre los arenavirus usando matrices de distancia. Los cladogramas de consenso fueron generados con los programas PROTDIST y CONSENSE. La secuencia de aminoácidos de las proteínas N y GPC fueron consideradas en los cladogramas de arriba y las secuencias correspondientes a los polipéptidos G1 y G2, en los de abajo. Los valores de consenso se muestran sobre las ramas del árbol indican la consistencia del nodo; mientras que la longitud de las ramas carece de significado.

4.4. Inclusión de una secuencia conservada y cambio del *outgroup*

La incorporación de la secuencia del péptido señal en el análisis del polipéptido G1, generó cladogramas semejantes a los anteriores pero con valores de consenso ligeramente menores. De hecho, el agrupamiento de OLI y PIC con los arenavirus del Viejo Mundo fue observado en los cladogramas generados con el PROTPARS y el PROTDIST, con valores de consenso del 79% y 86%, respectivamente (Figura 4.4). La disminución de los valores de consenso podría ser explicada por el aumento de la homogeneidad en el alineamiento de las secuencias del polipéptido G1, debido a la incorporación de la secuencia conservada del péptido señal. En este punto cabe recordar que el polipéptido G1 posee la secuencia más variable en la familia de los arenavirus.

Por otra parte, se reemplazó la secuencia del tospovirus INSV por la secuencia del phlebovirus RVFV (familia *Bunyaviridae*) con el objeto de analizar la influencia del *outgroup* sobre la topología general de los cladogramas. El RNA M de RVFV codifica en forma negativa al gen de la GPC (Schmaljohn & Patterson, 1990), a diferencia de INSV. Cabe destacar que los análisis de una misma región, realizados con los programas PROTPARS, FITCH y NEIGHBOR, generaron cladogramas con un patrón de agrupamiento diferente para los virus PIC y OLI (datos no mostrados). En los cladogramas generados para una misma región, los virus PIC y OLI fueron agrupados con los arenavirus del Nuevo Mundo, con los del Viejo Mundo e, inclusive, formando un grupo independiente. Aparte de estas discrepancias, los valores de consenso (35-50%) correspondientes al agrupamiento de PIC y OLI con el resto de los arenavirus, le restaron consistencia estadística a estos resultados. Pese a que la sustitución del *outgroup* no permitió obtener resultados consistentes, estos datos fueron considerados en la evaluación de las hipótesis sobre las posibles relaciones entre los arenavirus, que se describe en la discusión (sección siguiente).

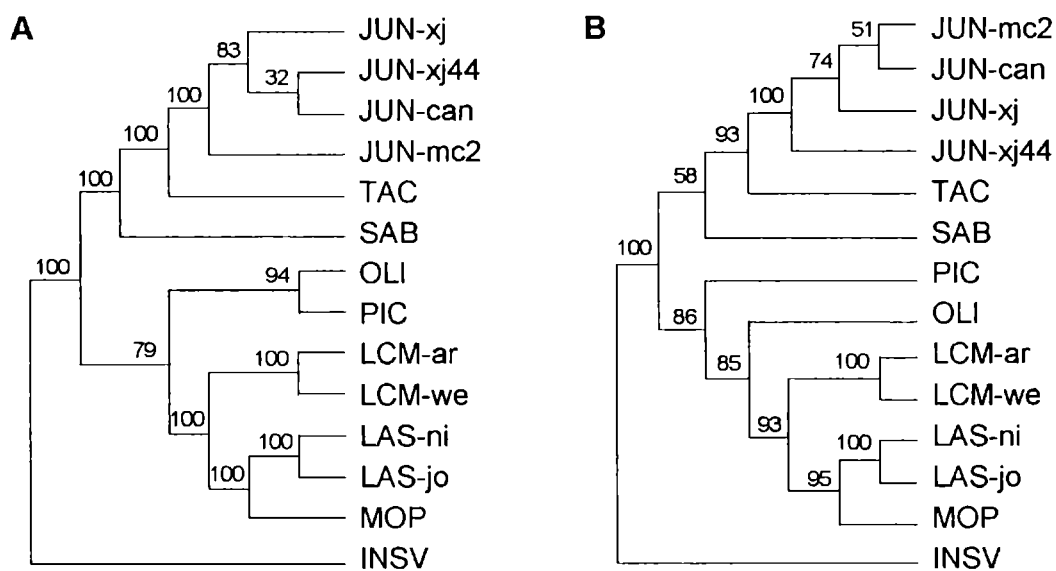


Figura 4.4. Efecto de la incorporación de la secuencia del péptido señal en la secuencia de aminoácidos del polipéptido G1. Los cladogramas fueron generados con los programas PROTPARS y PROTDIST en A y B, respectivamente. Se puede notar que los valores de consenso para el agrupamiento de los virus OLI y PIC son menores que en los análisis anteriores (ver figuras 4.2 y 4.3). Los valores de consenso, sobre las ramas del árbol, indican la consistencia del nodo; mientras que la longitud de las ramas carece de significado.

DISCUSION

El estudio filogenético de los arenavirus fue realizado usando diferentes enfoques y metodologías con el objeto de obtener resultados significativos. Inicialmente, se aplicó un enfoque clásico, considerando solamente los valores de similitud globales. A continuación de este análisis simple y ampliamente utilizado, el problema se abordó según el método cladista. Este último enfatiza la construcción de grupos monofiléticos, incorporando un grupo de referencia externo y aplicando técnicas de muestreo al azar. En este sentido, se emplearon programas que operan directamente sobre los alineamientos y otros que generan una matriz de distancia previamente a la construcción de los cladogramas. Además, se examinaron diferentes regiones y productos codificados en el RNA S: la secuencia de nucleótidos completa del RNA S, la secuencia de aminoácidos de las proteínas N, GPC y de sus productos proteolíticos, G1 y G2.

Este estudio mostró una separación evidente entre los arenavirus del Nuevo y Viejo Mundo, como fue reportado anteriormente en la literatura (Clegg, 1993). Sin embargo, el dendrograma correspondiente a la secuencia del RNA S (Figura 4.1A) indicó que OLI y PIC son ligeramente diferentes del resto de los virus del continente americano. La separación también se observa examinando los valores de identidad generados en la comparación de las secuencias tomadas de a pares; por ejemplo PIC presenta una similitud promedio del 56% con los arenavirus del Nuevo Mundo y del 55% con los del Viejo Mundo (Tabla 4.1). Estos resultados podrían sugerir que estos virus estarían más relacionados con el arenavirus ancestral que otros. En este punto, es necesario mencionar que PIC fue considerado anteriormente, como un virus ancestral con respecto a los arenavirus del Nuevo Mundo (Bowen *et al.*, 1996a). No obstante, los motivos de esta consideración no han sido fundamentados.

En este estudio se decidió examinar las secuencias completas del RNA S y sus productos codificados, GPC y N, con el objeto de reducir la posible aparición de resultados artificiales, como consecuencia del uso de datos parciales. El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína N produjo resultados semejantes a los reportados anteriormente por Clegg (1993) y Bowen (1996a). En cambio, el análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína GPC y sus productos G1 y G2, generó resultados diferentes. Considerando GPC y G1, los virus OLI y PIC se relacionan claramente con los

arenavirus del Viejo Mundo; mientras que el grado de relación es menos claro, cuando se examina la región G2.

Para explicar esta discrepancia aparente se podrían plantear, al menos, cuatro hipótesis (Figura 4.5). En principio, habría que considerar la posibilidad que OLI y PIC, posean una relación cercana con el grupo ancestral de los arenavirus del Nuevo Mundo (Figura 4.5A). El ancestro proveniente del Viejo Mundo, habría generado los linajes de arenavirus en América; y sus descendientes más directos podrían retener características que reflejen su origen.

La segunda hipótesis es que estos virus posean un ancestro común relativamente moderno, con características genómicas correspondientes a los dos grandes grupos de arenavirus. Las características mixtas podrían haberse originado por un evento de recombinación en el RNA S, durante una co-infección por arenavirus del Nuevo y Viejo Mundo, en un hospedador salvaje (Figura 4.5B). Aunque actualmente, no sea posible identificar la región de recombinación, se podría especular que el evento haya tenido lugar en la región intergénica o incluso dentro del gen GPC (Blinov *et al.*, comunicación personal). En el primer caso, el gen GPC tendría su origen en un arenavirus del Viejo Mundo, mientras que en el segundo caso, solamente la región G1 tendría ese origen.

La tercer posibilidad sería que OLI y PIC posean una semejanza superficial con los arenavirus del Viejo Mundo. Una situación de este tipo, podría originarse por la acumulación de mutaciones al azar en el gen GPC, generando una deriva génica entre los arenavirus del Nuevo Mundo (Figura 4.5C). En este punto se debe tener en cuenta que la extensa variabilidad del gen GPC es un reflejo de la débil presión de selección que opera en esa región y que favorece los fenómenos evolutivos de este tipo. A continuación, habría surgido una semejanza análoga de OLI y PIC con los arenavirus del Viejo Mundo, como resultado de una convergencia evolutiva.

Otra hipótesis se podría proponer para explicar la existencia de dos linajes de arenavirus en el Nuevo Mundo. Es bien conocido que diferentes sub-familias de la familia *Muridae*, los hospedadores roedores para los arenavirus, llegaron al continente americano, millones de años atrás. De este modo, los ancestros de OLI y PIC y del resto de los arenavirus del Nuevo Mundo, podrían haber sido introducidos por roedores de diferentes sub-familias, infectados con virus de cada uno de los linajes (Figura 4.5D).

Finalmente, se podrían considerar esquemas más complejos que involucren simultáneamente, a los elementos de las hipótesis descritas anteriormente.

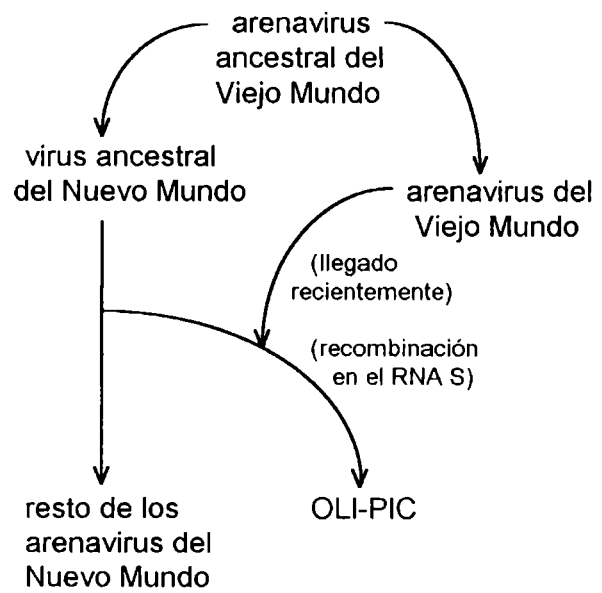
(página siguiente)

Figura 4.5. Representación gráfica de las hipótesis sobre las relaciones entre OLI y PIC con el resto de los arenavirus. La relación cercana con un arenavirus ancestral se considera en A y una recombinación reciente en el RNA S entre virus del Nuevo y Viejo Mundo se considera en B. En C, se considera una convergencia evolutiva, mientras que la migración de dos linajes independientes se considera en D. Explicaciones detalladas sobre cada hipótesis se presentan en el texto.

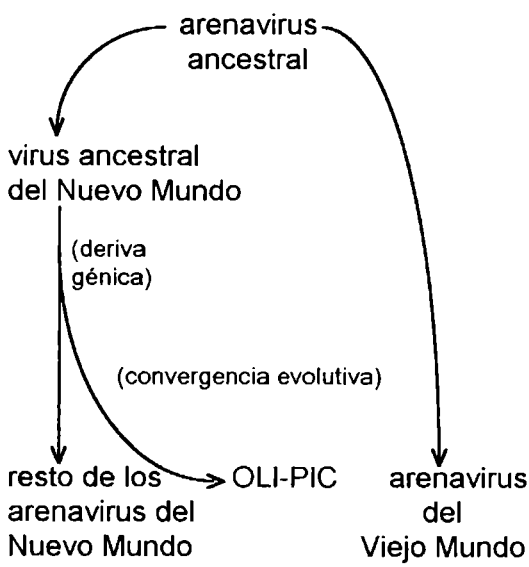
A



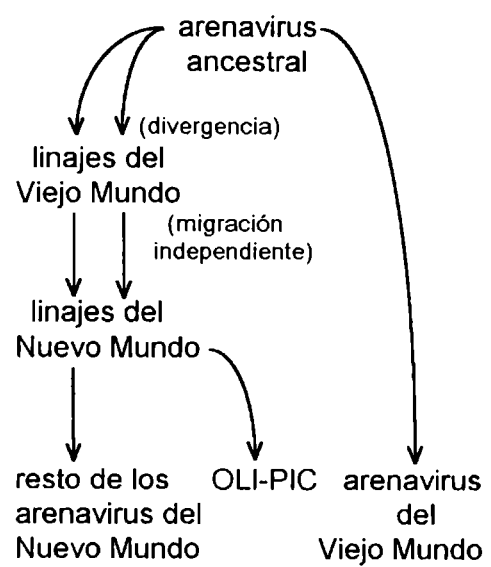
B



C



D



CAPÍTULO 5

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE NUEVOS ARENAVIRUS

INTRODUCCIÓN

Los arenavirus que han sido analizados hasta el momento comparten una secuencia muy conservada, de 19 nucleótidos de longitud, en el extremo 3' de sus RNA S (Auperin *et al.*, 1982; Bishop, 1990).

En este estudio se identificaron numerosas regiones conservadas en el alineamiento múltiple de la secuencia del RNA S de los arenavirus. La secuencia consenso de estas regiones fue usada para diseñar *primers* generalizados, que permitirían amplificar por RT-PCR un conjunto de fragmentos solapados abarcando el RNA S completo de todos los arenavirus. Además, se calculó el patrón de restricción de los fragmentos amplificados y se detectaron polimorfismos de longitud (RFLP) sobre los mismos.

El análisis por RT-PCR/RFLP fue utilizado para tipificar los fragmentos amplificados a partir del cDNA de arenavirus del Viejo Mundo (LCM) y del Nuevo Mundo (Junín y Tacaribe). Por otro lado, el ensayo permitió la identificación de un arenavirus nuevo, aislado en una muestra de un roedor capturado en el sur de la provincia de Santa Fe. La secuencia de nucleótidos de uno de los fragmentos amplificados fue usada en un análisis filogenético para determinar la relación entre el arenavirus nuevo y el resto de los miembros de la familia.

Las principales características del RT-PCR/RFLP son la rapidez del procedimiento, la simplicidad y un costo relativamente bajo. Estas características resultarían sumamente apropiadas en estudios básicos, epidemiológicos y durante las etapas iniciales de la caracterización molecular de arenavirus, en las cuales, se analizan numerosas muestras de campo.

RESULTADOS

5.1. Diseño de *primers* generalizados para arenavirus

La secuencia nucleotídica del RNA S de los arenavirus LCM-ar, LCM-we, MOP, LAS-jo, LAS-ni, PIC, TAC, JUN-mc2, JUN-xj, OLI y SAB, se utilizó para construir un alineamiento múltiple. El análisis del alineamiento permitió la detección de 17 regiones conservadas, adicionales a la descrita anteriormente (Figura 5.1)

Las secuencias consenso, correspondientes a estas regiones, fueron utilizadas para diseñar *primers* generalizados para la familia de los arenavirus. La utilización de los mismos en una reacción de amplificación por RT-PCR permitiría obtener 8 fragmentos de cDNA solapados cubriendo el RNA S completo de todos los arenavirus (Figura 5.1).

Estos *primers* fueron diseñados con, al menos, 5 bases estrictamente conservadas en su extremo 3'. En el resto de las 15-17 bases, se usaron criterios adicionales. En principio el *primer* no debería diferir en más de un 20% con respecto a ninguna de las secuencia utilizadas. Además, se permitieron degeneraciones de bases para favorecer el apareamiento de los *primers* con el RNA S de todos los arenavirus. En general, se prefirieron *primers* que presentaban diferencias menores con las secuencias alineadas más que el consenso estricto en esa región.

La secuencia de los *primers* está indicada en la Tabla 1 de la sección correspondiente en el capítulo sobre materiales y métodos. Los *primers* generalizados se nombraron con el prefijo ARS, indicando su presencia común en el RNA S de los arenavirus, seguido por un número que identifica la región conservada (del 1 al 19). También se indicó en su denominación la polaridad de su secuencia: V por viral y VC por viral complementaria.

De los 8 productos de amplificación, se requieren sólo 7 para cubrir la secuencia nucleotídica completa del RNA S. Seis de ellos presentan tamaños de 410 a 640 pb, permitiendo la determinación directa de su secuencia sin pasar por una etapa previa de subclonado (Figura 5.1). Debido al bajo grado de conservación en la región 5' del gen GPC, el fragmento amplificado tendría una longitud mínima aproximada de 1170 pb.

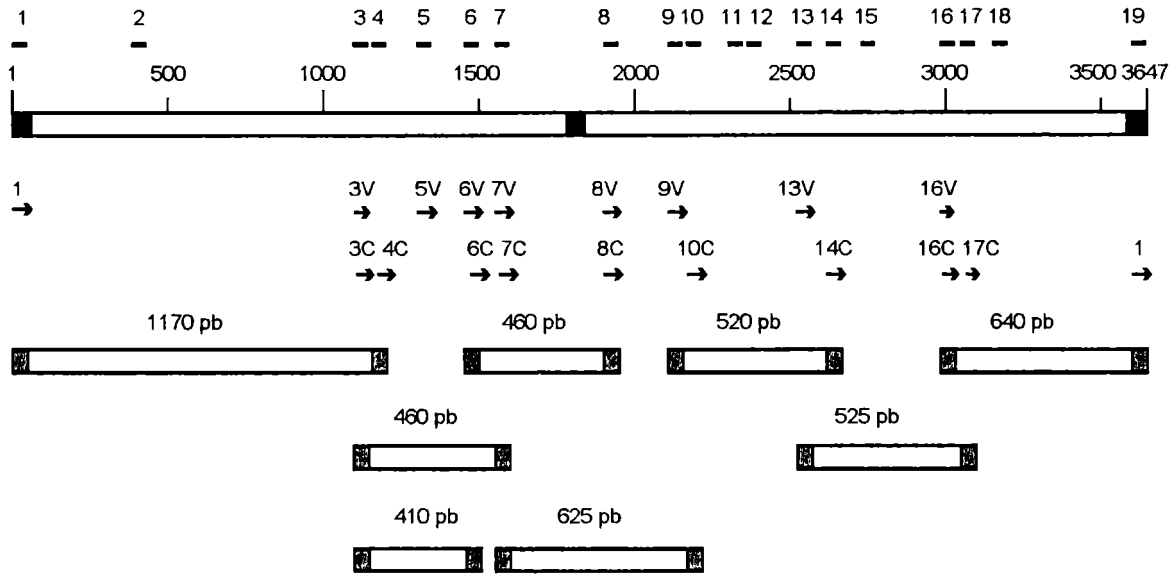


Figura 5.1. Diseño de *primers* generalizados para arenavirus. El RNA S de los arenavirus se representa por un rectángulo en la parte superior del esquema y los números indican las posiciones relativas en el alineamiento múltiple generado por el PILEUP. Las áreas negras corresponden a secuencias no-codificantes. Las líneas cortas sobre el RNA S indican la ubicación de las regiones conservadas. Los *primers* generalizados están indicados por flechas debajo del RNA S; su denominación se compone de un número y una letra indicando su polaridad (V por viral y C por viral-complementario). La longitud de los *primers* no está representada en escala y sus extremos 3' corresponden a las puntas de flechas. Los rectángulos menores con áreas grises en sus extremos, representan un conjunto de fragmentos de amplificación esperados en una reacción por RT-PCR, usando las combinaciones apropiadas de *primers*. El tamaño aproximado de los fragmentos de amplificación se indica sobre los mismos; aunque el tamaño exacto depende de cada virus en particular.

5.2. Caracterización de los fragmentos amplificados

Para caracterizar los 7 fragmentos de amplificación predichos, se calcularon los mapas de restricción para las enzimas *Ava* I, *Dde* I, *Dra* I, *Hae* III y *Hinf* I. Los patrones de restricción elegidos fueron los que permitieron diferenciar a todos los arenavirus analizados. En esta elección, también se tuvo en cuenta que los productos de la digestión posean una diferencia de tamaño suficiente, para ser apreciados por electroforesis en geles de agarosa.

De la comparación de todos los mapas de restricción generados se eligieron dos de ellos que presentaban las características deseadas: la digestión con *Hae* III del fragmento amplificado con los *primers* ARS1-ARS2C (1170 pb aprox.) y la digestión del fragmento amplificado con los *primers* ARS1-ARS16V (600 pb aprox.) con la enzima *Hinf* I.

Posteriormente, se descartó el patrón de restricción con *Hae* III del fragmento ARS1-ARS2C, considerando que su tamaño podría resultar en una amplificación poco eficiente y que su ubicación dentro del gen GPC, caracterizado por su variabilidad, podría impedir la detección de un arenavirus nuevo. El patrón con *Hinf* I del fragmento ARS1-ARS16V fue ensayado experimentalmente, ya que no posee ninguna de las desventajas citadas: posee un tamaño menor y está ubicado dentro del gen N, que no presenta una variabilidad muy importante en esa región (Figura 5.2).

5.3. Identificación de arenavirus por RT-PCR-RFLP

En particular el par de *primers* ARS1/ARS16V fue utilizado en una reacción de RT-PCR, sobre muestras de RNA de los arenavirus JUN, TAC y LCM y los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa. Los fragmentos amplificados, de 600 pb aproximadamente, fueron purificados a partir del gel y digeridos con *Hinf* I. El patrón de restricción obtenido coincidió con el calculado para estos virus.

También se usaron los pares de *primers* generalizados ARS16C/ARS8V, ARS8C/ARS6V, ARS6C/ARS3V y ARS3C/ARS1 para amplificar por RT-PCR el RNA S completo de los arenavirus JUN-mc2, TAC y LCM.

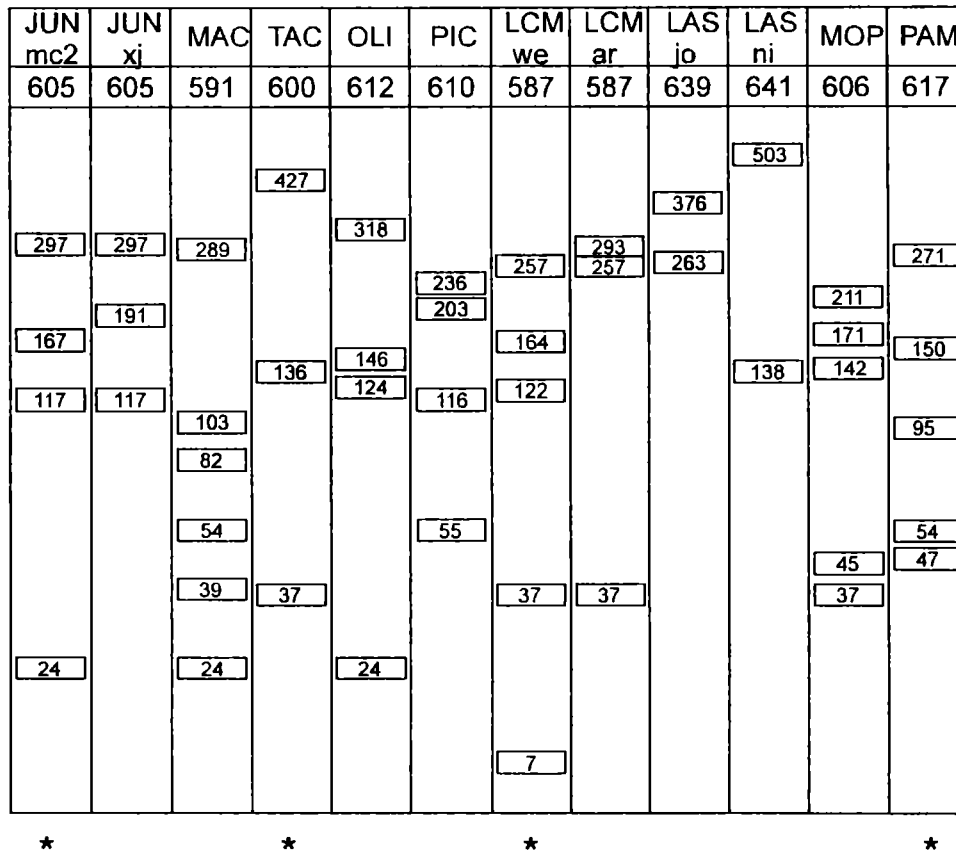


Figura 5.2. Identificación de arenavirus por RT-PCR/RFLP. En esta figura se representa graficamente el patrón de restricción usando la enzima *Hinf I* sobre los fragmentos amplificados con los *primers* ARS1/ARS16V. En la parte superior se indica el nombre de cada virus y la longitud del fragmento de amplificación correspondiente. Las rectángulos representan los fragmentos de restricción como se resolverían por electroforesis en gel de agarosa. Los tamaños esperados se indican dentro de los rectángulos. El nombre de los virus fue abreviado como se describió en capítulos anteriores.

* El RFLP para los virus JUN-mc2, TAC, LCM-we y PAM fue obtenido experimentalmente y analizado por electroforesis en geles de agarosa. El RFLP de PAM resultó diferente del resto y permitió la identificación de este nuevo aislamiento.

5.4. Caracterización de un nuevo aislamiento

En el marco del programa de captura de roedores llevado a cabo por el Instituto Nacional sobre Virosis Hemorrágicas Humanas (Pergamino, Argentina), un arenavirus fue detectado por métodos inmunológicos en una muestra de tejidos de un roedor *Bolomys sp.* Este virus fue aislado en cultivo de células y caracterizado inmunológicamente. En los IFAs, el virus aislado mostró una fuerte reacción cruzada con antisueros contra el virus Oliveros y una reacción más débil con los antisueros contra Junín y LCM (Calderón *et al.*, 1996).

A partir de las muestras de tejidos y de las células infectadas en cultivo, se realizó una extracción de RNA total, el cuál fue remitido posteriormente al laboratorio del IBBM, para ser analizado por RT-PCR/RFLP.

La amplificación de las diferentes muestras de RNA, por RT-PCR con los *primers* ARS1/ARS16V, produjo un fragmento del tamaño esperado para el resto de los arenavirus. Sin embargo, el patrón de restricción con *Hinf* I resultó diferente a los patrones calculados para los arenavirus cuya secuencia del RNA S había sido reportada (Figura 5.2). Este resultado era sugestivo de la presencia de un nuevo aislamiento, el cuál fue nombrado Pampa, de manera provisoria.

Con el objeto de ampliar la información este fragmento fue clonado en un plásmido y secuenciado. La secuencia nucleotídica fue comparada con la secuencia de la región homóloga del resto de los arenavirus. El virus Pampa mostró la homología más cercana con el virus Oliveros, coincidentemente con los datos inmunológicos. Estos virus presentan un valor de identidad de la secuencia nucleotídica de un 84%; y un valor de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos de un 94% y 96%, respectivamente (Tabla 5.1).

	PAM	OLI	TAC	MAC	JUN xj	JUN mc2	PIC	LCM ar	LCM we	LAS jo	LAS ni	MOP
PAM	85	61	58	60	60	60	57	55	55	56	54	
OLI	94	59	62	59	59	63	56	56	55	55	54	
TAC	57	59	72	72	70	57	55	57	57	57	56	
MAC	59	59	79	75	74	55	54	54	54	53	54	
JUN-xj	57	59	82	84	95	57	55	56	56	53	53	
JUN-mc2	54	56	78	81	95	56	56	56	55	53	53	
PIC	56	60	57	56	60	58	54	54	55	55	54	
LCM-ar	53	53	52	51	53	50	50	84	63	63	66	
LCM-we	52	53	52	50	52	49	50	93		64	64	65
LAS-jo	52	53	49	51	49	46	47	66	66		74	71
LAS-ni	51	51	49	49	51	48	48	67	66	89		70
MOP	48	48	48	47	50	48	51	66	66	81	80	
	aa											

Tabla 5.1. Comparación de la secuencia del fragmento definido por los *primers* ARS1/ARS16V. En el triángulo derecho se indican los valores de identidad de la secuencia nucleotídica (nt) y en el triángulo izquierdo se indican los valores correspondientes a la secuencia aminoacídica (aa). Los valores de la tabla fueron obtenidos en las comparaciones de las secuencias tomadas de a pares con el programa GAP. En negrita, se resaltan los valores de la comparación entre el virus PAM y OLI (su pariente mas cercano) y entre las cepas del mismo virus.

5.5. Análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó a partir de los dendrogramas generados en el alineamiento múltiple de la secuencia nucleotídica del fragmento comprendido entre los *primers* ARS1/ARS16V del virus Pampa y del resto de los arenavirus.

En los dendrogramas se observó que los arenavirus del nuevo mundo (PAM, JUN-mc2, JUN-xj, TAC, OLI, PIC, MAC) se agrupan independientemente de aquellos del viejo mundo (LCM-we, LCM-ar, LAS-ni, LAS-jo, MOP). También se observó que Pam y Oli se agrupan consistentemente. Este agrupamiento está de acuerdo con los valores de similitud obtenidos en la comparación de este par de secuencias.

Posteriormente, se realizó un análisis filogenético desde el enfoque cladista, a partir del alineamiento de la secuencia de aminoácidos predicha para este fragmento. El árbol filogenético (cladograma) resultante presentó la

misma topología y patrón de agrupamiento que los dendrogramas (datos no mostrados).

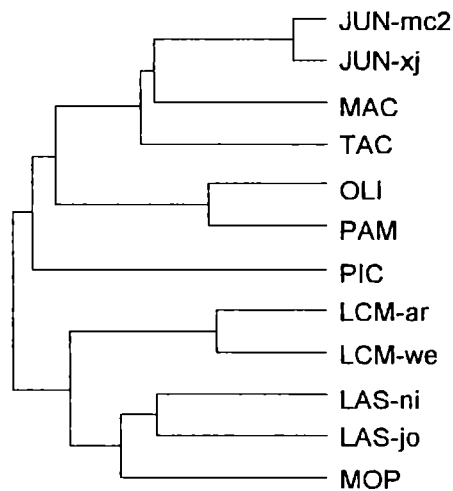


Figura 5.3. Relación del virus Pampa con el resto de la familia Arenaviridae. Las secuencias de la región flanqueada por el par de *primers* ARS1/ARS16V fueron alineadas y se construyó el dendrograma correspondiente con el programa PILEUP. Las distancias en el eje horizontal son proporcionales a las diferencias entre las secuencias. El nombre de los virus fue abreviado como se describió en el texto.

DISCUSIÓN

Los arenavirus comparten propiedades morfológicas y moleculares. Dentro de estas últimas se incluye una secuencia común a los arenavirus, presente en ambos extremos del RNA S viral. Como resultado del análisis de los alineamientos de la secuencia nucleotídica del RNA S se encontraron otras regiones genómicas conservadas. A partir de las mismas se diseñaron *primers* generalizados para la amplificación por RT-PCR, el clonado y la secuenciación del RNA S completo de todos los arenavirus. Además, el ensayo de RT-PCR/RFLP fue diseñado para caracterizar rápidamente el cDNA de los arenavirus, con el fin de extenderlo a estudios epidemiológicos.

Posteriormente, un arenavirus relacionado inmunológicamente con el virus OLI, fue aislado a partir de muestras de tejidos de un roedor de la especie (*Bolomys sp.*). Este aislamiento fue caracterizado usando el ensayo de RT-PCR/RFLP. El fragmento de cDNA amplificado por los *primers* ARS1/ARS16V mostró un patrón de restricción para la enzima Hinf I, diferente al resto de los arenavirus caracterizados hasta el momento. El virus nuevo fue nombrado como Pampa por la región fitogeográfica donde fue capturado el roedor. Recientemente, otros integrantes de mi grupo de investigación han caracterizado un nuevo aislamiento utilizando la misma estrategia.

Las relaciones entre los virus y los roedores hospedadores, han sido estudiadas para varios hantavirus (género de la familia *Bunyaviridae*). En la bibliografía se ha reportado que cada especie de virus infecta una única especie de roedores y que la filogenia de los virus parece reflejar la filogenia de sus hospedadores (Mills *et al.*, 1996). Este resultado es coincidente con la hipótesis de coevolución de los hantavirus y sus hospedadores, asociada con una baja tasa de transmisión de los virus entre las especies.

El análisis de las secuencias indicó que los virus PAM y OLI están relacionados en forma cercana, lo cual es esperable ya que ambos fueron aislados del mismo género de roedores. Pese a la alta similitud, la posibilidad que PAM y OLI sean virus de diferente especie no puede ser descartada. Bowen *et al.* (1996b), encontraron algunas evidencias que sostienen la hipótesis de co-evolución de los arenavirus y sus hospedadores roedores. Ellos agruparon a los arenavirus del nuevo mundo en tres linajes diferentes (A, B y C) usando la secuencia de la región C-terminal del gen N. En particular, Pichindé, Paraná y Flexal (miembros del linaje A) tienen hospedadores del género *Oryzomys*, mientras que Junín y Macupo (miembros del linaje B) tienen hospedadores del género *Calomys*. De todos modos, se conoce que el mismo

arenavirus puede infectar varias especies de roedores; por ejemplo, el virus Junín puede infectar *Calomys musculinus*, *Calomys laucha*, *Akodon azarae*, *Bolomys obscurus* y *Mus musculus*. Además, la misma especie de roedor puede estar infectada por dos arenavirus diferentes; por ejemplo, Machupo y Latino pueden infectar *Calomys callosus*. Estos hechos serían consistentes con la hipótesis de co-evolución para los arenavirus y sus hospedadores, considerando que podría ocurrir una tasa alta de transmisión interespecífica.

Con el objeto de establecer reglas generales para definir especies virales, Ward (1993) propuso que las especies del mismo género deben poseer el mismo conjunto de genes y deberían mostrar una identidad de secuencia moderada entre la mayoría de sus genes (35-85%). Además, propuso para las cepas virales, que la identidad de secuencia para todas las regiones codificantes debería ser relativamente alta (85-90%). Por otra parte, la clasificación de la familia de los picornavirus (Rueckert, 1990) se 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 nucleótidos respectivamente.

Si se analiza la taxonomía actual de los *Arenaviridae* usando las mismas reglas propuestas por Ward y Rueckert, la identidad en la secuencia nucleotídica entre los virus Pampa y Oliveros (84,6%) estaría cerca del valor de corte propuesto (85%) entre especies y cepas. Una definición más clara de la relación taxonómica entre Pampa y Oliveros deberá aguardar a la obtención de datos más amplios de la secuencia nucleotídica.

Igualmente, si se utiliza el valor de corte propuesto entre especies y cepas en los *Arenaviridae*, la relación entre las cepas Nigeria y Josiah del virus Lassa debería ser reevaluada. La identidad en la secuencia nucleotídica entre estas dos cepas (73,9%) es similar al valor obtenido entre especies virales relacionadas pero bien definidas, por ejemplo, los virus Machupo y Junín MC2 exhiben un valor de identidad del 73,9% si se considera la misma región. También, se puede realizar el mismo tipo de análisis en las comparaciones de la secuencia nucleotídica del RNA S completo. El valor de identidad de secuencia entre las cepas Nigeria y Josiah del virus Lassa (78%) es inferior a los valores de identidad entre las cepas del virus Junín (98-99%) y entre las cepas WE y Armstrong del virus LCM (94%). No obstante, la similitud en la secuencia de aminoácidos de las proteínas N y GPC (94 y 96% respectivamente) entre las cepas del virus Lassa, definen su estrecha relación inmunológica.

Finalmente, la utilización de los *primers* generalizados en los ensayos de RT-PCR podría facilitar la detección de arenavirus conocidos o aún no descritos en muestras clínicas o de campo; y el ensayo de RFLP permitiría una caracterización preliminar rápida y económica de los mismos, en laboratorios de mediana complejidad.

CAPÍTULO 6

ESTUDIO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

INTRODUCCIÓN

La antiterminación de la transcripción es un proceso que regula la actividad génica y ha sido estudiada en varios sistemas procariotas y eucariotas (Lazinski *et al.*, 1989; Roberts, 1993; Greenblatt *et al.*, 1993; Chattopadhyay *et al.*, 1995). Recientemente, han surgido evidencias sobre los mecanismos comunes que controlan la elongación de los transcritos sintetizados por las RNA polimerasas procariotas y eucariotas (Krumm *et al.*, 1993). Estos resultados son compatibles con la similitud en la secuencia de aminoácidos y la función de las subunidades mayores de ambas enzimas. Además, se ha determinado que la interacción de la RNA polimerasa con otros componentes del complejo de transcripción evitan su detención en pausas y la terminación prematura de la transcripción en varios sistemas eucariotes (Cullen, 1994; O'Brien *et al.*, 1994; Krumm *et al.*, 1995).

En presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas, la transcripción del RNA S de los arenavirus se interrumpe en la región intergénica y genera únicamente, el mRNA para la proteína N (Rivera-Pomar, 1991; Rivera-Pomar *et al.*, 1992; Franze-Fernández *et al.*, 1987). Este fenómeno sugiere la existencia de un mecanismo molecular de antiterminación que permita la síntesis de la copia antígenómica *full-length* del RNA S. *A priori*, esta función podría ser llevada a cabo por la proteína N, por algún otro producto génico viral o por un polipéptido celular con una alta tasa de recambio.

Los resultados de este trabajo mostraron que el cambio de modalidad desde la transcripción hacia la replicación en el virus Junín, está sujeta a una terminación dependiente de la estructura secundaria de la región intergénica y a un control de antiterminación, llevado a cabo por la proteína N.

RESULTADOS

6.1. Diseño del sistema experimental

Con el objeto de expresar el gen N en células eucariotas, se construyó un plásmido recombinante, incluyendo el marco de lectura abierto del gen N y las regiones no codificantes que flanquean al gen en 5' y 3'. En el plásmido recombinante (pKG4/N) la transcripción del gen N se halla bajo el control del promotor del antígeno T del virus SV40 (Rivera Pomar *et al.*, 1991).

La transfección de células BHK21 con el plásmido pKG4/N, permitió la selección de clones (BHK/N-JUN), por su resistencia al antibiótico G418, análogo de la neomicina. La proteína N del virus Junín fué detectada en el citoplasma celular por inmunofluorescencia y su tamaño fué determinado por *Western blot*, usando anticuerpos monoclonales específicos (Sánchez *et al.*, 1989). De este modo, se confirmó que las características de la proteína N sintetizada constitutivamente en las células BHK/N-JUN, era semejante al observado en células BHK21 infectadas (Rivera Pomar *et al.*, 1992). Sin embargo, al tiempo que la proteína N alcanzaba una alta concentración intracelular, se observaba un efecto citopático pronunciado que conducía a la muerte celular en las etapas tempranas de la selección clonal. En consecuencia, los clones seleccionados (BHK/N-JUN) expresaban constitutivamente el gen N, con un nivel menor que en los pasajes iniciales.

Con el propósito de estudiar el fenómeno de antiterminación, se examinó la replicación del virus Junín en células infectadas (BHK21 y BHK/N-JUN), en presencia y ausencia de síntesis de proteínas. El antibiótico puromicina se agregó al medio de cultivo para inhibir la síntesis de proteínas en las células, previamente a ser infectadas. Posteriormente, se usó una reacción de RT-PCR para detectar la síntesis de los transcritos antígenómicos en las células infectadas.

El diseño experimental se muestra en la Figura 6.1. La detección de los transcritos antígenómicos se realizó mediante una síntesis de cDNA, específica de cadena. La discriminación entre el mRNA para la proteína N y la copia antígenómica completa del RNA S (RNA S *vc full-length*) se logró mediante una amplificación con *primers* específicos. De acuerdo a este sistema, el fragmento amplificado de 186 pb resulta indicativo de secuencias conteniendo el gen N, que podrían representar el mRNA de N y/o el RNA S viral complementario. En tanto que, el fragmento amplificado de 310 pb indica

la presencia del RNA S antigenómico o viral complementario, conteniendo secuencias complementarias al gen GPC.

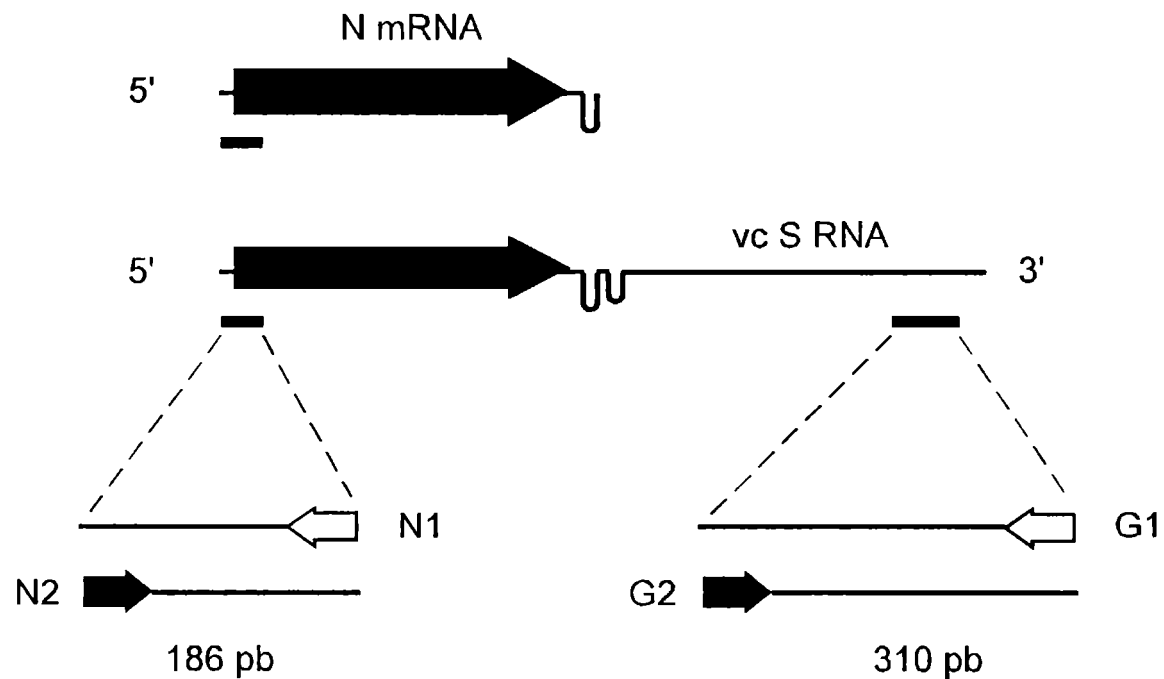


Figura 6.1. Diseño experimental utilizado para la detección de los transcritos antigenómicos del virus Junín. Las formas antigenómicas (mRNA de la proteína N y RNA S vc *full-length*) se muestran en la parte superior de la figura. Los *primers* usados para la detección por RT-PCR se indican abajo como flechas vacías o rellenas. Solamente los *primers* de sentido viral, N1 y G1, fueron usados en la síntesis de cDNA. A continuación, se utilizó el par de *primers* N1 y N2 para detectar el mRNA de N y el RNA S vc; mientras que los *primers* G1 y G2 fueron usados para detectar el RNA S vc *full-length*. El tamaño en pares de bases (pb), de los productos de amplificación predichos se indican debajo.

6.2. Detección de la antiterminación *in vivo*

Los experimentos mostrados en la Figura 6.2 corresponden a muestras obtenidas a 24 horas pos-infección. El fragmento de 186 pb fue detectado en células infectadas (calles 3, 4, 5 y 6) y en células BHK/N-JUN no infectadas (calle 2). La detección en estas últimas se debe a la expresión endógena del gen N. El control negativo para esta detección, corresponde a células BHK21 no infectadas (calle 1).

Por otra parte, el fragmento de 310 pb fue detectado en células infectadas sin tratar con puromicina (calles 9 y 10) y en las células BHK/N-JUN infectadas y tratadas con puromicina (calle 12). El control negativo para esta detección corresponde a células BHK21 y BHK/N-JUN no infectadas (calles 7 y 8).

El resultado clave de este ensayo se obtiene al comparar los resultados en las calles 11 y 12. Mientras que la puromicina inhibe la síntesis del RNA S_{vc} en células BHK21 infectadas (calle 11), esta especie molecular fue detectada en células BHK/N-JUN inhibidas e infectadas (calle 12).

Los resultados descritos anteriormente fueron confirmados en diferentes repeticiones del ensayo completo y además, se llevó a cabo un control adicional para este ensayo. Experimentalmente, se repitió el procedimiento de síntesis de cDNA, en ausencia de *primers*, sobre muestras de RNA extraídas de células BHK21 y BHK/N-JUN infectadas. El resultado negativo de la detección por PCR permitió descartar la posibilidad que otras moléculas, aparte de los oligonucleótidos G1 y N1, pudieran iniciar la síntesis de cDNA y generar artefactos.

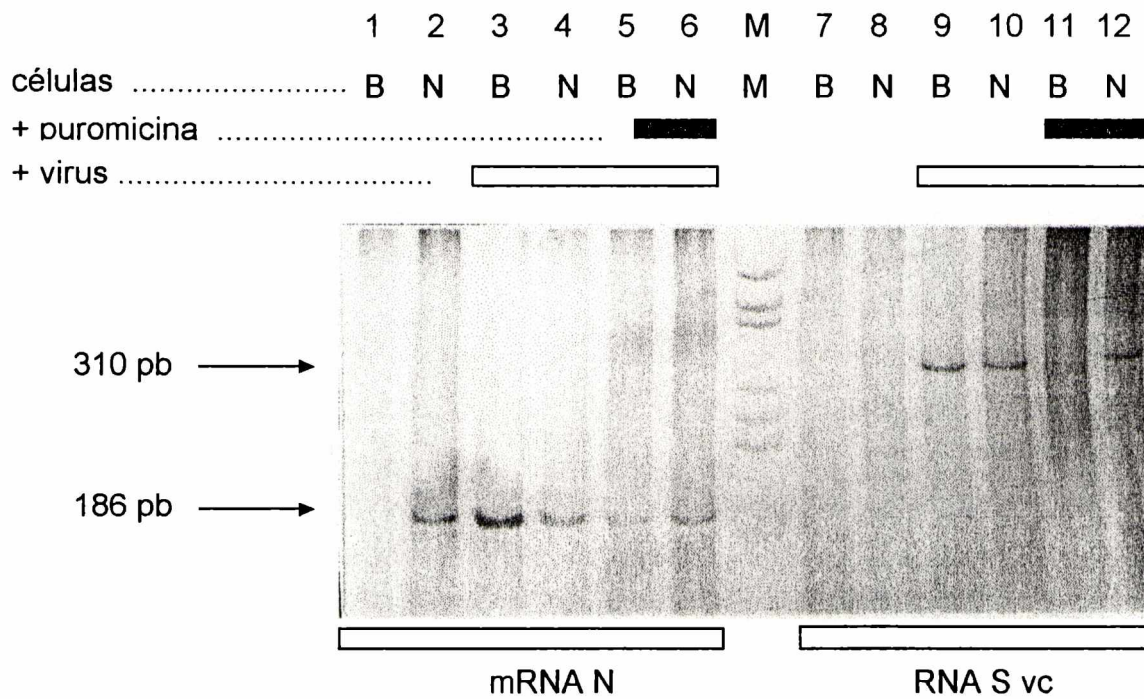


Figura 6.2. Detección de antiterminación de transcripción en el RNA S del virus Junín. A varios tiempos pos-infección, se aisló RNA celular total y se realizaron las ampliificaciones por RT-PCR como se describió en materiales y métodos. Los productos de amplificación fueron analizados por PAGE y detectados por tinción con plata. En el gel se muestra el análisis de las muestras correspondientes a 24 horas pos-infección. Las calles "B" corresponden a células BHK21, mientras que las calles "N" corresponden al clon BHK-NJUN, que expresa establemente el gen N. La infección viral de las células "B" y "N" se indican por un rectángulo abierto sobre las calles correspondientes (3, 4, 5, 6 y 9, 10, 11, 12). En forma similar, la inhibición de la síntesis de proteínas se indica por un rectángulo lleno (calles 5, 6, y 11, 12). Las células "B" y "N" sin infectar fueron usados como controles (calles 1, 2, 7 y 8). La calle "M" corresponde al marcador de peso molecular.

6.3. Ensayo de antiterminación en otros sistemas virales

El ensayo completo se repitió infectando células BHK y BHK/N-JUN, en presencia y ausencia de síntesis de proteínas, con la cepa XJ#44 del virus Junín. El resultado positivo de este ensayo permite afirmar que la proteína N de la cepa MC2 soporta la síntesis del RNA S vc de la cepa heteróloga, en presencia de puromicina. Este resultado es compatible con el valor de similitud (99%) en la secuencia de la proteína N de ambas cepas.

Por otra parte, se realizaron dos ensayos para analizar el proceso de antiterminación en el RNA S del virus LCM. En un ensayo se obtuvieron clones que expresaban constitutivamente el gen N del virus LCM (BHK/N-LCM), generados por transfección de células BHK21 con el plásmido pKG4/NLCM. A continuación, se infectaron células BHK/N-LCM con el virus LCM, en presencia y ausencia de síntesis de proteínas. Este ensayo se diseñó para determinar si los datos obtenidos para el virus Junín, eran compatibles para otro miembro de la familia de los arenavirus.

En otro ensayo, se infectaron células BHK/N-JUN con el virus LCM, en presencia y ausencia de síntesis de proteínas. El objetivo de este análisis permitiría determinar si la proteína N del virus Junín podía funcionar como antiterminador en el sistema de transcripción/replicación del virus LCM.

De acuerdo a los resultados de ambos ensayos, el modelo experimental fué descartado para el sistema del virus LCM. En principio, se logró una detección positiva del RNA S vc *full-length*, en presencia y ausencia de síntesis de proteínas, en todos los tipos celulares. Los datos fueron interpretados considerando que la síntesis de proteínas, inhibida en un 95%, permitía la acumulación de la proteína N y la síntesis del RNA S vc *full-length* a las 24 horas pos-infección. En ensayos posteriores, se detectó el RNA S vc del virus LCM en muestras obtenidas a tiempos pos-infección progresivamente menores. Incluso, esta especie de RNA fué detectada en los inóculos utilizados, correspondientes a sobrenadantes de células infectadas. La interpretación más probable de estos resultados, es que los viriones de LCM contienen una cantidad suficiente del RNA S viral complementario para ser detectada por RT-PCR. Por este motivo, sería necesario diseñar un sistema de detección cuantitativo que permita apreciar la cantidad del RNA S vc del virus LCM sintetizada en presencia y ausencia de síntesis de proteínas.

Con respecto al virus Junín, la forma complementaria del RNA S también formaría parte de los viriones; sin embargo, su concentración estaría por debajo del nivel mínimo requerido para su detección en las condiciones experimentales utilizadas.



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

MW
57473

DISCUSIÓN

En estudios previos, se analizaron los extremos 3' de los mRNA para la proteína N del virus Junín MC2, mediante ensayos de protección a RNAsa (Rivera Pomar, 1991). Brevemente, se obtuvieron híbridos en solución a partir de RNA total de células infectadas y una sonda de RNA de polaridad genómica, abarcando la región intergénica del RNA S. El tratamiento de los híbridos con una mezcla de RNAsa T1 y RNAsa A, rindió dos productos protegidos: uno de mayor tamaño, resultante de la hibridación de la sonda con el RNA S vc, y otro menor, resultante de la hibridación de la sonda con del mRNA de N. El tamaño del producto menor, indicó que la transcripción termina prematuramente en la región intergénica y genera el mRNA de N con una copia del primer *hairpin-loop* en su extremo 3'. De acuerdo a estos resultados, se postuló que la estructura de los *hairpins* podría representar una señal de terminación de la transcripción. Además, estos resultados son compatibles con reportes previos relacionados con los mRNAs del arenavirus Tacaribe (Iapalucci *et al.*, 1991).

Es interesante notar que la terminación prematura, también fué detectada en un sistema heterólogo de transcripción *in vitro* (*run-off transcription assay*). El ensayo fué realizado sobre un molde plasmídico conteniendo la secuencia del gen N completo y la región intergénica, bajo el control del promotor del fago T7. En estas condiciones se sintetizaron moléculas de RNA con una terminación cercana al primer *hairpin-loop* (Rivera Pomar, 1991).

De acuerdo a los resultados descriptos, se desprende la existencia de un mecanismo molecular que impide la terminación de la transcripción en la región intergénica y permite la generación de las copias antigenómicas completas del RNA S. El sistema de antiterminación cambiaría la modalidad desde la transcripción hacia la replicación, durante el transcurso de la infección viral.

La hipótesis de trabajo se formuló en base a los resultados obtenidos sobre el virus Junín y a los reportes bibliográficos sobre los sistemas de antiterminación de la transcripción en los fagos (Greenblatt *et al.*, 1993). En estos últimos, la antiterminación resulta de la interacción de proteínas del fago con el mRNA naciente. Por este motivo, se consideró la posibilidad de que la proteína N del virus Junín pudiera cumplir, de algún modo, con la función de antiterminación.

Para estudiar el proceso de antiterminación *in vivo*, se examinó la transcripción del RNA S, en ausencia de síntesis de proteínas y en presencia de proteína N endógena. La detección de las formas antigenómicas se realizó por medio de una reacción de amplificación por RT-PCR, específica de cadenas (Figura 6.1). Esta se basa en sintetizar el cDNA utilizando *primers* de polaridad viral que permiten detectar las formas complementarias (mRNA de N y RNA S vc). La discriminación de las formas antigenómicas se obtiene en la reacción de amplificación por PCR, usando los *primers* de polaridad viral junto con otros específicos para cada producto y de polaridad complementaria. Esta metodología ha sido utilizado en otros sistemas virales para examinar el curso de la replicación (Takeda *et al.*, 1992; Lanford *et al.*, 1994; Tam *et al.*, 1996).

Como se muestra en la Figura 6.2, el mRNA de N y la forma vc del RNA S fueron sintetizados en células BHK21 infectadas; pero solamente el mRNA de N fué detectado en estas células, cuando fueron pre-incubadas con puromicina. Estos datos indicarían que la señal de terminación de la transcripción no puede ser sobrepasada en ausencia de síntesis de proteínas. Sin embargo, cuando las células que contenían la proteína N endógena (BHK/N-JUN) fueron infectadas en las mismas condiciones experimentales, se sintetizó la forma *full-length* del RNA S vc, además del mRNA de N.

La información obtenida en estos ensayos indicaría que la proteína N funciona como antiterminador en el sistema de replicación del virus Junín. El esquema presentado en la Figura 6.3 presenta un modelo compatible con estos resultados.

La actividad de antiterminación de la proteína N podría ser interpretada de acuerdo a tres hipótesis. En principio, habría que considerar la posibilidad que la proteína N posee una alta afinidad por la estructura de los *hairpins*. A su vez, esta interacción anularía la señal de terminación de la transcripción en la región intergénica. Por ningún motivo, esto se contrapone con la función estructural de la proteína N, que se asocia a toda la extensión RNA S durante el proceso de ensamblaje de la nucleocápside.

Otra hipótesis es que la proteína N se une al transcrito naciente cuando alcanza una alta concentración intracelular, luego de la traducción de su mRNA. De este modo, cambiaría el destino del transcrito hacia la formación de una copia *full-length* del RNA S viral.

También es posible que la proteína N se asocie con el complejo de transcripción/replicación y torne a la RNA polimerasa viral insensible a la señal de terminación de la transcripción.

En este punto, es necesario mencionar una hipótesis alternativa (Franze-Fernández *et al.*, 1993) basada en el procesamiento pos-transcripcional del RNA S_{vc} y la generación del mRNA de N. La ribonucleasa hipotética podría degradar progresivamente al RNA S_{vc}, hasta alcanzar la estructura secundaria de la región intergénica (actividad exonucleasa); o por un corte interno sobre la misma región (actividad endonucleasa). De acuerdo a este modelo, la proteína N impediría la actividad enzimática de la RNAsa y mantendría la concentración del RNA S_{vc} en un estado estacionario.

El modelo alternativo resulta mucho más complejo que el mecanismo molecular de antiterminación, propuesto en este trabajo, y requiere de una nucleasa celular o una nueva función para una de las cuatro proteínas virales. Por otra parte, las predicciones del modelo alternativo pueden ser analizadas experimentalmente. En este sentido, un ensayo de *Northern blot* permitiría la detección de productos parcialmente digeridos generados por la actividad de una exorribonucleasa a tiempos cortos. De modo similar, este ensayo permitiría detectar los productos resultantes del corte generados por la participación de una endorribonucleasa. En ningún caso se han observado estos productos y en consecuencia, la evidencia experimental le resta validez al modelo alternativo (Franze Fernández *et al.*, 1993; Iapalucci *et al.*, 1991; Rivera Pomar, 1991).

El mecanismo de antiterminación, propuesto en este trabajo, es similar al modo de acción en los sistemas dependientes de DNA. En el caso del virus Junín, se trata de un sistema de síntesis de RNA dependiente de RNA y permitiría el cambio de modalidad desde la transcripción viral primaria a la replicación.

La relación entre la proteína N y el cambio de modalidad desde la transcripción hacia la replicación, también se ha demostrado en otros sistemas virales. Sin embargo, durante la replicación de los rhabdovirus y paramixovirus hay un requerimiento de la síntesis de proteínas, y más específicamente de la proteína N. Por otra parte, sus RNAs genómicos no tienen estructuras secundarias conspicuas en las regiones intergénicas (Patton *et al.*, 1984; Pattnaik *et al.*, 1992; Horikami *et al.*, 1992).

Los experimentos realizados *in vitro* sobre el virus Tacaribe, sugieren que la proteína Z es requerida para la replicación viral y, en menor grado, para la síntesis de los mRNAs (Garcin *et al.*, 1993). Los resultados de este estudio no descartan el posible rol de la proteína Z en la replicación del virus Junín. De hecho, la cantidad de esta proteína, incorporada por los viriones en la célula hospedadora, podría ser suficiente para cumplir con su función. En contraste,

las moléculas de la proteína N aportada por el virión, serían insuficientemente para actuar como antiterminador de transcripción. En consecuencia, la proteína N sintetizada *de novo* en la célula infectada, llevaría a cabo esta función y determinaría el inicio de la replicación.

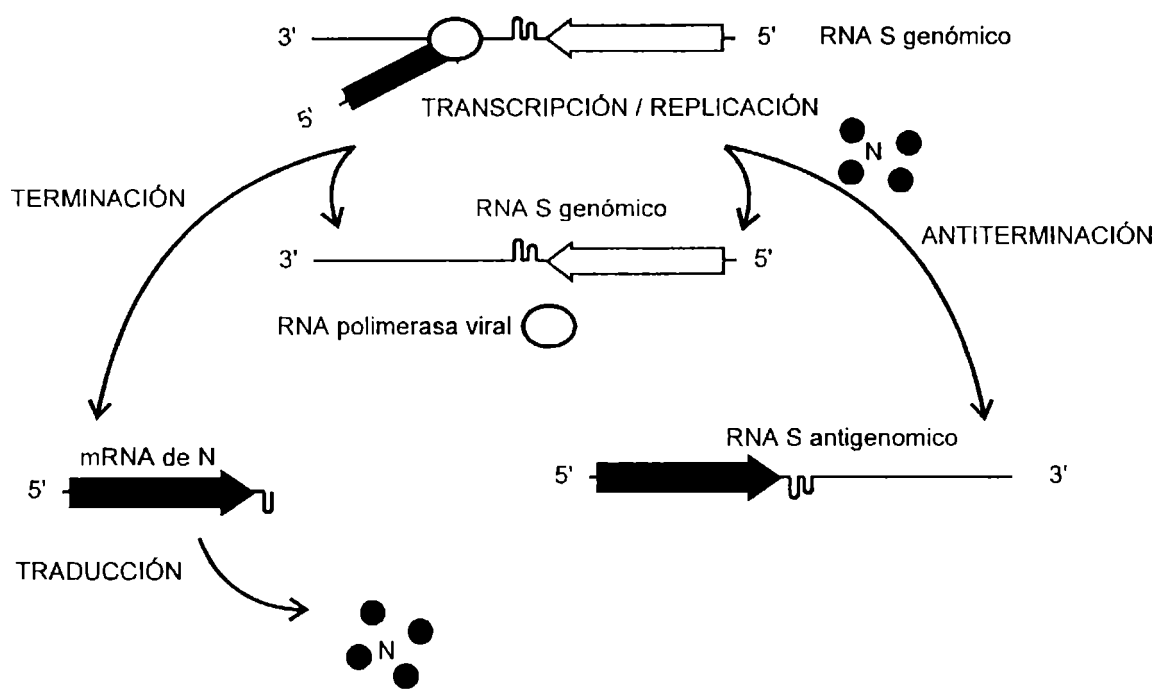


Figura 6.3. Modelo propuesto para el mecanismo de antiterminación en el virus Junín. A bajos niveles intracelulares de la proteína N, el extremo 3' de los RNA transcritos se pliegan en un *hairpin*, obligando a la RNA polimerasa a tomar una pausa y terminar la transcripción. La proteína N sintetizada *de novo*, se podría unir a la estructura de los *hairpins*, al RNA nascente o al complejo de transcripción, anulando la señal de terminación o tornando la RNA polimerasa, insensible a esa señal. Además, la proteína N se une al RNA S *full-length* para formar la nucleocápside, bajando la cantidad de N libre actuando como antiterminador y permitiendo una síntesis adicional del mRNA de N. Ambas funciones de N (control transcripcional y estructural) son probablemente la base para la síntesis simultánea del mRNA de N y del RNA S *full-length*.

Por otra parte, se han reportado numerosos antecedentes relacionados a la interacción proteína-RNA. Los datos publicados indican que las proteínas que se unen a determinadas estructuras secundarias en el RNA (Greenblatt *et al.*, 1993; Mataj, 1993) poseen motivos ricos en arginina (ARM, *arginine rich motif*). Una de ellas, la proteína N del fago λ reconoce un *hairpin* en los mRNA tempranos del fago y cumple la función de antiterminación. La proteína N de los fagos *lambdoides*, 21 y P22, tendría un modo de acción semejante. Los ARMs, también han sido encontrados encontrados en las proteínas Rev y Tat de HIV; residuos específicos de Arg en esta última proteína han sido involucrados en el reconocimiento de la estructura secundaria del TAR (Calnan *et al.*, 1991). Además, se ha sugerido que la proteína N del virus Hantaan contiene un ARM y que se une preferencialmente a regiones de doble cadena de RNA, tales como las que se encuentran en los *hairpins* (Gött *et al.*, 1993).

En este sentido, se han encontrado motivos semejantes a los descritos, en la proteína N del virus Junín (Romanowski, 1993) y en el resto de los arenavirus (Rivera Pomar *et al.*, 1997). En coincidencia con los datos mencionados, se ha detectado la interacción de la proteína N con la región del *hairpin* del RNA S viral (Rivera Pomar *et al.*, 1997), en experimentos de retardo de la migración en gel (*gel shift*). Actualmente, se están desarrollando diferentes ensayos en el laboratorio del IBBM para indagar si la proteína N se une a una secuencia específica o una estructura particular de doble cadena (*pandhandle* o *hairpin loop*). También se están realizando ensayos para obtener datos sobre los dominios de esta proteína responsables de su interacción con el RNA.

Las evidencias presentadas en este trabajo, como resultado de los ensayos *in vivo*, junto con los datos obtenidos sobre la interacción proteína-RNA, sugieren que la proteína N cumple la función de antiterminador de la transcripción en el sistema del virus Junín.

Finalmente, resta aclarar que hasta el presente, no se puede establecer si el cambio de modalidad desde la transcripción hacia la replicación del virus Junín está definido simplemente por la concentración de N. También, habría que considerar esquemas más complejos involucrando interacciones con otras proteínas virales o celulares, o inclusive, otras funciones, como la modificación (p.ej. fosforilación) de los componentes del complejo de transcripción-replicación.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES GENERALES

Estudio sobre la atenuación de la virulencia en el virus Junín

La cepa atenuada Junín Candid #1 fué desarrollada como una vacuna a virus vivo, para la fiebre hemorrágica argentina. En este estudio se obtuvo la secuencia nucleotídica del RNA S de los antecesores virulentos de la cepa vacunal, XJ (prototipo) y XJ#44. Las secuencias se examinaron en relación a la cepa vacunal y a la cepa salvaje MC2. El análisis y comparación de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de los genes GPC y N de estas cepas, permitió la detección de algunos cambios únicos a la cepa vacunal. Estos cambios podrían ser asociados provisionalmente con el fenotipo atenuado de esta cepa.

Análisis filogenético en la familia de los arenavirus

Los arenavirus aislados en el Viejo Mundo y en el Nuevo Mundo se distinguen por una serie de propiedades serológicas y genéticas. En este estudio se examinó la relación filogenética entre los miembros de la familia de los arenavirus, utilizando las secuencias nucleotídicas del RNA S y las secuencias aminoacídicas predichas para las proteínas GPC y N. Los resultados de este análisis reveló un posible parentesco entre los arenavirus Pichindé y Oliveros, aislados en el continente americano, con los arenavirus del Viejo mundo. Este análisis permitiría establecer las relaciones evolutivas entre los arenavirus del continente americano y evaluar las diferentes hipótesis sobre su origen.

Caracterización molecular de nuevos arenavirus

El análisis de la secuencia nucleotídica del RNA S de los arenavirus permitió la detección de numerosas regiones conservadas. A partir de ellas, se diseñaron *primers* generalizados para amplificar por RT-PCR un conjunto de fragmentos de cDNA, cubriendo la extensión completa del RNA S. A continuación, se diseñó un análisis de restricción (RFLP) para tipificar rápidamente los fragmentos amplificados. El ensayo completo de RT-PCR/RFLP permitió identificar un arenavirus nuevo, aislado en una muestra de campo.

Estudio sobre la regulación de la transcripción

La transcripción inicial del genoma de los arenavirus se interrumpe en la región intergénica y requiere de la síntesis de proteínas para superar esta señal. El mecanismo molecular que controla la antiterminación de la transcripción, también sería responsable del cambio de modalidad hacia la replicación en los arenavirus. Este evento se analizó experimentalmente, infectando una línea celular que expresaba constitutivamente el gen N, en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas. El resultado de este ensayo confirmó la participación de la proteína de la nucleocápside en el evento de antiterminación de la transcripción en el virus Junín. En este sistema experimental, la proteína regulatoria preexistente en la célula fue suficiente para ejercer su efecto, en ausencia de la síntesis de proteínas simultánea.

CAPÍTULO 8

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, R., SALMI, A., BUTLER, L.T., CHILLER, J.M. & OLDSTONE, M.B.A. (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. *Journal of Experimental Medicine* **60**, 521-540.
- AIHARA, S., RAO, C.M., YU, Y.X., LEE, T., WATANABE, K., KOMIYA, T., SUMIYOSHI, H., HASHIMOTO, H. & NOMOTO, A. (1991). Identification of mutations that occurred on the genome of Japanese encephalitis virus during the attenuation process. *Virus Genes* **5**, 95-109.
- ALBARIÑO, C.G.; GHIRINGHELLI, P.D.; POSIK, D.M.; LOZANO, M.E. AMBROSIO, A.M.; SANCHEZ, A. & ROMANOWSKI, V. (1997) Molecular characterization of attenuated Junin virus satrains. *Journal of General Virology* **78**, 1605-1610.
- ALBARIÑO, C.G.; POSIK, D.M.; GHIRINGHELLI, P.D.; LOZANO, M.E. & ROMANOWSKI, V. (1997). Arenavirus phylogeny: a new insight. *Virus Genes*. En prensa.
- AMBROSIO, A., ENRÍA, D & MAIZTEGUI, J.I. (1986). Junín virus isolation from lymphomononuclear cells of patients with Argentine hemorrhagic fever. *Intervirology* **25**, 97-102.
- AUPERIN, D.D., COMPANS, R.W. & BISHOP, D.H.L. (1982). 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., ROMANOWSKI, V., GALINSKI, M.S., & BISHOP, D.H.L. (1984). Sequencing studies of Pichindé arenavirus S RNA indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S RNA. *Journal of Virology* **52**, 897-904.
- AUPERIN, D.D. & MCCORMICK, J.B. (1989). Nucleotide sequence of the Lassa virus (Josiah strain) S genome RNA and amino acid sequence comparison of the N and GPC proteins to other arenaviruses. *Virology* **168**, 421-425.
- 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.I. & EDDY, G.A. (1982). Characteristics of candidate live attenuated Junin virus vaccine. *Fourth International Conference of Comparative Virology*, Alberta, Canada.
- BASSAM, B.J., CAETANO ANOLLES, G & GRESSHOFF, P.M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Analytical Biochemistry*, **196**, 80-83.

- BAYLEY, J.M. & DAVIDSON, N. (1976). Methylmercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis. *Analytical biochemistry*, **70**, 75-85.
- BIRNBOIM, H.C., & DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research* **7**, 1513-1523.
- BISHOP, D.H.L. (1990). Arenaviruses and their replication. En: *Virology*, segunda edición. Editado por Fields, B.N. & Knipe, D.M. New York, Raven Press. pp: 1231-1243.
- BOWEN, M.D., PETERS, C.J., MILLS, J.M. & NICHOLS, S.T. (1996a). Oliveros virus: a novel arenavirus from Argentina. *Virology* **217**, 362-366.
- BOWEN, M.D., PETERS C.J. & NICHOL S.T. (1996b). The phylogeny of New World (Tacaribe Complex) Arenaviruses. *Virology*, **219**, 285-290.
- BUCHMEIER, M., WALSH, R., DUTKO, F. & OLDSTONE (1980). The virology and immunobiology of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Advanced Immunology* **30**, 275-331.
- BUCHMEIER, M.J., CLEGG, J.C.S., FRANZE-FERNÁNDEZ, M.T., KOLAKOFSKY, D., PETERS, C.J., & 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.
- BURNS, J.W. & BUCHMEIER, M.J. (1991). Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* **183**, 620-629
- BURNS, J.W. & BUCHMEIER, M.J. (1993). Glycoproteins of Arenaviruses. En: *The Arenaviridae*. Editado por Salvato, M.S., Serie: The Viruses (Wagner, R. & Frankel Conrat, H. Eds.). New York. Plenum Press. pp: 17-35.
- CALDERÓN, G. (1996). Aislamiento, distribución y características de nuevos Arenavirus en la Argentina. Presentado en el Simposio sobre Diversos Arenavirus de Argentina. V Congreso Argentino de Virología. Tandil, Argentina.
- CALNAN, B.J., TIDOR, B., BIANCALANA, S., HUDSON, D. & FRANKEL, A.D. 1991. Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork. *Science*, **252**, 1167-1171.
- CHATTOPADHYAY, S., GARCIA-MENA, J., DEVITO, J., WOLSKA, K. & DAS, A. 1995. Bipartite function of a small RNA hairpin in transcription antitermination in bacteriophage lambda. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **92**: 4061-5.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156-159.
- CLEGG, J.C., WILSON, S.M. & 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. (1993). Molecular phylogeny of the arenaviruses and guide to published sequence data. En: *The Arenaviridae*. Editado por Salvato, M.S., Serie: The Viruses (Wagner, R. & Frankel Conrat, H. Eds.). New York. Plenum Press. pp: 175-187.
- COHEN, J.I., ROSENBLUM, B., TICEHURST, J.R., DAEMER, R.J., FEINSTONE, S.M. & PURCELL, R.H. (1987). Complete nucleotide sequence of an attenuated Hepatitis A virus: Comparisson with wild type virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **84**, 2497-2501.
- 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. & TESH, R.B. (1994). New arenavirus isolated in Brazil. *Lancet* **343**, 391-392.
- COLLINS, P.L., HILL, M.G., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **92**, 11563-11567.
- COMPANS, R.W. (1993). Arenavirus ultrastructure and morphogenesis. En *The Arenaviridae*, Editado por M. S. Salvato, Serie: The Viruses (Wagner, R. & Frankel Conrat, H. Eds.). Plenum Press, New York. pp. 51-83.
- CULLEN, B. R. (1994). RNA-sequence-mediated gene regulation in HIV-1. *Infectious Agents Diseases* **3**: 68-76.
- DAVIS, N.L., BROWN, K.W., GREENWALD, G.F., ZAJAC, A.J., ZACNY, V.L., SMITH, J.F. & 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.
- DESHPANDE, K.L., FRIED, V.A., ANDO, M. & WEBSTER, R.G. (1987) Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **84**, 36-40.
- DEWEY, R.D., 1995. Caracterización Molecular e Inferencias evolutivas de Aislamientos Argentinos de Tospovirus. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- DUKE, G.M., OSORIO, J.E. & PALMENBERG, A.C. (1990). Attenuation of Mengo virus through genetic engineering of the 5' noncoding poly(C) tract. *Nature* **343**, 474-6.
- EDDY, G.A., WAGNER, F.S., SCOTT, S.K. & MAHLAUDT, B.J. (1975). Protection of monkeys against Machupo virus by the passive administration of Bolivian hemorrhagic fever immunoglobulin (human origin). *Bulletin W.H.O.* **52**, 723-727.

- ENDRES, M.J., GRIOT, C., GONZALEZ-SCARANO, F. & NATHANSON, N. (1991). Neuroattenuation of an avirulent bunyavirus variant maps to the L RNA segment. *Journal of Virology* **65**, 5465-70.
- ENRIA, D.A., GARCÍA-FRANCO, S., AMBROSIO, A., VALLEJOS, D., LEVIS, S., & MAIZTEGUI, J. (1986). Current status of the treatment of Argentine Hemorrhagic Fever. *Medical and Microbiological Immunology* **175**, 173-176.
- FELSENSTEIN, J. (1996). PHYLIP (Phylogeny Inferencing Package) Version 3.5, University of Washington, USA.
- FRANZE-FERNANDEZ, M.T.; ZETINA, C.; IAPALUCCI, S.; LUCERO, M.A.; BOISSOU, C.; LOPEZ, R.; REY, O.; DAHELI, M.; COHEN, G., & ZAKIN, M. (1987). Molecular structure and early events in the replication of Tacaribe Arenavirus S RNA. *Virus Research* **7**, 309-324.
- FRANZE-FERNANDEZ, M.T; IAPALUCCI, S.; LOPEZ, N. & ROSSI, C. (1993). Subgenomic RNAs of Tacaribe virus. En *The Arenaviridae*, Editado por M. S. Salvato, Plenum Press, New York. pp. 113-132.
- FULHORST, C.F., BOWEN, M.D., KSIAZEK, T.G., ROLLIN, P.E., NICHOL, S.T., KOSOY, M.Y. & PETERS, C.J. (1996). Isolation and characterization of Whitewater Arroyo virus, a novel North American arenavirus. *Virology* **224**, 114-120.
- FULLER-PACE, F. & SOUTHERN, P. (1989). Detection of virus-specific RNA-dependent RNA polymerase activity in extracts from cells infected with Lymphocytic Choriomeningitis Virus: In vitro synthesis of full-length viral RNA species. *Journal of Virology*, **63**, 1938-1944.
- GARCIN, D. & KOLAKOFSKI, D. (1992). Tacaribe arenavirus RNA synthesis in vitro is primer dependent and suggests an unusual model for the initiation of genome replication. *Virology* **66**, 1370-1376.
- GARCIN, D., ROCHAT, S. & KOLAKOFSKY, D. (1993). The Tacaribe arenavirus small zinc finger protein is required for both mRNA synthesis and genome replication. *Journal of Virology*, **67**, 807-812.
- GHIRINGHELLI, P.D., ROMANOWSKI, V. & GRAU, O. (1991). Síntesis enzimática de $\gamma^{32}\text{P}$ y $\alpha^{32}\text{P}$ nucleósidos trifosfatos. XXI Reunión anula de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB), Córdoba, Argentina.
- GHIRINGHELLI, P.D., RIVERA POMAR, R.V., LOZANO, M.E., GRAU, O. & 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 of General Virology* **72**, 2129-2141.
- GHIRINGHELLI, P.D., ALBARIÑO, C.G., PIBOUL, M. & ROMANOWSKI, V. (1997). The glycoprotein precursor gene of the attenuated Junín virus vaccine strain (Candid #1). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **56** (2), 216-225.

- GONZÁLEZ, J.P.; SÁNCHEZ, A. & RICO-HESSE R. (1995) Molecular phylogeny of Guanarito virus, an emerging arenavirus affecting humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **53**(1), 1-6.
- GONZÁLEZ, J.P.J.; BOWEN, M.D.; NICHOL, S.T. & RICO-HESSE, R. (1996) Genetic characterization and phylogeny of Sabiá virus, an emergent pathogen in Brazil. *Virology*, **221**, 318-324.
- GÖTT, P., STOHWASSER, R., SCHNITZLER, P., DARAI, G. & BAUTZ, E. (1993). RNA binding of recombinant nucleocapsid proteins of Hantaviruses. *Virology*, **194**, 332-337.
- GRIFFITHS, C.M., WILSON, S.M. & 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**, 371-377.
- GREENBLATT, J., NODWELL, J. R. & MASON, S.W. (1993). Transcriptional antitermination. *Nature*, **364**, 401-406.
- HAHN, C.S., DALRYMPLE, J.M., STRAUSS, J.H. & RICE, C.M. (1987). Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **84**, 2019-2023.
- HORIKAMI, S.M., CURRAN, J., KOLAKOFKY, D. & MOYER, S.A. (1992). Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. *Journal of Virology*, **66**, 4901-4908.
- IAPALUCCI, S., LOPEZ, R., REY, O., LOPEZ, N., FRANZE-FERNANDEZ, M.T., COHEN, G.N., LUCERO, M., OCHOA, A., & ZAKIN, M.M. (1989a). Tacaribe virus L gene encodes a protein of 2210 amino acid residues. *Virology*, **170**, 40-47.
- IAPALUCCI, S., LOPEZ, N., REY, O., ZAKIN, M.M., COHEN, G.N. & 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., & FRANZE-FERNÁNDEZ, M.T. (1991) The 3' end termini of Tacaribe arenavirus subgenomic RNAs. *Virology* **182**, 269-278.
- IAPALUCCI, S., CHERŇAVSKY, A., ROSSI, C., BURGÍN, M.J. & FRANZE-FERNÁNDEZ, M.T. (1994) Tacaribe virus gene expression in cytopathic and non-cytopathic infections. *Virology* **200**, 613-22.
- JENSEN, M.J. & MOORE, D.M. (1993). Phenotypic and functional characterization of mouse attenuated and virulent variants of foot-and-mouth disease virus type O1 Campos. *Virology* **193**, 604-13.
- KOHARA, M., ABE, S., KUGE, S., SEMLER, B.L., KOMATSU, T., ARITA, M., ITOH, H. & NOMOTO, A. (1986). An infectious cDNA clone of the poliovirus Sabin strain could be used as a stable repository and inoculum for the oral polio live vaccine. *Virology* **151**, 21-30.

- KOZAK, M. (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eucaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Research* **12**, 857-872.
- KRUG, R.M. (1981). Priming of Influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs. *Current Topics on Microbiological Immunology* **93**, 125-149.
- KRUMM, A., MEULIA, T., & GROUDINE, M. (1993). Common mechanisms for the control of eukaryotic transcriptional elongation. *Bioessays*, **15**: 659-65.
- KRUMM, A., HICKEY, L.B. & GROUDINE, M. (1995). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II defines a general rate-limiting step after transcription initiation. *Genes & Development* **9**: 559-72.
- 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.
- LANFORD, R.E., SUREAU, C., JACOB J.R., WHITE, R., FUERST, T.R. (1994). Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology* **202**: 606-14.
- LASCANO, E.F. Y BERRÍA, M.I., (1970). Microscopía electrónica de cultivos primarios de fibroblastos de ratón inoculados con virus Junín. *Medicina (Buenos Aires)* **29**, 487-493.
- LAZINSKI, D., GRZADZIELSKA, E. & DAS, A. (1989). Sequence-specific recognition of RNA hairpins by bacteriophage antiterminators requires a conserved arginine-rich motif. *Cell*, **59**, 207-218.
- LAW, M.D., SPECK, J. & MOYER, J.W. (1992). The M RNA of impatiens necrotic spot Tospovirus (Bunyaviridae) has an antisense genomic organization. *Virology* **188**, 732-741
- LOZANO, M.E., GRAU, O. & 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. & GRAU O. (1993b). Nucleic acids amplification assay for the early and rapid detection of Junín virus in whole blood samples. *Virus Research* **27**, 37-53.
- LOZANO, M.E., ENRÍA, D., MAIZTEGUI, J.I., GRAU, O. & ROMANOWSKI V. (1995). Rapid diagnosis of argentine hemorrhagic fever by reverse transcriptase PCR-based assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**:5, 1327-1332.
- LOZANO, M.E. (1995). Desarrollo de un método de diagnóstico rápido para la fiebre hemorrágica argentina. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- LOZANO, M.E.; POSIK, D.M.; ALBARIÑO, C.G. SCHUJMAN, G.; GHIRINGHELLI, P.D., CALDERÓN, G.; SABATTINI, M. & 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**, 78-79.
- LUKASHEVICH, I.S., DJAVANI, M., SHAPIRO, K., SANCHEZ, A., RAVKOV, E., NICHOL, S.T. & SALVATO, M.S. (1997). The Lassa fever virus L gene: nucleotide sequence, comparison, and precipitation of a predicted 250 kDa protein with monospecific antiserum. *Journal of General Virology* **78**, 547-551.
- LUYTJES, W., KRISTAL, M., ENAMI, M., PARVIN, J.D. & 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.
- MAIZTEGUI, J.I. (1975). Clinical and epidemiological patterns of argentine hemorrhagic fever. *Bulletin W.H.O.* **52**, 3385-1575.
- MAIZTEGUI, J.I. & SABATTINI, M. (1977). Extensión progresiva del área endémica de la fiebre hemorrágica argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, **37**:3, 162-166.
- MAIZTEGUI, J.I.; FERNÁNDEZ, N.J. & DAMILANO, N.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., & BRIGGILER, A. (1986). Progressive extension of the endemic area and changing incidence of AHF. *Medical and Microbiological Immunology* **175**, 73-78.
- MAIZTEGUI, J.I., BARRERA ORO, J.G., FEUILLADE, M.R., PETERS, C.J., VALLEJOS, D. & MCKEE, K.T. (1990). Inoculation of human volunteers with Candid #1, a live attenuated Junín virus vaccine candidate. *VIIIth International Congress of Virology*, Berlín, Germany. Abstracts Book, pp. 111.
- MATTAJ, I. W. (1993). RNA recognition: a family matter?. *Cell*, **73**, 837-840.
- MCCORMICK, J.B. (1990). Arenaviruses. En: *Virology*, segunda edición. Editado por Fields, B.N. & Knipe, D.M. New York. Raven Press. pp: 1245-1267.
- MCKEE, K.T. JR, MAHLANDT, B.G., MAIZTEGUI, J.I., GREEN, D.E., EDDY, G.A. & PETERS, C.J. (1985). Experimental Argentine haemorrhagic fever in rhesus macaques: virus strain-dependent clinical response. *Journal of Infectious Diseases* **152**, 218-221.
- MEYER, B.J. & SOUTHERN, P.J. (1994). Sequence heterogeneity in the termini of lymphocytic choriomeningitis virus genomic and antigenomic RNAs. *Journal of Virology* **68**: 7659-64.
- MILLS, J. (1996). Relaciones evolutivas entre los Arenavirus y sus reservorios. Presentado en el Simposio sobre Diversos Arenavirus de Argentina. V Congreso Argentino de Virología. Tandil, Argentina.

- O'BRIEN, T., HARDIN, S., GREENLEAF, A. & LIS, J.T. (1994). Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation. *Nature*, **370**: 75-7.
- PARODI, A.S., GREENWAY, D.J., RUGIERO, H.R., RIVERO, E., FRIGERIO, M.J., METTLER, N.E., GARZON, F., BOXACA, M., GUERRERO, L.B. & NOTA, N.R. (1958). Sobre la etiología del brote epidémico en Junín. *Día Médico (Buenos Aires)* **30**, 2300-2302.
- PATTNAIK, A.K., BALL, L.A., LEGRONE, A.W. & WERTZ, G.W. (1992). Infectious defective interfering particles of VSV from transcripts of a cDNA clone. *Cell*, **69**, 1011-1020.
- PATTON, J.T., DAVIS, N.L. & WERTZ, G.W. (1984). N protein alone satisfies the requirement for protein synthesis during RNA replication of vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology* **49**, 303-309.
- PIROSKY, I., ZUCCARINI, J., MOLINELLI, E.A., DI PIETRO, A., MARTINI, P., FERREYRA, B., GUTMAN, L.F., & VAZQUEZ, T. (1959). Virosis hemorrágica del noeste bonaerense. La primera inoculación experimental al hombre. *Orientación Médica* **8**, 144-148.
- POLO, J.M. & JOHNSTON, R.E. (1991). Mutational analysis of a virulence locus in the E2 glycoprotein gene of Sindbis virus. *Journal of Virology* **65**, 6358-61.
- PREHAUD, C., COULON, P., LAFAY, F., THIERS, C., & FLAMAND, A. (1988) Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. *Journal of Virology* **62**, 1-7.
- RAJU, R. RAJU, L., HACKER, D., CARCIN, D., COMPANS, R., & KOLAKOFSKY, D. (1990) Non-templated bases at the 5' ends of Tacaribe virus mRNAs. *Virology* **174**, 53-59.
- RIVERA POMAR, R.V. (1991). Análisis Molecular del Gen de la Proteína de la Nucleocápside del Virus Junín. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- RIVERA POMAR, R.V., MANZELLA, E.M., GHIRINGHELLI, P.D., GRAU, O. & ROMANOWSKI, V. (1991). Patterns of transient expression of the arenavirus nucleocapsid protein gene in transfected cells. *Biología Celular y Microscopía Electrónica*, **15**, 41-56.
- RIVERA POMAR, R. V., GHIRINGHELLI, P. D., LOZANO, M. E., ALBARIÑO, C.G. & ROMANOWSKI, V. (1992). Transcription of Junín virus S RNA. *NATO-EEC Course and Workshop on Regulation of Gene Expression in Animal Viruses* (Mallorca, España), abstract S7.
- RIVERA POMAR, R.V., LOZANO, M.E., ALBARIÑO, C.G., GHIRINGHELLI, P.D. AND ROMANOWSKI, V. (1997). Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity *in vivo*. En consideración.
- ROBERTS, J.W. (1993). RNA and protein elements of E. coli and lambda transcription antitermination complexes. *Cell*, **72**, 653-655.
- ROMANOWSKI, V. (1981). Estructura bioquímica del virus Junín. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

- ROMANOWSKI, V. & BISHOP, D.H.L. (1983). The formation of Arenaviruses that are genetically diploid. *Virology* **126**: 87-95.
- ROMANOWSKI, V., MATSUURA, Y., & BISHOP, D.H.L. (1985). Complete sequence of the S RNA of lymphocytic choriomeningitis virus (WE strain) compared to that of Pichindé arenavirus. *Virus Research* **3**, 101-114.
- ROMANOWSKI, V. (1993) Genetic organization of Junín virus, the ethiological agent of argentine hemorrhagic fever. En *The Arenaviridae*, Editado por M. S. Salvato, Serie: The Viruses (Wagner, R. & Frankel Conrat, H. Eds.). Plenum Press, New York. pp. 51-83.
- RUECKERT R.R. (1990). Picornaviridae and Their Replication. En *Virology*, Segunda edición. Editado por Fields, B.N. & Knipe, D.M. New York. Raven Press. pp. 507-548.
- RUSTICI, S.M. (1984). Desarrollo in vitro del virus Junín, proteínas intracelulares. Tesis doctoral. Fac. de Cs. Exactas, U.N.L.P., Argentina
- SABATTINI, M.S., GONZALEZ DE RIOS, L.E., DIAZ, G. & VEGA, V.R. (1977). Infeccion natural y experimental de roedores con virus Junín. *Medicina* (Buenos Aires) **37** (Supl. 3), 149-161.
- 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.; JAIMES, E.; VASQUEZ, C.; ARAOZ, F. & QUARALES, J. (1991). Venezuelan hemorrhagic fever. *Lancet* **338**, 1033-1036.
- SALVATO, M., SHIMOMAYE, E. & 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. & 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.S. (1993). Molecular biology of the prototype arenavirus, Lymphocytic choriomeningitis virus. En: *The Arenaviridae*. Editado por Salvato, M.S. Serie: The Viruses (Wagner, R. & Frankel Conrat, H. Eds.). New York. Plenum Press. pp: 133-156.
- SAMBROOK, J., FRITSCH E.F. & MANIATIS T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- SANCHEZ, A., PIFAT, D.Y., KENYON, R.H., PETERS, C.J., MCCORMICK, J.B. & KILEY, M.P. (1989). Junin virus monoclonal antibodies: Characterization and crossreactivity with other arenaviruses. *Journal of General Virology* **70**, 1125-1132.

- SANGER, F.; NICKLEN, S & COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 5463-5466.
- SCHMALJOHN, C.S. & PATTERSON, J.L. (1990). Bunyaviridae and Their Replication. En *Virology*, Second Edition. Editado por Fields, B.N. & Knipe, D.M. New York. Raven Press. pp. 1175-1194
- SNYDER, M.H., BETTS, R.F., DEBORDE, D., TIERNEY, E.L., CLEMENTS, M.L., HERRINGTON, D., SEARS, S.D., DOLIN, R., MAASSAB, H.F. & 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.
- SPRIGGS, D.R., BRONSON, R.T. & FIELDS, B.N. (1983). Haemagglutinin variants of reovirus type 3 have altered central nervous system tropism. *Science* **220**, 505-507.
- TAKEDA S; SHIBATA M; MORISHIMA T; HARADA A; NAKAO A; TAKAGI H; NAGAI Y. (1992). Hepatitis C virus infection in hepatocellular carcinoma. Detection of plus-strand and minus-strand viral RNA. *Cancer* **70**: 2255-9.
- TAKEHARA, K., MIN, M.K., BATTLES, J.K., SUGIYAMA, K., EMERY, V.C., DALRYMPLE J.M. & BISHOP, D.H. (1989). Identification of mutations in the M RNA of a candidate vaccine strain of Rift Valley fever virus. *Virology*, **169**: 452-7.
- TAM, A.W., WHITE, R., REED, E., SHORT, M., ZHANG, Y., FUERST, T.R., LANFORD, R.E. (1996). In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vivo-infected primary macaque hepatocytes. *Virology* **215**: 1-9.
- TASHIRO, M., YAMAKAWA, K., TOBITA, K., KLENK, H.D., ROTT, R., & 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.
- TATEM, J.M., WEEKS-LEVY, C., GEORGIU, A., DIMICHELE, S.J., GORGACZ, E.J., RACANIELLO, V.R., CANO F.R. & MENTO, S.J. (1992). A mutation present in the amino terminus of Sabin 3 poliovirus VP1 protein is attenuating. *Journal of Virology* **66**, 3194-7.
- VRATI, S., FARAGHER, S.G., WEIR, R.C. & DALGARN, L. (1986). Ross River virus mutant with a deletion in the E2 gene: properties of the virion, virus-specific macromolecule synthesis, and attenuation of virulence for mice. *Virology*, **151**, 222-32.
- WALSETH, T.F. & JOHNSON, R.A. (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, **562**, 11-31.
- WARD, C.W. (1993). Progress towards a higher taxonomy of viruses. *Research in Virology* **144**, 419-453.

- WELSH, R.M. & BUCHMEIER, M.J. (1979). Protein analysis of defective interfering lymphocytic choriomeningitis virus and persistently infected cells. *Virology*, **96**, 503-515.
- WILSON, S.M. & 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.
- WULFF, H., LANGE, J.V., & WEBB, P.A. (1978). Interrelationship among arenaviruses measured by indirect immunofluorescence. *Intervirology*, **9**, 344-350.
- YOUNG, P.R. & HOWARD, C.R. (1983). Fine structure analysis of Pichindé virus nucleocapsids. *Journal of General Virology*, **64**, 833-842.
- ZHENG, D.X., DICKENS, L., LIU, T.Y. & 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.

Fe de Erratas

Página	donde dice	debe decir
v	virus satrains	virus strains
43	y se pasaron a través de	y se colectaron en
43	de 45 μ m	de 0,45 μ m
44	se desarrolle en	se desarrollase en
60	de la región G2	de la proteína N
86		(reemplazar página completa)
107	reveló un posible	revelaron un posible
109	virus satrains	virus strains