

## **PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA**

# **“LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DEL RNA VIRAL CON AGENTES DIRIGIDOS A ENZIMAS CELULARES COMO ESTRATEGIA ANTIVIRAL CONTRA EL VIRUS JUNÍN”**

**Wainstein, Denise Carina – LU: 1047000**

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

**Dra. Sepúlveda, Claudia Soledad - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, CABA**

Co-Tutor Interno:

**Dr. Prada, Federico - Fundación UADE, CABA**

13 de Agosto de 2018



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA  
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

## Agradecimientos

Hoy quiero agradecer a todos los que me estuvieron acompañando e hicieron este momento posible.

Gracias a la Dra. Damonte por darme la oportunidad de incorporarme a su laboratorio.

Gracias a mi directora de tesis, la Dra. Claudia Sepúlveda, por haberme enseñado y guiado todo este tiempo con tanto cariño y paciencia. Por no dejarme nunca bajar los brazos, por toda esa buena energía, optimismo y empuje hacia adelante que siempre me brindó. Por ser una excelente profesional pero sobre todo un excelente persona. Gracias Clau!!!

Gracias a todo el laboratorio de Virología, en especial a Juli, Fede, Ceci, Jose, Maxi, Nieves, Vero, Ale, Lau y Bri por haber podido contar siempre con ellos en cualquier momento. Gracias por los almuerzos, las charlas y por la buena onda de siempre.

Gracias a mis amigos por haberme acompañado de principio a fin en este proyecto. A mis amigos de la facu Fran, Mica, Nati, Maca, Tami, Emi, Juli y en especial Mati, Gise y Mechi, porque me ayudaron hasta en lo imposible. A Gasti, por las charlas, los cafés y por hacer de mi trabajo un lugar tan lindo y divertido. A mis amigos de la vida, en especial a Cami, Arcu, Ro, Manu, Melu, Wen, Sofi, Vicky y Facu gracias por estar siempre. A mi hermana biotecnóloga Agos, por acompañarme y recorrer todo este camino conmigo. Su amistad es una de las cosas más valiosas que me llevo de la carrera. A mi hermana de la vida, Daf, con quien emprendí mi primer proyecto de investigación hace ya 6 años. Gracias por el apoyo y amor incondicional de siempre, por recordarme y demostrarme que siempre se puede.

Gracias a mi familia por estar siempre y confiar en mí. A mis viejos, sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Gracias por haberme transmitido desde chiquita que con trabajo y esfuerzo todo es posible. Por guiarme y apoyarme siempre en cada una de mis decisiones. A Martu, Por ser mi “compañero de estudio” este ultimo tiempito, por los mates, los chistes y por tus palabras de aliento. A Charlotte y Olivia. A mis primos y tíos, y en especial a mi tía Mónica por tanto amor, por estar siempre, por repetirme una y otra vez “*the sky is the limit*”. A mi bobo Beba, por estar pendiente de cada nota, y por su compañía en mis tardes de estudio. A Tuti, por ser mí sede favorita de estudio. Por los almuerzos, los mates, las risas. Gracias por todos estos años de amor incondicional y apoyo!!

## Resumen

### **La inhibición de la síntesis del RNA viral con agentes dirigidos a enzimas celulares como estrategia antiviral contra el virus Junín**

El virus Junín (JUNV), perteneciente a la familia *Arenaviridae* y causante de la enfermedad conocida como fiebre hemorrágica Argentina, carece aún de un tratamiento. Es por eso, que en el presente trabajo proponemos a IMPDH como blanco para terapias antivirales. Para ello, se utilizaron siRNAs como herramienta para el silenciamiento de la enzima con el fin de analizar el impacto del mismo en la replicación viral de JUNV. Los efectos del silenciamiento fueron evaluados a nivel transcripcional del mensajero de la enzima por la técnica de PCR en tiempo real, y a nivel de expresión de proteína, con la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Dado los bajos niveles de silenciamiento obtenidos por esta técnica, se recurrió al silenciamiento mediado por shRNAs codificados en plásmidos. Los resultados obtenidos mostraron que el silenciamiento de la enzima impacta negativamente sobre la expresión de proteínas virales y a su vez, este efecto se vio revertido por el agregado a las células de un exceso de guanosina, el producto de la vía metabólica de esta enzima. Además, se evaluó la sensibilidad de JUNV ante los inhibidores farmacológicos de la enzima IMPDH RIB y MPA, mostrando niveles similares de inhibición a los descritos en la bibliografía en dosis no citotóxicas.

Los resultados obtenidos demuestran que la enzima IMPDH es un blanco antiviral promisorio y representan un punto de partida para futuros estudios con otros sistemas virales, a fin de desarrollar una estrategia antiviral de amplio espectro para el tratamiento de enfermedades virales huérfanas de tratamiento.

## **Abstract**

### **Inhibition of viral RNA synthesis with agents directed to cellular enzymes as an antiviral strategy against Junín virus**

Junín virus belongs to the *Arenaviridae* family and causes the hemorrhagic fever disease, which has no cure yet. For this reason, in the present work, we propose IMPDH as a target for antiviral therapies. To do this, siRNAs were used as a tool for the silencing of the enzyme in order to analyze its impact on JUNV viral replication. The effects of the silencing were evaluated at the transcriptional level of the enzyme messenger by the real-time PCR technique, and at the level of protein expression, with the indirect immunofluorescence (IFI) technique. Given the low levels of silencing obtained by this technique, silencing was resorted to by shRNAs encoded in plasmids.

The results obtained showed that the silencing of the enzyme negatively impacts the expression of viral proteins and, in turn, this effect was reversed by the addition of excess guanosine to the cells, the product of the metabolic pathway of this enzyme. In addition, the sensitivity of JUNV to the pharmacological inhibitors of the enzyme IMPDH RIB and MPA was evaluated, showing similar levels of inhibition to those described in the literature in non-cytotoxic doses. The results obtained show that the IMPDH enzyme is a promising antiviral target and represents a starting point for future studies with other viral systems, in order to develop a broad-spectrum antiviral strategy for the treatment of orphan viral treatment diseases.

## **Abreviaturas**

**BSA:** albúmina sérica bovina

**CC:** control celular

**CC50:** concentración citotóxica 50%

**CE50:** concentración efectiva 50%

**CI50:** concentración inactivante 50%

**C-terminal:** extremo carboxilo terminal

**CV:** control viral

**DABCO:** 1,4-diazabicyclo octano

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**dNTP:** deoxinucleótidos trifosfato

**FHV:** fiebre hemorrágica viral.

**FITC:** isotiocianato de fluoresceína

**GP:** complejo viral de glicoproteínas

**GP1:** glicoproteína viral 1

**GP2:** glicoproteína viral 2

**GPC:** precursor de las glicoproteínas (antes del clivaje)

**h:** hora

**ICTV:** Comité Internacional de Taxonomía de Virus

**IMPDH:** inosina monofosfato deshidrogenasa.

**IS:** índice de selectividad

**JUNV:** virus Junín

**kDa:** kiloDalton

**L:** RNA-polimerasa viral dependiente de RNA

**m.i.:** multiplicidad de infección

**mAc:** anticuerpo monoclonal

**MEM:** medio mínimo esencial Eagle

**min:** minutos

**MM:** medio de mantenimiento

**MP:** medio de plaqueo

**MPA:** ácido micofenólico

**mRNA:** ácido ribonucleico mensajero

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

**NP:** nucleoproteína viral

**N-terminal:** extremo amino terminal

**p.i.:** post-infección

**PBS:** buffer fosfato salino

**RIB:** ribavirina

**RNA:** ácido ribonucleico

**RNP:** ribonucleoproteína

**SDS:** dodecil sulfato de sodio

**seg:** segundo

**SFB:** suero fetal bovino

**SSP:** péptido señal estable

**ST:** suero de ternera

**TfR1:** receptor 1 de transferrina

**UFP:** unidades formadoras de placa

**VLP:** partícula tipo viral o similar a virus

**VM:** Viejo Mundo

**NM:** Nuevo Mundo

**Z:** proteína viral de matriz

## Índice

Abreviaturas.....	5
Estructura del trabajo.....	8
1. Introducción y Objetivos.....	9
2. Antecedentes.....	12
3. Hipótesis.....	43
4. Metodología.....	45
5. Resultados.....	58
6. Discusión.....	77
7. Conclusión.....	85
8. Bibliografía.....	87

**Este trabajo incluye las siguientes secciones:**

El presente trabajo final de grado inicia con el apartado “Introducción y objetivos”, en el cual se establece la relevancia científica del asunto estudiado, así como los objetivos, tanto el general como los específicos que se tuvieron para llevar la investigación adelante. A continuación, el capítulo “Antecedentes”, en el que se establece el marco teórico vigente en la actualidad, y a partir del cual se desarrolla la investigación. En tercer lugar se presenta la sección “Hipótesis”, en la que se establecen los interrogantes que luego se tomaran como base para estudiar los resultados. Posteriormente se presenta la sección “Materiales y métodos”, donde se explica el modus operandi llevado a cabo para realizar los procedimientos experimentales utilizados. Seguido a ello, se postulan los resultados obtenidos, que permiten dar lugar a la discusión de los mismos y las conclusiones obtenidas de ellos. Como cierre, se exhibe la bibliografía consultada para la realización de la investigación.

# 1. Introducción y objetivos

## 1.1 Introducción

La fiebre hemorrágica argentina (FHA) es una enfermedad endémica de nuestro país producida por el virus Junín (JUNV), un virus envuelto con genoma bipartito de RNA simple cadena y estrategia de codificación ambisentido, perteneciente a la familia *Arenaviridae*. Hasta la actualidad no se posee ninguna quimioterapia antiviral específica efectiva para el tratamiento de infecciones con los virus de esta familia, lo cual supone una la amenaza para la salud humana. La falta de control efectivo de la enfermedad revela la necesidad de búsqueda de agentes antivirales seguros y eficaces.

En los últimos años ha comenzado a surgir con fuerza la idea de utilizar factores celulares que participan en la infección viral como potenciales blancos antivirales. Las ventajas de este abordaje se basan fundamentalmente en evitar la aparición de variantes resistentes, uno de los problemas clave de la quimioterapia en la actualidad, sobre todo en RNA virus. En el contexto de blancos celulares, uno de los aspectos más explorados hasta el presente está representado por las enzimas celulares que intervienen en los distintos caminos metabólicos relacionados a la síntesis del RNA celular.

La proteína Inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) es una enzima celular que cataliza el paso limitante en la ruta de síntesis *de novo* de nucleótidos de guanósina. En infecciones virales, la actividad de esta enzima se ve incrementada ya que se requieren altas concentraciones de nucleótidos para la rápida proliferación viral.

En el presente trabajo se estudió el impacto del silenciamiento de esta enzima en la replicación del arnavirus Junín, basándose en los objetivos que se describen a continuación.

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo general:

Los objetivos generales de este trabajo están dirigidos a contribuir en el desarrollo de una terapia antiviral para la prevención y tratamiento de infecciones virales de relevancia en la salud pública de nuestro país. Para este trabajo de Tesis de Licenciatura, el objetivo planteado fue determinar los efectos de la inhibición de un

blanco celular como la enzima Inosina Monofosfato Deshidrogenasa sobre la replicación *in vitro* del virus Junín.

### **1.2.2. Objetivos específicos:**

- ❖ Determinación de las condiciones óptimas para el silenciamiento génico de la enzima Inosina Monofosfato Deshidrogenasa, en cuanto a sistema celular, condiciones de cultivo y protocolo de silenciamiento.
- ❖ Evaluar los efectos del silenciamiento génico sobre los niveles de mRNA y la expresión de la proteína Inosina Monofosfato Deshidrogenasa *in vitro*.
- ❖ Evaluar los efectos del silenciamiento génico sobre la replicación del virus Junín.
- ❖ Determinar la importancia de este blanco celular como potencial blanco antiviral para infecciones con el virus Junín.
- ❖ Comparar los efectos inhibitorios del silenciamiento génico con los efectos de inhibidores farmacológicos de la enzima.

## **2. Antecedentes**

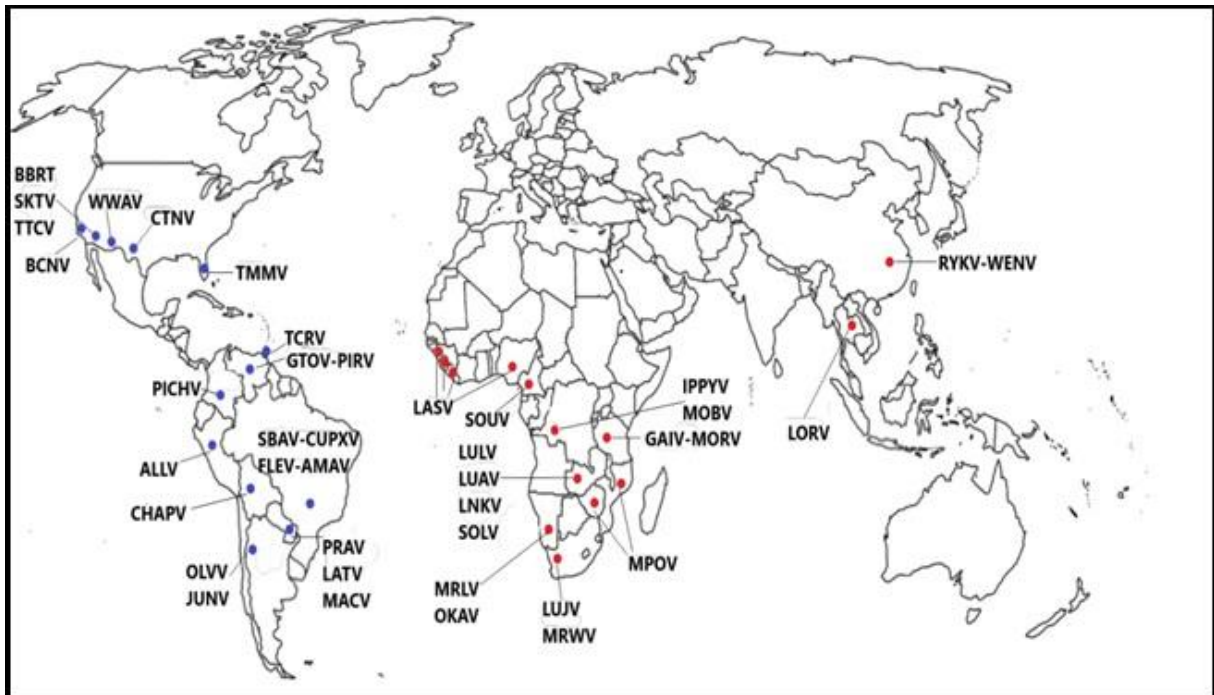
## 2.1. Arenavirus: Clasificación, características y genoma

La familia *Arenaviridae* se estableció en 1976 para albergar predominantemente virus murinos. Hasta hace poco, la familia era monogenérica, incluía el género único *Arenavirus*, con un número cada vez mayor de especies distribuidas en diferentes regiones alrededor del mundo. La taxonomía de la familia fue modificada y enmendada sustancialmente (Radoshitzky *et al.*, 2015) después del descubrimiento de distintos arenavirus en las serpientes alethinophidian (Bodewes *et al.*, 2013; Hetzel *et al.*, 2013; Stenglein *et al.*, 2014). En particular, el género *Arenavirus* se renombró *Mammarenavirus* (figura I.1), y en 2014 se estableció un segundo género, *Reptarenavirus*, para varios de los virus de serpiente recientemente descubiertos. En 2018 la familia se amplió por la adición de un nuevo género *Hartmanivirus* (Maes *et al.*, 2018), que debe su nombre al virus Haartman Institute snake (HISV) aislado de una boa constrictor en cautiverio en Finlandia (Hetzel *et al.* 2013; Hepojoki *et al.*, 2015).

**Tabla I.1. Taxonomía aceptada para la familia *Arenaviridae* en el 10° reporte (2017) y actualización (2018) del Comité Internacional de Taxonomía Viral (en inglés ICTV).**

Género/Grupo	Especie	Virus (Abreviación)
<i>Hartmanivirus</i>	<i>Haartman hartmanivirus</i> ■	Haartman Institute snake virus (HISV)
<i>Mammarenavirus</i>		
Grupo Viejo	<i>Gairo mammarenavirus</i>	Gairo virus (GAIV)
Mundo	<i>Ippy mammarenavirus</i>	Ippy virus (IPPYV)
	<i>Lassa mammarenavirus</i> †	Lassa virus (LASV)
	<i>Loei River mammarenavirus</i>	Loei River virus (LORV)
	<i>Lujo mammarenavirus</i> †	Lujo virus (LUJV)
		Luli virus (LULV) ‡
	<i>Luna mammarenavirus</i>	Luna virus (LUAV)
	<i>Lunk mammarenavirus</i>	Lunk virus (LNKV)
	<i>Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus</i> ⊗ ■	Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)
	<i>Mariental mammarenavirus</i>	Mariental virus (MRLV)
	<i>Merino Walk mammarenavirus</i>	Merino Walk virus (MRWV)
	<i>Mobala mammarenavirus</i>	Mobala virus (MOBV)
	<i>Mopeia mammarenavirus</i>	Mopeia virus (MPOV)
	<i>Okahandja mammarenavirus</i>	Okahandja virus (OKAV)
	<i>Ryukyu mammarenavirus</i>	Morogoro virus (MORV) ‡
	<i>Solwezi mammarenavirus</i>	Ryukyu virus (RYKV)
	<i>Souris mammarenavirus</i>	Solwezi virus (SOLV)
	<i>Wenzhou mammarenavirus</i>	Souris virus (SOUV)





**Fig I.1. Distribución geográfica de los mammarenavirus.** Se representan en el mapa todos los mammarenavirus identificados hasta la fecha a excepción del virus de la coriomeningitis linfocítica virus (LCMV), cuya distribución es mundial. En azul los virus del NM, en rojo los virus del VM.

El grupo del Nuevo Mundo (NM) es el que presenta mayor diversidad genética y es por eso que se divide en 4 linajes: A, B, C y D (figura I.2). Cada virus pertenece a un clastro según la especie del hospedador, su localización geográfica, su patogenicidad en humanos y según la diferencia de secuencias aminoacídicas entre especies del mismo género (Radoshitzky, S. et al, 2015). El linaje A incluye cinco virus sudamericanos que no infectan humanos. El B incluye ocho especies de virus sudamericanos cinco de los cuales son patógenos humanos causantes de FH: Machupo *mammarenavirus*, Chapare *mammarenavirus*, Guanarito *mammarenavirus*, Brazilian *mammarenavirus* y Argentinian *mammarenavirus*.

El resto de las especies de este grupo no posee la capacidad de infectar células humanas (Abraham J 2009).

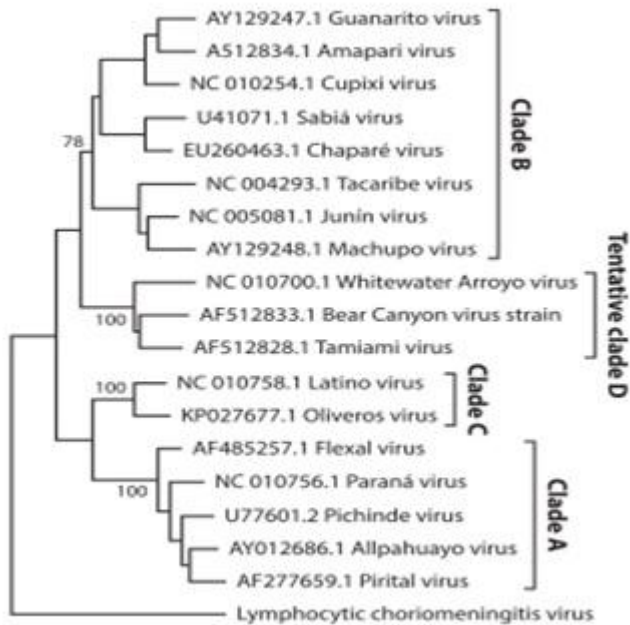
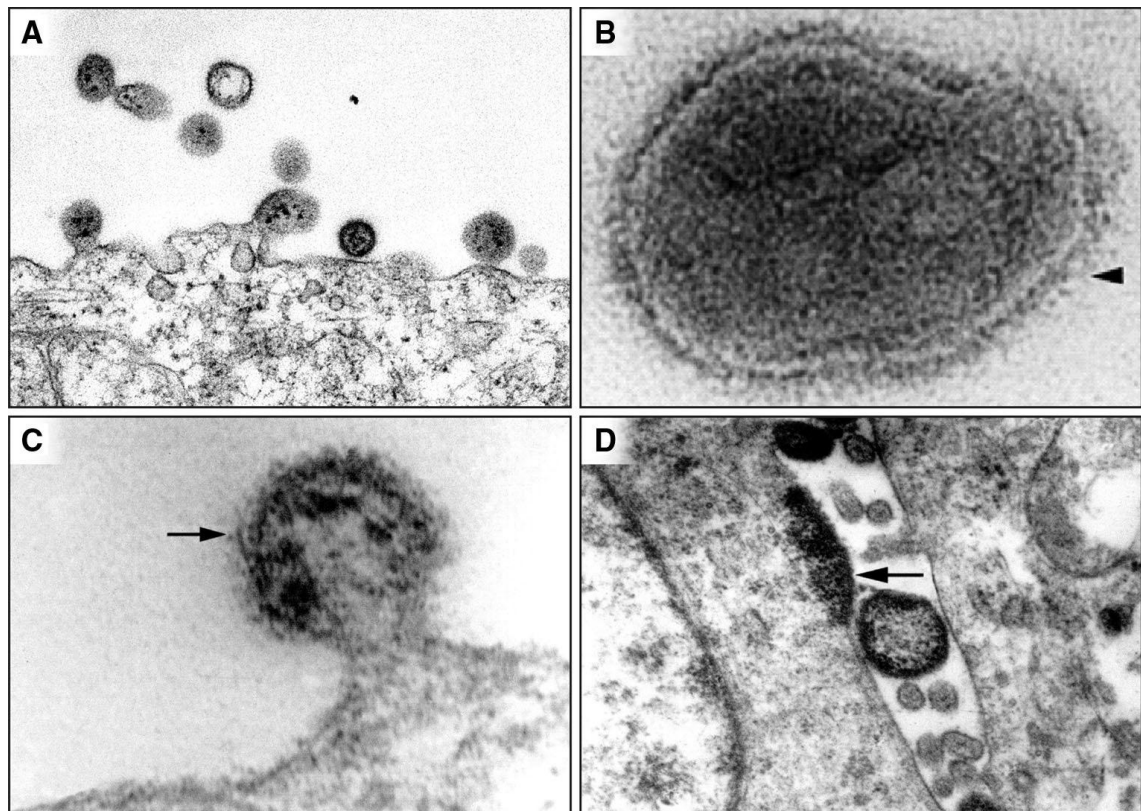


Fig I.2. Taxonomía de los virus de nuevo mundo (Sarute *et al*, 2017)

## 2.2. El virión y el ciclo de multiplicación viral

Los arenavirus son virus envueltos, esféricos o pleomórficos, variando de 50 a 300 nm de diámetro (Charrel *et al*, 2003) (Fig.I.3.). El nombre arena deviene del aspecto arenoso de las partículas en secciones de microscopía electrónica, debido a la incorporación de los ribosomas de las células hospedadoras.



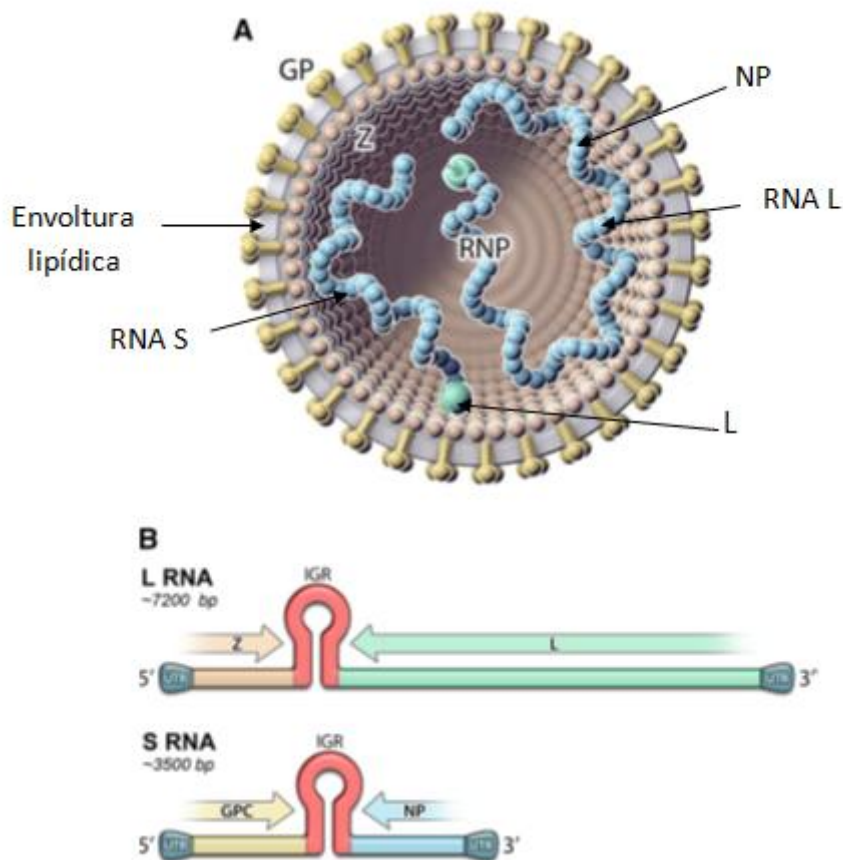
**Fig I.3.** (A) Microscopía electrónica de partículas de arenavirus brotando de la membrana de una célula infectada (Schley *et al.*, 2013); (B) Partícula de arenavirus purificada en gradiente de sacarosa y teñida negativamente. (C, D) Secciones de células Vero infectadas con arenavirus. Las flechas indican proyecciones de superficie en las partículas virales (B y C) y el sitio de brotado dentro de la membrana de una célula infectada por arenavirus (panel D) (Lukashevich y Salvato, 2006).

El genoma consiste en dos moléculas de RNA monocatenario ambisentido, designados L (grande) y S (pequeño). El RNA viral purificado no es infeccioso. Los extremos 5' y 3' de los segmentos L y S del RNA tienen regiones no codificantes (UTR) y contienen secuencias inversas complementarias conservadas de 19 a 30 nucleótidos en cada extremo (Auperin *et al.*, 1982). Estos extremos forman estructuras secundarias del tipo “pandhandle” o “mango de sartén” a través del apareamiento de bases (Harnish *et al.*, 1993, Salvato *et al.*, 1989; Young *et al.*, 1983). El 3' UTR de cada segmento contiene el promotor genómico que dirige la replicación del RNA y la transcripción génica (Fig. I.4.B) (Hass *et al.*, 2006). Cada segmento genómico codifica para dos proteínas diferentes en dos marcos de lectura abierto que no se superponen (ORF) de polaridades opuestas (codificación ambisentido) (Auperín *et al.*, 1984).

El segmento L ( $\approx 7.200$  nt) codifica una RNA polimerasa viral dependiente de RNA (L) y una proteína de matriz (Z) con un gran motivo de unión a zinc del tipo RING (Salvato *et al.*, 1989). El segmento S ( $\approx 3.500$  nt) codifica una nucleoproteína (NP) y un precursor de glicoproteínas (GPC) (Kunz *et al.*, 2003). Los dos ORF en cada segmento están separados por una región intergénica no codificante (IGR) que podría formar una o más estructuras energéticamente estables del tipo horquilla (Auperin *et al.*, 1984). El IGR participa en la terminación de la transcripción dependiente de la estructura (Tortorici *et al.*, 2001) en el ensamblaje del virus y la brotación (Pinschewer *et al.*, 2005).

Los mRNAs de los arenavirus tienen cap pero no están poliadenilados (Meyer *et al.*, 1993). Los extremos 5' de los mRNA virales contienen varias bases no codificantes, que se asemejan a los mRNAs del virus de influenza A y bunyavirus (Meyer *et al.*, 1993). El inicio de la transcripción se asemeja al mecanismo de eliminación del cap de los virus de influenza A y bunyavirus e implica el clivaje del cap y las bases asociadas mediante la actividad endonucleasa asociada a la polimerasa L (Raju *et al.*, 1990). El cap se utiliza posteriormente para iniciar la transcripción del genoma.

NP es la principal proteína estructural de los arenavirus. La proteína es un componente de las nucleocápsides y está asociada al RNA viral en forma de estructuras similares a cuentas. NP es esencial para la transcripción y la replicación viral (Pinschewer *et al.*, 2003).



**Fig I.4. Arriba: representación de la estructura de una partícula viral. Abajo: organización genómica de los segmentos L y S del RNA de los arenavirus.**

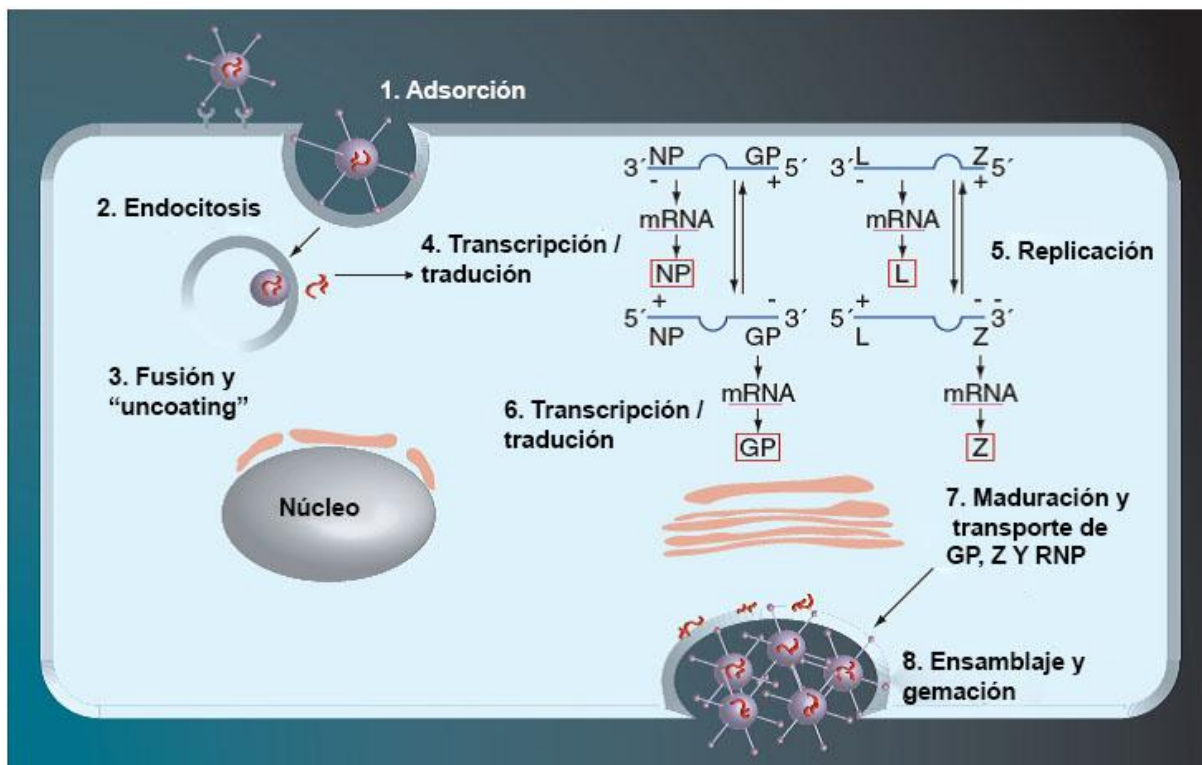
**GP:** glicoproteína, **L:** RNA polimerasa dependiente de RNA, **NP:** nucleoproteína, **RNP:** ribonucleoproteína, **Z:** proteína de matriz, **RNA L y S:** segmento largo de RNA y segmento corto de RNA, respectivamente. (Radoshitzky *et al.*, 2015)

Al igual que otras RNA polimerasas dependientes de RNA, L lleva a cabo dos procesos diferentes: transcripción y replicación (Kranzusch *et al.*, 2012). La proteína de matriz Z contiene un motivo RING de unión a zinc (Salvato *et al.*, 1989) y es la principal fuerza conductora para la formación de viriones (Eichler *et al.*, 2004). Z también inhibe la síntesis de RNA en una manera dosis dependiente (Kranzusch *et al.*, 2011). Las dos glicoproteínas GP1 y GP2, derivan del clivaje postraduccional del precursor GPC. GP1 y GP2 junto con un péptido estable forman la espícula viral (Fig. I.4.A).

La relación entre los segmentos S y L encontrada en las partículas virales no es equimolecular, ya que el segmento S se encuentra en mayor proporción que L (Romanowski *et al.*, 1983, Southern *et al.*, 1987).

En la Figura I.5., se muestra un esquema general del ciclo de multiplicación de los arenavirus. GP1 es la proteína de unión del virus que media la interacción con los receptores de la célula hospedadora para la adsorción inicial. Luego de la unión a las células, los viriones son internalizados por endocitosis en las vesículas de bajo pH, donde se desencadena la fusión entre la envoltura viral y la membrana del endosoma después de una alteración conformacional que expone un péptido fusogénico presente en la GP2 (Castilla *et al.*, 1994; Di Simone *et al.*, 1994; York & Nunberg, 2006). Luego de la fusión, las RNP son liberadas en el citoplasma y la polimerasa L comienza la biosíntesis de macromoléculas. La transcripción de los mRNA para NP y L a partir de los segmentos S y L, respectivamente, ocurre en el citoplasma celular y es el primer evento de síntesis (Fig. I.5.). Luego de que se ha producido la síntesis de NP, podría producirse la replicación con la síntesis de la cadena completa del RNA antigenómico. Este antigenoma sirve tanto como intermediario de replicación en la síntesis del genoma de RNA completo y como molde para la transcripción de los mRNAs subgenómicos de S y L, correspondientes a GPC y Z, respectivamente. Aunque los dos fragmentos del genoma contienen secuencias en sentido positivo en sus regiones 5', aún no existen evidencias de que puedan ser directamente traducidas a GPC y Z respectivamente (De la Torre, 2005) y, por tanto, los arenavirus se comportan en este punto como un verdadero virus de cadena negativa con la transcripción como el primer evento de biosíntesis luego del desnudamiento. A través de las secuencias en los extremos 3' de los segmentos genómicos L y S y sus secuencias inversas complementarias en los extremos 5' se producen estructuras secundarias de dúplex intra o inter segmentos con circularización del genoma, observadas por microscopía electrónica (Young *et al.*, 1983; Meyer *et al.*, 2002). Finalmente, la formación y liberación de los viriones de la progenie involucra el transporte intracelular y el ensamblaje de las RNP con el complejo glicoproteico (GP) inserto en la superficie celular. Este proceso morfogénico requiere del correcto procesamiento de GPC para generar viriones infectivos (Beyer *et al.*, 2003; Kunz *et al.*, 2003; York *et al.*, 2004) y la participación de Z como proteína de matriz que interactúa con proteínas virales y proteínas celulares específicas para

promover la brotación del virus a través de la membrana plasmática (Strecker *et al.*, 2003; Urata *et al.*, 2006; Capul *et al.*, 2007).



**Fig. I.5. Esquema del ciclo de replicación de los arenavirus.** (Modificado de García et al., 2011).

### 2.3. Fiebres hemorrágicas

Las fiebres hemorrágicas virales (FHV) son un grupo de enfermedades reemergentes cuyos agentes etiológicos son virus con genoma de RNA muy diferentes clasificados en las familias *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Filoviridae*, *Flaviviridae* y *Rhabdoviridae*. Estos virus pueden producir una infección subclínica o un leve síndrome febril, pero las formas más severas de enfermedades hemorrágicas están asociadas con morbilidad y mortalidad extremadamente altas (Ansari et al., 2013). El término "fiebre hemorrágica viral" se utiliza para describir un síndrome multisistémico caracterizado por el deterioro del sistema vascular, a veces acompañado de hemorragia. Todas las FHV comparten ciertas características:

- 1- Son producidas por virus con envoltura y genoma de RNA.
- 2- Son zoonosis; es decir, utilizan como vectores/hospedadores a insectos, garrapatas, roedores, murciélagos u otros reservorios silvestres o domésticos.
- 3- Están geográficamente restringidos a las áreas donde viven sus especies hospedadoras.
- 4- La infección desde el hospedador a los humanos ocurre mayormente por inhalación de aerosoles de excreciones de roedores, heridas en la piel o ingestión de comida contaminada (McCormick *et al.*, 2002; Geisbert *et al.*, 2004). La transmisión humano- humano puede ocurrir en forma intra-nosocomial y está asociada con alta tasa de mortalidad (Fisher-Hoch *et al.*, 1995).

Las FHV causan sintomatologías similares, tales como, daño en distintos órganos, en vasos sanguíneos y afectan la capacidad del cuerpo para auto-regularse. Además puede producir erupción hemorrágica, epistaxis, hematemesis y hemoptisis, entre otros síntomas (WHO *recommended surveillance standards*, 2016). También generan alteración de la síntesis hepática de factores de coagulación, tormenta de citoquinas, aumento de la permeabilidad vascular, activación del complemento y coagulación intravascular diseminada. El síndrome patogénico severo a menudo se ve respaldado por una inmunidad ineficaz, cargas virales elevadas, pérdida de plasma y co-infección con otros patógenos. La creciente información sobre el mecanismo del ciclo de replicación de los arenavirus, permitió la evaluación experimental de varios compuestos para bloquear diferentes etapas (Fig.I.5.), incluida la entrada, replicación y salida

## 2.4. El virus Junín y la Fiebre Hemorrágica Argentina

La fiebre hemorrágica Argentina (FHA) es una enfermedad endémica de la zona agrícola del centro de Argentina denominada "pampa húmeda" (Maiztegui, 1975). El virus Junín (JUNV) es el agente etiológico de FHA, es un virus transmitido por roedores de la especie *Calomys musculinus*, aunque también puede infectar murinos de otras especies (Mills *et al.*, 1991). *C. musculinus* abunda en las zonas de agricultura especialmente en plantaciones

de maíz y de trigo, por lo que los trabajadores y habitantes de las zonas rurales son lo que se encuentran en mayor riesgo.

Esta enfermedad fue detectada por primera vez en el año 1954 en los partidos de Junín y Chacabuco de la provincia de Buenos Aires. Posteriormente, en 1958 el Dr. Parodi logró aislar e identificar el virus en el Hospital Regional de Junín, a partir de órganos y sangre proveniente de pacientes infectados (Parodi *et al.*, 1958). Los roedores sufren infecciones crónicas sin síntomas de enfermedad, liberando el virus al medio ambiente, además, transmiten la infección por contacto con otros animales, sobre todo durante peleas entre machos adultos en los períodos de reproducción (Sabattini *et al.*, 1977). La transmisión virósica del roedor al humano ocurre cuando los trabajadores que se encuentran en el campo inhalan aerosoles del virus a partir de la orina, las heces y/o la saliva de ratones infectados ó entran en contacto a través de abrasiones de la piel.

Los síntomas clínicos de la FHA incluyen alteraciones hematológicas, cardiovasculares, inmunológicas y neurológicas, según la gravedad de la enfermedad. La fiebre hemorrágica se genera a nivel sistémico, siendo el tejido linfático uno de los principales tejidos blanco de replicación (Laguens *et al.*, 1983).

## 2.5. Estrategias antivirales

### 2.5.1. Compuestos dirigidos a la entrada viral

En los últimos años, varios proyectos han sido desarrollados para el hallazgo de nuevos agentes antiarenavirus que tienen como blanco potencial a las GPs virales involucradas en la entrada viral, que es el primer paso de la infección y un determinante crucial para el tropismo celular, rango de hospedadores y la patogénesis del virus y su bloqueo representa una barrera para suprimir el principio de la infección.

A través de ensayos de alto rendimiento (*high-throughput screening*, HTS), se identificaron dos compuestos inhibidores denominados ST-193 y ST-294. ST-193, mostró potente actividad antiviral contra LASV *in vitro* y en modelos animales (Larson *et al.*, 2008; Cashman *et al.*, 2011) en tanto que ST-294 resultó un potente inhibidor *in vitro* de TCRV, JUNV, MACV y GTOV y fue también protector contra TCRV en un modelo de infección en ratón lactante (Bolken *et al.*, 2006). Tanto ST-294 como ST-193 interfirieron específicamente con la fusión de membranas mediante el bloqueo de la interacción de GP2 con SSP y por

estabilización del complejo GP de prefusión en el ambiente ácido del endosoma (York *et al.*, 2008). En otro HTS frente a pseudotipos retrovirales que expresan las GPs de LASV, JUNV, GTOV y MACV se identificaron las moléculas designadas 8C1, 16G8 y 17C8 con potente actividad inhibitoria (Lee *et al.*, 2008a; Whitby *et al.*, 2009). 16G8 bloqueó la fusión de membranas dependiente de pH.

Otro enfoque para bloquear la entrada viral consistió en la utilización de oligonucleótidos que obstruyeron la unión de GP1 al receptor, debido a su carácter de molécula polianiónica. Los polímeros anfipáticos de DNA (PAs) fueron evaluados *in vitro*, demostrando ser potentes inhibidores en forma dependiente del tamaño e hidrofobicidad (Lee *et al.*, 2008a; Whitby *et al.*, 2009), por su gran peso molecular sólo podrían utilizarse como agentes profilácticos para prevenir la infección.

Finalmente, un anticuerpo monoclonal contra JUNV denominado F100G5 se une al péptido de fusión presente en GP2 cuando el complejo glicoproteico se encuentra alterado conformacionalmente por efecto del pH ácido y, a través de esta unión anticuerpo-GP2, se impide la fusión de membranas viral y endosomal interfiriendo con la penetración (York *et al.*, 2010).

### **2.5.2. Compuestos dirigidos a la RNA polimerasa viral**

El inhibidor de amplio espectro de virus de RNA Favipiravir o T-705 es convertido a ribofuranosil-trifosfato por enzimas celulares, y este metabolito inhibe selectivamente a la RNA polimerasa dependiente de RNA de influenza sin provocar toxicidad ni inhibir el material genético de las células de mamífero (Furuta *et al.*, 2009). Se demostró la inhibición específica de la replicación/transcripción viral por T-705 usando un sistema replicón de LCMV, sugiriendo que T-705 actuaría directamente sobre la RNA polimerasa dependiente de RNA (Mendenhall *et al.*, 2010, 2011). También, oligómeros de morfolino fosforodiamidato conjugados con péptidos (PPMO) bloquearon la replicación de arenavirus. Estas moléculas son análogos de ácido nucleico monocatenarios diseñados para formar pares de bases con sus secuencias diana y bloquear eficazmente la expresión génica. Se descubrió que los PPMO dirigidos al extremo 5' conservado del genoma de arenavirus reducen los títulos de virus no solo en cultivo de tejidos sino también en ratones infectados con LCMV (Neuman *et al.*, 2011).

La ribavirina (RIB), posee varios mecanismos de acción descriptos, uno de los cuales es la inhibición de la RNA polimerasa viral dependiente de RNA al funcionar como análogo de nucleósido. El mecanismo de RIB se trata más detalladamente en el apartado de compuestos dirigidos a blancos celulares.

Otro compuesto, designado 3f, también bloquea la síntesis de RNA de JUNV, aunque su mecanismo exacto de acción aún no se ha dilucidado (Sepúlveda et al., 2012).

### **2.5.3. Compuestos dirigidos a la proteína Z**

Uno de estos enfoques fue a través del uso de siRNA contra Z. Los siRNAs mostraron ser altamente efectivos para reducir el título de JUNV en cultivo celular (Artuso *et al.*, 2009).

La miristoilación del extremo N de Z es esencial por su papel en la brotación de la membrana celular (Strecker *et al.*, 2006), se ha demostrado que los análogos de ácido mirístico son eficaces contra la infección por JUNV en cultivo celular, así como en la alteración de la localización subcelular de la proteína Z de LASV (Cordo *et al.*, 1999; Strecker *et al.*, 2006). Por otro lado, compuestos reactivos con motivos de unión a zinc como disulfuros aromáticos y de tiuramo, fueron efectivos inhibidores *in vitro*, ejerciendo sus efectos a través de la interacción con el motivo RING de la proteína Z (García *et al.*, 2006, Sepúlveda *et al.*, 2010) induciendo el despliegue y la oligomerización de la proteína. Además, se ha demostrado que este tipo de compuesto interrumpe la interacción de Z con la PML celular, restaurando así la formación de cuerpos nucleares que normalmente se ve alterada por el arenavirus Z (García *et al.*, 2010).

### **2.5.4. Inhibidores dirigidos a blancos celulares**

Como una alternativa al enfoque tradicional para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos, en los últimos años ha comenzado a surgir con fuerza la idea de utilizar factores celulares que participan en la infección viral como potenciales blancos antivirales. Las ventajas de este abordaje se basan fundamentalmente en la factibilidad de obtener drogas de amplio espectro activas contra distintos virus patógenos así como la posibilidad de evitar la aparición de la resistencia antiviral, uno de los problemas clave de la quimioterapia en la actualidad. En contraposición, esta estrategia antiviral puede resultar en mayor citotoxicidad

respecto del uso de blancos específicos virales, pero a su vez permite el uso de drogas ya utilizadas con otros fines terapéuticos y de las que se conoce su perfil de seguridad.

En distintos procesos de la infección con arnavirus, desde la adsorción y entrada hasta el ensamblaje y liberación de nuevas partículas virales, participan numerosos componentes celulares que representan nuevos puntos posibles de ataque para bloquear la infección viral, algunos de los cuales se detallan a continuación (figura I.6).

Uno de los aspectos más explorados está representado por las enzimas celulares que intervienen en los distintos caminos metabólicos relacionados a la síntesis del RNA celular.

Precisamente la RIB (1- $\beta$ -D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida), el único antiviral aprobado para el uso clínico para las FH arnavirales. Aunque se han propuesto múltiples mecanismos de acción para la RIB contra distintos virus con genoma de RNA, de acuerdo al sistema virus-célula de que se trate puede variar el modo de inhibición ejercido por RIB, predominando los mecanismos descriptos en la sección 2.7.2. Esto último se propone como el blanco principal de la inhibición (Streeter et al., 1973; Leysen et al., 2005). El bloqueo de IMPDH disminuiría el nivel de reserva intracelular de guanosina trifosfato (GTP) con la consiguiente reducción de la síntesis del RNA viral y el rendimiento del virus, un efecto revertido por la adición exógena de guanosina. En el caso particular de los arnavirus está actualmente en discusión cuál es el real modo de acción de RIB, proponiéndose que además de inhibir la IMPDH podría actuar también sobre la polimerasa viral o por mutagénesis letal (Ruiz-Jarabo et al., 2003; Moreno et al., 2011; Ölschläger et al., 2011).

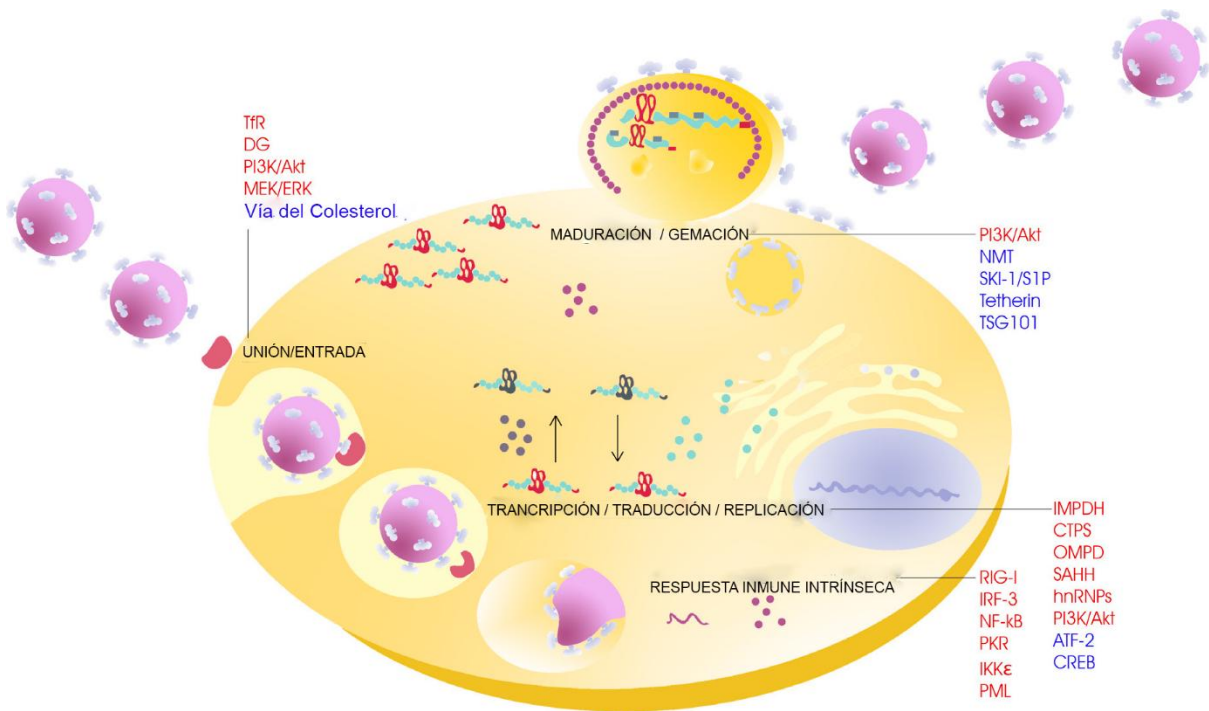
Otros conocidos inhibidores de la IMPDH como el 5-etinil-1- $\beta$ -D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida (EICAR) y el ácido micofenólico (MPA) fueron ensayados como antivirales en infecciones con arnavirus.

EICAR mostró una potencia antiviral *in vitro* 10 a 100 veces mayor que RIB contra JUNV y TCRV (De Clercq et al., 1991) y fue capaz de inhibir la replicación de LASV *in vitro* al igual que el MPA (Ölschläger et al., 2011). Para superar los inconvenientes registrados por el tratamiento de humanos con RIB, se evaluaron contra diferentes arnavirus otros análogos relacionados inhibidores de la IMPDH como la ribamidina, tiazofurina y selenazofurina (Andrei et al., 1990, 1993; Smee et al., 1993). También se han evaluado inhibidores de la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) como teriflunomida (Sepúlveda et al., 2018), análogos de citidina, dirigidos a la citosina trifosfato sintetasa (CTP sintetasa); análogos de

carbanucleósidos inhibidores de la orotidilico-monofosfato (OMP) descarboxilasa, que convierte OMP a UMP (uridina monofosfato), y análogos de adenosina, la mayoría de ellos actuando como inhibidores de S-adenosilhomocisteína (SAH) hidrolasa, enzima clave en la transmetilación para obtener el 5' cap del mRNA (Andrei *et al.*, 1990; Smees *et al.*, 1992; Guillerm *et al.*, 2003; Gowen *et al.*, 2010). Estos inhibidores se han ensayado *in vitro* o *in vivo*, algunos de ellos, pero sin mostrar mayor efectividad que RIB.

Los eventos de maduración post-traducciona de proteínas virales llevados a cabo por componentes celulares son considerados como blancos antivirales, se destacan los estudios sobre potenciales inhibidores del clivaje proteolítico del precursor GPC efectuado por la proteasa celular subtilisina kexina isozima-1 (SKI-1) / sitio-1 proteasa (S1P) (Urata *et al.*, 2011; Pasquato *et al.*, 2012), de la serin-proteasa acoplada a SKI-1 / S1P (Maisa *et al.*, 2009) y pequeñas moléculas basadas en péptidos inhibidoras de SKI-1 / S1P (Rojek *et al.*, 2010) pudieron inhibir eficientemente la infección *in vitro* de virus del VM y NM.

La composición lipídica de las membranas celulares, es otro factor celular influyente en la infección viral. Agentes que alteran la bicapa lipídica como ácidos grasos de longitud de cadena C10-C18 afectaron las etapas tardías del ciclo de JUNV (Bartolotta *et al.*, 2001); el anticuerpo monoclonal quimérico bavituximab reactivo con fosfolípidos aniónicos expuestos en células infectadas y viriones (Soares *et al.*, 2008) y un derivado de rodamina denominado LJ001 que se inserta en la membrana lipídica viral impidiendo la entrada y propagación infecciosa de una amplia variedad de virus con envoltura, incluido JUNV (Wolf *et al.*, 2010).



**Figura I.6. Blancos celulares involucrados en la replicación de los arenavirus (Linero *et al.*, 2012)**

## 2.6. Control de la enfermedad: Prevención y tratamientos actuales

Como en la mayoría de las infecciones virales, la vacunación es el método de elección para la prevención de las FH por arenavirus. El desarrollo de vacunas contra LASV y JUNV se intentó durante los últimos 40 años empleando diversos enfoques.

Se ha logrado una vacuna viva atenuada efectiva contra JUNV llamada Candid 1, a través de un esfuerzo de cooperación internacional. La vacunación de la población de riesgo que se inició en Argentina en 1991, mostró una eficacia protectora superior o igual a 84% y ha dado lugar a una reducción constante de la FH argentina en los últimos años (Maiztegui *et al.*, 1998; Enría *et al.*, 2002). Para LASV, la situación parece ser más compleja, quizá debido a la diferente contribución en la respuesta de anticuerpos y de células T para controlar la infección. Numerosos proyectos se han desarrollado incluyendo vacunas recombinantes competentes en replicación que expresan las glicoproteínas de arenavirus basadas en diferentes vectores virales (Geisbert *et al.*, 2005; Bredenbeek *et al.*, 2006; Lukashevich *et al.*,

2008; Cheng *et al.*, 2013, 2015; Wang *et al.*, 2018; Amanat *et al.*, 2018). Algunas de estas vacunas produjeron respuesta protectora en modelos animales, pero hasta la fecha no ha tenido lugar ningún ensayo en seres humanos.

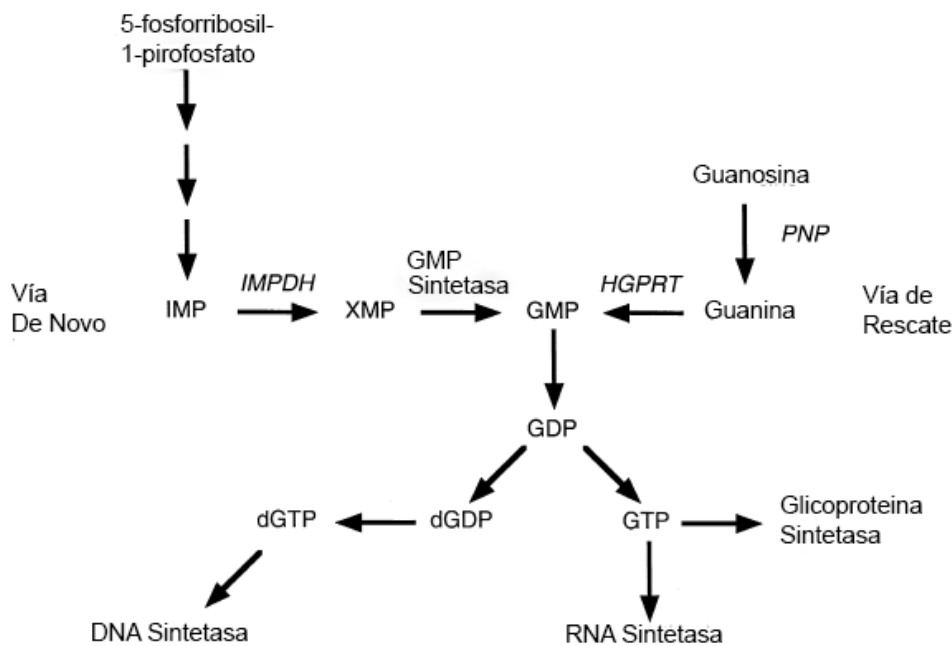
La terapia actual contra las infecciones de arnavirus incluye el tratamiento con RIB y la administración pasiva de suero de convaleciente con alto título de anticuerpos específicos. Para LASV, el tratamiento recomendado es la administración intravenosa de RIB en los primeros 6 días de la enfermedad (McCormick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

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

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

## 2.7. IMPDH

La enzima inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) es una oxidorreductasa implicada en la síntesis *de novo* del nucleótido guanosina. Su localización es en el citoplasma y la reacción que cataliza es la oxidación dependiente del dinucleótido nicotinamida adenina (NAD<sup>+</sup>) de inosina monofosfato (IMP) a xantosina monofosfato (XMP) y es el paso limitante para esta ruta metabólica (Hedstrom L, 2009) (Fig. I.7.).



**Figura. I.7. Representación esquemática de la biosíntesis de nucleótidos de guanosina por la ruta *de novo* y la de rescate.** (M.D. Sintchak *et al.*, 1999)

La actividad humana de IMPDH se compone de las actividades de dos isoenzimas muy relacionadas, denominadas tipo I y tipo II, que están codificados por genes individuales ubicados en los cromosomas 7 y 3, respectivamente (Gu, J.J *et al.*, 1994; Glense, D, *et al*

1993; Natsumeda Y, *et. al.*, 1990). Ambas isoformas son tetrámeros conformados por monómeros de 56 kDA cada uno y poseen la misma actividad catalítica, afinidad por el sustrato y valores  $K_i$  para inhibidores conocidos (Konno, Y *et al.*, 1991; Carr, S. F *et al.*, 1993). Su secuencia aminoacídica coincide en un 84% y hasta el momento no se conocen las diferencias en los roles de las funciones celulares de cada una de ellas (Cuny *et al.*, 2017).

En cuanto a su patrón de expresión, los tejidos expresan ambas isoenzimas en diferentes grados (Jain J *et al.*, 2004; Zimmermann A *et al.* 1996). Se ha visto que el tipo II es la isoforma dominante en la mayoría de los tejidos y su expresión se ve incrementada en células proliferativas (ya sea en células que dan inicio al ciclo de división celular o células neoplásicas), y su expresión se reduce drásticamente en respuesta a la inducción de la división celular. (Collart *et al.*, 1988; Jackson *et al.*, 1975; Senda *et al.*, 1994, Nagai, *et al.*, 1992). En cambio, la expresión de IMPDH I se ha considerado inalterada por la proliferación o transformación celular, y su expresión es de manera constitutiva a niveles bajos de mensajero (Nagai *et al.*, 1992). Sin embargo, en tejidos específicos tales como riñón, páncreas, colon, cerebro y leucocitos de sangre periférica, los niveles de expresión de mRNA de IMPDH I son significativamente mayores que en otros tejidos (Senda *et al.*, 1994; Nagai *et al.*, 1991).

En comparación con el gen de tipo II, en el cual su expresión está regulada por un solo promotor, la regulación transcripcional de IMPDH tipo I es bastante más compleja. La expresión del gen IMPDH tipo I está mediada por tres transcritos de mRNA distintos de 4,0, 2,7 y 2,5 kb (J. J. Gu, J. *et al.*, 1997). Estas tres transcripciones se han asociado con la presencia de tres regiones promotoras distintas, P1, P2 y P3. La especie de mRNA de 4,0 kb se expresa preferentemente en linfocitos T y monocitos activados y es baja e indetectable en la mayoría de las líneas celulares tumorales linfoides y no linfoides. El transcrito de 2,7 kb se ha observado hasta la fecha solo en líneas celulares tumorales, mientras que el transcrito de 2,5 kb se expresa universalmente. Esto deja en evidencia que la regulación del gen de tipo I de IMPDH es compleja y puede desempeñar un papel importante en el desarrollo específico del tejido (Zimmermann *etal.*, 1998).

Los estudios sobre la regulación de la actividad de IMPDH tipo II han demostrado una fuerte regulación transcripcional positiva del mRNA en respuesta a la inhibición de enzimas y al agotamiento de nucleótidos de guanina/ guanosina en varios tipos celulares (YanShan Ji *et*

al. 2006; D A Glesne et al., 1991). La reducción intracelular de los niveles de GTP induce la formación de agregados de alto peso molecular. Estudios *in vitro* confirmaron que la restauración de los niveles de GTP no solamente revierte sino previene la formación de estos agregados de IMPDH. (Ji *et al.*, 2006)

### 2.7.1. IMPDH como blanco celular antiviral

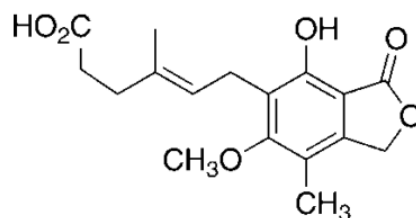
La síntesis de nucleótidos de guanosina es particularmente importante para que las células proliferen rápidamente. Es por eso que IMPDH se convirtió en un objetivo terapéutico atractivo para una variedad de enfermedades como cáncer o infecciones virales. (Cuny, Suebsuwong, & Ray, 2017).

### 2.7.2. Drogas con blanco anti-IMPDH

#### 2.7.2.1. Ácido micofenólico (MPA) y Ribavirina (RIB)

MPA (Fig. I.8.) es el metabolito activo del agente inmunosupresor micofenolato mofetil, y actúa como inhibidor reversible no competitivo de la enzima celular IMPDH (Sintchak & Nimmesgern, 2000), siendo el isotipo II 4.8 veces más sensible que el isotipo I (Cahr *et al.*, 1993)

MPA mostró actividad antiviral y anticancerígena en distintos modelos de cultivos celulares. También ha sido usado para el tratamiento de la psoriasis y, más recientemente, ha revivido su uso como antitumoral debido a su acción antiangiogénica. MPA también indujo



**MPA**

diferenciación o apoptosis en distintas líneas tumorales (Hedstrom *et al.*, 2009).

**Figura. I.8. Estructura química del MPA.** (Lizbeth Hedstrom, 2009)

RIB es un análogo sintético de guanosina con actividad antiviral (Figura.I.9). Fue sintetizado por primera vez en la década del '70 y desde entonces se ha descubierto que tiene efecto sobre muchos virus DNA y RNA (Thomas *et al.*, 2012). Hoy en día se han propuesto los siguientes mecanismos de acción para esta droga:

1. Inhibición de la polimerasa viral: Este mecanismo implica que, dado que la polimerasa viral utiliza nucleótidos intracelulares, al incorporarse la RIB, como análogo de nucleótido, impide la elongación de la cadena que se estaba sintetizando al no poder incorporar nuevos nucleótidos a la misma (Markland *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2012)

2. Mutagénesis en el RNA (“error catástrofe”): Este segundo mecanismo propone la incorporación de RIB al genoma de RNA del virus. Una vez incorporado, dado que la RIB se aparea tanto con uracilo o citocina, se van generando crecientes mutaciones que resultan en genomas no funcionales (Crotty *et al.*, 2001).

3. Inhibición de la Inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH): Este tercer mecanismo implica una inhibición competitiva de la enzima IMPDH causada por la RIB. Esta enzima está implicada en la síntesis *de novo* de nucleótidos de guanosina y cataliza la reacción inosina-5-monofosfato a xantina-5-monofosfato. Al estar presente la RIB, esta se une al sitio de unión al sustrato de la IMPDH, teniendo como consecuencia una menor concentración de GTP en la célula, y por ende, una menor cantidad de replicas del virus

4. Inhibición de la formación del “cap”: De acuerdo a este mecanismo, la RIB inhibe a la enzima viral guaniltransferasa, impidiendo la formación del cap en el extremo 5' del RNA viral (Markland *et al.*, 2000).

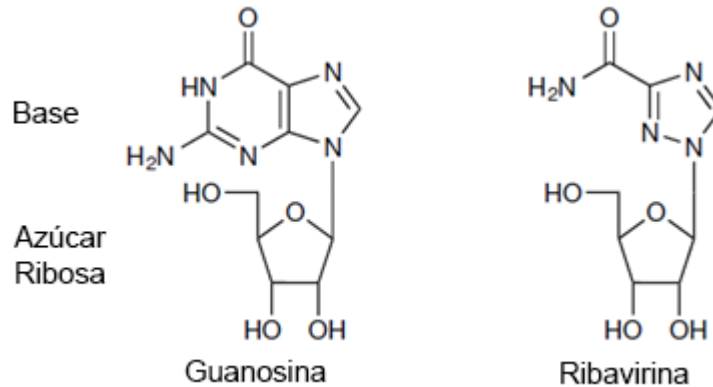


Figura I.9. Estructura de la RIB (Thomas, Ghany, & Liang, 2012)

## 2.8. Herramientas para el silenciamiento de enzimas celulares

### 2.8.1. iRNA

#### 2.8.1.1. Descubrimiento

La historia del descubrimiento del RNA de interferencia comienza a principios de la década del 90 cuando investigadores de Holanda y Estados Unidos estudiaban, en forma independiente, la chalcona sintasa en petunias, una enzima que permite aumentar la pigmentación de estas flores. El objetivo era introducir copias extras del gen de dicha enzima para lograr una mayor pigmentación y generar de esta forma, flores más oscuras. Sin embargo, el resultado que obtuvieron no fue el esperado; por el contrario los pétalos eran variegados con sectores que carecían de pigmentación lo cual indicaba la falta de actividad de la chalcona sintasa y en algunos casos las flores eran completamente blancas. Los investigadores midieron entonces la concentración de mRNA de la enzima en las flores blancas, y se encontraron con una disminución tanto del gen endógeno como del transgénico. En base a esta observación pudieron inferir que la disminución en la producción del pigmento era debido a la reducción de la cantidad de mRNA de la enzima. Lo que les quedaba por dilucidar era por qué la sobreexpresión de este gen conllevaba a una menor concentración del mRNA (Ecker *et al.*, 1986; Napoli *et al.*, 1990). Investigaciones posteriores realizadas sobre este fenómeno en plantas, lograron demostrar que la disminución era debido a la inhibición de la expresión génica por un aumento en la degradación del mRNA, a lo que se lo denominó “co-supresión de la expresión génica” (Van Blokland *et al.*, 1994).

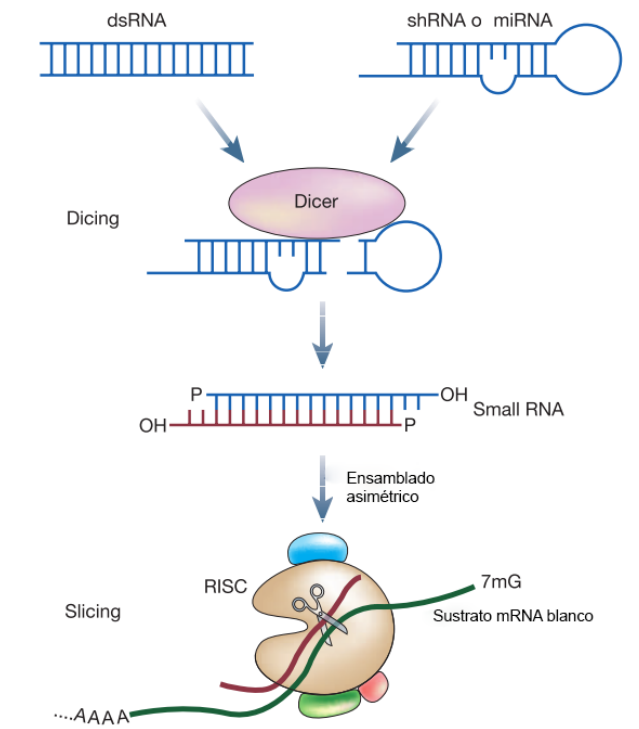
El mecanismo molecular que regía en la co-supresión de la expresión génica fue descrito años más tarde cuando Craig Mello y Andrew Fire realizaron investigaciones sobre el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Ellos observaron que la microinyección en *C.elegans* de RNA doble cadena (RNAdc) del gen *unc22*, correspondiente a una proteína muscular muy abundante, generaba una mayor reducción de la expresión génica respecto de la microinyección de cada una de las cadenas del RNA por separado, tanto las cadenas sentido como antisentido (Fire *et al.*, 1998), por lo que la característica de ser “doble cadena” era crítica para que se lleve a cabo el silenciamiento génico. A partir de estos estudios, se descubrió en plantas la presencia de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RPDR). Esta enzima comienza a sintetizar moléculas de RNAdc en presencia de altos niveles de mRNA, es por ello que al sobre expresar el gen de la chalcona sintasa hubo una reducción en la pigmentación, ya que los niveles elevados de mRNA activaron a la RPDR y por lo tanto se silenció la expresión génica de la enzima. A este silenciamiento génico mediado por RNAdc se lo ha denominado “RNA de interferencia o RNAi”.

## **2.8.1.2. Mecanismo de silenciamiento**

### **2.8.1.2.1. RNAi en invertebrados y plantas**

La vía del siRNA comienza al introducirse una doble cadena larga (aproximadamente 500 nucleótidos) de RNA de origen exógeno. Una vez dentro de la célula, la molécula de dsRNA es reconocida por una RNAasa de tipo III localizada en el citoplasma, llamada Dicer (Billy *et al.*, 2001; Bernstein *et al.*, 2001; Grishok *et al.*, 2001; Ketting *et al.*, 2001; Knight *et al.*, 2001; Martens *et al.*, 2002) y esta cliva la cadena en fragmentos pequeños de RNA doble cadena (siRNA, por sus siglas en inglés, *small interfering RNA*) de 22-25 nucleótidos de largo con 2-3 nucleótidos no pareados en el extremo 3' de cada hebra, un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'.(Elbashir, *et al* 2001; Hammond *et al.*, 2000, Zamore *et al.*, 2000). Luego, el complejo proteico inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés *RNA- induced silencing complex*) toma los siRNAs sintetizados por Dicer, y en presencia de ATP, separa las hebras de RNA e incorpora la cadena antisentido, la cual guiará al complejo hacia el mRNA complementario (Nykanen, *et al* 2001; Schwarz *et al.*, 2002). Finalmente,

RISC cliva el mRNA en la región complementaria al siRNA y posteriormente es degradado, evitando su traducción (Figura I.10.)



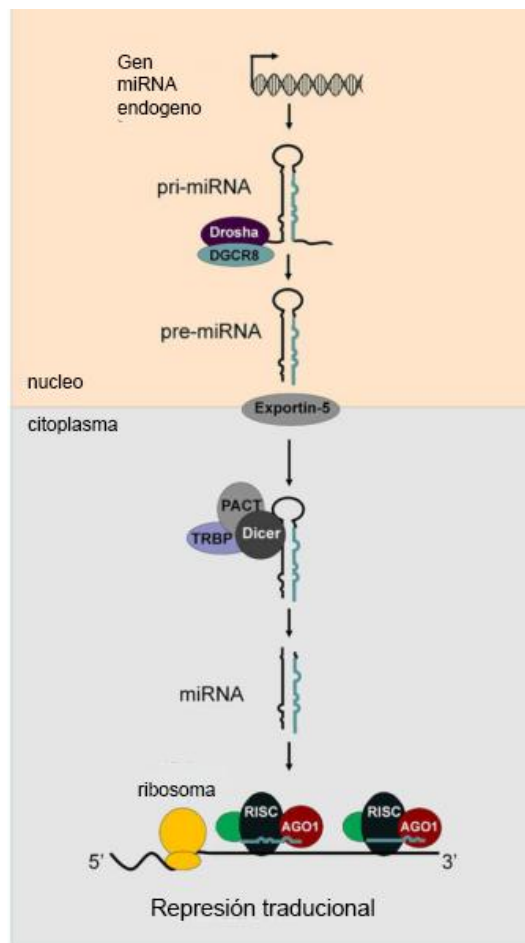
**Figura I.10. Ruta del silenciamiento de RNAi en diferentes organismos (Hannon et al., 2004)**

### 2.8.1.2.2. RNAi en mamíferos

En células de mamífero, el mecanismo anti-viral del RNAi fue sustituido por la respuesta mediada por interferón (INF). La introducción de dsRNA largo (mayores a 30 pb), induce la activación de la proteína quinasa PKR17, la cual fosforila al factor de iniciación 2 (eIF2a), inhibiéndolo. De esta manera, se frena el proceso de traducción de todo mRNA presente en la célula. Dicho de otra manera, la respuesta mediada por IFN induce una inhibición no específica de la traducción (Manche *et al.*, 1992). Sin embargo, se sintetizan químicamente dsRNA más pequeños, imitando la estructura de los siRNA producidos por los invertebrados y plantas (figura I.11) y luego introduciéndolos en células somáticas de mamífero, se obtiene el silenciamiento específico de genes, sin inducir la respuesta a INF. Esto último sugiere que la maquinaria de RNAi presente en plantas e invertebrados, también está presente en mamíferos, con la salvedad que el RNAi se incorpora directamente al complejo RISC, sin ninguna intervención de Dicer. (Elbashir, *et al.*, 2001). Posteriormente se

demonstró la existencia de los componentes del RNAi en mamíferos equivalentes a los encontrados en invertebrados plantas y hongos, incluyendo Dicer (Provost *et al.*,2002).

Si bien no hay evidencias de la generación natural de siRNA a partir de dsRNA largos de origen exógeno en células somáticas de mamíferos si se demostró la existencia de tres clases de RNAi que participan en mamíferos: microRNAs (miRNAs), *endogenous small interfering RNAs* (endo-siRNAs) y PIWI RNAs (piRNAs) (Reinhart *et al.*, 2002; Aravin *et al.*, 2007). Los dos últimos están implicados en la supresión de transposones, mientras que los miRNA están implicados en la regulación de la expresión de ciertos genes (Lau *et al.*, 2010). Estos RNA pequeños de doble hebra (~22 nucleótidos) reconocen secuencias parcialmente complementarias en el mRNA correspondiente, lo cual resulta en la inhibición de la traducción de dicho mRNA (Herrera-Carrillo *et al.*, 2017 Saxena *et al.*, 2003)



**Figura I.11. La ruta celular del miRNA endógeno** (Herrera-Carrillo et al., 2017)

### 2.8.1.3. RNAi como herramienta para el silenciamiento de genes

Con el descubrimiento del RNAi surgió la posibilidad de estudiar no solo el mecanismo de regulación génica y el estudio individual de las funciones de diferentes genes, sino también de utilizarlo como una herramienta terapéutica potencial para enfermedades como HIV, hepatitis, enfermedades genéticas y cáncer (Hannon & Rossi, 2004)

La inhibición artificial de la expresión de genes mediante RNAi es conocido como “silenciamiento” o “*knocking down*” debido a que la inhibición es transciente, a diferencia del “*knocking out*” donde el gen es eliminado completamente del genoma (Herrera *et al.*, 2017). Para células eucariotas se han desarrollado las tres herramientas para el silenciamiento específico de genes. El método a escoger depende de dos factores: la duración del efecto del silenciamiento y el tipo de células que se desea trabajar.

#### 2.8.1.3.1. siRNA

Los siRNAs sintéticos constan de una secuencia de 21 nucleótidos, los cuales pueden tanto ser diseñados y sintetizados en el laboratorio o pueden ser adquiridos comercialmente. Cualquiera que sea la manera de obtención, los siRNAs presentan similitudes de composición, tales como: un tamaño aproximadamente de 19 nucleótidos complementarios mas 2 nucleótidos no apareados en el extremo 3' de cada hebra, un contenido de G + C que varía entre 30-52% pero evitando las secuencias de pares alternados GC, preferentemente debe tener un nucleótido U o A en la posición 1, U en posición 17, A en posición 3 y U en posición 10 (Hornung *et al.*, 2005; Huesken *et al.*, 2005; Kitana, 2004; Reynolds *et al.*, 2004; Shabalina, Spiridonov, & Ogurtsov, 2006). Además deben evitarse homologías entre la secuencia de siRNAs con blancos no deseados (“*off-targets*”) y evitar las secuencias motivo conocidas que puedan activar la respuesta inmune innata a través de los receptores tipo-Toll (TLRs) (Amarzguioui & Prydz, 2004; Judge *et al.*, 2005)

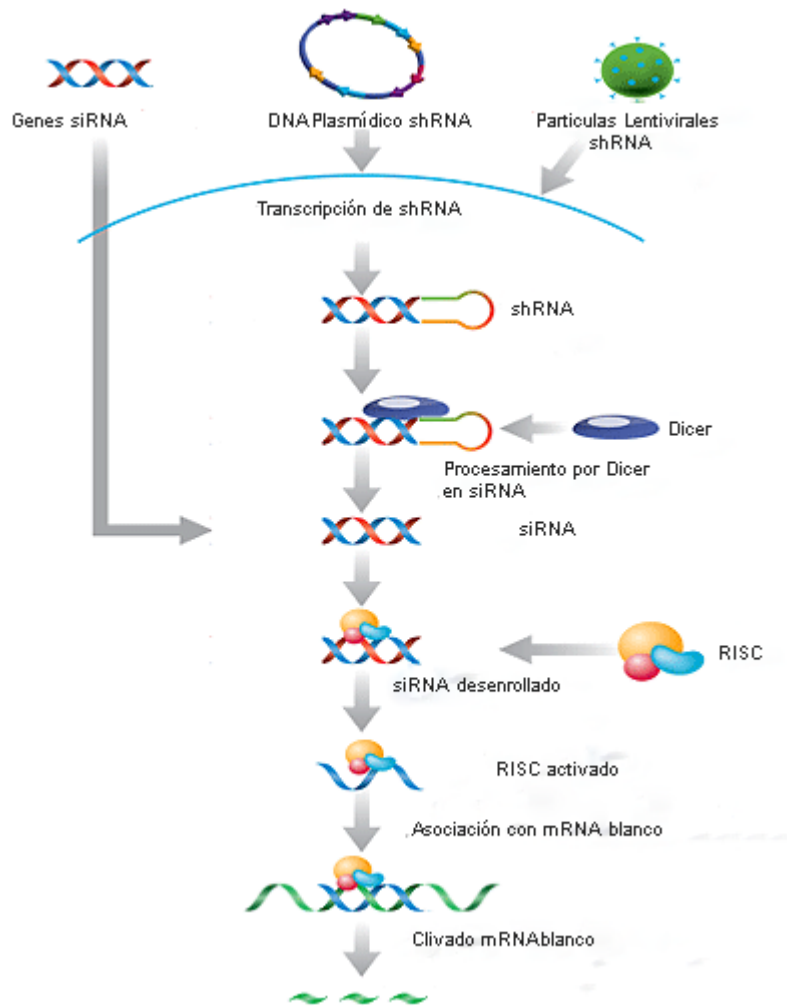
Una vez sintetizados, los siRNAs pueden ser introducidos a las células eucariotas por transfección. La duración del silenciamiento es de tres a siete días y depende esencialmente de la línea celular que se está utilizando, la eficiencia de la transfección, la cantidad y diseño de

siRNA y complementariedad con el blanco. Un dato interesante, es que se ha determinado que aun con baja complementariedad, si se agrega suficiente cantidad de reactivo el blanco puede ser silenciado. Sin embargo, si se agregan grandes cantidades de siRNA puede activar la respuesta mediada por IFN, la saturación de la ruta de siRNA e incrementar los “*off targets*” (Herrera-Carrillo *et al.*, 2017).

### **2.8.1.3.2. short hairpin RNA (shRNA)**

Si bien la técnica de silenciamiento con siRNA constituye en una serie simple de pasos, la misma tiene como resultado un corto periodo de silenciamiento. Los vectores de expresión de shRNA posibilitan la solución a este problema, ya que se introducen de manera estable dentro de la célula y permiten el silenciamiento específico de genes por un periodo mayor de tiempo (Paddison *et al.*, 2004).

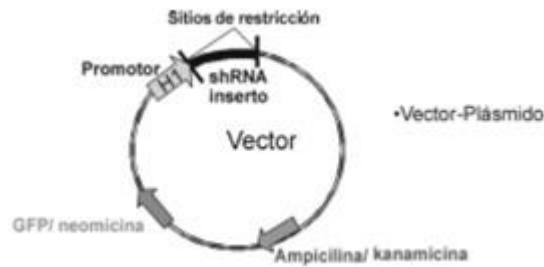
Los shRNA son estructuras de RNA sintetizados a partir de una sola hebra y contienen una secuencia de 19 nucleótidos, una secuencia complementaria a la anterior, de 19-29 nucleótidos y entre ellas una secuencia de cinco a diez nucleótidos denominada estructura rizo. Una vez sintetizado, el shRNA es tomado por Dicer, que lo cliva formando un siRNA. (Ortiz-Quintero, 2009). El mecanismo de acción de shRNA a partir de vectores se resume en la figura I.12



**Figura I.12. La ruta del shRNA exógeno (Herrera-Carrillo et al., 2017)**

### 2.8.1.3.3. Vectores plasmídicos

Estos vectores deben tener un sitio de restricción en donde se agrega la secuencia del shRNA, un promotor, y un gen que exprese un marcador o una resistencia a antibiótico. Son introducidos a las células mediante transfección o electroporación. Tanto el gen reportero como la resistencia a antibiótico permite seleccionar las células transfectadas (Figura.I.13)



**Figura I.13. Vectores plasmídicos de expresión de shRNAs** (Ortiz-Quintero, 2009)

### 2.8.1.3.4. Vectores virales

Son vectores desarrollados a partir de partículas virales a las cuales se les eliminaron los genes que les confieren la patogenicidad y en reemplazo a estos se coloca el gen de que expresa el shRNA de interés. La ventaja de este tipo de vectores radica en que se introducen en las células con mayor facilidad que los plásmidos. El tipo de virus del cual se parte para desarrollar el vector dependerá de las características celulares de las células blanco, así como también del objetivo buscado (Tabla I.2).

Los vectores virales pueden desarrollarse a partir de adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus o una subclase de estos, los lentivirus (Herrera-Carrillo *et al.*, 2017). Las células infectadas quedan establemente transformadas ya que se integra el material genético en los cromosomas, pudiendo seleccionarlas mediante una resistencia a antibiótico. La principal ventaja es que se obtiene un cultivo establemente silenciado.

**Tabla I.2. Sistemas de vectores virales** (Herrera-Carrillo *et al.*, 2017)

Vector Viral	Ventajas	Deficiencias
Adenovirus	Captación eficiente en células que se dividen y que no se dividen Capacidad de inserción (máx. 8 kb, extendida a 37 kb en vectores "gutless")	Títulos altos de vectores, alta eficiencia Sin integración, expresión a corto plazo Requiere administración repetida* Alta inmunogenicidad
Virus adeno-	Títulos altos de vectores, alta	Requiere virus auxiliar para la replicación

asociados	<p>eficiencia Continua siendo predominantemente episomal</p> <p>Bajo riesgo de mutagénesis por inserción</p>	<p>Protocolo de producción que consume mucho tiempo</p> <p>Capacidad de inserción limitada (max 3-5 kb)</p>
Retrovirus	<p>Baja respuesta inmune en el huésped</p> <p>Capacidad de inserción modesta (máximo 8 kb)</p> <p>Se integra en el genoma</p>	<p>Títulos bajos de vectores</p> <p>Se incorpora solo a las células divisorias</p> <p>Tropismo restringido (ampliado mediante pseudotipado)</p> <p>Alto riesgo de mutagénesis por inserción</p>
Lentivirus	<p>Captación en células que se dividen y que no se dividen</p> <p>Capacidad de inserción modesta (máximo 8 kb)</p> <p>Se integra en el genoma</p> <p>La nueva generación se autoinactiva por seguridad</p>	<p>Títulos bajos de vectores</p> <p>Tropismo restringido (ampliado mediante pseudotipado)</p> <p>Riesgo de mutagénesis por inserción</p>

\* El ADN episomal se pierde rápidamente al dividir las células, pero puede ser retenido por las células no mitóticas

### **3. Hipótesis**

Es mediante el siguiente trabajo que se buscara evaluar si la inhibición de la actividad enzimática de IMPDH se correlaciona con la inhibición de la replicación del virus Junín mediante el silenciamiento génico por RNA de interferencia.

## 4. Materiales y métodos

#### 4.1. Líneas celulares

Para el desarrollo experimental de este trabajo, se utilizaron las líneas celulares A549, proveniente de carcinoma pulmonar humano (ATCC CCL-185); BHK-21, proveniente de riñón de hámster neonato (ATCC CRL8544) y Vero, proveniente de riñón de mono verde africano adulto *Cercopithecus aethiops* (ATCC CCL-81).

Las células fueron subcultivadas semanalmente utilizando tripsina, en cabinas de bioseguridad de tipo I, realizando seguimientos diarios de su crecimiento por observación directa con microscopio de inversión. Periódicamente se les realizaron controles de presencia de contaminación por micoplasma mediante tinción con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

Para el caso de A549 y Vero, fueron crecidas en botellas cerradas de plástico T25 y de vidrio, respectivamente y mantenidas en estufa a 37° C sin CO<sub>2</sub> utilizando el Medio Mínimo Esencial Eagle (MEM) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, EE.UU) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, EE.UU) y 50 µM/ml del antibiótico gentamicina (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Las células BHK-21 fueron crecidas en medio mínimo esencial Dulbecco (D-MEM) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) suplementado con 5% de suero fetal bovino, glutamina y aminoácidos no esenciales, a 37 °C en estufa gaseada con 4% de CO<sub>2</sub>.

Cuando los cultivos se realizaron en microplaca, las células se crecieron y mantuvieron a 37 °C en estufa con 4% de CO<sub>2</sub>.

En todos los casos, al medio de mantenimiento (MM), se le redujo el suero a 1,5%. El medio de plaqueo (MP) consistió en MEM en doble concentración suplementado con 4% de suero de ternera (ST) y 100 µg/ml de gentamicina, mezclado con volúmenes iguales de metilcelulosa 1,4 % (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

#### **4.1.1. Células A549**

Esta línea está formada por células humanas provenientes del epitelio alveolar basal. Originalmente estas células eran las responsables de la difusión de sustancias a través de los alvéolos del pulmón.

La línea celular A549 fue desarrollada en el año 1972 a través de la remoción y cultivo de tejido canceroso de pulmón en un tumor extirpado de un hombre de 58 años de edad y desde entonces fue una línea muy utilizada como huésped para transfecciones. *In vitro* crecen adherentemente, formando una mono capa.

#### **4.1.2. Células Vero**

La línea celular Vero se inició a partir del riñón de un mono verde africano adulto sano el 27 de marzo de 1962, por Y. Yasumura y Y. Kawakita en la Universidad de Chiba en Chiba, Japón.

Estas células epiteliales crecen adherentemente formando una monocapa. Las células Vero tienen diversas aplicaciones, entre ellas destacamos su capacidad para usarse como huésped de transfecciones.

#### **4.1.3. Células BHK**

Esta línea celular se originó en Marzo de 1961. Estas células son provenientes de riñón de hámster dorado sano y cuando son crecidas *in vitro* crecen adherentemente formando una monocapa. Esta línea es muy utilizada como huésped para infecciones virales y transfecciones.

### **4.2. Virus**

Se utilizó la cepa IV4454 naturalmente atenuada del virus Junín (JUNV) (Contigiani *et al.*, 1977).

El stock de trabajo se preparó en células BHK con una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,1 unidades formadoras de placas (UFP) por célula en botellas T75. Se dejó adsorber el inóculo durante 1 h a 37 °C, luego se lo retiró y se cubrieron las células con MM. El sobrenadante de las células infectadas se cosechó al tercer, cuarto y quinto día post-infección (p.i.) y se almacenó a -70 °C hasta su uso. El título del stock se determinó por

formación de placas en células Vero (*ver 3.5*) y en todos los casos estuvo en el orden  $10^6$  - $10^7$  UFP/ml.

### **4.3. Compuestos antivirales**

Los compuestos antivirales testeados en el presente trabajo fueron ribavirina (RIB) (Sigma.Aldrich, EE.UU) y el ácido micofenólico (MPA) (Sigma-Aldrich, EE.UU). Se prepararon soluciones madres 100 mM de los compuestos en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y luego se guardaron a -20 °C hasta su uso.

### **4.4. Ensayo de citotoxicidad: Método del MTT**

Se utilizó el ensayo colorimétrico o técnica del MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) (Mosmann, 1983). Este compuesto es procesado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa formando cristales de formazán (producto coloreado), en cantidad proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Para estudiar el efecto de los compuestos sobre células confluentes, las monocapas de células crecidas en microplacas de 96 cavidades (90% de confluencia) fueron tratadas con diluciones seriadas al medio de los compuestos, por triplicado durante 48 h a 37 °C. Luego de 48 h a 37 °C se agregaron 10 µl de una solución de MTT (5 mg/ml) en cada pocillo y se incubó a 37 °C durante 2 h. Seguidamente, se descartaron los sobrenadantes y los cristales de formazán fueron disueltos en 200 µl de etanol 96°. Se determinó la densidad óptica, utilizando un lector de microplacas a una longitud de onda de prueba de 492 nm y una longitud de referencia de 690 nm. Se calculó la CC50, concentración citotóxica del compuesto que reduce el 50% de la viabilidad celular, con el promedio de absorbancia, tomando como control monocapas tratadas sólo con el disolvente del compuesto (DMSO).

### **4.5. Ensayo de plaqueo o recuento de placas**

Células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades durante 24 h se infectaron con distintas diluciones de virus en PBS y se dejaron adsorber durante 1 h a 37 °C. Luego se retiró el inoculo y se cubrieron las monocapas con 1 ml de MP. Las células fueron fijadas con formol y teñidas con cristal violeta para el recuento de placas de lisis a los 7 días p.i.

## 4.6. Determinación de la actividad antiviral

Con el objetivo de determinar la actividad antiviral de los compuestos, se realizó un ensayo de inhibición del rendimiento viral a las 48 h. Para ello, células crecidas en placa de 24 cavidades durante 24 h se infectaron con JUNV IV4454 con un m.i.=0,1. Luego de 1 h de adsorción a 37 °C, se retiró el inóculo y se cubrieron por duplicado con 0,5 ml diluciones seriadas al medio de los compuestos MPA y RIB en MM. Se incubaron las células por 48 h a 37 °C y se titularon los sobrenadantes mediante el método de recuento en placa (*ver 3.5*).

A los 7 días p.i. se contaron las placas de lisis y se calculó el porcentaje de inhibición. A partir de los datos anteriores se calcularon la CE50 como la concentración efectiva del compuesto que reduce la infectividad viral en un 50%.

## 4.7. Silenciamiento de la enzima IMPDH

### 4.7.1. Silenciamiento mediado por siRNAs

Cultivos celulares fueron crecidos en microplacas de 24 cavidades hasta lograr una confluencia de entre 50-70% para Vero y 30-50% para A549. Luego, se siguió el siguiente protocolo:

Para cada muestra se prepararon mezclas separadas de 3 µl de 10 µM de siRNA IMPDH (Santa Cruz Biotech., EEUU) o de siRNA control negativo (SCR) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) en 50 µl finales de OptiMEM (Invitrogen – Life Technologies, EE.UU.) sin suero y 1 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen – Life Technologies, EE.UU.) en 50 µl del mismo medio. Se utilizó una mezcla de tres siRNA de 19-25 nucleótidos específicos contra la enzima humana IMPDH (Cat. sc-45679) para los tratamientos y una mezcla de siRNA control negativo universal (Cat. Sic-001). Luego de 5 min, se combinaron las soluciones de Lipofectamina 2000 y siRNAs y se incubaron por 15 h a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos. Se lavaron las células con MEM 5% SFB sin antibiótico dos veces y luego se colocaron 400 µl de ese medio a cada pocillo. Una vez cumplidos los 15 minutos, se agregaron los 100 µl de la mezcla siRNA+ Lipoanfectamina o SCR+

Lipoanfectamina, según correspondiese. Se incubó durante 24 h a 37 °C en estufa de 4% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.7.2. Silenciamiento mediado por plásmido**

Para el silenciamiento con plásmidos se utilizaron 1 µg/µl del plásmido silenciador de IMPDH (Cat. sc-45679-SH, Santa Cruz Biotech., EE.UU.) o de un plásmido control vacío en 50 µl finales de OptiMEM sin suero y 1 µl de Lipofectamina 2000 en 50 µl finales de OptiMEM sin suero, siguiendo el mismo protocolo descrito en 2.7.1.

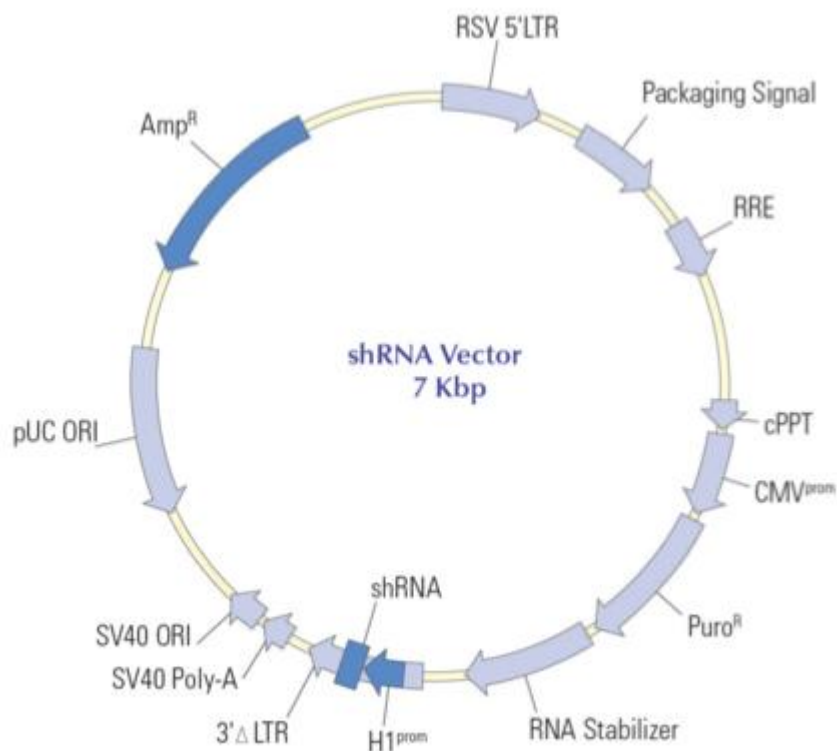
##### **4.7.2.1. Obtención y purificación del plásmido sc-45679-SH**

Un volumen total de 100 µl de bacterias *Escherichia coli* NEB 5-alpha competentes (New England BioLabs, EEUU) fue transformado con 1 µg/µl del plásmido (**Fig. MMI**) mediante la técnica de golpe de temperatura. Primero se descongelaron las células en hielo durante 10 minutos, luego se agregaron 5 µl de DNA plasmídico y se incubó en hielo durante 30 minutos. Luego de ese tiempo se produjo un golpe de calor a 42 °C por exactamente 30 segundos y se volvió a colocar en hielo por otros 5 minutos. Seguidamente se agregaron 950 µl de medio LB y se incubó durante 1 h a 37 °C en agitación.

Luego de sembraron 50 µl del cultivo en placa de ágar LB con ampicilina y se seleccionaron las colonias transformadas después de incubarlas toda la noche (ON) a 37 °C.

Se picaron colonias transformadas y se sembraron 5 ml de caldo LB con ampicilina durante 24 h a 37 °C en agitación.

Luego se centrifugaron los tubos para concentrar las bacterias, se extrajo el DNA plasmídico siguiendo el protocolo del kit de extracción de la empresa Geneid, y se cuantificó producto de extracción utilizando el fluorómetro Nanodrop (Thermo Fisher, EE.UU.).



**Figura MM1 Estructura del plásmido shRNA Vector.** (Santa Cruz, EE.UU).

#### 4.8. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Monocapas de células se sembraron sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades. A las 24 h se realizó el silenciamiento génico de la proteína IMPDH de acuerdo a lo detallado en 3.7.1 ó 3.7.2.

A las 24 h post-transfección (p.t.) se removieron los sobrenadantes y se infectaron las células con una suspensión de virus JUNV IV4454 a una m.i.=0,1 durante 1 h a 37 °C.

Luego de la adsorción, se retiraron los inóculos y se cubrieron las células con MEM 5% sin antibiótico.

A las 48 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes para la titulación del rendimiento viral por el método de placas y se fijaron las monocapas mediante dos condiciones diferentes.

##### 4.8.1. Fijación con paraformaldehído

Las monocapas fueron lavadas dos veces con PBS, luego se agregaron 200 µl de paraformaldehído 4% en PBS por cavidad y se incubó durante 10 minutos a 37 °C, se quitó el fijador y se colocaron 200 µl de  $\text{CNH}_4$  20 mM y se incubó durante otros 10 minutos a temperatura ambiente para inhibir la autofluorescencia. Pasado el tiempo de incubación, se removieron los sobrenadantes y se realizaron 3 lavados con PBS de 10 min en agitación, luego se permeabilizaron las células con PBS-10% Tritón.

#### **4.8.2. Fijación con metanol**

Las monocapas fueron lavadas dos veces con PBS, luego se agregaron 200 µl de metanol frío por cavidad y se incubó durante 10 minutos a -20 °C, se quitó el fijador y se realizaron 3 lavados con PBS de 10 min en agitación

Luego de la fijación y los lavados se realizó la tinción indirecta para la detección de proteínas virales y celulares mediante IFI. Ésta es una técnica inmunológica que se basa en la detección de antígenos de interés mediante el uso de anticuerpos específicos. Se la denomina indirecta debido a que se utilizan dos anticuerpos: El primario, que se une al antígeno blanco específico que se desea analizar, y el secundario que se une a las regiones constantes de las cadenas pesadas del anticuerpo primario y contiene un fluoróforo unido covalentemente. Una vez agregados estos anticuerpos, las muestras son observadas al microscopio de fluorescencia a la longitud de onda correspondiente para excitar al fluoróforo.

El siguiente paso consistió en el bloqueo del pegado inespecífico del anticuerpo primario, para ello se incubaron las muestras ON con solución de bloqueo PBS-5% BSA.

Se incubó con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-IMPDPH H-300 (Santa Cruz, EE.UU), en una concentración 1:50 en solución de bloqueo durante 2 h a 37 °C.

Luego se incubó con el anticuerpo monoclonal de ratón SA02-BG12 reactivo contra NP (Sánchez *et al.*, 1989) en una concentración 1:300 en solución de bloqueo durante 1 h a 37 °C.

Lo siguiente fue una incubación con una mezcla de anticuerpos secundarios Alexa 555 (Thermo-Fisher, EE.UU.) de conejo dilución 1:100 y Alexa 488 (Thermo-Fisher, EE.UU.) de ratón dilución 1:300 durante 1 h.

Se cubrió cada pocillo con 400  $\mu$ l de DAPI y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Entre cada paso de incubación se realizaron 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno en agitación. Por último se realizó un lavado final con agua bidestilada y se montaron los vidrios sobre portaobjetos en una solución tamponada de glicerol conteniendo 2,5 % de 1,4-diazabicyclo octano (DABCO). Los preparados se observaron al microscopio de fluorescencia.

El porcentaje de células fluorescentes en cada preparación fue calculado a partir de 20 campos ópticos seleccionados al azar, tomando como control las monocapas no infectadas y sin tratar o infectadas y sin tratar, dependiendo del antígeno analizado.

## 4.9. RT-PCR en tiempo real

### 4.9.1. Extracción de RNA

Monocapas de células se sembraron en microplacas de 6 cavidades. A las 24 h se realizó el silenciamiento génico de la proteína IMPDH y la infección viral de acuerdo a lo detallado en 3.7

A las 48 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes para su titulación por el método de placas y se extrajo el RNA total utilizando el reactivo comercial TriZol siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras de RNA se cuantificaron utilizando el fluorómetro Nanodrop (Thermo Scientific Inc., EE.UU.) y se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

### 4.9.2. Síntesis de cDNA

El RNA extraído se utilizó como molde para la retrotranscripción en la síntesis de cDNA, y luego ser usado como molde para la PCR en tiempo real. Para ello, se tomaron 5  $\mu$ g del RNA y se llevó a 9,5  $\mu$ l de volumen final con agua bidestilada libre de nucleasas. Se agregaron 0,5  $\mu$ l de oligonucleótidos específicos (Eurofins Genomics, UK) o 1,2  $\mu$ l de aleatorios (GenBiotech, EE.UU.) (*Tabla MMI*), según el caso, en una concentración 10  $\mu$ M y se dejó incubar durante 5 min a 65 °C, luego de 5 min a temperatura ambiente, a cada muestra se le agregó la mezcla de reacción conteniendo:

**Tabla MM1. Composición de la mezcla de retrotranscripción.**

Retrotranscriptasa murina M-MLV (100 U/ $\mu$ l, Promega, EE.UU.)	1 $\mu$ l
Buffer 5X	4 $\mu$ l
dNTPs 10 mM	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O (libre de nucleasas)	4 $\mu$ l
Volumen final	10 $\mu$ l

El volumen final fue de 20  $\mu$ l y la reacción se llevó a cabo a 42 °C durante 2 h.

#### 4.9.3. PCR en tiempo real

El cDNA sintetizado se empleó como molde en la reacción de una PCR en tiempo real. El volumen final de reacción fue de 25  $\mu$ l. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo con 2  $\mu$ l de cDNA en presencia de buffer completo de reacción FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche, Alemania) y 0,4  $\mu$ l de cada oligonucleótido 10  $\mu$ M (**Tabla MM2**) siguiendo las siguientes condiciones: una incubación a 95 °C durante 5 min, 45 ciclos de 30 seg a 95 °C, 45 seg a 63 °C y 30 seg a 72 °C, finalmente 1 ciclo de 5 min a 72 °C. Al término de la reacción, todas las muestras fueron sometidas a distintas temperaturas (55-95 °C) para calcular las curvas de disociación.

Para poder analizar la expresión de todos estos genes en una sola PCR, se realizó previamente una PCR gradiente para seleccionar la temperatura para el pegado de los oligonucleótidos más adecuada. El rango de temperaturas fue seleccionado a partir de un análisis de las secuencias con el programa Vector (Thermo Fisher Scientific, EEUU).

**Tabla MM2- Primers utilizados en la PCR de tiempo real**

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
Actina	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Actina 1</li> </ul>	5'-GAGACCTTCAACACCCCAGCC-3'
<ul style="list-style-type: none"> <li>Actina 2</li> </ul>	5'-GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'
N	
<ul style="list-style-type: none"> <li>186</li> </ul> <p>Complementario a las secuencias ubicadas en los extremos 5' del mRNA de NP.</p>	5'-GGCATCCTTCAGAACATC-3'
<ul style="list-style-type: none"> <li>Arena</li> </ul> <p>Complementario a las secuencias ubicadas en los extremos 3' del RNA S genómico y 3' del RNA S genómico complementario de la mayoría de los arenavirus.</p>	5'-CGCACAGTGGATCCTAGGC-3'
IMPDH I	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Forward</li> </ul>	5'-GAAAGAGGCAAATGAGATCC-3'
<ul style="list-style-type: none"> <li>Reverse</li> </ul>	5'-AGACGGTATTTGTCATCCTC-3'
IMPDH II	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Forward</li> </ul>	5'-AGGGAAATTCCATCTTCCAG-3'
<ul style="list-style-type: none"> <li>Reverse</li> </ul>	5'-CTGCATCAATGAGGTTCTTG-3'

Las secuencias de los oligos IMPDH I y II (Sigma-Aldrich, EE.UU.) están diseñadas a partir de secuencias humanas y se utilizaron para cuantificar la cantidad de transcrito de los

isotipos de genes de *impdh I* y *II*. Los oligos Arena y 186 (Eurofins Genomics, UK) permiten detectar un fragmento de 186 nucleótidos presente en el gen *n* de todos los Arenavirus. Por último, el gen de *actina* (Eurofins Genomics, UK) fue utilizado como control interno.

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

#### 4.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 6. La comparación de las medias fue testeada por análisis de varianza (ANOVA) de dos vías aplicando el test Tukey's para comparaciones múltiples. La significancia estadística se definió como  $P < 0.05$  (95% intervalo de confianza).

#### 4.11. Cálculos

**Título viral:** Unidades formadoras de placas (UFP) por mililitro de suspensión viral.

Número promedio de placas

Título= \_\_\_\_\_

Volumen del inóculo x dilución

**Porcentaje de inhibición viral:**

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

### **Concentración citotóxica/efectiva 50%:**

Graficar porcentaje de viabilidad/porcentaje de inhibición vs. Concentración de compuesto, realizar una regresión lineal, determinar el 50% de viabilidad/inhibición a partir del gráfico.

### **PCR tiempo real:**

*CT*: número de ciclos para el umbral de fluorescencia seleccionado.

$\Delta CT$ : diferencia entre el promedio de los valores de *CT* de las muestras utilizando oligonucleótidos virales y los valores de *CT* de las muestras utilizando oligonucleótidos celulares.

$$\Delta CT = CT_{\text{viral}} - CT_{\text{celular}}$$

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

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

$$QR (\text{cantidad relativa}): 2^{\Delta\Delta CT}$$

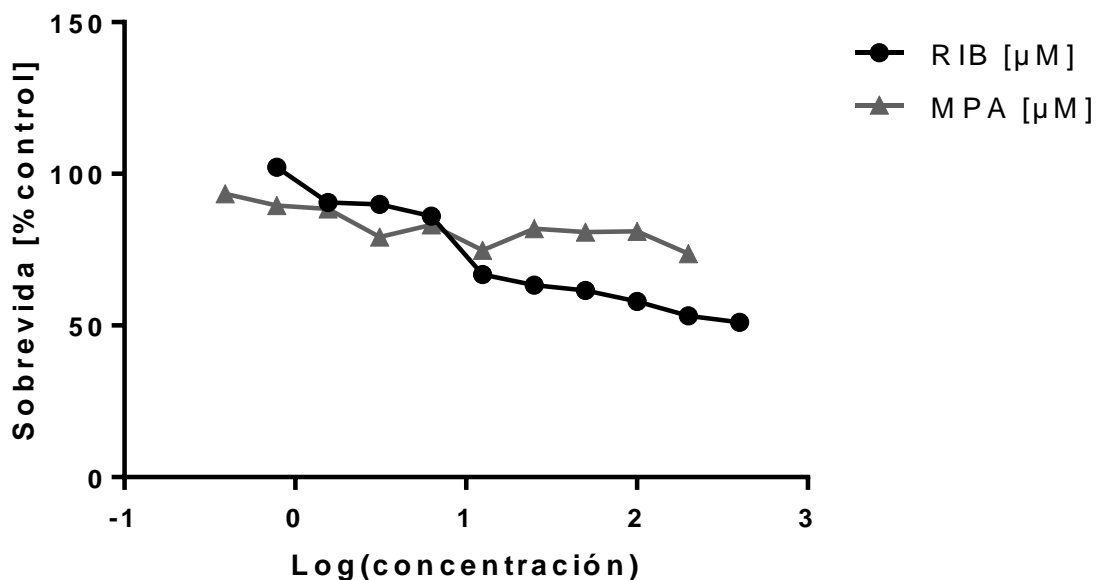
Si  $QR=1$ , no hay diferencia entre el control y las células tratadas;  $QR > 1$  indica el número de veces que aumenta la expresión del gen; y  $QR < 1$  representa el número de veces que dicha expresión se encuentra inhibida respecto de la condición control.

## 5. Resultados

## 5.1. Evaluación de la citotoxicidad, actividad inhibitoria contra JUNV

### 5.1.1. Citotoxicidad

Se evaluó la citotoxicidad de los compuestos MPA y RIB en células A549 utilizando el método de MTT, determinándose la CC50 siguiendo el protocolo descrito en MM 3.4.



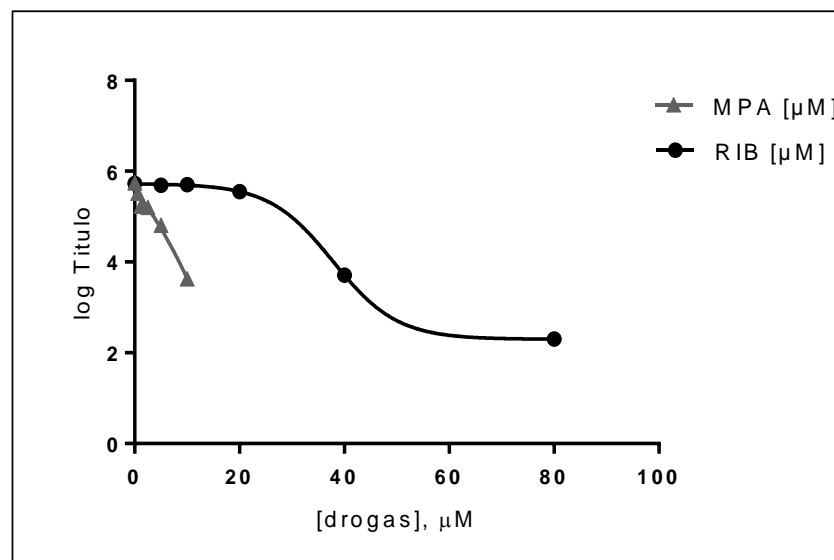
**Figura R1: Actividad citotóxica de MPA y RIB.** Células A549 crecidas 24 h en microplacas de 96 cavidades hasta un 90% de confluencia, fueron tratadas con diluciones seriadas al medio de MPA o RIB por triplicado a 37 °C. A las 48 h se agregó una solución de MTT durante 2 h y se determinó la densidad óptica a 490 nm. Los valores corresponden al promedio de triplicados de dos ensayos independientes y se expresan como porcentaje de supervivencia respecto a un control celular sin tratar más DMSO, solvente utilizado para disolver los compuestos  $\pm$  DE.

Tal como se puede observar en la figura R.1 las concentraciones crecientes de ambos compuestos analizadas en este trabajo no tienen un impacto negativo en la viabilidad de las

células, ya que no se observa descenso en el porcentaje de viabilidad respecto del control celular no tratado hasta la máxima concentración evaluada.

### 5.1.2. Actividad inhibitoria

El efecto inhibitorio de los compuestos se determinó mediante ensayos de inhibición del rendimiento viral, de acuerdo a lo detallado en MM.3.6



**Figura R.2. Actividad inhibitoria contra JUNV.** Células Vero fueron infectadas (m.i. 0,1) con JUNV cepa IV4454 y luego de 1 h de adsorción a 37 °C el inóculo fue removido y las células cubiertas con MM conteniendo distintas concentraciones de MPA RIB. El rendimiento viral fue medido a las 48 h p.i. La comparación de ambos resultados puede verse en la figura C.

Los ensayos se realizaron en células A549 crecidas en microplacas de 24 cavidades hasta un 80% de confluencia. Los cultivos se infectaron con una suspensión de JUNV (m.i. 0,1) y se trataron con diluciones seriadas al medio de cada compuesto en MM utilizando dosis no citotóxicas o solo con MM y DMSO (CV). A las 48 h p.i. se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la infectividad viral por el método de placas. Se determinó la concentración

efectiva 50 (CE50), la cual reduce un 50% la infectividad viral y el correspondiente índice de selectividad para ambos tratamientos.

### 5.1.3. Citotoxicidad y actividad antiviral de los compuestos

Compuesto	CC50 [ $\mu$ M]	CE50 [ $\mu$ M]	IS
MPA	>200	0,69 $\pm$ 0,25	> 289.9
RIB	>400	24,44 $\pm$ 1,34	> 16.4

**Tabla R.1.**

**CC50:** concentración citotóxica 50%, determinada en células A549, luego de 48 h de incubación con cada compuesto, mediante el método del MTT.

**CE50:** concentración efectiva 50%, determinada mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral de JUNV, en células A549 a las 48 h p.i.

**IS:** índice de selectividad, relación entre CC50/CE50. Los valores corresponden a la media de dos determinaciones independientes  $\pm$  DE.

Ambas drogas resultaron ser efectivos inhibidores de la infección de JUNV. MPA mostró un índice de selectividad mucho mayor al de RIB (Tabla R.1.) El MPA resultó ser un inhibidor más potente ya que logra altos niveles de inhibición en dosis mucho menores a las de RIB (Figura R.2)

## 5.2. Inmunofluorescencia indirecta

Para la determinación de los niveles de proteína IMPDH se recurrió a la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en células A549. Primeramente, y debido a que este anticuerpo se utilizaría por primera vez en el laboratorio, se ensayaron distintas condiciones de fijación, tiempos incubación, concentración de anticuerpos, etc a fin de optimizar los resultados (Figura R.3)

Células A549 se cultivaron por 24h sobre cubreobjetos en un 50% de confluencia.

Se ensayaron dos métodos de fijación de los cultivos celulares, uno con metanol frío (Figura R.3 paneles A y B) y otro con paraformaldehído (paneles C y D).

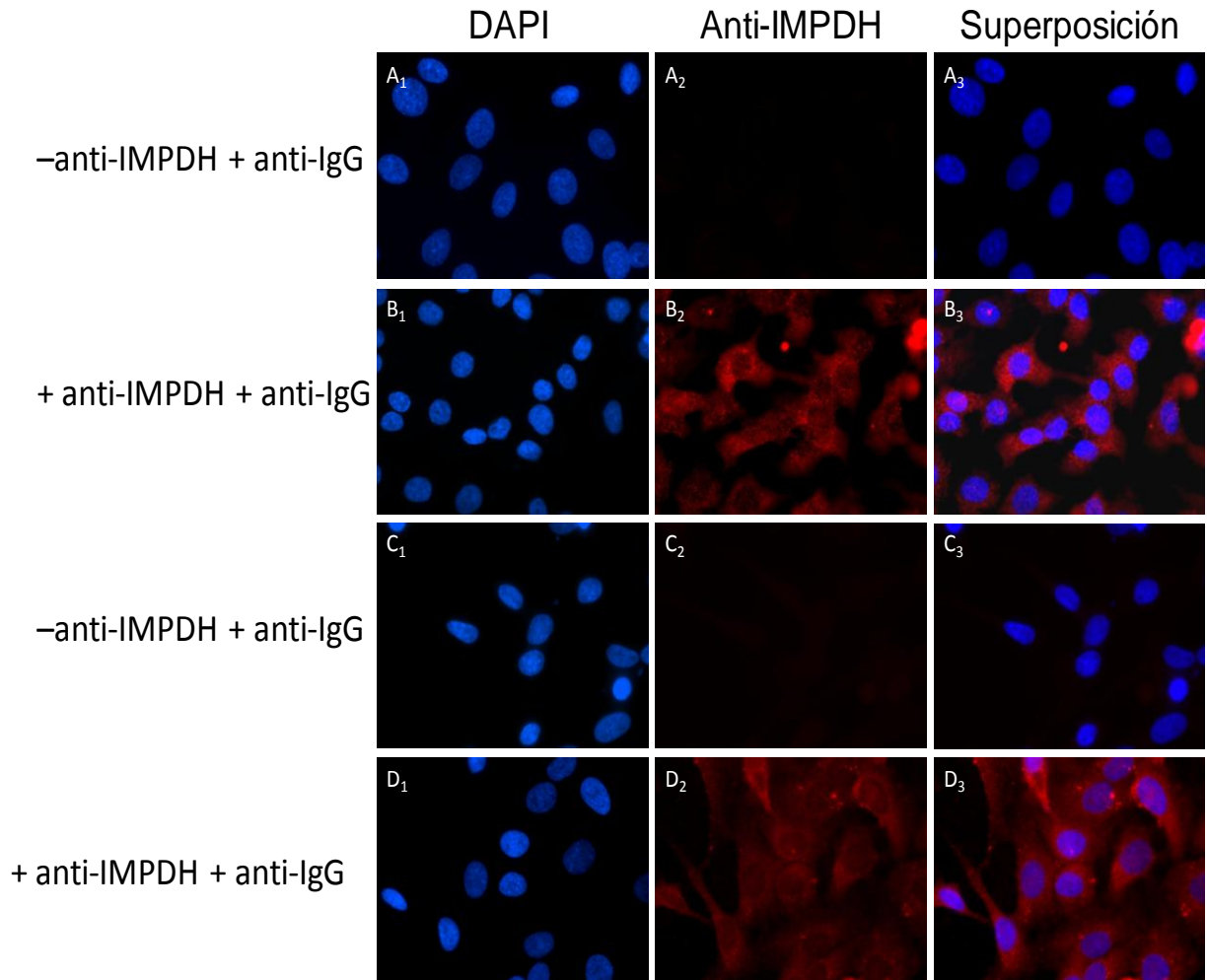
Luego se determinó la concentración óptima del anticuerpo primario anti-IMPDH y de anticuerpo secundario como así también el tiempo de incubación de los mismos. Las mejores concentraciones que mostraron menor pegado inespecífico y buena señal fueron 1:50 para el anti-IMPDH y 1:100 del secundario anti-IgG de conejo Alexa 555. En cuanto a los tiempos, no se encontraron diferencias entre incubaciones cortas a 37 °C e incubaciones ON en frío, con lo cual, a fin de optimizar los tiempos de la técnica se determinaron 2 h para el primario y 1 h para el secundario, ambos a 37 °C.

La fijación con paraformaldehído y posterior permeabilización con Tritón X-100 mostró mayor pegado inespecífico cuando se utilizó anticuerpo secundario sin incubar previamente con el primario (panel C), por tal motivo se decidió continuar con la fijación con metanol.

En cuanto al anticuerpo utilizado para la detección de los antígenos virales, se utilizaron las condiciones de uso corriente en el laboratorio.

En todos los casos, se utilizó la tinción con DAPI como coloración de contraste.

Estas condiciones se establecieron para los ensayos posteriores.



### Figura R.3. Puesta a punto del método de fijación

La expresión de IMPDH se reveló a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Las preparadas se observaron en un microscopio de fluorescencia con un aumento de 600X.

Paneles A: células sin anticuerpo anti-IMPDH fijadas con metanol; paneles B: células sin anticuerpo anti-IMPDH fijadas con paraformaldehído; paneles C: células con anticuerpo anti-IMPDH fijadas con metanol; paneles D: células con anticuerpo anti-IMPDH fijadas con paraformaldehído.

Panel 1: tinción con DAPI; panel 2: revelado de IMPDH; panel 3: conjunción de las imágenes 1 y 2.

### 5.3. RT-PCR y PCR cuantitativa

La técnica de PCR cuantitativa se utilizó para evaluar los niveles de RNA tanto de la enzima IMPDH, como los genes virales y el gen control actina.

Con el fin de poder cuantificar la expresión de los cuatro los genes en una misma corrida de PCR, se realizó una PCR gradiente para establecer una temperatura que permitiera el pegado de los todos los oligonucleótidos de los distintos genes. El rango de temperaturas fue seleccionado a partir de un análisis de las secuencias con el programa Vector (Thermo Fisher Scientific, EE.UU), concluyendo que la menor temperatura de *melting* se da con el primer del gen celular *impdh1* reverse, y la mayor temperatura de *melting* se da con el primer Arena del gen viral *n* (tabla R.2.)

**Tabla R.2. Primers de los genes de interés con sus respectivas temperaturas de melting.**

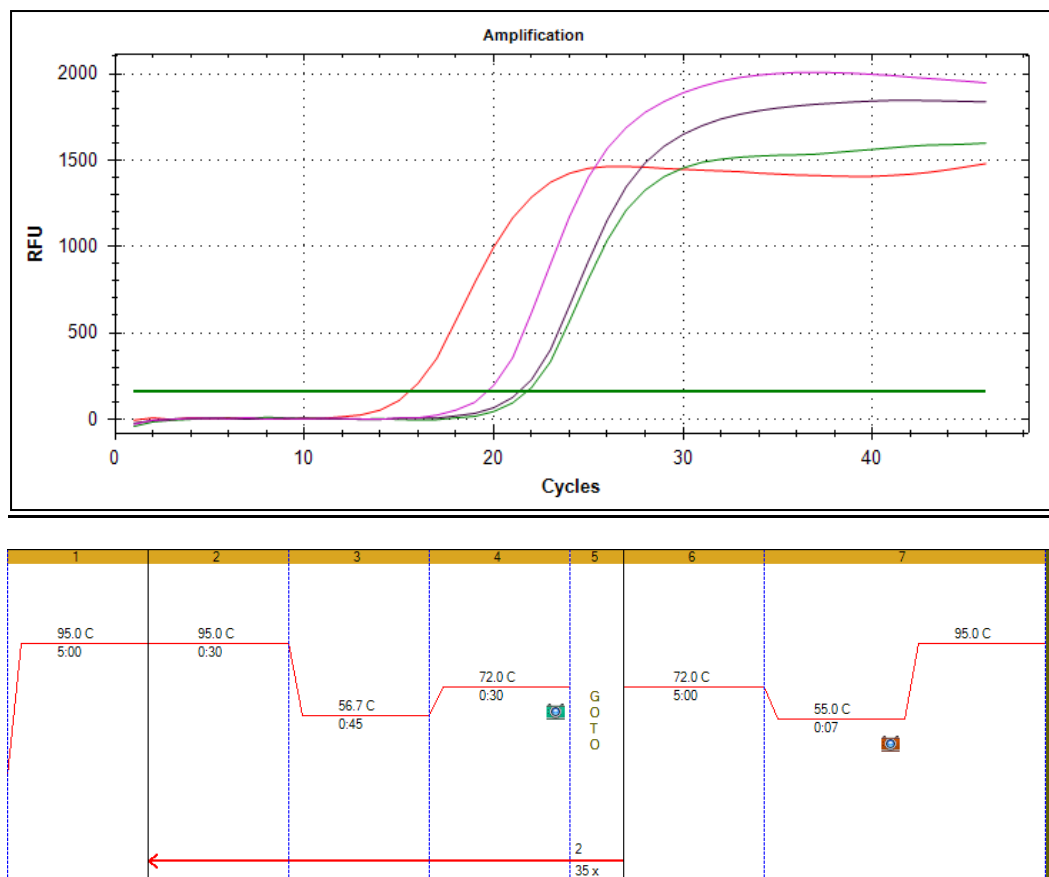
Gen	Secuencia	Tm (°C)
<b>Actina</b>		
-Forward	5'-GAGACCTTCAACACCCCAGCC-3'	67,6
-Reverse	5'-GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'	65,8
<b>N</b>		
-Arena	5'-CGCACAGTGGATCCTAGGC-3'	45,6
-186	5'-GGCATCCTTCAGAACATC-3'	43,8
<b>IMPDH1</b>		
-Forward	5'-GAAAGAGGCAAATGAGATCC-3'	58,6
-Reverse	5'-AGACGGTATTTGTCATCCTC-3'	56,4
<b>IMPDH2</b>		
-Forward	5'-AGGGAAATTCATCTTCCAG-3'	60,3
-Reverse	5'-CTGCATCAATGAGGTTCTTG-3'	56,4

Una vez establecido el rango, se realizó la PCR en gradiente variando la temperatura de *annealing* desde los 45 a los 60 °C.

Los resultados obtenidos demostraron que la temperatura de *annealing* que permitía evaluar todos los genes fue de 56,7 °C. El grafico de amplificación simultánea de los cuatro genes se observa en la Figura R.4 A.

También se verificó mediante de curva de melting que arroja el equipo, que cada para de primers mostrara un único pico, lo cual demuestra que la amplificación es específica.

Las condiciones de corrida para todas las PCRs practicadas en esta tesis se observan en la Figura R.4 B.



**Figura R.4. A: Grafico de la amplificación de los 4 genes con la T de annealing seleccionada.** La curva de actina, N, IMPDH1 y IMPDH2 se muestran en rojo, verde, violeta y lila respectivamente. B- Condiciones de corrida para la amplificación simultánea de los genes de interés.

#### 5.4. Estudio del silenciamiento de la expresión génica de IMPDH mediante siRNA

Para analizar la importancia de la vía metabólica de síntesis de nucleótidos de sobre la replicación del virus JUNV, se realizó el silenciamiento génico de ambas isoformas de la enzima IMPDH mediante la técnica de RNA pequeños interferentes (siRNA). Esta enzima participa en un paso clave en la síntesis *de novo* de nucleótidos de guanosina, su inhibición

conlleva al descenso de los niveles de este nucleósido y se traduce en una inhibición de la síntesis del material genético.

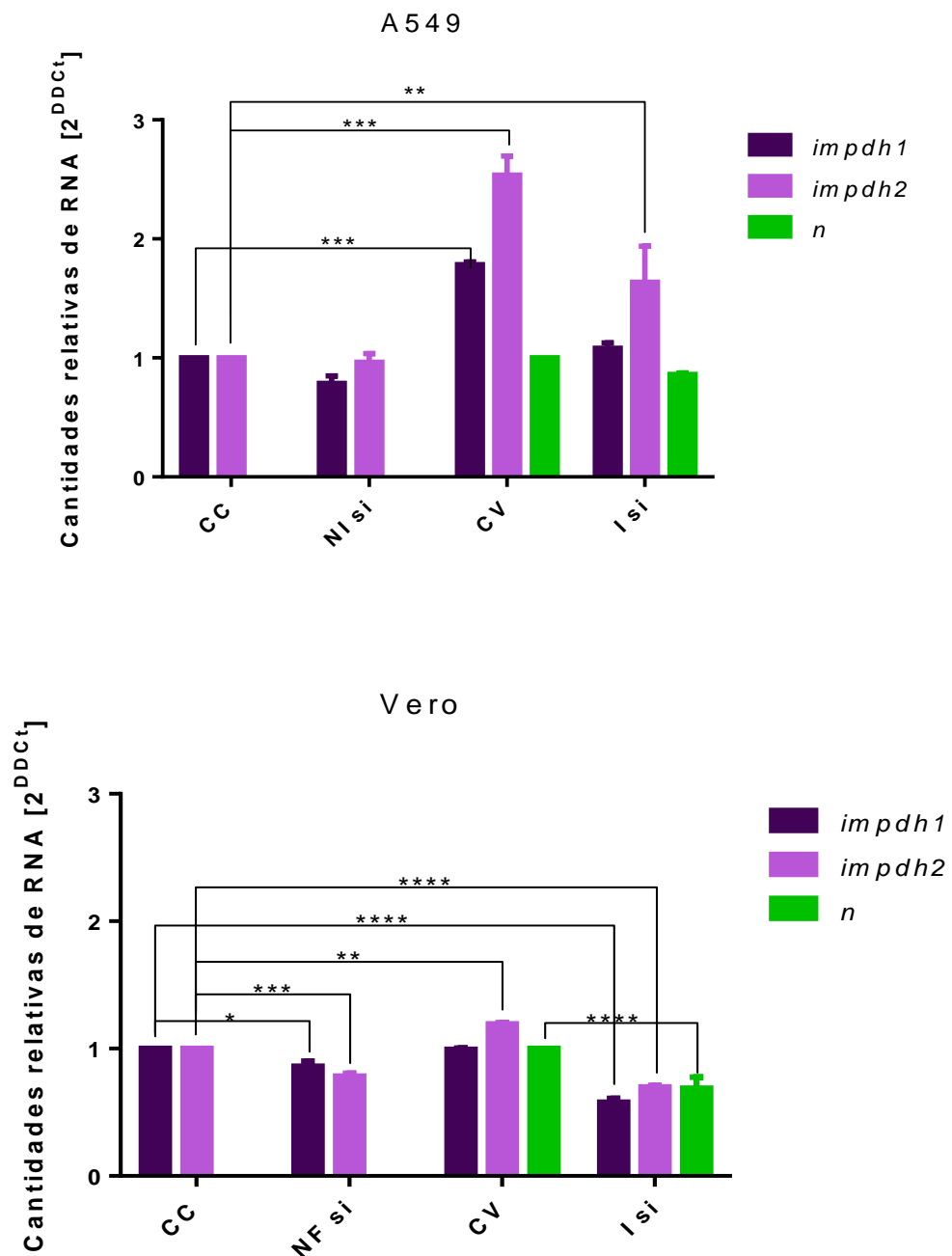
Los efectos del silenciamiento génico de IMPDH se evaluaron a nivel de la síntesis de macromoléculas: RNA y proteínas tanto celulares como virales.

#### **5.4.1. Efectos del silenciamiento génico con IMPDH-siRNAs sobre los niveles de RNA de IMPDH y la nucleoproteína viral N**

Con el objetivo de estudiar cuantitativamente el efecto del silenciamiento de los genes de IMPDH, primeramente se determinaron los niveles de mRNA de la enzima y de la nucleoproteína viral N.

Para ello, células Vero y A549 fueron crecidas en microplacas de 24 pocillos durante 24 hs y luego transfectadas con los siRNA específicos para ambas isoformas de IMPDH y siRNA negativos inespecíficos (scr) como control negativo de silenciamiento, utilizando Lipofectamina 2000, tal como se describe en MM 3.7.1. A las 24 h post-transfección las células fueron infectadas con JUNV a una m.i. 0,1 y luego incubadas con MM; a las 48 h p.i. se extrajo el RNA total y se lo utilizó como molde para la síntesis de cDNA utilizando oligonucleótidos aleatorios. Las muestras de cDNA fueron amplificadas con los oligonucleótidos correspondientes a ambos genes de *impdh* y al gen viral *n* (Tabla MM 1) mediante PCR en tiempo real usando *actina* como gen normalizador celular.

Los niveles de mRNA de ambas isoformas obtenidos en los tratamientos con scr RNA fueron considerados el 100%, 1 en la escala lineal, lo cual corresponde al control no silenciado. La misma estrategia se utilizó para la determinación del control para el gen viral.



**Figura R.5. Silenciamiento por IMPDH-siRNAs, efecto sobre los niveles de mRNA de las enzimas y el gen viral de la nucleoproteína.**

Células A549 o Vero fueron transfectadas con IMPDH-siRNA o scrRNA negativos y posteriormente infectadas con JUNV IV4454. Luego el RNA de *impdh1*, *impdh2* y el viral se midieron por real time PCR usando *primers* específicos para los genes *impdh1*, *impdh2*, *n* y *actina*. Los datos se expresan como cantidades de RNA relativas al control de células (CC) y al control viral (CV) y normalizadas

por el mRNA de  $\beta$ -actina. En todos los casos, cada valor corresponde a la media de dos repeticiones  $\pm$  desvío estándar (DE). Los asteriscos indican diferencia significativa (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). NF si; no infectado silenciado; I si; infectados silenciado.

Los niveles de mRNA de los tratamientos fueron referidos como cantidades relativas de RNA respecto al control de cada gen, utilizando la técnica del  $\Delta$ Ct. Se consideraron tratamientos al silenciamiento tanto como a la infección viral.

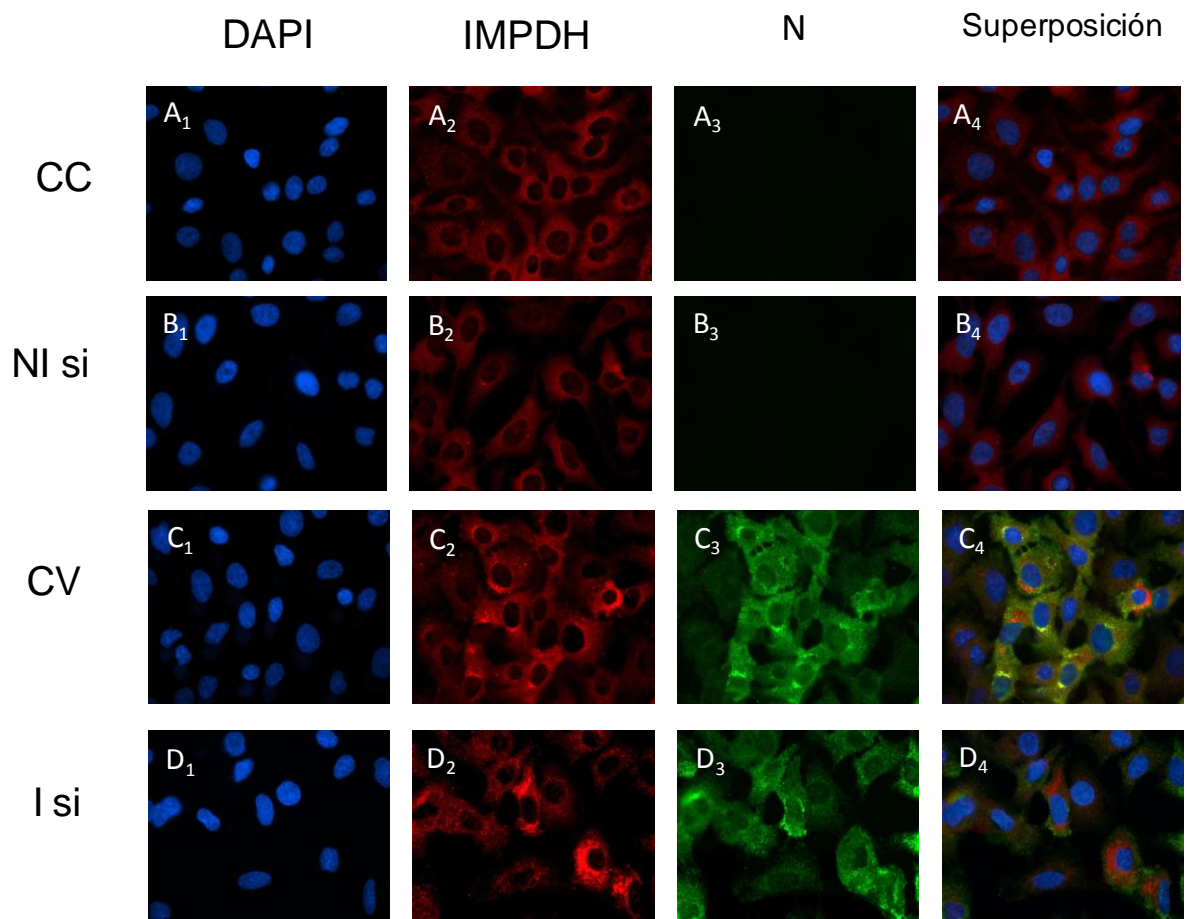
En el caso de la línea celular A549 las diferencias observadas en los niveles de RNA de las enzimas no fueron significativas. La cuantificación de *impdh1* en células silenciadas no infectadas mostró apenas 0,2 puntos de inhibición y no hubo diferencias para *impdh2*. Por el contrario, en células infectadas, ambos genes se vieron aumentados en 0.8 y 1.5 para *impdh1* e *impdh2* respectivamente; esos aumentos fueron significativos. Estos resultados se vieron reflejados en los niveles del gen viral, el cual no mostró diferencias significativas respecto de los cultivos infectados no silenciados.

En el caso de la línea celular Vero, la cantidad relativa de mRNA fue de 0,86 para *impdh1* y 0,78 para *impdh2*, respecto del control celular (CC). Si bien las diferencias son bajas, resultaron significativas. Por otra parte, los niveles de *impdh1* no variaron en los cultivos infectados no silenciados (CV) respecto al control celular, pero se observó un leve incremento significativo para el caso de la expresión de *impdh2*. En este caso, el silenciamiento de ambas isoformas se tradujo en una disminución significativa de los niveles de mRNA del gen viral *n*.

#### **5.4.2. Efecto del silenciamiento génico con IMPDH-siRNA sobre los niveles de expresión de la proteína IMPDH y la nucleoproteína viral N.**

Con el objetivo de evaluar cualitativamente el silenciamiento mediado por siRNAs sobre los niveles de expresión de la proteína IMPDH y los antígenos virales, se llevó a cabo una IFI en cultivos silenciados y no silenciados, infectados y no infectados. Para ello, células Vero y A549 fueron crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 pocillos durante 24 h y luego fueron transfectadas con los siRNA específicos o siRNA negativos (SCR) utilizando Lipofectamina 2000 tal como se describe en MM 2.8.1. A las 24 h post-transfección las células fueron infectadas con JUNV (m.i. 0,1) y luego incubadas con MM; a las 48 h p.i. se fijaron los cultivos y se realizó la IFI para IMPDH y N siguiendo el protocolo descrito en MM 3.8.2.

En las figuras R.6 se muestra el efecto del silenciamiento génico de sobre los niveles de expresión de la proteína IMPDH y la nucleoproteína viral N en células A549. Puede observarse que el tratamiento con siRNA específicos contra la enzima no produce una disminución de la intensidad de fluorescencia correspondiente a IMPDH, tanto en células infectadas como no infectadas (A2 vs B2 y C2 vs D2). Esto coincide con el bajo nivel de silenciamiento observado a nivel de RNA. Por otro lado, la expresión de la proteína viral N no varía en células silenciadas respecto al control (C3 vs C4). Los resultados obtenidos con células Vero fueron similares.



**Figura R.6. Efecto del silenciamiento de IMPDH mediado por siRNAs sobre partículas virales en A549.** Los preparados se observaron en un microscopio de fluorescencia (marca y modelo) con un aumento de 600X. Los antígenos virales se revelaron usando los anticuerpos monoclonales SA02-BG12 para NP y H-300 para IMPDH.

Paneles A: control celular no silenciado scr-siRNA; paneles B: células silenciadas IMPDH-siRNA no infectadas; paneles C: control viral no silenciadas scr-SIRNA; paneles D: células infectadas silenciadas

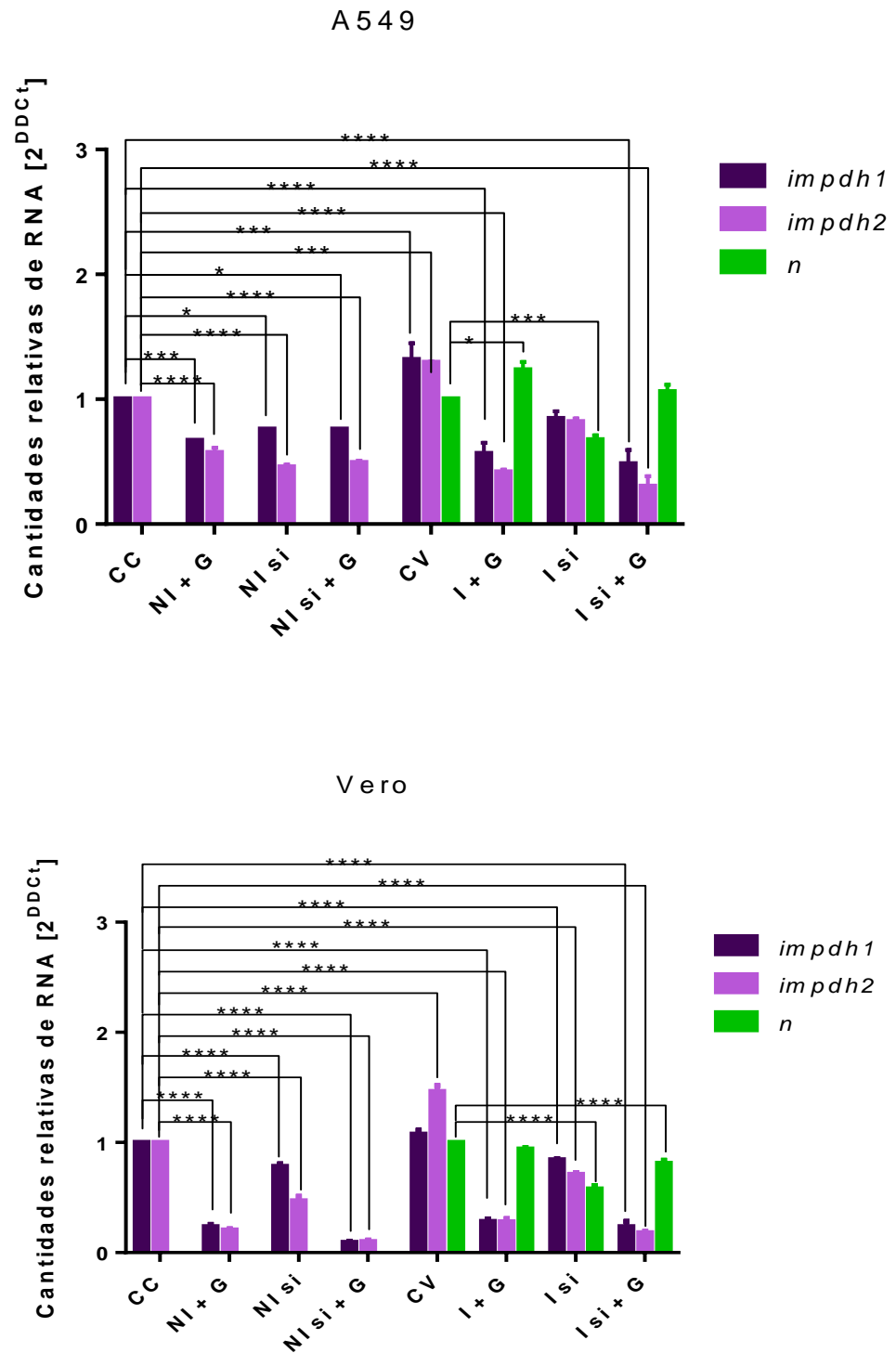
IMPDH-siRNAs; paneles 1: tinción con DAPI paneles 2: anti-IMPDH; paneles 3: revelado de N; paneles 4: conjunción de imágenes 1, 2 y 3.

## **5.5. Estudio del silenciamiento de la expresión génica de IMPDH mediante shRNAs**

Dados los pobres niveles de silenciamiento génico e inhibición de la replicación viral obtenidos con los IMPDH-siRNAs, se decidió evaluar otra estrategia realizando el silenciamiento mediante la transfección con plásmidos que expresan las secuencias de IMPDH-sh-RNAS (sc-45679-SH) siguiendo el protocolo detallado en MM 3.8.2.

### **5.5.1. Efectos del silenciamiento génico con IMPDH-shRNAs sobre los niveles de RNA de IMPDH y la nucleoproteína viral N**

Células Vero y A549 fueron crecidas en microplacas de 24 pocillos durante 24 hs y luego transfectadas con el plásmido que contiene las secuencias para el silenciamiento o con el vector vacío (control negativo de silenciamiento) utilizando Lipofectamina 2000, tal como se describe en MM 3.7.2. A las 24 hs post-transfección las células fueron infectadas con JUNV a una m.i. 0,1 y luego incubadas con MM y a las 48 h p.i. se extrajo el RNA total y se lo procesó para su posterior amplificación con *primers* específicos de acuerdo a lo detallado en MM 3.9. Para determinar si la disminución de los niveles de RNA viral se debe a una baja en la disponibilidad de nucleótidos de guanosina, se decidió incluir un ensayo de reversión con guanosina exógena suplementando el medio de incubación post-transfección con un exceso de guanosina. Los resultados se muestran en la figura R.7.



**Figura R.7. Silenciamiento por IMPDH-shRNAs, efecto sobre los niveles de mRNA de las enzimas y el gen viral de la nucleoproteína.** Células A549 o Vero fueron transfectadas con plásmidos que expresan las secuencias de IMPDH-shRNA o shRNA negativos y posteriormente infectadas con JUNV IV4454. Luego el RNA de *impdh1*, *impdh2* y

el viral se midieron por real time PCR usando *primers* específicos para los genes *impdh1*, *impdh2*, *n* y *actina*. Los datos se expresan como cantidades de RNA relativas al control de células (CC) y al control viral (CV) y normalizadas por el mRNA de  $\beta$ -actina. En todos los casos, cada valor corresponde a la media de dos repeticiones  $\pm$  desvío estándar (DE). Los asteriscos indican diferencia significativa (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). NI si; no infectado silenciado; I si; infectados silenciado; +G: agregado de guanosina.

Como se esperaba, el agregado exógeno de guanosina disminuyó los niveles de RNA de ambas isoformas de la enzima IMPDH dado que el nivel del nucleósido es el que regula los niveles de expresión del mensajero de la enzima. El efecto fue mayor en la línea celular Vero.

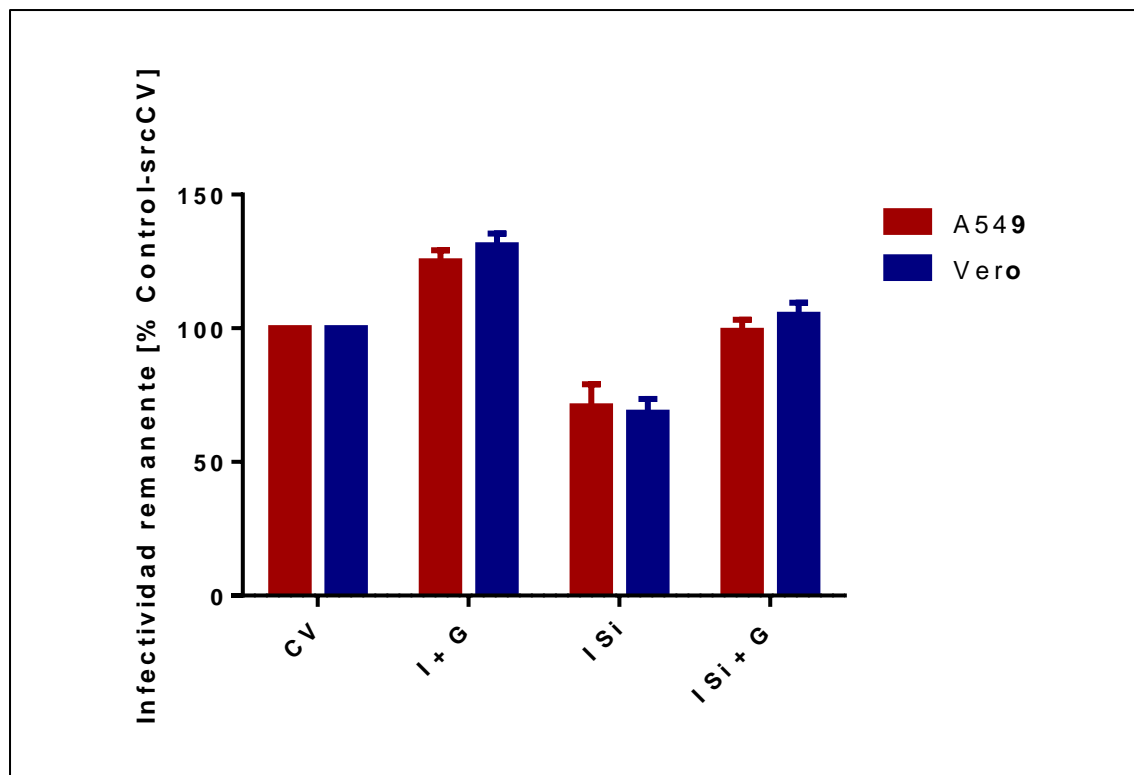
En el caso de A549 los niveles de silenciamiento observados sobre los genes de las enzimas fueron de 0,24 y 0,65 para *imph1* y 2 respectivamente. Si bien los efectos fueron mejores sobre *impdh2*, ambas diferencias resultaron significativas. Por otra parte, los niveles de ambas isoformas aumentaron significativamente en cultivos infectados no silenciados pero esos aumentos no se observaron en los cultivos infectados y suplementados con guanosina, primando el efecto inhibitorio del nucleósido por sobre el incremento producido por la infección viral. Si bien el silenciamiento de ambas enzimas en células infectadas fue menor que en células no infectadas (0,2 en ambas enzimas), esta diferencia no resultó estadísticamente significativa, pero si lo fue para el descenso del nivel de RNA del gen viral.

En cuanto a los resultados en la línea celular Vero, se observó un descenso significativo en ambas isoformas de la enzima debido al silenciamiento génico. Al igual que para el caso de A549, la infección viral produjo un aumento en los niveles de RNA de las enzimas el cual solo resultó significativo para IMPDH 2. En los cultivos silenciados e infectados, se observó una disminución significativa de los tres genes analizados.

Al igual que en A549, la administración de guanosina en forma exógena, produce un fuerte descenso de los niveles de los mensajeros de ambas isoformas y restituye los niveles de RNA correspondientes al gen viral *n*.

**5.5.2. Efecto del silenciamiento de IMPDH sobre la producción de partículas virales**

A fin de estudiar el efecto del silenciamiento de IMPDH sobre la producción de partículas virales infectivas, se titularon los sobrenadantes de los cultivos infectados silenciados y no silenciados de los experimentos de PCR cuantitativa mediante la técnica de plaqueo.



**Figura R.8. Efecto sobre la producción de partículas virales.** El gráfico está expresado en % de infectividad, respecto del control viral (shCV). I: infectado; I si: infectado silenciado; +G: más guanosina.

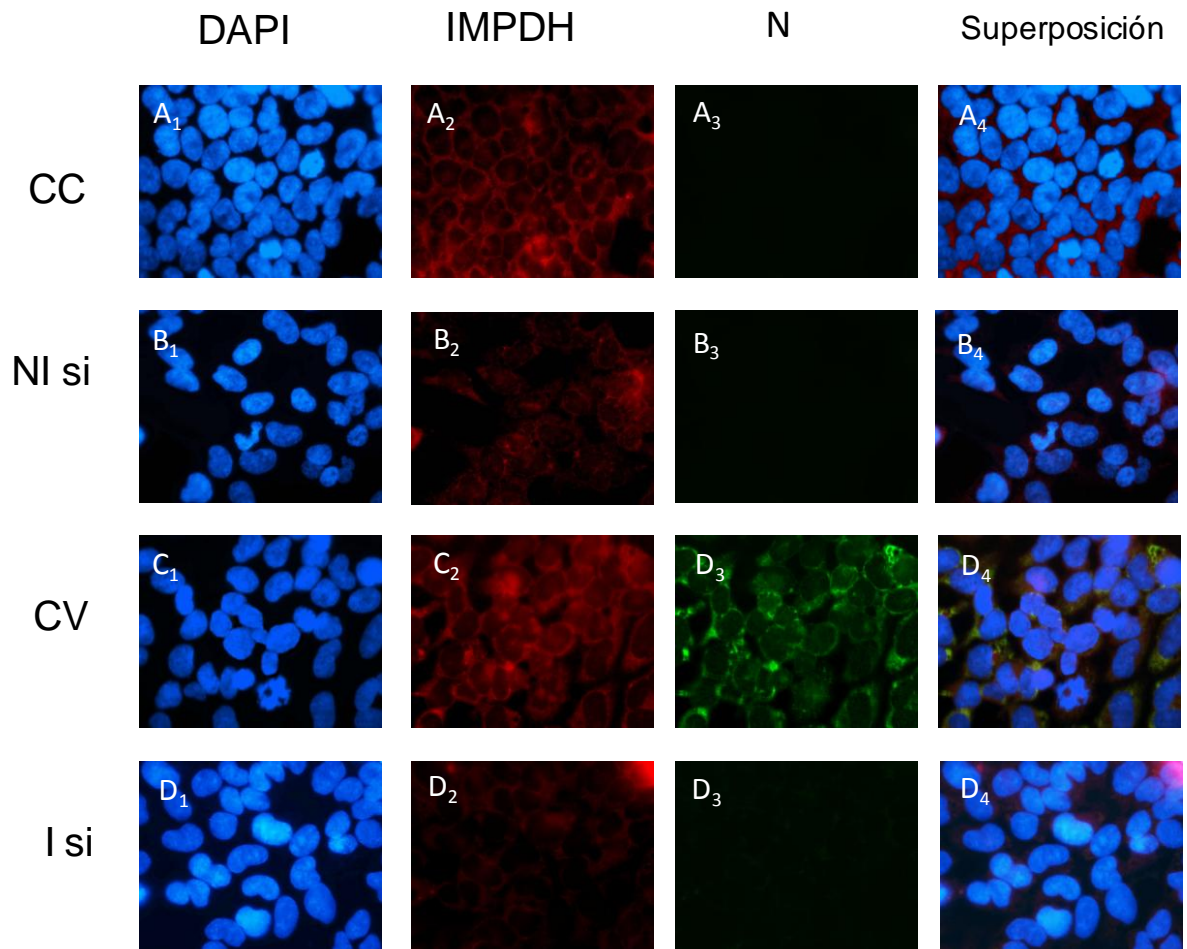
Tal como se puede observar en el grafico R.8, el porcentaje de infectividad disminuye en los cultivos infectados silenciados en ambos sistemas celulares. Dicha disminución se revierte a los niveles del control viral por el agregado exógeno de guanosina, tanto en Vero como en A549. Por otra parte, se puede observar un aumento del porcentaje de infectividad en cultivos infectados, no silenciados, suplementados con guanosina.

### **5.5.3. Mediante inmunofluorescencia indirecta.**

Con el objetivo de poder visualizar el efecto del silenciamiento mediado por shRNAs, a las células A549 se les realizó una inmunofluorescencia indirecta siguiendo el protocolo descrito en MM 3.9.

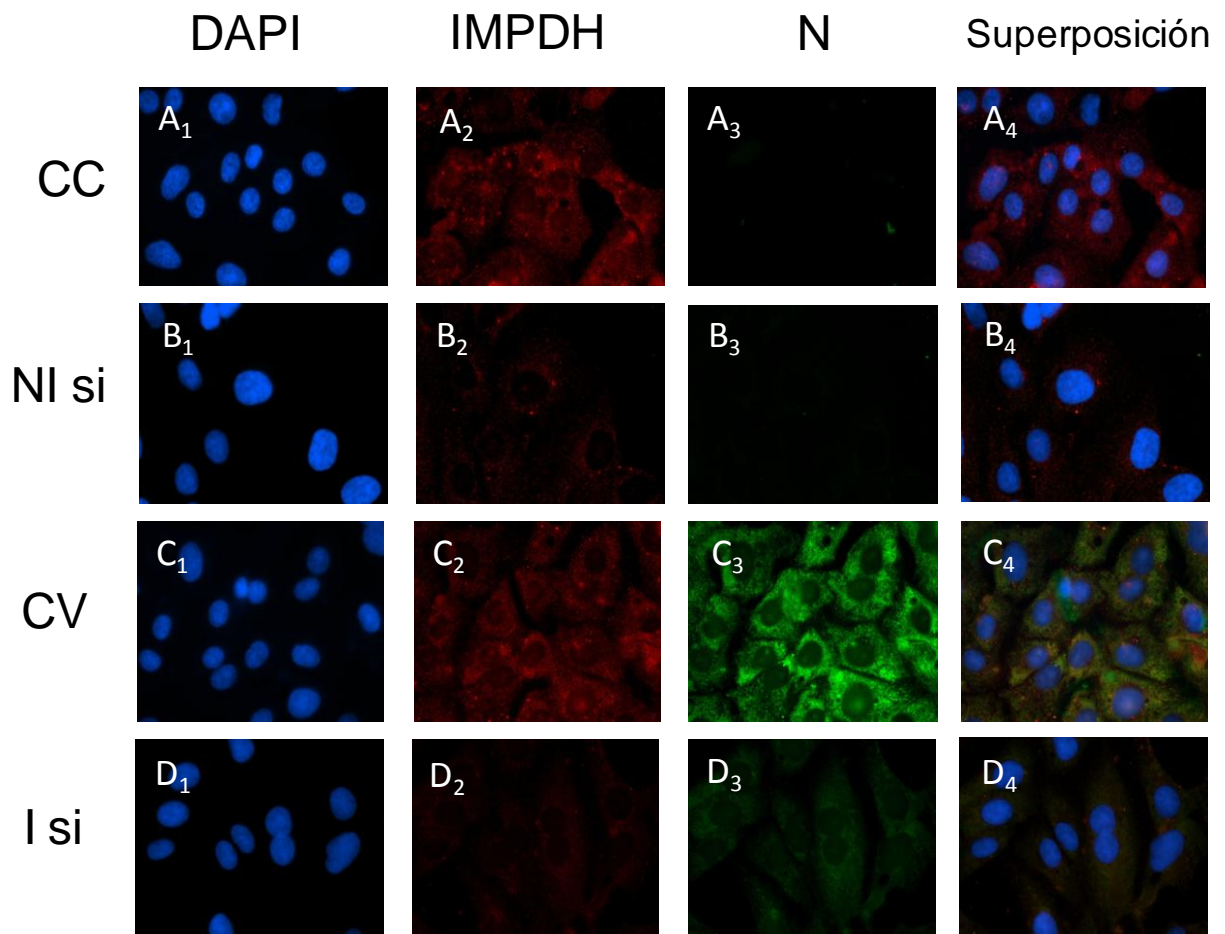
Tal como se puede ver en la figura R.9. y R.10., al analizar la intensidad de fluorescencia para el caso de la enzima IMPDH se puede ver que el silenciamiento de la enzima (panel B y D) es mucho más notorio respecto al control (panel A y C respectivamente) que con la técnica anterior.

En cuanto a la expresión del antígeno viral, coincidió la disminución de la intensidad de fluorescencia correspondiente a la proteína viral N con la disminución de la señal de fluorescencia de IMPDH. No obstante a ello, se observó una diferencia de acuerdo al tipo celular evaluado. En el caso de las células Vero, si bien el número de células positivas no se vio modificado, si se observó una marcada disminución de la intensidad de fluorescencia de las mismas (Figura R.10. C1 vs D1). En A549 en cambio, se observó una disminución del número de células positivas, pero no se observaron diferencias en la intensidad de fluorescencia (Figura R.9 C1 vs D1).



**Figura R.9. Efecto del silenciamiento de IMPDH mediado por shRNAs sobre partículas virales en células A549.** Las células fueron crecidas en microplacas de 24 pocillos durante 24 h y luego fueron transfectadas (o no, a modo control) con los plásmidos codificantes de IMPDH-shRNA específicos (SCR) utilizando Lipofectamina 2000 tal como se describe en MM 3.8.2. A las 24 h post-transfección las células fueron infectadas con JUNV (m.i. 0,1) y luego incubadas con MM; a las 48 h p.i. se fijaron para realizar una inmunofluorescencia indirecta. La expresión de IMPDH, la proteína viral N, y la tinción del núcleo celular se realizaron siguiendo el protocolo descrito en MM 4.9.2

Las preparadas se observaron en un microscopio de fluorescencia con un aumento de 1000X.



**Figura R.10. Efecto del silenciamiento de IMPDH mediado por shRNAs sobre partículas virales en células Vero.** Las células fueron crecidas en microplacas de 24 pocillos durante 24 h y luego fueron transfectadas (o no, a modo control) con los plásmidos codificantes de IMPDH-shRNA específicos (SCR) utilizando Lipofectamina 2000 tal como se describe en MM 4.8.2. A las 24 h post-transfección las células fueron infectadas con JUNV (m.i. 0,1) y luego incubadas con MM; a las 48 h p.i. se fijaron para realizar una inmunofluorescencia indirecta. La expresión de IMPDH, la proteína viral N, y la tinción del núcleo celular se realizaron siguiendo el protocolo descrito en MM 4.9.2 Las preparados se observaron en un microscopio de fluorescencia con un aumento de 1000X.

## 6. Discusión

Los arenavirus se han convertido en un desafío serio y creciente para la salud pública en los últimos años, particularmente en las Américas y África. Entre los miembros de la familia *Arenaviridae*, LASV y JUNV generan brotes anuales periódicos de fiebre hemorrágica en áreas endémicas de África Occidental y Argentina, respectivamente. En la actualidad, la infección con JUNV se logró manejar efectivamente en la región endémica usando una combinación de vacunación y terapia con plasma híper inmune. Sin embargo, no está claro el uso de la terapia con plasma a largo plazo y no hay recursos similares disponibles para otros arenavirus del NM.

Aunque se han estudiado diferentes tipos de compuestos por su actividad anti-arenavirus (Andrei y De Clercq, 1993; Damonte y Coto, 2002; García et al., 2011), actualmente no se dispone de una quimioterapia específica y segura contra ninguno de ellos. El único medicamento aprobado para el tratamiento humano es RIB, un análogo de guanósina con un amplio espectro de actividad antiviral contra los virus de ARN. Sin embargo, este fármaco no es igualmente eficaz contra todos los arenavirus que causan FH y el tratamiento, recomendado solo en la fase temprana de la enfermedad clínica, puede producir reacciones secundarias indeseables (Enría y Maiztegui, 1994; Fisher-Hoch et al., 1992; McCormick et al., 1986).

Los medicamentos antivirales con licencia en uso actual contra otros virus se dirigen solo a proteínas virales, son generalmente específicos para cada tipo de virus y son propensos a inducir la aparición rápida de mutantes virales resistentes. La resistencia a los inhibidores virales es un problema particularmente más grave para la terapia de virus de ARN clínicamente importantes, dado su alto índice de mutación (Ge, et al 2003, Nakazawa, et al 2008). Una alternativa para mitigar este problema podría ser el desarrollo de fármacos que afecten los factores del huésped requeridos para completar el ciclo de replicación en lugar de factores directamente codificados por el patógeno. Hay una serie de procesos necesarios para la multiplicación del virus dentro de la célula infectada que implican vías celulares y enzimas, que han demostrado ser objetivos atractivos para la intervención quimioterapéutica contra varios virus no relacionados (Konishi et al., 2003, Shi et al., 2005, Meng et al., 2006; Bousarghin et al., 2009). Se espera que este enfoque establezca una alta barrera contra el escape viral de la inhibición, ya que no es de esperar que las mutaciones virales individuales compensen la pérdida de un factor de huésped requerido. Además de la rara aparición de

resistencia a virus, la terapia inhibiendo las vías celulares proporciona un objetivo prometedor para el desarrollo de antivirales de amplio espectro activos contra todos los virus del mismo género / familia e incluso virus no relacionados, ya que muchos virus pueden compartir una dependencia de la misma función del hospedador. Otra ventaja de los blancos celulares es la posibilidad de emplear como agentes antivirales medicamentos existentes con licencia para otros trastornos humanos con perfiles de datos de seguridad definidos y los historiales de uso clínico disponibles, que requieren solo una evaluación para el nuevo uso indirecto. Por otro lado, los factores celulares pueden dar lugar a veces a efectos secundarios citotóxicos u otros indeseables. Para minimizar este problema, la inhibición debe dirigirse con precisión. En este aspecto, la aplicación de una estrategia antiviral basada en factores del hospedador parece ser más adecuada para el tratamiento de infecciones causadas por patógenos asociados con enfermedades agudas en humanos, como las FHs causadas por arenavirus, ya que el tiempo de tratamiento es limitado y se pueden minimizar los posibles efectos colaterales. Para respaldar aún más la aplicación de esta estrategia antiviral, es necesario comprender completamente la importancia y la participación de las interacciones virus-célula para una adecuada infección viral. Los estudios de genómica y proteómica automatizadas junto con la bioinformática han proporcionado las herramientas para avanzar en el estudio del interactoma virus-huésped de diversos patógenos (Kim et al., 2013; Wilson et al., 2013; Fire et al., 1998). Aunque todavía existe una pequeña aplicación de estas tecnologías en arenavirus (Zamore et al., 2005; Brummelkamp et al., 2002; Pillai et al., 2007; Kawasaki et al., 2004), en los últimos años se han publicado numerosos informes sobre estrategias inhibitorias basadas en blancos celulares.

Fue interesante comparar los efectos contra JUNV de inhibidores de IMPDH con actividad antiviral contra varios otros virus, como RIB y MPA. RIB es un análogo de nucleósido que una vez dentro de la célula se convierte en RIB-5`-monofosfato y de esta forma se convierte en un inhibidor competitivo de IMPDH (Streeter et al., 1973). Luego, RIB-5`-trifosfato se forma mediante fosforilación adicional y se han propuesto otros mecanismos antivirales asociados a su forma trifosfato: inhibición directa de la ARN polimerasa viral (Eriksson et al., 1977; Rankin et al., 1989; Toltzis et al., 1988), la inhibición de la incorporación del cap en el extremo 5` de los mRNA virales (Goswami et al., 1979) y la inducción de “catástrofe de error” como resultado de la acumulación de mutaciones (Gracia y Cameron, 2002). Existe evidencia para apoyar cada uno de los mecanismos de acción de RIB

propuestos, y las combinaciones distintas de virus / hospedador pueden favorecer preferentemente uno o más de estos mecanismos durante la infección viral. En el caso particular de los arenavirus, hay evidencia para LCMV y LASV de que el mecanismo de acción de RIB no se centra principalmente en la inhibición de IMPDH, como se describe para otros virus como flavivirus y paramixovirus (Leyssen et al., 2005), y puede implicar la polimerasa viral (Moreno et al., 2011; Ölschläger et al., 2011; Ruiz-Jarabo et al., 2003). Experimentos con RIB y guanosina realizados en el laboratorio también indican que el agotamiento de GTP intracelular no es la causa dominante para la inhibición de JUNV (Sepúlveda et al. 2012). Hace décadas se evaluaron otros conocidos inhibidores de IMPDH contra diferentes arenavirus con resultados variables (He et al., 2010). Más recientemente, 5-etinil-1-β-D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida (EICAR) y ácido micofenólico (MPA) se probaron con éxito contra arenavirus patógenos y mostraron una mayor potencia y selectividad antiviral *in vitro* que RIB contra JUNV y LASV con MPA como el inhibidor más activo (valores IC<sub>50</sub> alrededor de 0.3 µg/mL) (Sabbioni et al., 2007; Dave et al., 2006). EICAR es un inhibidor competitivo de IMPDH, mientras que MPA es un inhibidor no nucleosídico, no competitivo y reversible. Ambos compuestos poseen propiedades antiproliferativas, inmunosupresoras y antivirales (Kitchin et al. 1977). La acción antiviral muy potente de este fármaco frente a la multiplicación JUNV se mostró por primera vez en nuestro laboratorio y esta inhibición se revirtió por completo cuando se complementó el medio con guanosina, incluso a bajas concentraciones (Sepúlveda et al. 2012). Por lo tanto, la actividad anti-JUNV de MPA está ciertamente asociada con el agotamiento del nivel de GTP a través del bloqueo de IMPDH, demostrando adicionalmente la alta susceptibilidad de la replicación de JUNV a la inhibición de esta ruta celular. Un mecanismo similar de inhibición por MPA se demostró contra el arenavirus del Viejo Mundo LASV (Ölschläger et al., 2011). El stock viral generado para el desarrollo de los experimentos de esta tesis se ensayó con estos dos compuestos a fin de verificar su susceptibilidad y utilizar estos resultados como controles.

Primeramente se ensayó la citotoxicidad de ambos compuestos en los distintos sistemas celulares mediante la técnica del MTT, los cuales no resultaron tóxicos en las dosis ensayadas. Utilizando estos resultados se evaluó la susceptibilidad del stock viral de trabajo a estos compuestos determinándose dosis efectivas 50 (CE<sub>50</sub>) similares a las de la bibliografía (Sepúlveda et al. 2012). El MPA resultó más potente y selectivo que RIB.

El fenómeno de RNA de interferencia es un mecanismo celular de silenciamiento génico en el que se produce la degradación de RNA mensajeros específicos mediante secuencias cortas de RNA complementarias. La tecnología de siRNA proporcionó una potencial estrategia para combatir infecciones virales patogénicas, así como permitió el estudio de factores involucrados en la replicación de estos virus debido a que son sumamente específicos, fáciles de diseñar y muchas veces pueden dirigirse contra diversas cepas de un mismo virus o incluso de virus de géneros relacionados.

En el presente trabajo se estudió el rol de ambas isoformas de IMPDH utilizando la estrategia de siRNA y shRNAs. Se utilizó una mezcla comercial de tres siRNAs diseñados por el laboratorio comercializador, los cuales fueron transfectados en cultivos de células humanas A549 y células Vero de mono verde africano; ambas líneas celulares son de uso frecuente para el estudio de infecciones por arnavirus.

Los resultados del silenciamiento se evaluaron a nivel del RNA y de la expresión de la proteína con su correspondiente consecuencia sobre las macromoléculas virales. Son conocidas las limitaciones de la técnica de silenciamiento por siRNAs, a las cuales se suman la baja eficiencia de transfección con Lipofectamina.

El primer modelo de silenciamiento ensayado fue poco eficiente. Aún variando y ajustando la mayor cantidad de variables del protocolo de transfección e infección viral. La transfección de cultivos con fragmentos de RNA interferentes específicos produjo pobres diferencias respecto a los transfectados con RNA negativos. El mejor resultado obtenido se observa en la figura R.5. y se observa un silenciamiento mayor para la isoforma 2. Si bien para las células Vero el silenciamiento fue significativo, la técnica no tuvo el mismo resultado con las células A549. Por el contrario, la infección viral produjo un aumento significativo de los niveles de mensajero de IMPDH, sobre todo IMPDH2 en ambos tipos celulares, debido al descenso de los niveles del nucleótido producto de la intensa síntesis de material genético viral.

Los resultados obtenidos en cuanto a niveles de mensajeros de IMPDH se correlacionaron con los niveles de expresión proteica (figura R.7) observados por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal anti-IMPDH total.

Con el interés de lograr mayores niveles de silenciamiento, se decidió cambiar el uso de siRNAs por el de shRNAs codificados en vectores plasmídicos. Estos plásmidos expresan

los shRNAs en las células transfectadas, y es un método que logra un silenciamiento también transiente pero más prolongado y estable en el tiempo que el de siRNA. La herramienta ideal para este tipo de ensayos es la utilización de vectores lentivirales, los cuales no requieren transfección, se integran en el genoma de la célula blanco y logran una expresión estable del shRNA (Barton et al., 2002; Devroe E et al., 2002), pero es una técnica costosa en cuanto fondos y al momento de realizar este trabajo no contamos con los recursos necesarios para adquirirla.

El silenciamiento de la enzima IMPDH con shRNA resultó más efectivo, ambas isoformas fueron significativamente silenciadas respecto al control no silenciado, aunque la isoforma 2 fue siempre más susceptible que la isoforma 1. Estos mayores niveles de silenciamiento sobre IMPDH se tradujeron en niveles significativos de inhibición viral a nivel del mRNA y la expresión de la nucleoproteína y a nivel del título de partículas infectivas. Existen varios reportes en la literatura donde se impacto negativo sobre la producción viral producto del silenciamiento génico de *impdh* (Ziegler et al., 2017, Eric C. Dunham et al., 2018).

Como se mencionó anteriormente, ambas líneas celulares son permisivas a la infección con JUNV, aunque el título viral es significativamente mayor en las células Vero comparadas con A549 debido a que son deficientes en interferón (INF). Otros autores han determinado una reducción de 1 log en la producción viral en A549 respecto a Vero, producto de la secreción y respuesta a INF presente en A549 y ausente en Vero (Peña Cárcamo et al., 2018). Diferencias similares observamos en nuestros experimentos respecto a la señal de fluorescencia correspondiente al antígeno viral en ambos sistemas celulares. Mientras que en la línea A549 se observa una clara disminución del número de células positivas en los focos de infección, en Vero ese número no sufre cambios pero si lo hace la intensidad de la señal. A549 restringe la propagación de la infección, no así Vero. En ambas líneas silenciadas se observa una disminución de la producción de virus infeccioso, tal como se refleja en los títulos virales obtenidos.

Para poder confirmar que el efecto inhibitorio del silenciamiento de IMPDH sobre la replicación viral se debe a la disminución de los niveles intracelulares de guanósina, se realizó un ensayo de reversión por el agregado exógeno de un exceso del nucleósido. Efectivamente, la normalización de los niveles del precursor nucleotídico, restituyó los valores virales a nivel

del control no silenciado, tanto sea el mRNA, la expresión del antígeno viral como la producción de virus infeccioso. Como era de esperarse, el exceso de guanosina activa el mecanismo de regulación negativa del mRNA de IMPDH, es por ello que se determinaron niveles menores del mensajero de IMPDH en los cultivos tratados con guanosina que en aquellos no tratados.

Otra herramienta muy utilizada para silenciar funciones celulares, es la transfección de plásmidos que expresan proteínas mutantes dominantes negativas de la proteína de interés. Descartamos esta opción debido a que la expresión exacerbada de una proteína no funcional produce la activación de diferentes mecanismos de respuesta y regulación celular. Esa incertumbre, se suma a las alteraciones celulares de carácter espaciales, arquitectónicas, metabólicas y fisiológicas provocadas por la infección viral, y a que los actores involucrados en esas respuestas celulares en muchos casos participan a distinto nivel en la replicación viral como por ejemplo proteínas chaperonas (Booth et al., 2016) o cascadas de señalización (Linero *et al.*, 2015; Brunetti *et al.*, 2018)

Debido a sus altas tasas de mutación, los virus (en especial los de genoma de RNA), tienen el potencial de evadir los sistemas de defensa del hospedador, como así también dejar de ser sensibles a medicamentos antivirales o a vacunas. Por lo tanto, el desarrollo de terapias antivirales nuevas y alternativas se vuelve fundamental. Durante la última década, los científicos han utilizado ampliamente la vía celular de RNA de interferencia (iRNA) para atacar genes de interés y restringir su expresión (Haasnoot J, Berkhout B, 2009; Leonard & Schaffer, 2006). La tecnología de siRNA se ha explorado para silenciar genes que causan enfermedades y para estudios funcionales (Monga, Qureshi, Thakur, Gupta, & Kumar, 2017; Thakur, Qureshi, & Kumar, 2017). Además, esta estrategia puede dirigirse a virus, ya que incluso un genoma vírico diminuto puede proporcionar varias secuencias blanco potenciales. Por ejemplo, siRNAs dirigidos contra diferentes genes de virus mortales como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus influenza (INFLUENZA) (Singh, 2008; Rossi et al., 2006), virus de la hepatitis B (HBV), coronavirus (Konishi, Wu, & Wu, 2003) SARS (SARS-CoV), (Meng, Lui, Meng, Cao, & Hu, 2006; Shi et al., 2005) el virus del papiloma humano (HPV) (Bousarghin et al., 2009) y el virus del Nilo Occidental (ONV) (Kumar, Sang, Shankar, & Manjunath, 2006) en células infectadas mostraron resultados alentadores en la inhibición de la replicación viral y algunos de ellos se encuentran en ensayos clínicos, (Shah & Schaffer,

2011). Así, los siRNAs surgieron como una herramienta modular y adaptable para tratar infecciones de diferentes familias virales, debiéndose ajustar sus aplicaciones terapéuticas y consideraciones de diseño y entrega. En nuestros resultados encontramos un promisorio blanco antiviral potencialmente utilizable para combatir infecciones por arenavirus patógenos humanos. En este caso, la técnica de siRNA proporcionó una herramienta de estudio a fin de verificar el rol de la enzima IMPDHA en la replicación de JUNV. Lejos estamos de proponer el uso de esta mezcla de siRNAs como método terapéutico ya que los resultados obtenidos son muy preliminares y los niveles de inhibición muy bajos. Como herramienta de estudio, la técnica permitió determinar que la actividad de IMPDH es importante para la replicación de JUNV, a nivel de la biodisponibilidad de precursores o materia prima necesaria para la síntesis de sus macromoléculas.

## 7. Conclusiones

- ❖ El stock viral de JUNV generado fue sensible a los inhibidores farmacológicos de la enzima IMPDH RIB y MPA, y mostró niveles similares de inhibición a los descritos en la bibliografía en dosis no citotóxicas.
- ❖ La transfección de siRNAs contra IMPDH no produjo un silenciamiento génico significativo en la línea celular A549, lo cual se vio reflejado en los niveles de expresión de la proteína.
- ❖ La transfección de siRNAs contra IMPDH produjo un silenciamiento génico significativo en la línea celular Vero, pero no se vio reflejado en los niveles de expresión de la proteína.
- ❖ La transfección de siRNA contra IMPDH en ambas líneas celulares no produjo efectos sobre los niveles de infección de JUNV.
- ❖ La transfección de shRNAs contra IMPDH produjo un silenciamiento génico significativo en ambas líneas celulares, lo cual se vio reflejado sendos descensos de niveles de expresión de la proteína.
- ❖ La transfección de shRNAs contra IMPDH produjo inhibición de la replicación de JUNV, en cuanto la síntesis de sus macromoléculas y a la producción de virus infectivo en ambas líneas celulares.
- ❖ La administración de exceso de guanosina en forma exógena, revirtió los efectos inhibitorios sobre la replicación de JUNV.

## 8. Bibliografía

- A. Ansari, A. J. (2013). Viral Hemorrhagic Fevers. *CDC Fact Sheet*, 5, 1–3.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05106.x>
- Abraham, J., Kwong, J. A., Albarino, C. G., Lu, J. G., Radoshitzky, S. R., Salazar-Bravo, J., ... Choe, H. (2009). Host-Species transferrin receptor 1 orthologs are cellular receptors for nonpathogenic new world clade B arenaviruses. *PLoS Pathogens*, 5(4), 17–19.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000358>
- Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M. Q., Harrach, B., Harrison, R. L., Knowles, N. J., ... Davison, A. J. (2012). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016). *Archives of Virology*, 161(10), 2921–2949.  
<https://doi.org/10.1007/s00705-016-2977-6>
- Amanat, F., Duehr, J., Oestereich, L., Hastie, K. M., Saphire, E. O., & Krammer, F. (2018). Antibodies to the Glycoprotein GP2 Subunit Cross-React between Old and New World Arenaviruses. *mSphere*, 3(3), e00189-18.
- Amarzguioui, M., & Prydz, H. (2004). An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316(4), 1050–1058.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.157>
- Andrei G, De Clercq E (1990). Inhibitory effect of selected antiviral compounds on arenavirus replication in vitro. *Antiviral Res* 14:287-300.
- Andrei G, De Clercq E (1993). Molecular approaches for the treatment of hemorrhagic fever virus infections. *Antiviral Res* 22:45-75.
- Aravin, A. A., Hannon, G. J., & Brennecke, J. (2007). The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science*, 318(5851), 761–764.  
<https://doi.org/10.1126/science.1146484>
- Artuso MC, Ellenberg PC, Scolaro LA, Damonte EB, García CC (2009). Inhibition of Junín virus replication by small interfering RNAs. *Antiviral Res* 84:31-37.
- Auperin, D., Compans, R., & Bishop, D. (1982). Nucleotide sequence conservation at the 3' termini of the virion RNA species of New World and Old World arenaviruses. *Virology*, 203, 200–203.  
[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(82\)90130-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(82)90130-1)
- Auperin, D. D., Galinski, M., & Bishop, D. H. L. (1984). The sequences of the N protein gene and intergenic region of the S RNA of pichinde arenavirus. *Virology*, 134(1), 208–219.  
[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90286-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90286-1)
- Bacus, S. S., Kiguchi, K., Chin, D., King, C. R., & Huberman, E. (1990). Differentiation of cultured human breast cancer cells (AU-565 and MCF-7) associated with loss of cell surface HER-2/neu antigen. *Molecular Carcinogenesis*, 3, 350–362.
- Bartolotta S, García CC, Candurra NA, Damonte EB (2001). Effect of fatty acids on arenavirus replication: inhibition of virus production by lauric acid. *Arch Virol* 146(4):777-90.
- Barton, G. M., Medzhitov, R., Barton, G. M., & Medzhitov, R. (2002). Linked references are available on JSTOR for this article : Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells, 99(23), 14943–14945.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for bidentate ribonuclease in the initiation site of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363–366.  
<https://doi.org/10.1038/35053110>
- Beyer WR, Popplau D, Garten W, von Laer D, Lenz O (2003). Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J Virol* 77:2866-

2872.

- Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Müller, U., & Filipowicz, W. (2001). Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), 14428–14433. <https://doi.org/10.1073/pnas.261562698>
- Bodewes, R., Kik, M. J. L., Stalin Raj, V., Schapendonk, C. M. E., Haagmans, B. L., Smits, S. L., & Osterhaus, A. D. M. E. (2013). Detection of novel divergent arenaviruses in boid snakes with inclusion body disease in The Netherlands. *Journal of General Virology*, 94(PART 6), 1206–1210. <https://doi.org/10.1099/vir.0.051995-0>
- Bolken TC, Laquerre S, Zhang Y, Bailey TR, Pevear DC, Kickner SS, Sperzel LE, Jones KF, Warren TK, Amanda Lund S, Kirkwood-Watts DL, King DS, Shurtleff AC, Guttieri MC, Deng Y, Bleam M, Hruby DE (2006). Identification and characterization of potent small molecule inhibitor of hemorrhagic fever New World arenavirus. *Antiviral Res* 69:86-97.
- Bossi P, Van Loock F, Tegnell A, Gouvras G; Task Force on Biological and Chemical Agent Threats, Public Health Directorate, European Commission, Luxembourg (2004). Bichat guidelines for the clinical management of haemorrhagic fever viruses and bioterrorism-related haemorrhagic fever viruses. *Eur Surveill*9(12):E11-E12.
- Bousarghin, L., Touze, A., Gaud, G., Iochmann, S., Alvarez, E., Reverdiau, P., ... Coursaget, P. L. (2009). Inhibition of cervical cancer cell growth by human papillomavirus virus-like particles packaged with human papillomavirus oncoprotein short hairpin RNAs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(2), 357–365. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0626>
- Bowick, G. C., Fennewald, S. M., Elsom, B. L., Aronson, J. F., Luxon, B. A., Gorenstein, D. G., & Herzog, N. K. (2006). Differential Signaling Networks Induced by Mild and Lethal Hemorrhagic Fever Virus Infections. *Journal of Virology*, 80(20), 10248–10252. <https://doi.org/10.1128/JVI.01384-06>
- Bowick, G. C., Fennewald, S. M., Scott, E. P., Zhang, L., Elsom, B. L., Aronson, J. F., ... Herzog, N. K. (2007). Identification of Differentially Activated Cell-Signaling Networks Associated with Pichinde Virus Pathogenesis by Using Systems Kinomics. *Journal of Virology*, 81(4), 1923–1933. <https://doi.org/10.1128/JVI.02199-06>
- Bredenbeek PJ, Molenkamp R, Spaan WJ, Deubel V, Marianneau P, Salvato MS, Moshkoff D, Zapata J, Tikhonov I, Patterson J, Carrion R, Ticer A, Brasky K, Lukashevich IS (2006). A recombinant yellow fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *Virology* 345(2):299-304.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 2002;296: 550-553. <https://doi.org/10.1126/science.1068999>
- Capul AA, Perez M, Burke E, Kunz Z, Buchmeier MJ, de la Torre JC (2007). Arenavirus Z-glycoprotein association requires Z myristoylation but not functional RING or late domains. *J Virol* 81:9451-9460.
- Carr, S. F., Papp, E., Wu, J. C., & Natsumeda, Y. (1993). Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(36), 27286–27290.
- Cashman KA, Smith MA, Twenhafel NA, Larson RA, Jones KF, Allen RD 3rd, Dai D, Chinsangaram J, Bolken TC, Hruby DE, Amberg SM, Hensley LE, Guttieri MC (2011). Evaluation of Lassa antiviral compound ST-193 in a guinea pig model. *Antiviral Res* 90(1):70-9.
- Castilla V, Mersich SE, Candurra NA, Damonte EB (1994). The entry of Junin virus into Vero cells. *Arch Virol* 136:363-374.
- Charrel, R. N., & Lamballerie, X. De. (2003). Arenaviruses other than Lassa virus, 57 S, 89–100.

- Coley, W., Kehn-Hall, K., Duyne, R. Van, & Kashanchi, F. (2009). Novel HIV-1 therapeutics through targeting altered host cell pathways. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(11), 1369–1382. <https://doi.org/10.1517/14712590903257781>
- Collart, F. R., Henning-chubb, C., & Huberman, E. (1990). \_ I, 53, 47–53.
- Collart, F. R., & Huberman, E. (1988). Cloning and Sequence Analysis of the Human and Chinese Hamster, 263(30), 15769–15772.
- Collart, F. R., & Huberman, E. (1990). Expression of IMP dehydrogenase in differentiating HL-60 cells. *Blood*, 75(3), 570–576.
- Cordo SM, Candurra NA, Damonte EB (1999). Myristic acid analogs are inhibitors of Junin virus replication. *Microbes Infect.* 1(8):609-14.
- Crotty, S., Cameron, C. E., & Andino, R. (2001). RNA virus error catastrophe : Direct molecular test by using ribavirin, 98(12).
- Crowcroft NS (2002). Management of Lassa fever in European countries. *Eur Surveill* 7(1)50-52.
- Cuny, G. D., Suebsuwong, C., & Ray, S. S. (2017). Inosine-5 ' -monophosphate dehydrogenase ( IMPDH ) inhibitors : a patent and scientific literature review ( 2002-2016 ). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 0(0). <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1280463>
- Dave RS, McGettigan JP, Qureshi T, Schnell MJ, Nunnari G, Pomerantz RJ. siRNA targeting vaccinia virus double-stranded RNA binding protein [E3L] exerts potent antiviral effects. *Virology*. 2006; 348:489-497. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.01.013>
- Damonte, E. B., & Coto, C. E. (2002). Treatment of arenavirus infections: from basic studies to the challenge of antiviral therapy. *Advances in virus research*, 58, 125-156.
- De Clercq E, Cools M, Balzarini J, Snoeck R, Andrei G, Hosoya M, Shigeta S, Ueda T, Minakawa N, Matsuda A (1991). Antiviral activities of 5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide and related compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 35(4):679-84
- De La Torre JC (2005). Arenavirus extinction through lethal mutagenesis. *Virus Res* 107,207-14.
- Devroe, E., & Silver, P. A. (2002). Retrovirus-delivered siRNA. *BMC biotechnology*, 2(1), 15.
- Di Simone C, Zandonatti MA, Buchmeier MJ (1994). Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike. *Virology* 198:455-465.
- Djavani, M., Crasta, O. R., Zhang, Y., Zapata, J. C., Sobral, B., Lechner, M. G., ... Salvato, M. S. (2009). Gene expression in primate liver during viral hemorrhagic fever. *Virology Journal*, 6, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-20>
- Duffy, S., Shackelton, L. A., & Holmes, E. C. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: Patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics*, 9(4), 267–276. <https://doi.org/10.1038/nrg2323>
- Ecker, J. R., & Davis, R. W. (1986). Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(August), 5372–5376. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.15.5372>
- Eichler, R., Strecker, T., Kolesnikova, L., Ter Meulen, J., Weissenhorn, W., Becker, S., ... Lenz, O. (2004). Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: Electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP). *Virus Research*, 100(2), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.11.017>

- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21 ± nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836), 494–498. <https://doi.org/10.1038/35078107>
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Development*, 15(2), 188–200. <https://doi.org/10.1101/gad.862301>
- Enría DA & Maiztegui JI (1994). Antiviral treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 23:23-31. Enría, D. A., & Oro, J. B. (2002). Junin virus vaccines. In *Arenaviruses II* (pp. 239-261). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Enría DA, Briggiler AM, Sánchez Z (2008). Treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 78:132-139.
- Eriksson, B., Helgstrand, E., Johansson, N. G., Larsson, A., Misiorny, A., Norén, J. O., ... Oberg, B. (1977). Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11(6), 946–951. <https://doi.org/10.1128/AAC.11.6.946>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Fisher-Hoch SP, Gborie S, Parker L, Huggins J (1992). Unexpected adverse reactions during a clinical trial in rural West Africa. *Antiviral Res* 19:139-147.
- Fleming, M. A., Chambers, S. P., Connelly, P. R., Nimmegern, E., Fox, T., Bruzzese, F. J., ... Thomson, J. A. (1996). Inhibition of IMPDH by mycophenolic acid: Dissection of forward and reverse pathways using capillary electrophoresis. *Biochemistry*, 35(22), 6990–6997. <https://doi.org/10.1021/bi9607416>
- Floryk, D., & Huberman, E. (2006). Mycophenolic acid-induced replication arrest, differentiation markers and cell death of androgen-independent prostate cancer cells DU145. *Cancer Letters*, 231(1), 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.01.006>
- Floryk, D., Tollaksen, S. L., Giometti, C. S., & Huberman, E. (2004). Differentiation of human prostate cancer PC-3 cells induced by inhibitors of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. *Cancer Research*, 64(24), 9049–9056. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1553>
- Friedel, C. C., & Haas, J. (2011). Virus-host interactomes and global models of virus-infected cells. *Trends in Microbiology*, 19(10), 501–508. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.07.003>
- Furuta Y, Takahashi K, Shiraki K, Sakamoto K, Smee DF, Barnard DL, Gowen BB, Julander JG, Morrey JD (2009). T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res* 82:95-102.
- García CC, Djavani M, Topisirovic I, Borden KLB, Salvato MS, Damonte EB (2006). Arenavirus Z protein as an antiviral target: virus inactivation and protein oligomerization by zinc finger-reactive compounds. *J Gen Virol* 87:1217–1228.
- García CC, Sepúlveda CS, Damonte EB (2011). Novel therapeutic targets for arenavirus hemorrhagic fevers. *Future Virology* 6(1) 27-44.
- Ge, Q., McManus, M. T., Nguyen, T., Shen, C.-H., Sharp, P. A., Eisen, H. N., & Chen, J. (2003). RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2718–2723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437841100>
- Geisbert, T. W., & Jahrling, P. B. (2004). Exotic emerging viral diseases: Progress and challenges. *Nature Medicine*, 10(12S), S110–S121. <https://doi.org/10.1038/nm1142>

- Geisbert, T. W., Jones, S., Fritz, E. A., Shurtleff, A. C., Geisbert, J. B., Liebscher, R., ... & Guttieri, M. C. (2005). Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever. *PLoS medicine*, 2(6), e183.
- Glesne, D. A., Collart, F. R., & Huberman, E. (1991). Regulation of IMP dehydrogenase gene expression by its end products, guanine nucleotides. *Molecular and Cellular Biology*, 11(11), 5417–5425. <https://doi.org/10.1128/MCB.11.11.5417>. Updated
- Glesne, D., Collart, F., Varkony, T., Drabkin, H., & Huberman, E. (1993). Chromosomal localization and structure of the human type II IMP dehydrogenase gene (IMPDH2). *Genomics*. <https://doi.org/10.1006/geno.1993.1177>
- Goswami BB, Borek E, Sharma OK, Fujitaki J, Smith RA (1979). The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits capping of mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 89:830–836.
- Gowen BB, Wong MH, Larson D, Ye W, Jung KH, Sefing EJ, Skirpstunas R, Smee DF, Morrey JD, Schneller SW (2010). Development of a new Tacaribe arenavirus infection model and its use to explore antiviral activity of a novel aristeromycin analog. *PLoS One* 16;5(9) pii: e12760
- Graci JD & Cameron CE (2006). Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev Med Virol* 16:37-48.
- Grard, G., Fair, J. N., Lee, D., Slikas, E., Steffen, I., Muyembe, J., ... Leroy, E. M. (2012). A Novel Rhabdovirus Associated with Acute Hemorrhagic Fever in Central Africa, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002924>
- Gregory D., Teng, Xin, Yuan, Junying, Degterev, Alexei, Porco Jr., John A. (2016) HETEROCYCLIC INHIBITORS OF NECROPTOSIS United States President and Fellows of Harvard College, Tufts University, The Brigham and Women's Hospital, Inc., Trustees of Boston University 20160102053
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., ... Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106(1), 23–34. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00431-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00431-7)
- Gu, J. J., Sychala, J., & Mitchell, B. S. (1997). Regulation of the human inosine monophosphate dehydrogenase type I gene. Utilization of alternative promoters. *Journal of Biological Chemistry*, 272(7), 4458–4666. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.7.4458>
- Guillerm G, Guillerm D, Vandenplas-Vitkowski C, Glapski C, De Clercq E (2003). Inactivation of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase with novel 5'- thioadenosine derivatives. Antiviral effects. *Bioorg Med Chem Lett* 13(10):1649-52.
- Haasnoot J, Berkhout B. Nucleic acids-based therapeutics in the battle against pathogenic viruses. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;243-263. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-79086-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-540-79086-0_9)
- Hager, P. W., Collart, F. R., Huberman, E., & Mitchell, B. S. (1995). Recombinant human inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II proteins: purification and characterization of inhibitor binding. *Biochemical pharmacology*, 49(9), 1323-1329.
- Hannon, G. J., & Rossi, J. J. (2004). Unlocking the potential of the human genome with RNA interference, 431(September).
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404(6775), 293–296. <https://doi.org/10.1038/35005107>
- Harnish, D. G., & Rawls, W. E. (1993). Arenavirus Replication Molecular Dissection of the Role of

- Viral Protein and RNA, 157–158.
- Haas WH, Breuer T, Pfaff G, Schmitz H, Köhler P, Asper M, Emmerich P, Drosten C, Gölnitz U, Fleischer K, Günther S (2003). Imported Lassa fever in Germany: surveillance and management of contact persons. *Clin Infect Dis* 36(10):1254-1258.
- Hass, M., Westerkofsky, M., Muller, S., Becker-Ziaja, B., Busch, C., & Gunther, S. (2006). Mutational Analysis of the Lassa Virus Promoter. *Journal of Virology*, 80(24), 12414–12419. <https://doi.org/10.1128/JVI.01374-06>
- He Y, Jiang Y, Wang G, et al. Inhibition of HBV-DNA replication and expression by siRNA based on magnetic nanoparticles transferring in HepG2 2.2.15 cells. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2010;35:543-548. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-7347.2010.06.002>
- Hedstrom, L. (2009). IMP dehydrogenase: Structure, mechanism, and inhibition. *Chemical Reviews*, 109(7), 2903–2928. <https://doi.org/10.1021/cr900021w>
- Henrik Martens,\* Jindrich Novotny,\* Jürgen Oberstrass, T. L. S., & Pamela Postlethwait, and W. N. (2002). RNAi in Dictyostelium: The Role of RNA-directed RNA Polymerases and Double-stranded RNase Henrik. *Molecular Biology of the Cell*, 13(6), 2170–2179. <https://doi.org/10.1091/mbc.01>
- Herrera-Carrillo, E., Liu, Y. P., & Berkhout, B. (2017). Improving miRNA delivery by optimizing miRNA expression cassettes; in viral vectors. *Human Gene Therapy Methods*, hgtb.2017.036. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2017.036>
- Hepojoki, J., Salmenperä, P., Sironen, T., Hetzel, U., Korzyukov, Y., Kipar, A., & Vapalahti, O. (2015). Arenavirus Coinfections Are Common in Snakes with Boid Inclusion Body Disease. *Journal of Virology*, 89(16), 8657–8660. <https://doi.org/10.1128/JVI.01112-15>
- Hetzel, U., Sironen, T., Laurinmaki, P., Liljeroos, L., Patjas, A., Henttonen, H., ... Hepojoki, J. (2013). Isolation, Identification, and Characterization of Novel Arenaviruses, the Etiological Agents of Boid Inclusion Body Disease. *Journal of Virology*, 87(20), 10918–10935. <https://doi.org/10.1128/JVI.01123-13>
- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., ... Hartmann, G. (2005). Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nature Medicine*, 11(3), 263–270. <https://doi.org/10.1038/nm1191>
- Huesken, D., Lange, J., Mickanin, C., Weiler, J., Asselbergs, F., Warner, J., ... Hall, J. (2005). Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. *Nature Biotechnology*, 23(8), 995–1001. <https://doi.org/10.1038/nbt1118>
- J.J Gu et al. (1994). Assignment of the Human type I IMP Dehydrogenase Gene to chromosome 7q31.3-q32.
- Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., ... Linsley, P. S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology*, 21(6), 635–637. <https://doi.org/10.1038/nbt831>
- Jackson, R. C., Weber, G., & Morris, H. P. (1975). IMP dehydrogenase, an enzyme linked with proliferation and malignancy. *Nature*, 256(5515), 331–333. <https://doi.org/10.1038/256331a0>
- Jain, J., Almquist, S. J., Ford, P. J., Shlyakhter, D., Wang, Y., Nimmegern, E., & Germann, U. A. (2004). Regulation of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II isoforms in human lymphocytes. *Biochemical Pharmacology*, 67(4), 767–776. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.09.043>

- Ji, Y., Gu, J., Makhov, A. M., Griffith, J. D., & Mitchell, B. S. (2006). Regulation of the interaction of inosine monophosphate dehydrogenase with mycophenolic acid by GTP. *Journal of Biological Chemistry*, 281(1), 206–212. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507056200>
- Judge, A. D., Sood, V., Shaw, J. R., Fang, D., McClintock, K., & MacLachlan, I. (2005). Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nature Biotechnology*, 23(4), 457–462. <https://doi.org/10.1038/nbt1081>
- Kawasaki H, Taira K. MicroRNA-196 inhibits HOXB8 expression in myeloid differentiation of HL60 cells. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. 2004; 211-212. <https://doi.org/10.1093/nass/48.1.211>
- Ketting, R. F., Fischer, S. E. J., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J., & Plasterk, R. H. A. (2001). C. elegans. *Genes & Development*, (516), 2654–2659. <https://doi.org/10.1101/gad.927801.2654>
- Khattab, M. A. (2009). Targeting host factors: A novel rationale for the management of hepatitis C virus. *World Journal of Gastroenterology*, 15(28), 3472–3479. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.3472>
- Kiguchi K, Collart FR, Henning-Chubb C, Huberman E. *Cell Growth Differ* 1990;1:259. [PubMed: 1980599]
- Kim CW, Chang KM. Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clin Mol Hepatol*. 2013; 19: 17-25. <https://doi.org/10.3350/cmh.2013.19.1.17>
- Kitchin JE, Pomeranz MK, Pak G, Washenik K, Shupack JL (1997). Rediscovering mycophenolic acid: a review of its mechanism, side effects, and potential uses. *J Am Acad Dermatol* 37: 445–449.
- Knight, S. W., & Bass, B. L. (2001). A Role for the RNase III Enzyme DCR-1 in RNA Interference and Germ Line Development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 293(5538), 2269–2271. <https://doi.org/10.1126/science.1062039>
- Konishi, M., Wu, C. H., & Wu, G. Y. (2003). Inhibition of HBV replication by siRNA in a stable HBV-producing cell line. *Hepatology*, 38(4), 842–850. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50416>
- Konno, Y., Natsumeda, Y., Nagai, M., Yamaji, Y., Ohno, S., Suzuki, K., & Weber, G. (1991). Expression of human IMP dehydrogenase types I and II in Escherichia coli and distribution in human normal lymphocytes and leukemic cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, 266(1), 506–509.
- Kranzusch, P. J., & Whelan, S. P. J. (2011). Arenavirus Z protein controls viral RNA synthesis by locking a polymerase-promoter complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), 19743–19748. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112742108>
- Kranzusch, P. J., & Whelan, S. P. J. (2012). Architecture and regulation of negative-strand viral enzymatic machinery. *RNA Biology*, 9(7), 941–948. <https://doi.org/10.4161/rna.20345>
- Krumm, S. A., Ndungu, J. M., Yoon, J. J., Dochow, M., Sun, A., Natchus, M., ... Plemper, R. K. (2011). Potent host-directed small-molecule inhibitors of myxovirus rna-dependent rna-polymerases. *PLoS ONE*, 6(5), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020069>
- Kumar, P., Sang, K. L., Shankar, P., & Manjunath, N. (2006). A single siRNA suppresses fatal encephalitis induced by two different flaviviruses. *PLoS Medicine*, 3(4), 505–514. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030096>
- Kunz, S., Edelmann, K. H., de la Torre, J. C., Gorney, R., & Oldstone, M. B. A. (2003). Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions. *Virology*, 314(1), 168–178. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00421-5](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00421-5)
- Laguens, M., Chamb, J.G. & Laguens, R.P. (1983). In Vivo Replication of Pathogenic and Attenuated

- Strains of Junin Virus in Different Cell Populations of Lymphatic Tissue. *Infection and immunity*, 41 (3), 1279-1283.
- Larson RA, Dai D, Hosack VT, Tan Y, Bolken TC, Hruby DE, Amberg SM (2008). Identification of a broad-spectrum arenavirus entry inhibitor. *J Virol* 82:10768-10775.
- Lau, N. C. (2010). Small RNAs in the animal gonad: Guarding genomes and guiding development. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(8), 1334–1347. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.03.005>
- Lee AM, Rojek JM, Spiropoulou CF, Gundersen AT, Jin W, Shaginian A, York J, Nunberg JH, Boger DL, Oldstone MB, Kunz S (2008a). Unique small molecule entry inhibitors of hemorrhagic fever arenaviruses. *J Biol Chem* 283:18734-18742.
- Leonard, J. N., & Schaffer, D. V. (2006). Antiviral RNAi therapy: Emerging approaches for hitting a moving target. *Gene Therapy*, 13(6), 532–540. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302645>
- Leyssen P, Balzarini J, De Clercq E, Neyts J (2005). The predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral activity in vitro against flaviviruses and paramyxoviruses is mediated by inhibition of IMP dehydrogenase. *J Virol* 79(3):1943-1947
- Lu, Z. (2004). *nd es Bio t D ist r La nd es Bio sci en No t D ist r ibu te*, (May), 571–573.
- Lukashevich, I., & Salvato, M. (2006). Lassa Virus Genome. *Current Genomics*, 7(6), 351–379. <https://doi.org/10.2174/138920206778948673>
- Lukashevich IS, Carrion R Jr, Salvato MS, Mansfield K, Brasky K, Zapata J, Cairo C, Goicochea M, Hoosien GE, Ticer A, Bryant J, Davis H, Hammamieh R, Mayda M, Jett M, Patterson J (2008). Safety, immunogenicity, and efficacy of the ML29 reassortant vaccine for Lassa fever in small non-human primates. *Vaccine* 26(41):5246-5254.
- Maes, P., Alkhovsky, S. V., Bào, Y., Beer, M., Birkhead, M., Briese, T. Kuhn, J. H. (2018). Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. *Archives of Virology*, (0123456789), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3843-5>
- Maisa A, Ströher U, Klenk HD, Garten W, Strecker T. Source (2009). Inhibition of Lassa virus glycoprotein cleavage and multicycle replication by site 1 proteaseadapted alpha(1)-antitrypsin variants. *PLoS Negl Trop Dis*. 3(6):e446.
- Maiztegui, J. I., Laguens, R. P., Cossio, P. M., Casanova, M. B., de la Vega, M. T., Ritacco, V., ... Arana, R. M. (1975). Ultrastructural and immunohistochemical studies in five cases of Argentine hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases*, 132(1), 35–43. <https://doi.org/10.1093/infdis/132.1.35>
- Maiztegui, J. I., McKee Jr, K. T., Oro, J. G. B., Harrison, L. H., Gibbs, P. H., Feuillade, M. R., ... & Halsey, N. A. (1998). Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases*, 177(2), 277-283.
- Manche, L., Green, S. R., Schmedt, C., & Mathews, M. B. (1992). Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Molecular and Cellular Biology*, 12(11), 5238–5248. <https://doi.org/10.1128/MCB.12.11.5238>
- Markland, W., Jain, J., & Kwong, A. D. (2000). Broad-Spectrum Antiviral Activity of the IMP Dehydrogenase Inhibitor VX-497 : a Comparison with Ribavirin and Demonstration of Antiviral Additivity with Alpha Interferon, 44(4), 859–866.
- Martinez-Sobrido, L., & de la Torre, J. C. (2016). Novel strategies for development of hemorrhagic fever arenavirus live-attenuated vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 15(9), 1113–1121. <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1182024>

- McCormick JB, Fisher-Hoch SP (2002) Lassa fever. *Curr. Top. Microbiol Immunol* 262:75-109
- McCormick JB, King IJ, Webb PA, Scribner CL, Craven RB, Johnson KM, Elliott LH, Belmont-Williams R (1986). Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N. Engl. J. Med.* 314(1):20-26.
- Megan L. Shaw. (2011). The host interactome of influenza virus presents new potential targets for antiviral drugs. *Reviews in Medical Virology*, 25(1), 2–23. <https://doi.org/10.1002/rmv>
- Mendenhall M, Russell A, Juelich T, Messina EL, Smee DF, Freiberg AN, Holbrook MR, Furuta Y, de la Torre JC, Nunberg JH, Gowen BB (2010). T-705 (favipiravir) inhibition of arenavirus replication in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(2):782-787.
- Mendenhall M, Russell A, Smee DF, Hall JO, Skirpstunas R, Furuta Y, Gowen BB (2011). Effective oral favipiravir (T-705) therapy initiated after the onset of clinical disease in a model of arenavirus hemorrhagic fever. *PLoS Negl Trop Dis* 5(10):e1342.
- Meng, B., Lui, Y. W., Meng, S., Cao, C., & Hu, Y. (2006). Identification of effective siRNA blocking the expression of SARS viral envelope E and RDRP genes. *Molecular Biotechnology*, 33(2), 141–148. <https://doi.org/10.1385/MB:33:2:141>
- Messina, E., Gazzaniga, P., Micheli, V., Barile, L., Lupi, F., Aglianò, A. M., & Giacomello, A. (2004). Low levels of mycophenolic acid induce differentiation of human neuroblastoma cell lines. *International Journal of Cancer*, 112(2), 352–354. <https://doi.org/10.1002/ijc.20425>
- Messina, E., Micheli, V., & Giacomello, A. (2005). Guanine nucleotide depletion induces differentiation and aberrant neurite outgrowth in human dopaminergic neuroblastoma lines: A model for basal ganglia dysfunction in Lesch-Nyhan disease. *Neuroscience Letters*, 375(2), 97–100. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.10.076>
- Meyer BJ, de la Torre JC & Southern PJ. (2002). Arenaviruses: Genomic RNAs, Transcription and Replication. In: Arenaviruses I. The Epidemiology, Molecular and Cell Biology of Arenaviruses. Editado por MBA Oldstone, Springer-Verlag Berlin Heidelberg , pp139-157
- Meyer, Barbara J. ; Southern, Peter J. Concurrent sequence analysis of 5' and 3' RNA termini by intramolecular circularization reveals 5' nontemplated bases and 3' terminal heterogeneity for lymphocytic choriomeningitis virus mRNAs. In: *Journal of Virology*. 1993 ; Vol. 67, No. 5. pp. 2621-2627
- Mills, J.N., Ellis, B.A., McKee, K.T. Jr, Ksiazek, T.G., Oro, J.G., Maiztegui, J.I., Calderon, G.E., Peters, C.J. & Childs, J.E. (1991). Junin virus activity in rodents from endemic and nonendemic loci in central Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 44(6):589-597
- Minakawa, N., Takeda, T., Sasaki, T., Matsuda, A., & Ueda, T. (1991). Nucleosides and nucleotides. 96. Synthesis and antitumor activity of 5-ethynyl-1-β-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 34(2), 778–786. <https://doi.org/10.1021/jm00106a045>
- Mitchell, B. S., Hager, P. W., & Ki, I. (1995). DEHYDROGENASE TYPE I AND TYPE II PROTEINS PURIFICATION OF INHIBITOR BINDING [ Et1. *Science*, 49(9), 1323–1329.
- Monga, I., Qureshi, A., Thakur, N., Gupta, A. K., & Kumar, M. (2017). ASPsiRNA: A Resource of ASP-siRNAs Having Therapeutic Potential for Human Genetic Disorders and Algorithm for Prediction of Their Inhibitory Efficacy. *G3 & Genes/Genomes/Genetics*, 7(September), g3.117.044024. <https://doi.org/10.1534/g3.117.044024>
- Moreno H, Gallego I, Sevilla N, de la Torre JC, Domingo E, Martín V (2011). Ribavirin can be mutagenic for arenaviruses. *J Virol* 85(14):7246-55.
- Müller, S., Geffers, R., & Günther, S. (2007). Analysis of gene expression in Lassa virus-infected

- HuH-7 cells. *Journal of General Virology*, 88(5), 1568–1575.  
<https://doi.org/10.1099/vir.0.82529-0>
- Nagai, M., Natsumeda, Y., Konno, Y., Nagai, M., Hoffman, R., Irino, S., & Weber, G. (1991). Selective Up-Regulation of Type II Inosine 5' -Monophosphate Dehydrogenase Messenger RNA Expression in Human Leukemias Selective Up-Regulation of Type II Inosine 5' - Monophosphate Dehydrogenase, (23), 3886–3890.
- Nagai, M., Natsumeda, Y., Weber, G., Lymphocytes, N., & Cells, H.-L. (1992). Proliferation-linked Regulation of Type II IMP Dehydrogenase Gene in Human Normal Lymphocytes and HL-60 Leukemic Cells Proliferation-linked Regulation of Type II IMP Dehydrogenase Gene in Human, 258–261.
- Nair, V., & Shu, Q. (2007). Inosine monophosphate dehydrogenase as a probe in antiviral drug discovery. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 18(5), 245–258.  
<https://doi.org/10.1177/095632020701800501>
- Nakazawa, M., Kadowaki, S. etsu, Watanabe, I., Kadowaki, Y., Takei, M., & Fukuda, H. (2008). PA subunit of RNA polymerase as a promising target for anti-influenza virus agents. *Antiviral Research*, 78(3), 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.12.010>
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R., The, S., Cell, P., Apr, N., & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans Published by : American Society of Plant Biologists ( ASPB )  
Linked references are available on JSTOR for this article :, 2(4), 279–289.
- Natsumeda, Y., Ohno, S., Kawasaki, H., Konno, Y., Weber, G., & Suzuki, K. (1990). Two distinct cDNAs for human IMP dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 265(9), 5292-5295.
- Neuman BW, Bederka LH, Stein DA, Ting JP, Moulton HM, Buchmeier MJ (2011).  
Development of peptide-conjugated morpholino oligomers as pan-arenavirus inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 55(10):4631-8.
- Nykänen, A., Haley, B., & Zamore, P. D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 107(3), 309–321.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00547-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00547-5)
- Ölschläger, S., Neyts, J., & Günther, S. (2011). Depletion of GTP pool is not the predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral effect on Lassa virus. *Antiviral Research*, 91(2), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.05.006>
- Ortiz-Quintero, B. (2009). RNA de interferencia: Origen y aplicaci??n en el silenciamiento de genes. *Revista de Investigacion Clinica*, 61(5), 412–427.
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Sachidanandam, R., & Hannon, G. J. (2004). Short Hairpin Activated Gene Silencing in Mammalian Cells. *RNA Interference, Editing, and Modification*, 265, 85–100.  
<https://doi.org/10.1385/1-59259-775-0:085>
- Paessler, S., & Walker, D. H. (2013). Pathogenesis of the Viral Hemorrhagic Fevers. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 8(1), 411–440. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164041>
- Parodi, A.S., Greenway, D.J., Ruggiero, H.R., Rivero, S., Frigerio, M.J., de la Barrera. M., Mettler, N., Garzón, F., Boxaca, M., Guerrero, L.B. & Nota, N.R. (1958). Sobre la etiología del brote epidémico de Junín. *El Día Médico* 30, 2300-2302.
- Pastorino, B., Nougairède, A., Wurtz, N., Gould, E., & de Lamballerie, X. (2010). Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs.

- Antiviral Research*, 87(3), 281–294. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.04.014>
- Pasquato, A., Rochat, C., Burri, D. J., Pasqual, G., de la Torre, J. C., & Kunz, S. (2012). Evaluation of the anti-arenaviral activity of the subtilisin kexin isozyme-1/site-1 protease inhibitor PF-429242. *Virology*, 423(1), 14-22.
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol.* 2007;17: 118-126. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.12.007>
- Pinschewer, D. D., Perez, M., & de la Torre, J. C. (2003). Role of the virus nucleoprotein in the regulation of lymphocytic choriomeningitis virus transcription and RNA replication. *Journal of Virology*, 77(6), 3882–3887. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.6.3882>
- Pinschewer, D., Perez, M., & De La Torre, J. (2005). Dual Role of the Lymphocytic Choriomeningitis Virus Intergenic Region in Transcription Termination and Virus Propagation. *Jv*, 79(7), 4519–4526. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.7.4519>
- Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Frendewey, D., Samuelsson, B., & Ra, O. (2002). Ribonuclease Activity and Rna Binding of Recombinant Human Dicer.Pdf, 21(21).
- Rossi JJ. RNAi as a treatment for HIV-1 infection. *Biotechniques*. 2006. Suppl: 25-29.
- Radoshitzky, S. R., B??o, Y., Buchmeier, M. J., Charrel, R. N., Clawson, A. N., Clegg, C. S., ... de la Torre, J. C. arlos. (2015). Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Archives of Virology*, 160(7), 1851–1874. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2418-y>
- Raju, R., Raju, L., Hacker, D., Garcin, D., Compans, R., & Kolakofsky, D. (1990). Nontemplated bases at the 5' ends of tacaribe virus mRNAs. *Virology*, 174(1), 53–59. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90053-T](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90053-T)
- Rankin JT, Eppes SB, Antczak JB, Joklik WK (1989). Studies on the mechanism of the antiviral activity of ribavirin against reovirus. *Virology* 168:147–158.
- Reinhart, B. J., & Bartel, D. P. (2002). Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science*, 297(5588), 1831. <https://doi.org/10.1126/science.1077183>
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S., & Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology*, 22(3), 326–330. <https://doi.org/10.1038/nbt936>
- Rojek JM, Pasqual G, Sanchez AB, Nguyen NT, de la Torre JC, Kunz S (2010). Targeting the proteolytic processing of the viral glycoprotein precursor is a promising novel antiviral strategy against arenaviruses. *J Virol* 84(1):573-84.
- Romanowski V, & Bishop DH (1983). The formation of arenaviruses that are genetically diploid. *Virology* 126:87-95.
- Ruiz-Jarabo CM, Ly C, Domingo E, de la Torre JC (2003) Lethal mutagenesis of the prototype arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *Virology* 308:37-47.
- Sabattini, M.S., Gonzalez de Ríos, L., Díaz, G. & Vega, R. (1977). Infección natural y experimental de roedores con virus Junín. *Medicina (Buenos Aires)* 37 (supl3), 149-159.
- Sabbioni S, Callegari E, Spizzo R, et al. Anticancer activity of an adenoviral vector expressing short hairpin RNA against BK virus T-ag. *Cancer Gene Ther.* 2007;14: 297-305. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7701014>
- Salvato, M. S., & 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), 1–10.

- 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 MS, Buchmeier MJ, Charrel RN, Clegg JCS, Gonzalez JP, Lukashevich IS, Peters CJ, Romanowski V (2010). Family Arenaviridae. In: Virus Taxonomy Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus.
- Sanchez A, Pifat DY, Kenyon RH, Peters CJ, McCormick JB, Kiley MP (1989). Junin virus monoclonal antibodies: characterization and cross-reactivity with other arenaviruses. *J Gen Virol* *70*(5):1125-32.
- Sanjuan, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., & Belshaw, R. (2010). Viral Mutation Rates. *Journal of Virology*, *84*(19), 9733–9748. <https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10>
- Sarute, N., & Ross, S. R. (2017). New World arenavirus biology. *Annual review of virology*, *4*, 141–158.
- Saxena, S., Jónsson, Z. O., & Dutta, A. (2003). Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(45), 44312–44319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307089200>
- Schley, D., Whittaker, R. J., & Neuman, B. W. (2013). Arenavirus budding resulting from membrane curvature. *Journal of the Royal Society Interface*, *10*(86).
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Haley, B., & Zamore, P. D. (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways. *Molecular Cell*, *10*(3), 537–548. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00651-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00651-2)
- Senda, M., & Natsumeda, Y. (1994). Tissue-differential expression of two distinct genes for human IMP dehydrogenase (E.C.1.1.1.205). *Life Sciences*, *54*(24), 1917–1926. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)90150-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)90150-3)
- Sepúlveda, C. S., García, C. C., Fascio, M. L., D'Accorso, N. B., Docampo Palacios, M. L., Pellón, R. F., & Damonte, E. B. (2012). Inhibition of Junin virus RNA synthesis by an antiviral acridone derivative. *Antiviral Research*, *93*(1), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.10.007>
- Shabalina, S. A., Spiridonov, A. N., & Ogurtsov, A. Y. (2006). Computational models with thermodynamic and composition features improve siRNA design. *BMC Bioinformatics*, *7*, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-65>
- Shah, P. S., & Schaffer, D. V. (2011). Antiviral RNAi: Translating science towards therapeutic success. *Pharmaceutical Research*, *28*(12), 2966–2982. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0549-8>
- Shi, Y., Yang, D. H., Xiong, J., Jia, J., Huang, B., & Jin, Y. X. (2005). Inhibition of genes expression of SARS coronavirus by syntehtic small interfering RNAs. *Cell. Res.*, *15*(3), 193–200.
- Shigeru Takasaki<sup>1,\*</sup>, Shuji Kotani<sup>1,2,3</sup>, Akihiko Konagaya<sup>1</sup>. (2004). An Effective Method for Selecting siRNA Target Sequences in Mammalian Cells, (May), 571–573.
- Silver, E. D. and P. A. (2002). Retrovirus-delivered siRNA, *5*, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-5-29>
- Singh, S. K. (2008). RNA interference and its therapeutic potential against HIV infection. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *8*(4), 449–461.
- Sintchak, M. D., & Nimmesgern, E. (2000). The structure of inosine 5 X -monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors.

- Smee DF, Gilbert J, Leonhardt JA, Barnett BB, Huggins JH, Sidwell RW (1993). Treatment of lethal Pichinde virus infections in weanling LVG/Lak hamsters with ribavirin, ribamidine, selenazofurin and amplitgen. *Antiviral Res* 20(1):57-70.
- Smee DF, Morris JL, Barnard DL, Van Aerschot A (1992). Selective inhibition of arthropod-borne and arenaviruses in vitro by 3'-fluoro-3'-deoxyadenosine. *Antiviral Res* 18(2):151-62.
- Soares MM, King SW, Thorpe PE (2008). Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases. *Nat Med* 14(12):1357-62.
- Southern PJ, Singh MK, Riviere Y, Jacoby DR, Buchmeier MJ, Oldstone MB (1987). Molecular characterization of the genomic S RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 157:145-55.
- Stenglein, M. D., Leavitt, E. B., Abramovitch, M. A., McGuire, J. A., & DeRisi, J. L. (2014). Genome sequence of a bornavirus recovered from an African garter snake (*Elapsoidea loveridgei*). *Genome announcements*, 2(5), e00779-14.
- Stenglein, M. D., Sanders, C., & Kistler, A. L. (2012). Identification, Characterization, and, 3(4), 1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00180-12>. Editor
- Strecker T, Eichler R, Meulen J, Weissenhorn W, Dieter Klenk H, Garten W, Lenz O (2003). Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles. *J Virol* 77(19):10700-10705.
- Strecker T, Maisa A, Daffis S, Eichler R, Lenz O, Garten W (2006). The role of myristoylation in the membrane association of the Lassa virus matrix protein Z. *Virol J* 3:93.
- Streeter DG, Witkowski JT, Khare GP, Sidwell RW, Bauer RJ, Robins RK, Simon LN (1973). Mechanism of action of 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:1174-1178.
- Tafforeau, L.; Roubourdin-Combe, C.; Lotteau, V. Virus-Human cell interactomes. *Methods Mol. Biol.* 2012, 812, 103–120.
- Thakur, A., Qureshi, A., & Kumar, M. (2017). VhfRNAi: A web-platform for analysis of host genes involved in viral infections discovered by genome wide RNAi screens. *Molecular BioSystems*, 13(7), 1377–1387. <https://doi.org/10.1039/c6mb00841k>
- Thomas, E., Ghany, M. G., & Liang, T. J. (2012). The Application and Mechanism of Action of Ribavirin in Therapy of Hepatitis C. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 23(1), 1–12. <https://doi.org/10.3851/IMP2125>
- Toltzis P, O'Connell K, Patterson JL (1988). Effect of phosphorylated ribavirin on vesicular stomatitis virus transcription. *Antimicrob Agents Chemother* 32:492–497.
- Tortorici, M. A., Albario, C. G., Posik, D. M., Ghiringhelli, P. D., Lozano, M. E., Rivera Pomar, R., & Romanowski, V. (2001). Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity in vivo. *Virus Research*, 73(1), 41–55. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(00\)00222-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00222-7)
- Umejiego, N. N., Li, C., Riera, T., Hedstrom, L., & Striepen, B. (2004). *Cryptosporidium parvum* IMP Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40320–40327. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407121200>
- Urata S, Noda T, Kawaoka Y, Yokosawa H, Yasuda J (2006). Cellular factors required for Lassa virus budding. *J Virol* 80(8):4191-4195.
- Urata, Y., Uesato, R., Tanaka, D., Kowatari, K., Nitobe, T., Nakamura, Y., & Motomura, S. (2011). Prevalence of reactivation of hepatitis B virus replication in rheumatoid arthritis

- patients. *Modern rheumatology*, 21(1), 16-23.
- Van Blokland, R., Van der Geest, N., Mol, J. N. M., & Kooter, J. M. (1994). Transgene mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *The Plant Journal*, 6(6), 861–877. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1994.6060861.x>
- WHO recommended surveillance standards WHO/CDS/CSR/ISR/99.2 <http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/whocdscsr992syn.pdf>. Accessed Aug 2016
- Whitby LR, Lee AM, Kunz S, Oldstone MBA, Boger DL (2009). Characterization of Lassa virus cell entry inhibitors: Determination of the active enantiomer by asymmetric synthesis. *Bioorg Med Chem Lett* 19:3771-3774
- Williams, B. R. G. (1997). Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochemical Society Transactions*, 25(2), 509–513. <https://doi.org/10.1042/bst0250509>
- Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys*. 2013; 42: 217-239. <https://doi.org/10.1146/annurevbiophys-083012-130404>
- Wolf MC, Freiberg AN, Zhang T, Akyol-Ataman Z, Grock A, Hong PW, Li J, Watson NF, Fang AQ, Aguilar HC, Porotto M, Honko AN, Damoiseaux R, Miller JP, Woodson SE, Chantasirivisal S, Fontanes V, Negrete OA, Krogstad P, Dasgupta A, Moscona A, Hensley LE, Whelan SP, Faull KF, Holbrook MR, Jung ME, Lee B (2010). A broad-spectrum antiviral targeting entry of enveloped viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:3157-3162.
- Young, P. R., & Howard, C. R. (1983). Fine structure analysis of Pichinde virus nucleocapsids. *Journal of General Virology*, 64(4), 833–842. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-64-4-833>
- York J, Berry JD, Ströher U, Li Q, Feldmann H, Lu M, Trahey M, Nunberg JH. (2010). An antibody directed against the fusion peptide of Junín virus envelope glycoprotein GPC inhibits pH-induced membrane fusion. *J Virol* 84:6119-6129
- York J & Nunberg JH (2006). Role of the stable signal peptide of Junin arenavirus envelope glycoprotein in pH-dependent membrane fusion. *J Virol* 80:7775-7780.
- York, J., Dai, D., Amberg, S. M., & Nunberg, J. H. (2008). pH-induced activation of arenavirus membrane fusion is antagonized by small-molecule inhibitors. *Journal of virology*, 82(21), 10932-10939.
- York J, Romanowski V, Lu M, Nunberg JH (2004). The signal peptide of the JUNV arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex. *J Virol* 78:10783-10792.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., & Bartel, D. P. (2000). RNAi- Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals, *101*, 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80620-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80620-0)
- Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science*. 2005; 309: 1519-1524. <https://doi.org/10.1126/science.1111444>
- Zimmerman, C., Brduscha-Riem, K., Blaser, C., Zinkernagel, R. M., & Pircher, H. (1996). Visualization, characterization, and turnover of CD8+ memory T cells in virus-infected hosts. *Journal of Experimental Medicine*, 183(4), 1367-1375.
- Zimmermann, A. G., Gu, J. J., Laliberté, J., & Mitchell, B. S. (1998). Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase: regulation of expression and role in cellular proliferation and T lymphocyte activation. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 61, 181–209.