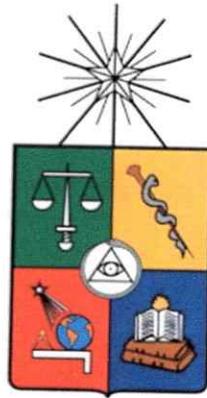


UCH-FC

Doc-Microb

L. 864

C. 1



El SmRNA del Hantavirus Andes codifica para la proteína no estructural NSs; evaluación de su posible rol como antagonista de la vía de IFN-I



Tesis

Entregada a la

Universidad De Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Microbiología

Facultad De Ciencias

Por

Loretto Pilar Solís Mardones

Septiembre, 2015

Director de Tesis Dr: Marcelo López Lastra



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE POSTGRADO



INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

LORETTO PILAR SOLÍS MARDONES

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 4 de mayo del 2015

Director de Tesis

Dr. Marcelo López Lastra

Firma manuscrita de Marcelo López Lastra en tinta negra sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Eugenio Spencer

Firma manuscrita de Eugenio Spencer en tinta negra sobre una línea horizontal.

Dr. Oscar León

Firma manuscrita de Oscar León en tinta negra sobre una línea horizontal.

Dr. Jonás Chnaiderman

Firma manuscrita de Jonás Chnaiderman en tinta azul sobre una línea horizontal.

*"... Porque veo al final de mi rudo camino
que yo fui el arquitecto de mi propio destino
Que si extraje la hiel o la miel de las cosas
es porque en ellas fuse hiel o mieles sabrosas
Cuando planté rosales, siempre coseché rosas..."*

Amado Nervo.



Nací el 20 de septiembre del año 1980 en la ciudad de Coyhaique. Ingresé al colegio Canadá en 1986, donde cursé educación básica y en los últimos años participé activamente en el grupo Scout "Canadá", los que marcaron gran parte de mi gusto por la naturaleza, la amistad y diversos valores a seguir. Posteriormente, realicé la educación media en el liceo Josefina Aguirre Montenegro. En el año 1999 me trasladé a la ciudad de Valdivia para seguir la carrera de Licenciatura en Ciencias en la Universidad Austral de Chile. Una de las mejores decisiones que pude tomar, ya que me abrió las puertas para poder elegir finalmente la mención en microbiología. Durante este tiempo hice grandes amigos y crecí como persona. En 2005 decidí seguir estudios de postgrado con el magister en Ciencias mención Microbiología en la misma facultad de ciencias, una gran oportunidad para realizar investigación junto a un gran grupo de trabajo, con quienes hasta el día de hoy sigo en contacto. El 2009 me trasladé a la ciudad de Santiago para continuar con mi especialización, donde ingresé al doctorado en Microbiología en la Universidad de Chile, buscando profundizar mis conocimientos, ampliar mis capacidades y conocer nuevos grupos de trabajos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi madre, que siempre me ha apoyado en todos los proyectos que he llevado acabo, especialmente cuando tomé la decisión de realizar el doctorado. Su amor incondicional hace que tenga las fuerzas para que continúe día a día, sin dejar de creer que puedo hacer lo que me proponga. Gracias, te amo.

A mi padre, que está siempre conmigo en mi corazón, y me recuerda que debo seguir mis sueños. Te extraño y te amo.

Me gustaría agradecer al Dr. Marcelo López, por darme la posibilidad de trabajar en su laboratorio y por confiar en mí. Especialmente por sus consejos y discusiones que hicieron que creciera en la parte profesional e incluso personal. Muchas gracias.

Agradecer a todos mis compañeros de laboratorio, por su apoyo durante todos estos años y por los diversos momentos lindos que hemos vivido. Hago mención especial a Jenniffer, compañera y amiga, agradecida de conocerte y de haber compartido tantas cosas lindas y que claramente faltan muchas más por vivir. A Karlita, por ser una gran amiga y mujer admirable, agradezco tu apoyo y tú dulzura en los momentos en que muchas veces solo lo necesité. Felipe, por ser un excelente compañero de puesto y por tu paciencia. Fernando, por ser como eres, una persona siempre dispuesta a ayudar, en especial cuando más lo necesité. Estefanía, por el apoyo y por tu gran humor. Joaquín, por estar siempre cuando te necesité. Nataly, por tu apoyo y ayuda cuando lo necesité. Pablo, por los lindos momentos que compartimos, los innumerables consejos que me diste y el mejor regalo que he recibido.

Agradezco a mis amigos de Coyhaique que nunca me han dejado de apoyar y que siempre han creído en mí. Betty, Cristian, Denis, Diego, Ivalú, Caco, Fabiola. A mi gran amigo Franco porque siempre has estado conmigo, en las buenas y en las malas.

FINANCIAMIENTO

Beca de doctorado nacional CONICYT 2009

Beca de Apoyo a la Realización de Tesis Doctoral CONICYT 24121222

Proyecto Instituto Milenio P09/016-F IMII

INDICE DE CONTENIDOS

Índice de contenidos	vii
Índice de figuras	x
Lista de abreviaturas	xii
Resumen	xvi
Abstract	xvii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hantavirus Andes	1
1.2 Partícula viral y organización genómica	2
1.3 Características de las proteínas virales	4
1.4 Ciclo Replicativo	11
1.4.1 Entrada viral	11
1.4.2 Replicación y transcripción	13
1.4.3 Síntesis de proteínas, ensamblaje y salida viral	15
1.5 Sistema inmune innato	16
1.5.1 Modulación del sistema inmune innato por Hantavirus	21
2. MATERIALES Y METODOS	25
2.1 Materiales biológicos	25
2.2 Obtención de los stocks virales	26

2.3 Titulación viral	26
2.4 Infección de células VeroE6 con ANDV	28
2.5 Infección de Hámster Sirio Dorado con ANDV	28
2.6 Anticuerpos	29
2.7 Plásmidos	30
2.8 Inmunofluorescencia	31
2.9 Western Blot.....	33
2.10 Inmunohistoquímica	35
2.11 Inducción con poly(I:C).....	36
2.12 Ensayo de activación de los promotores de INF- β y NF κ B.....	37
2.13 Ensayo de viabilidad celular.....	38
2.14 Detección de RNA de ANDV mediante RT-PCR	38
3. RESULTADOS	40
3.1 Expresión de la proteína NSs -ANDV en el contexto de una infección viral <i>ex vivo</i>	40
3.1.1 Detección de las proteínas N y NSs-ANDV por las técnicas de <i>western blot</i> e inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	40
3.2 Detección <i>ex vivo</i> de la proteína NSs-ANDV durante la infección viral en células VeroE6.....	46
3.3 Detección <i>in vivo</i> de la proteína NSs -ANDV durante la infección viral en Hámster Sirio Dorado	50

3.4 La proteína NSs-ANDV inhibe la activación del promotor de IFN- β	53
3.5 La Infección con ANDV en células VeroE6 no activa IRF-3.....	56
3.6 La infección de ANDV en células VeroE6 no antagoniza la activación de IRF-3	60
3.7 La Infección con ANDV en células VeroE6 antagoniza la activación de NF κ B.....	63
3.8 La proteína NSs-ANDV antagoniza la activación de NF κ B.....	67
3.9 La proteína NSs-ANDV inhibe la activación del promotor de NF κ B	69
4. DISCUSIÓN	71
5. CONCLUSIÓN	77
6. BIBLIOGRAFIA	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de la partícula viral y organización genómica	3
Figura 2. Comparación del SmRNA de TULV y ANDV.	9
Figura 3. Modelo esquemático del mRNA del segmento S del virus Andes.	10
Figura 4. Ciclo Replicativo	12
Figura 5. Replicación y transcripción viral	14
Figura 6. Inducción y vías de señalización de IFN-I	20
Figura 7. Estrategias de los Hantavirus para evadir la respuesta a IFN-I	22
Figura 8. Representación esquemática de los plásmidos utilizados para expresar His-N y His-NSs de ANDV.....	41
Figura 9. Expresión transiente de las proteínas NSs-ANDV y N-ANDV detectadas por <i>Western blot</i>	43
Figura 10. Expresión transiente de las proteínas NSs-ANDV y N-ANDV detectadas por inmunofluorescencia.....	45
Figura 11. Células VeroE6 fueron transfectadas con los plásmidos p-NSs- ANDV, pN-ANDV y pHis-UNR, detectadas por inmunofluorescencia.	48
Figura 12. Detección de la proteína NSs- ANDV en células VeroE6 infectadas.....	49
Figura 13. Detección de la proteína NSs-ANDV en tejido de pulmón de	

Hámster Sirio Dorado	52
Figura 14. La proteína NSs-ANDV inhibe la activación del promotor IFN- β	55
Figura 15. Detección de IRF-3 en células VeroE6.....	58
Figura 16. La infección con ANDV no activa IRF-3	59
Figura 17. Durante la infección con ANDV no se inhibe la translocación de IRF-3.....	62
Figura 18. Detección y activación de NF κ B en células VeroE6.....	64
Figura 19. La infección con ANDV antagoniza la activación de NF κ B.....	66
Figura 20. La proteína NSs- ANDV antagoniza la activación de NF κ B durante la inducción con poly (I:C).....	68
Figura 21. La proteína NSs-ANDV inhibe la activación del promotor NF κ B	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ANDV	: Virus Andes
BSA	: Albumina de suero de bovino
BSL-3	: Laboratorio de bioseguridad tipo 3
cRNA	: RNA complementario
DMEM	: <i>Medio Eagle modificado de Dulbecco</i>
DNA	: Acido desoxirribonucleico
dNTPs	: Desoxinucleótidos 5' trifosfato
DAB:	: Diaminobenzidine
DAPI	: Diamidino-phenylindole
d.p.i	: Días post infección
DTT	: Ditiotreitol
dsRNA	: RNA de doble hebra
EDTA	: Etilen-diamino-tetra-acetato
FLuc	: Luciferasa de luciérnaga
FHSR	: Fiebre hemorrágica con Síndrome renal
GPC	: Precursor de glicoproteína
GTP	: Guanosin trifosfato
HTNV	: Virus Hantaan

HRP	: Peroxidasa de rábano
H ₂ O ₂	: Peróxido de hidrogeno
h.p.t	: Horas post transfección
INFAR	: Receptor asociado a interferón
IAP	: Inhibidor de la apoptosis
ISRE	: Elemento de respuesta a interferón
IFN-I	: Interferón tipo I
ISG15	: Gen 15 estimulado por Interferón
IRF-3	: <i>Interferon regulatory factor 3</i>
IκB	: Inhibidor de κB
IKK	: IκB quinasa
kDa	: Kilo Dalton
KCl	: Cloruro de Potasio
LACV	: Virus La Crosse
Mm	: milímetro
MAVS	: <i>mitochondrial antiviral signalling protein</i>
MOPS	: Ácido Morfolino Propano Sulfónico
mRNA	: RNA mensajero
MgCl ₂	: Cloruro de Magnesio
MDA-5	: Melanoma Differentiation-Associated gene 5
MOI	: Multiplicidad de infección
NCR	: Región no codificante

NLS	: Señal de localización nuclear
NSs	: Proteína no estructural del segmento S
NS1	: Proteína no estructural 1
NK	: <i>Natural killer</i>
NFκB	: <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
OAS	: <i>2'-5'oligoadenylate synthetase</i>
ORF	: Marco abierto de lectura
PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida
PHV	: Virus Prospect Hill
PRD	: Dominio regulador positivo
PKR	: Proteína quinasa dependiente de RNA
pb	: Pares de base
PBS	: Buffer fosfato salino
PDVF	: Polifluoruro de vinilideno
PUUV	: Virus Puumala
RIG-I	: Gen I inducible por ácido retinoico
RT-PCR	: Transcripción inversa- Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	: Ácido ribonucleico
RLA	: Actividad luciferasa relativas
RNAsas	: Nucleasa de ácido ribonucleico
r.p.m	: Revoluciones por minuto
rNTPs	: Desoxiribonucleótidos 5' trifosfato

RER	: Retículo endoplasmático rugoso
RdRp	: RNA polimerasa RNA dependiente
RNP	: Complejo ribonucleoproteico
SCPH	: Síndrome cardiopulmonar por hantavirus
SNV	: Virus Sin Nombre
SEOV	: Virus Seoul
STAT	: Traductor de señal y activador de la transcripción
SDS	: Dodecil sulfato de sodio Tris: tris-(hidroximetil)-aminoetano
ssRNA	: RNA de hebra simple
TULV	: Virus Tula
TAE	: Tris-Acetato EDTA
TNF- α	: Factor de necrosis tumoral
TRAF-3	: <i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3</i>
TBK-1	: <i>TANK-binding kinase-1</i>
UTR	: Región no traducida
UNR	: <i>Upstream of N-ras</i>
UUKV	: Virus Uukunami
VP35	: Proteína V35
vRNA	: RNA viral
WB	: <i>Western blot</i>
ZEOV	: Virus Ebola Zaire

RESUMEN

El virus Andes (ANDV), miembro del género Hantavirus de la familia Bunyaviridae, es el principal agente etiológico del síndrome cardiopulmonar por hantavirus (SCPH) en América del Sur. El genoma viral comprende tres segmentos de RNA de hebra simple de polaridad negativa denominados según su tamaño: segmento L (Large), segmento M (Medium), y segmento S (Small). Este trabajo de tesis se centra en el estudio del RNA mensajero del segmento S (SmRNA). Se demuestra que, además de codificar para la proteína de la nucleocapside (N), el SmRNA codifica para una proteína no estructural denominada proteína no-estructural del segmento S (NSs). La expresión de la proteína NSs-ANDV se demuestra en un contexto de infección viral en líneas celulares VeroE6, y también en un modelo de infección animal utilizando hámster Sirio. Luego de evaluar la posible función de la proteína NSs-ANDV, se establece que ésta modula el sistema inmune innato, específicamente inhibiendo la activación del promotor $\text{INF-}\beta$ y $\text{NF}\kappa\text{B}$. Además se establece que la proteína NSs-ANDV inhibe la activación de $\text{NF}\kappa\text{B}$. En resumen, este trabajo de tesis demuestra por primera vez la expresión de la proteína NSs-ANDV, y establece su rol en la modulación del el sistema inmune innato celular.

ABSTRACT

The Andes virus (ANDV), a rodent-borne hantavirus, member of the *Bunyaviridae* family of viruses, is the major etiological agent of the hantavirus cardiopulmonary syndrome (HCPS) in South America. The viral genome comprises three segments of single stranded, negative polarity RNA, named by their size: L segment (Large), M segment (Medium) and S segment (Small). This thesis focused on the study of the S segment mRNA (smRNA). Results demonstrate that, the SmRNA not only encodes for the nucleocapsid protein (N) but also for a nonstructural protein, the nonstructural protein of the S segment (NSs-ANDV). The expression of the NSs-ANDV protein is shown in the context of a viral infection in VeroE6 cell lines, and in an animal model, the Syrian hamster. Next we sought to establish a possible role for the NSs-ANDV protein. Results suggest that the NSs-ANDV modulates the innate immune system by inhibiting the activation of NF κ B and INF- β promoter during ANDV infection. Consistent with its role in inhibiting cellular innate immunity results show that the NSs-ANDV protein inhibits dsRNA induced activation of NF κ B. In summary, this thesis shows for the first time the expression of the protein NSs-ANDV in the context of a viral infection, and establishes its role in modulating the cellular innate immune system.

1. INTRODUCCION

1.1 Hantavirus Andes

El género *Hantavirus* de la familia *Bunyaviridae* comprende 24 especies virales (1), que han sido clasificados en 2 grandes grupos de acuerdo a la distribución geográfica de su reservorio (2) y a la patología que provocan en humanos (3). Los Hantavirus del Viejo Mundo, como son Hantaan (HTNV), Puumala (PUUV) y Seoul (SEOV), se localizan geográficamente en las regiones de Europa y Asia, siendo los agentes etiológicos de la fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR) (3). Los Hantavirus del Nuevo Mundo como son Sin Nombre (SNV) y Andes (ANDV) se localizan geográficamente en el continente americano y son agentes etiológicos del síndrome cardiopulmonar causado por hantavirus (SCPH) (3–6). El género hantavirus también comprende especies no patogénicas para el hombre como son los virus Prospect Hill (PHV) y Tula (TULV) (7, 8).

A la fecha, en Chile se ha identificado y aislado sólo un Hantavirus, el virus Andes (ANDV) el que se asocia al SCPH (4, 9). Esta enfermedad descrita en la década del 90, ha evolucionado como un problema emergente de salud pública en Chile y Argentina (4, 10), alcanzando una tasa de mortalidad de un 30 a 40% (<http://epi.minsal.cl/>). El reservorio de ANDV es el ratón *Oligoryzomys longicaudatus* o “ratón de cola larga”, que en Chile se distribuye entre la cuarta y la undécima región (11).

1.2 Partícula viral y organización genómica

Los Hantavirus son virus envueltos de morfología esférica que presentan un tamaño aproximado entre 70-160 nm (3). En la envoltura se encuentran insertas las glicoproteínas virales Gn y Gc en forma de heterodímero (12-14) (Figura 1A). Al interior de la partícula se encuentra el genoma viral que corresponde a tres segmentos de RNA de hebra simple de polaridad negativa. Los segmentos del RNA genómico se denominan según su tamaño en segmento L (*Large*), segmento M (*Medium*) y segmento S (*Small*). El segmento L con un tamaño aproximado de 6,6 Kb y codifica para la RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp) viral o proteína L. El segmento M presenta un tamaño aproximado de 3,7 Kb, y codifica para las glicoproteínas Gn y Gc. El segmento S presenta un tamaño aproximado de 2,1 Kb y codifica para la nucleoproteína (proteína N). En algunos virus del género el segmento S también codifica, en un marco de lectura (ORF) alternativo al marco de la proteína N, para una proteína no estructural (NSs) (15) (Figura 1B). Una característica del RNA genómico viral es la complementariedad de bases existentes entre los extremos 5' y 3' de todos los segmentos (Figura 1C). Esta complementariedad de bases permite al RNA genómico circularizar por medio de interacciones nucleotídicas no covalentes formando una estructura del tipo "panhandle"(16). El RNA genómico, junto a múltiples copias de la proteína N, forma un complejo ribonucleoproteico que en conjunto con la RNA polimerasa viral son encapsidados en las partículas virales sintetizadas *de novo* (17) (Figura 1A).

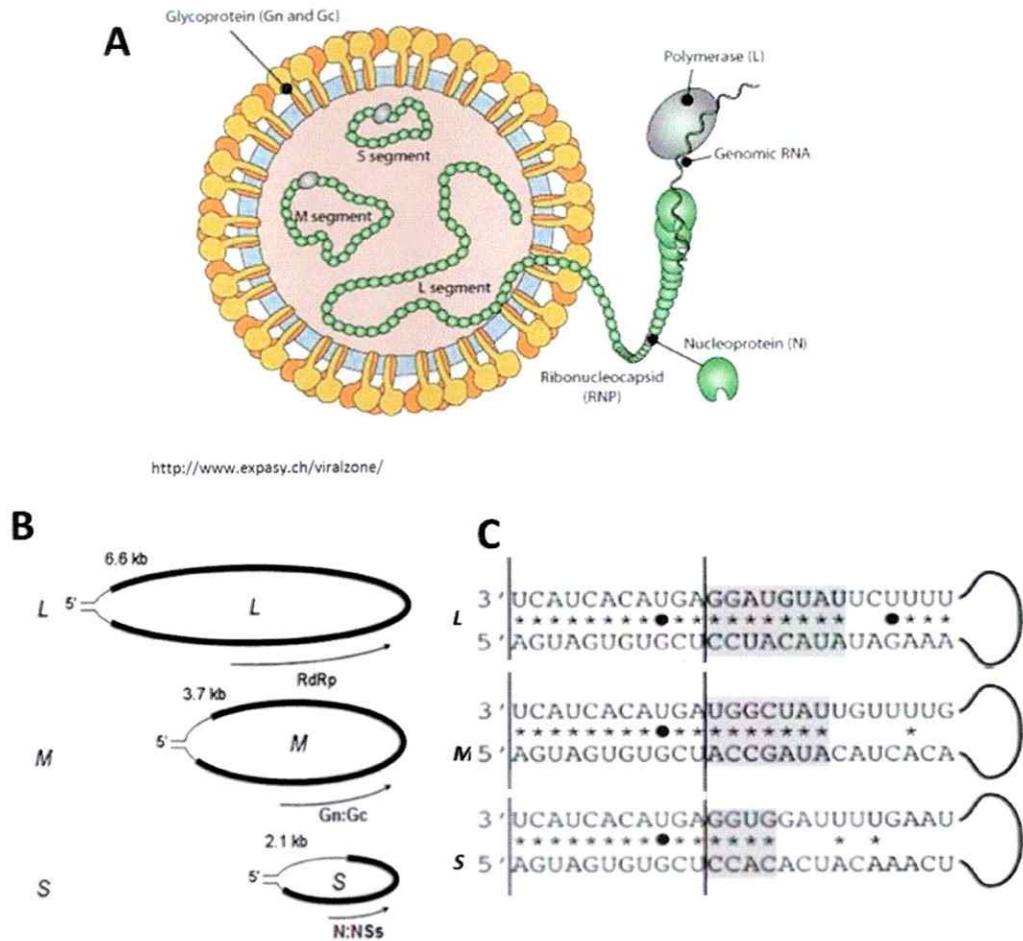


Figura 1. Modelo de la partícula viral y organización genómica.

A) Representación esquemática de la partícula viral. Desde el exterior al interior de la partícula viral encontramos las glicoproteínas Gn y Gc insertadas en la envoltura lipídica. Los 3 segmentos (L, M y S) de RNA genómico de polaridad negativa, cubiertos de proteína N y una copia de la RdRp viral, forman un complejo ribonucleoproteico (RNP) (<http://www.expasy.ch/viralzone/>). **B)** Representación esquemática de los segmentos de RNA genómicos de hantavirus. El segmento S codifica para las proteínas N y NSs, el segmento M codifica para las glicoproteínas Gn y Gc, y el segmento L codifica para la RNA polimerasa RNA dependiente (proteína L) (7). **C)** La estructura “Panhandle” de RNA genómico viral se establece por complementariedad de bases entre la región 5`no codificante (NCR) y el 3`NCR de los 3 segmentos. En la figura se destaca que las primeras 11 bases son conservadas entre los 3 segmentos.

1.3 Características de las proteínas virales

La RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp) viral (Proteína L), de un peso molecular de 250 a 280 kDa dependiendo del virus analizado (18), presenta un dominio con actividad endonucleasa en el extremo N-terminal (19). La proteína L participa tanto en el proceso de replicación como en la transcripción del genoma viral. Durante la etapa de transcripción, para cada segmento genómico, la proteína L sintetiza un RNA mensajero (mRNA) a partir del RNA viral (vRNA) y durante la replicación, la proteína L sintetiza un RNA complementario (cRNA), intermediario de replicación que luego será utilizado como templado para la síntesis de nuevas copias de vRNA. Es el vRNA *de novo* sintetizado el que será empaquetado en las nuevas partículas virales. Se ha observado que la actividad transcripcional de la RdRp viral requiere de la proteína N, la que participa en la obtención de nucleótidos con estructura "cap" (7-metilguanosina) en su 5' y en su extremo 3' un "-OH" libre (20). Estos partidores con estructura 5'cap se obtienen desde mRNA celulares mediante un proceso denominado "*cap snatching*".

Las glicoproteínas Gn y Gc se sintetizan a partir de un precursor de glicoproteínas (GPC) en el retículo endoplasmático rugoso (RER) (17). El GPC es procesado co-traduccionalmente dando origen a la glicoproteína Gn que proviene del extremo N-terminal, y Gc que corresponde al extremo C-terminal (13). Durante su paso por el RER las glicoproteínas sufren un procesos de maduración el que se asocia a modificaciones

del tipo N-glicosilaciones (21). Ambas glicoproteínas, Gn y Gc forman complejos heteromultiméricos en el RER, los cuales posteriormente son transportadas al aparato de Golgi (22–24). Estos complejos multiméricos son finalmente dirigidos a los sitios de ensamblaje de la partícula viral (25). A este respecto se ha descrito que las regiones citoplasmáticas de Gn (~150 aa) y Gc (~9-26 aa) pueden interactuar directamente con la proteína N (26), la que se encuentra formando parte de los complejos ribonucleoproteicos junto al vRNA. Las glicoproteínas virales cumplen dos funciones importantes durante la etapa de entrada del virus a la célula: son las responsables de la interacción con los receptores en la superficie celular y favorecen el proceso de fusión de membrana para permitir al virus escapar de la vía de degradación endocítica (27). Durante el proceso de fusión de membranas, se ha determinado que la glicoproteína Gc presenta el péptido de fusión de tipo II que se activa a pH bajo (28). Además, se ha descrito que la cola citoplasmática de Gn inhibe la respuesta de interferón de tipo I, específicamente inhibiendo los sensores citoplasmáticos RIG-I (*Retinoica Acid-inducible Gene-1*) y TBK-1 (*TANK-binding kinase-1*) (29), permitiendo así retardar la respuesta inmune celular.

La proteína N es el componente más abundante de la partícula viral y juega un papel central en el ciclo replicativo. Se encuentra formando un complejo ribonucleico (RNP) junto al RNA viral (30), además de interactuar con la proteína L (31). Mir y cols, determinaron que la proteína N trimeriza y es capaz de unirse específicamente a la estructura “*panhandle*” formada por los extremos 5’ y 3’ del RNA genómico junto a la

proteína L (32). Además, se estableció que la proteína N de SNV es capaz de reemplazar de manera funcional al complejo de iniciación eucariótico 4F (eIF4F). El complejo eIF4F está constituido por tres proteínas eIF4E, eIF4G y eIF4A, las que participan en el proceso de inicio de la traducción (33). La proteína eIF4E reconoce e interactúa con la estructura 5'cap del mRNA, mientras que eIF4A, una RNA-helicasa bidireccional dependiente de ATP, participa relajando las estructuras secundarias presentes en el mRNA. La función de eIF4A requiere del cofactor eIF4B. La proteína eIF4G presenta dos sitios de unión a eIF4A, un sitio de unión a eIF4E y un sitio de unión a eIF3, el que a su vez une la subunidad ribosomal 40S. El factor eIF4G actúa como una proteína de andamio, permitiendo el ensamblaje del complejo de iniciación sobre el mRNA. Además eIF4G media la circularización del mensajero gracias a su capacidad de interacción con la proteína de unión a poly(A) (PABP), que une a la cola 3'poly (A) (33). La subunidad ribosomal 40S es reclutada al mRNA como parte del complejo 43S formado por el complejo ternario (eIF2-GTP/tRNA_i) y los factores eIF1A, eIF1 y eIF5. La proteína N reconoce e interactúa con la estructura 5'cap del mRNA, reemplazando en función a eIF4E (34). Más aún, la proteína N interactúa con la proteína ribosomal S19 presente en la subunidad ribosomal 40S, atrayendo así a la subunidad 40S hacia el mRNA viral (35). Es así como la proteína N reemplaza de manera funcional a la proteína eIF4G. Por otro lado, el mRNA de hantavirus carece de cola 3'poly-(A), por lo tanto, la interacción eIF4G-PABP no es requerida en el proceso de iniciación de la síntesis de proteínas para los segmentos S y L (34). En el caso del ANDV se ha establecido que el extremo 3'UTR del mRNA reemplaza funcionalmente la cola poly-(A), estimulando el inicio de la traducción (36). Finalmente, la proteína N también desestabiliza estructuras secundarias

del mRNA facilitando la migración del complejo de iniciación en dirección 5' a 3' en un proceso conocido como *scanning* ribosomal, reemplazando así la función de la helicasa eIF4A/eIF4B (34). Se ha postulado que esta función de la proteína N del SNV otorgaría ventajas al virus durante su ciclo replicativo al incrementar de manera selectiva el inicio de la traducción de los mRNA virales sobre los mRNA celulares (34).

La proteína N es el principal antígeno viral responsable de gatillar la respuesta inmune temprana contra el patógeno (37), así también se ha descrito que la proteína N es capaz de modular la respuesta inmune innata (38). La proteína N es capaz de bloquear la inducción de NFκB (*Nuclear Factor Kappa B*) mediada por la vía TNF-α (factor de necrosis tumoral) y es capaz de interactuar con la proteína importina-α, impidiendo así la translocación de NFκB al núcleo (39, 40). Además, la proteína N es capaz de inhibir la fosforilación de STAT-1 impidiendo así la formación del complejo ISFG-3, bloqueando la activación de los genes activados por IFN (ISRE) (38).

En algunos miembros de la familia *Bunyaviridae* el mRNA del segmento S presenta un marco de lectura alternativo (+1) que codifica para una proteína no estructural del segmento S denominada de forma genérica proteína NSs. Al inicio de este trabajo de investigación, para el género *Hantavirus* la expresión de la proteína NSs había sido sólo caracterizada en los Hantavirus Puumala (PUUV) y Tula (TULV) (41, 42). Estudios de la proteína NSs de diversos miembros de la familia *Bunyaviridae*, la describen como una

proteína de tamaño variable, que presenta desde 50 a 95 residuos aminoacídicos (42, 43). La localización subcelular de la proteína NSs también varía en diferentes virus desde una distribución perinuclear, a la formación de estructuras filamentosas en el núcleo (43, 44). Basados exclusivamente en alineamiento de secuencias, se había predicho que el mRNA de ANDV podría codificar para la proteína no estructural del segmento S, NSs (17, 45). Un alineamiento de secuencias nucleotídicas entre el mensajero del segmento S de TULV que expresa la proteína NSs, y el mensajero del segmento S de ANDV (Figura 2) (Tesis doctoral Jorge Vera-Otárola) (113) muestra que las regiones 5' no traducidas (5'UTR) de ambos mRNA poseen características similares. Al igual que TULV, la región 5'UTR de ANDV posee una longitud de 42 nucleótido y presenta un codón de inicio putativo para un ORF fuera del marco de lectura con respecto al AUG N. En el caso de TULV es este último codón de inicio de la proteína NSs. La distancia entre el AUG N y el AUG putativo de NSs-ANDV es de 76 nucleótidos, distancia conservada en TULV (Tesis Doctoral, Jorge Vera) (113). Al realizar un alineamiento de secuencia aminoacídica entre la proteína NSs de TULV y la proteína NSs putativa de ANDV, se puede observar una identidad de 40% y una similitud de 51% (46). Además, en la tesis doctoral de Jorge Vera, se estableció que el codón de inicio putativo de NSs-ANDV es funcional al ser reconocido por la maquinaria de traducción del hospedero.. Como resumen de esta tesis se estableció un modelo esquemático del mRNA del segmento S del virus Andes se presenta en la figura 3.

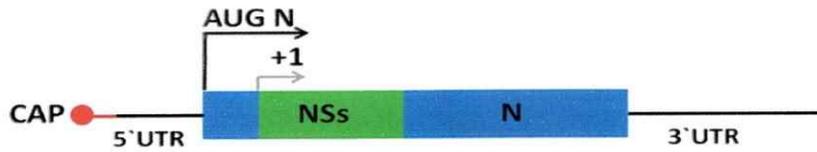


Figura 3. Modelo esquemático del mRNA del segmento S del virus Andes. El SmRNA posee una estructura 5'cap, una región 5'UTR, 1 ORF codificantes para proteína N con su respectivo AUG N y un posible ORF de la proteína NSs con su AUG NSs. En el extremo 3' posee una región 3'UTR trunca con respecto al cRNA.

Dependiendo del virus en estudio, la proteína NSs es capaz de contribuir en la patogénesis viral mediante diversos mecanismos como son la inducción de la apoptosis a través de la interacción con los inhibidores de la apoptosis (IAPs) (47), inhibición de la traducción celular por la unión directa a la subunidad 40S ribosomal, inhibiendo el reconocimiento de los codones de inicio durante el proceso de *scanning* (48). La proteína NSs también participa en la inhibición de la respuesta a interferón del tipo I (49, 50). En los miembros del género *Hantavirus* que expresan la proteína NSs, PUUV y TULV, se ha descrito que ésta proteína es capaz de antagonizar la respuesta inmune innata del hospedero, específicamente la respuesta mediada por IFN-I (42, 51).

1.4 Ciclo Replicativo

1.4.1 Entrada viral

El ciclo replicativo de Hantavirus se inicia con la interacción de las glicoproteínas con receptores celulares (Figura 4). Se ha sugerido que los receptores utilizados por estos virus son algunos miembros de la familia β -3-integrina, específicamente $\alpha_v\beta_3$ integrinas para los hantavirus patogénicos y $\alpha_{iib}\beta_1$ integrinas para los hantavirus no patogénicos (52–54). Se ha propuesto además que el subcomponente C1q (gC1qR)/p32, *Decay-accelerating-factor* (DAF)/CD55, actuaría como un co-factor durante la entrada del virus (55, 56). Posterior a la interacción con el receptor, el mecanismo utilizado para la entrada varía dependiendo del patógeno. Por ejemplo, los virus La Crosse (LACV) y ANDV ingresan a la célula mediante endocitosis mediada por receptores dependientes de clatrina, mientras que la entrada del virus Ukunami (UUKV) independiente de clatrina (Figura 4) (27). Otro factor importante, es la dependencia asociada al colesterol de la membrana plasmática (57). Los hantavirus inician el proceso de fusión de membrana de manera dependiente del pH y se ha determinado que para HTNV es pH 6,3 y para ANDV es pH 5,8 (27, 58). Dentro de los compartimientos endosomales, la acidificación del medio, induce el proceso de fusión entre las membranas de la envoltura de la partícula viral con la membrana del endosoma, ocurriendo así el desnudamiento y liberación de los 3 complejos ribonucleoprotéico al citoplasma (3) (Figura 4).

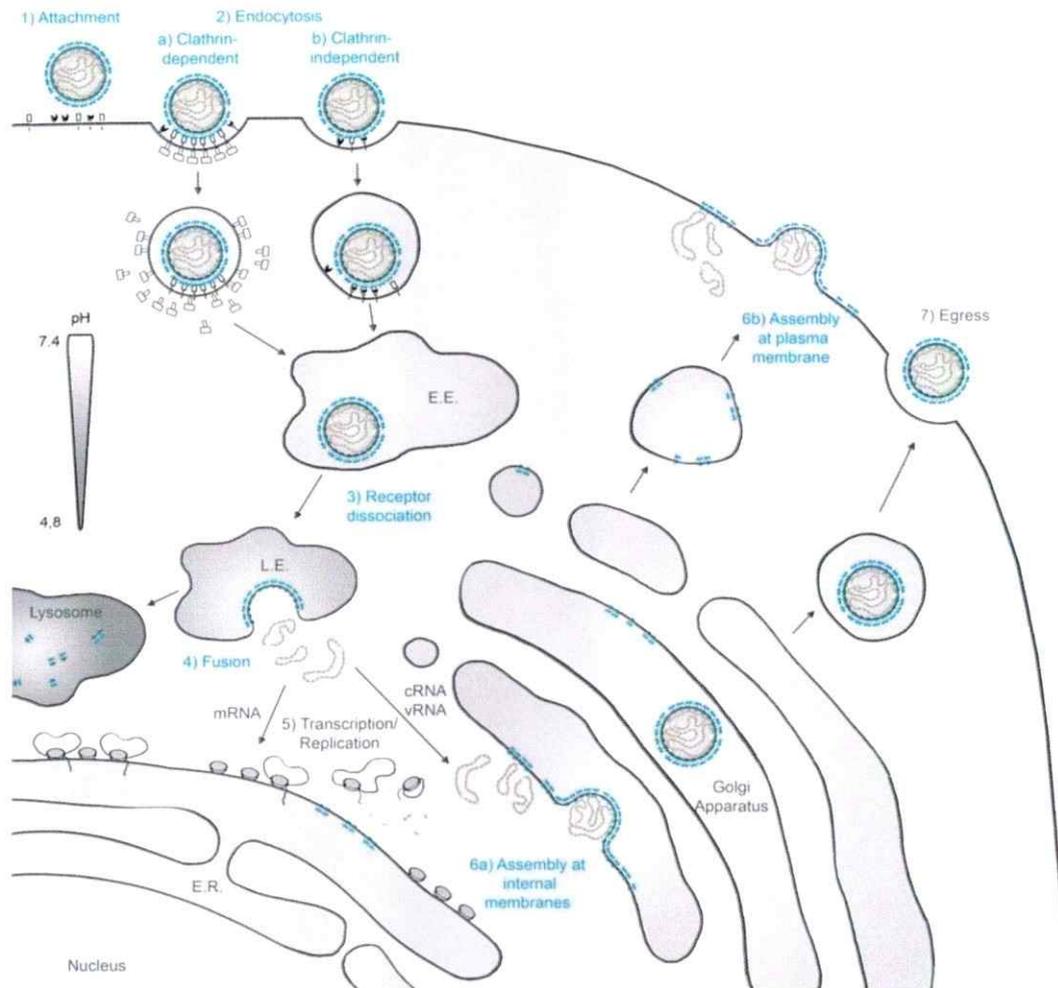


Figura 4. Ciclo replicativo. Se divide en 7 etapas: (1) Adsorción a través de la interacción entre los receptores de la superficie celular y las glicoproteínas del virus; (2) Entrada por endocitosis mediado por receptores dependiente o no de clatrina (3) Disociación de los receptores; (4) Fusión de las membranas y liberación de los complejos ribonucleicos; (5) El vRNA es utilizado como templado por la proteína L para del cRNA y el mRNA.; (6) Ensamblaje de todos los componentes virales en el aparato de Golgi o en la membrana plasmática; (7) Liberación de las partículas virales. Figura extraída de (27).



1.4.2 Replicación y transcripción

En el citoplasma celular la proteína L utiliza el vRNA como templado para la síntesis de dos poblaciones de RNA de polaridad positiva, el cRNA y el mRNA. Para la síntesis del mRNA, la polimerasa viral mediante su actividad endonucleasa, corta y secuestra oligonucleótidos con estructura 5'cap desde mRNA celulares, proceso denominado "cap snatching" para luego utilizarlos como partidores en el inicio de la transcripción desde el vRNA (19). Se ha descrito que el *cap snatching* ocurre asociado a los cuerpos P, proceso en el que también participa la proteína viral N (20). Así, durante la transcripción primaria, el vRNA se utiliza como molde para la síntesis de los mRNA virales que poseen estructura 5'cap. El extremo 3' no traducido (UTR) del mRNA viral es, sin embargo, trunco con respecto al cRNA (22). Además los mRNA generados desde los segmentos S y L no poseen una cola poly-(A)(61, 62). Una vez culminada la transcripción primaria, la polimerasa viral inicia el proceso que se denomina transcripción secundaria o replicación que corresponde a la síntesis del cRNA utilizando como templado el vRNA y una molécula de GTP como partidador (63). A diferencia de la transcripción primaria, que da origen a los mRNA virales, la transcripción secundaria da origen a un cRNA que carece de estructura 5'cap y es complementario en toda su extensión con respecto a su molde (vRNA) (59) (Figura 5). El mecanismo molecular por el cual la proteína L viral es capaz de sintetizar dos poblaciones de RNA diferentes, mRNA y cRNA, a partir de un mismo molde, aún no ha sido dilucidado. El cRNA sirve

luego como templado para la síntesis de nuevas copias de vRNA el que se encapsida junto a las proteínas N y L en las partículas virales sintetizadas *de novo* (Figura 5).

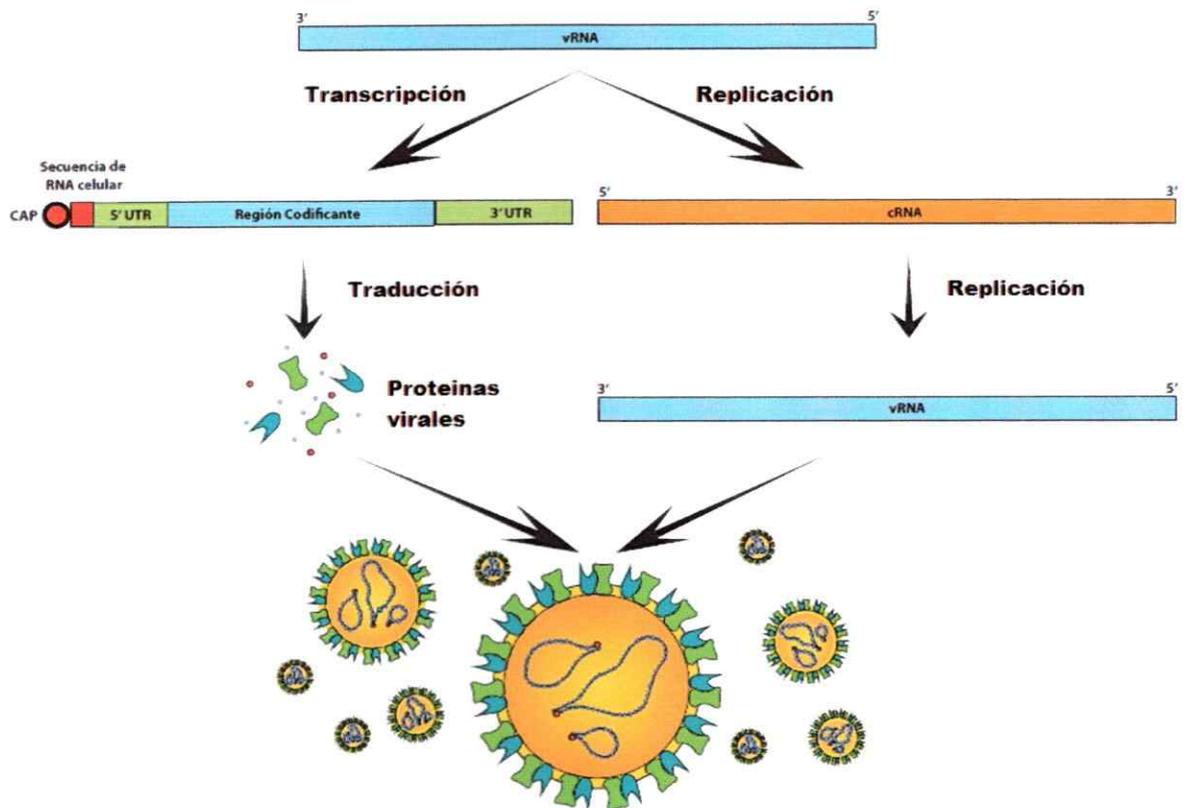


Figura 5. Replicación y transcripción viral. El vRNA es utilizado como templado por la polimerasa viral para la síntesis de mRNA los cuales son truncos en la región 3`UTR (transcripción primaria). A partir de los mRNA se sintetizan las proteínas virales. El vRNA también es utilizado para la síntesis de cRNA, el que a su vez se utiliza como templado para la generación de vRNA (replicación o transcripción secundaria). Las proteínas virales y los vRNA son utilizados para el proceso de encapsidación y ensamblaje de partículas virales.

1.4.3 Síntesis de proteína, ensamblaje y salida viral

La síntesis de las proteínas virales a partir del mRNA ocurre en diferentes compartimentos intracelulares. La traducción del mRNA correspondientes a los segmentos L y S ocurre en el citoplasma en un proceso asociado a ribosomas libres, mientras que la traducción del mRNA del segmento M se realiza en el retículo endoplasmático rugoso (RER). En eucariontes, el inicio de la traducción canónico o cap-dependiente, requiere de la estructura 5'cap del mRNA que es reconocida por el complejo eIF4F (34) (ver sección 1.3). Se ha reportado que la proteína N participa en el proceso de inicio de la traducción de los mRNAs virales reemplazando al complejo eIF4F (ver sección 1.3). La proteína N reconoce e interactúa con la estructura 5'cap del mRNA y luego interactúa con la subunidad 40S ribosomal facilitando su reclutamiento al extremo 5'cap del mRNA. Luego la proteína N actúa como helicasa facilitando así el proceso de inicio de la traducción (60).

El ensamblaje de los componentes virales y salida de la partícula viral ocurre generalmente en sitios específicos, en su mayoría en microdominios en la membrana plasmática o en compartimientos internos de la célula (56, 61). Para ciertos hantavirus el ensamblaje se realiza asociado al aparato de Golgi (25) mientras que para otros como ANDV y SNV se ha sugerido que el ensamblaje y salida ocurre asociado a la membrana plasmática (58) (Figura 4).

1.5 Sistema inmune innato

El sistema inmune es el encargado de la defensa del organismo frente a los agentes patógenos. Existen dos tipos de respuesta inmune: innata y adaptativa (62). La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa contra un patógeno, es poco específica y reconoce componentes estructurales de los agentes infecciosos (63), logrando así eliminarlos o bien limitar su propagación. La respuesta inmune innata depende de barreras físicas naturales (epitelios, mucosa y enzimas), células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), células *natural killer* (NK) y moléculas solubles como mediadores inflamatorios, citoquinas y moléculas del sistema del complemento. La respuesta inmune adaptativa es considerada una segunda línea de protección que se establece después de haber tenido contacto con el antígeno inductor (62). A diferencia de la respuesta inmune innata, la respuesta es específica y se gatilla protegiendo al hospedero principalmente en el marco de una segunda infección. La respuesta inmune adaptativa incluye una respuesta que es mediada por los linfocitos T (respuesta celular) y otra que depende de los linfocitos B (respuesta humoral).

El reconocimiento de los agentes exógenos a nivel celular se logra gracias a receptores de reconocimiento de patrones, PRR (*Pattern Recognition Receptor*) los cuales reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos, PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*). Entre las moléculas reconocidas por PRRs, están las variantes de

ácidos nucleicos que normalmente se encuentran asociados a los virus. Durante el ciclo viral, los productos como proteínas virales y/o genoma viral son reconocidos por el sistema inmune innato, lo que lleva a una interacción PAMP-PRR, desencadenando el inicio de la respuesta inmune innata.

Durante la infección viral, los sensores celulares que reconocen los virus o sus componentes como agentes exógenos incluyen varios tipos de PRR:

1. Superficiales: TLR (*Toll-like receptor*) TLR-2, TLR-4. (64–66)
2. Endosomales: TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9 (64–66).
3. Citoplasmáticos: ejemplos RIG-I (*Retinoica Acid-inducible Gene-1*) o MDA-5 (*Melanoma Differentiation-Associated gene 5*) (66, 67).

Para desencadenar esta respuesta inmune durante la infección viral son necesarios dos eventos: la detección de los PAMPs virales por los distintos PRR y la activación de la cascada de señalización de proteínas que regulan la síntesis de los interferones (IFNs)(63, 66). (Figura 6).

Los interferones alfa/beta (IFN α/β) pertenecen a la familia de interferón de tipo I (IFN-I) (63). La expresión de IFN-I depende de la activación de factores transcripcionales que se encuentran inactivos en el citoplasma tales como IRF-3 (*Interferon regulatory factor 3*) y NF κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) (68) (Figura 6). Pero además se requieren varios

elementos reguladores para inducir la activación de INF-I en respuesta una infección viral. En el promotor de INF- β , se encuentra un elemento "enhancer" que contiene 4 dominios reguladores positivos del tipo PRDI a PRDIV (*positive regulatory domains*), que funcionan en conjunto para activar la expresión de IFN- β . Los factores de transcripción que interactúan con estos dominios son: NF κ B que se asocia a PRDII, IRF-3 que se une a PRDIII y PRDI, y el factor de transcripción ATF-2/c-Jun (*Activating Transcription Factor*) que interactúa con PRDIV (69). IRF-3 se expresa en el citoplasma y durante la infección viral es activado por fosforilación. La quinasa TBK-1 (*TANK-binding kinase-1*) fosforila IRF-3 en su extremo C-terminal, induciendo así su homodimerización y posterior translocación al núcleo. En el núcleo, el homodímero de IRF-3 forma un complejo con el co-activador transcripcional p300/CBP, NF κ B y Jun que se unen al promotor del gen de IFN- β , iniciando así la transcripción del mRNA de IFN- β (69, 70)(Figura 6).

En células no infectadas, el factor de transcripción NF κ B que está compuesto por las subunidades p50/p65, se encuentra secuestrado en el citoplasma por una familia de inhibidores denominados I κ Bs (Inhibidores de κ B). Las proteínas I κ B enmascaran la secuencia de localización nuclear (NLS) de las proteínas de NF κ B y las mantienen en un estado inactivado en el citoplasma (71). Durante la infección viral, la activación de NF κ B se inicia con la degradación de las proteínas I κ B. Esto ocurre principalmente por la activación de la I κ B quinasa (IKK). La IKK está formada por un heterodímero de 2 subunidades catalíticas de IKK- α , IKK- β y una subunidad reguladora IKK- γ (71). IKK

fosforila dos residuos de serina localizados en un dominio de I κ B. Una vez fosforiladas, el inhibidor I κ B se ubiquitina para ser después degradado por el proteosoma. Este proceso permite la translocación al núcleo de NF κ B (71).

IFN α/β son inducidos durante la infección viral, estimulando un conjunto de genes que codifican para proteínas con actividad antiviral (66). La señal inicial es amplificada por la vía de señalización JAK/STAT (*Janus Kinase/ Signal transducer and activator of transcription*) que es mediada por los receptores de reconocimiento de IFN (IFNAR) tipo I y II. Estos receptores se activan por interacción con los IFN α/β formando un complejo receptor-ligando. Las JAK fosforilan a los receptores y también a las proteínas STAT. De esta manera, STAT1 y STAT2 pierden su afinidad por el receptor y forman un complejo con IRF-9, denominado ISFG-3 (*IFN-stimulated gene factor 3*). ISFG-3 es un factor de transcripción que transloca al núcleo asociándose a sus secuencias blanco en los promotores, denominados elementos de respuesta estimulados por IFN, ISRE (*IFN stimulated response element*) que se encuentran en los genes regulados por IFN α/β . Los genes que son inducidos durante la respuesta antiviral son PKR (*RNA dependent Protein Kinase*), OAS (*2'-5' oligoadenylate synthetase*), MxA (proteína Mx), ISG15, los que participan en la inhibición de la replicación y propagación viral (72-74) (Figura 6).

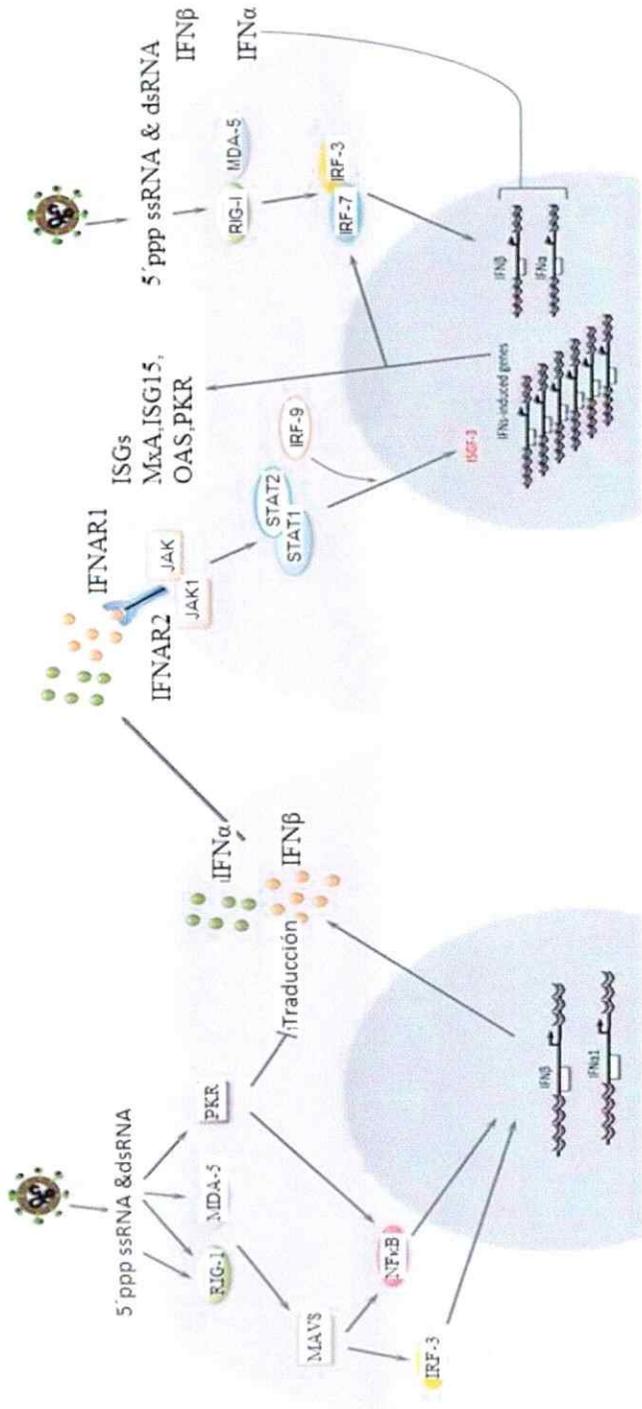


Figura 6. Inducción y vías de señalización de IFN-I. La replicación viral puede producir estructuras 5'ppp ssRNA y dsRNA. Estas estructuras activan los receptores citoplasmáticos RIG-I y MDA-5 que a su vez activan a los factores transcripcionales IRF-3 y NFκB, estos translocan al núcleo y activan los promotores IFN-α/β. Los interferones secretados actúan de forma autocrina y paracrina permitiendo la expresión de numerosos ISGs (76).

1.5.1 Modulación del sistema inmune innato por Hantavirus

Los hantavirus han desarrollado diversos mecanismos de inhibición de la respuesta inmune innata. Entre los mecanismos se incluyen el bloqueo directo de la inducción y la inhibición de la vía de señalización del interferón (74, 75). La modulación negativa de estas vías por parte de algunos virus es fundamental para su replicación. Es así como diversos virus expresan proteínas que bloquean a los efectores como IRF-3 o NFκB, claves en la respuesta inmune innata (74, 76). Las estrategias de los Hantavirus para evadir el sistema inmune innato implican varias proteínas virales, incluyendo las glicoproteínas, la proteína N y la proteína NSs (Figura 7). Se ha demostrado que la región citoplasmática de la glicoproteína Gn del hantavirus NY-1V es capaz de inhibir la regulación mediada por TBK-1 y RIG-1 por interacción con TRAF-3 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 3*). TRAF-3 recluta a las quinasas TBK-1/IKKε que activa a NFκB y fosforilan a IRF-3 (77). Se ha observado que durante la infección con ANDV y PHV disminuye la fosforilación de STAT-1 y STAT-2, impidiendo su translocación al núcleo (38). Además, la proteína GPC del virus ANDV es capaz de inhibir la fosforilación de STAT-1, evitando su posterior translocación al núcleo (38). Igualmente, la proteína N de ANDV es capaz de inhibir la translocación de STAT-1 (75). Estos antecedentes muestran que las proteínas virales pueden antagonizar la vía de señalización JAK/STAT. Además, se demostró que la proteína N del SNV interactúa con la proteína importina-α impidiendo la translocación de NFκB activado (39). La expresión de la proteína NSs de los virus

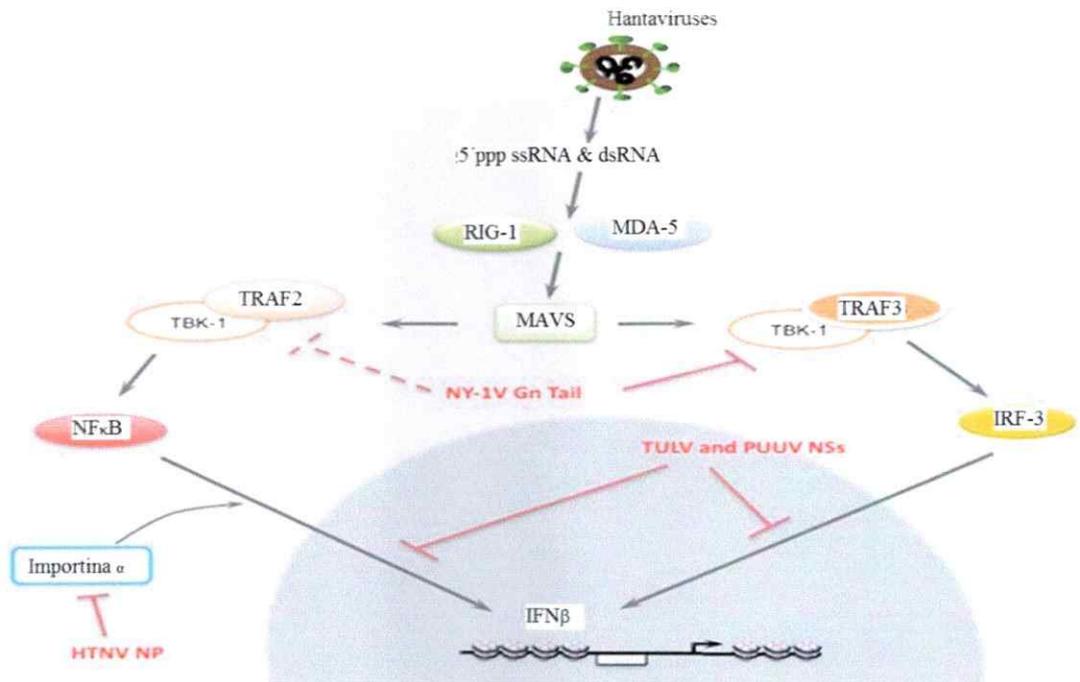


Figura 7. Estrategias de los Hantavirus para evadir la respuesta a IFN-I.

La región citoplasmática de la Gn del virus NY-1V puede inhibir la activación de IRF-3 y supuestamente NFκB a través de la fosforilación TBK-1. La proteína N de HTNV bloquea la respuesta de NFκB al interactuar con proteínas importina-α inhibiendo la translocación nuclear de NFκB. Por último, la proteína NSs de TULV y PUUV inhibe la inducción de IFN-β y la activación de IRF-3 y NF-kB (76). Figura extraída de May y Bouloy, 2011.

TULV y PUUV muestran que son capaces de inhibir la inducción de IFN- β (Figura 7), además de inhibir la activación de los promotores de IRF-3 y NF κ B (78, 79).

De acuerdo a los antecedentes mencionados, en este trabajo de tesis se evaluó si el SmRNA de ANDV codifica para una proteína no estructural NSs del virus ANDV. Una vez establecida la expresión de la proteína NSs-ANDV en el contexto de una infección viral se decidió estudiar la posible función de ésta. Basado en los que se ha descrito para la proteínas virales NSs de otros miembros del género Hantavirus, las cuales son capaces de inhibir la activación de IFN-I, en éste trabajo se postuló a la proteína NSs-ANDV como un posible modulador de la respuesta inmune innata.

Hipótesis

El SmRNA de ANDV codifica para la proteína NSs, la cual se expresa en el contexto de una infección viral, actuando como un antagonista en la vía de activación de IFN-I.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la expresión de la proteína NSs-ANDV y determinar su posible función como modulador del sistema inmune innato celular

Objetivo específicos

- I. Evaluar la expresión de la proteína NSs-ANDV en el contexto de una infección viral.
- II. Establecer si la proteína NSs-ANDV modula la vía de inducción de IFN-I.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Material biológico

La línea celular VeroE6 (ATCC® CRL-1586™, proveniente de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*), fue mantenida en Medio Dulbecco's Eagle modificado (DMEM) (Hyclone) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Hyclone), 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) (Gibco BRL) y 1% Fungizona (Gibco BRL) y mantenidas en estufa de incubación a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

Para las infecciones en células VeroE6 se utilizó el aislado viral CHI-7913 (4) del Hantavirus Andes (ANDV). Las infecciones con ANDV se realizaron en un laboratorio de bioseguridad nivel 3 (BSL-3, Centro de Investigaciones Médicas, Escuela de Medicina, PUC).

Para la infección *in vivo* se utilizó como modelo animal al Hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*). Se utilizaron machos de dos a cuatro semanas de edad con peso entre 100 a 180 g. Todos los animales fueron obtenidos desde el bioterio de ANLIS (Administración nacional de laboratorios e institutos de Salud, Departamento de Virología, B. Aires, Argentina) "Dr. C. G. Malbrán", en colaboración con la Dra. Paula Padula. Para las infecciones realizadas en Hámster Sirio Dorado se utilizó el hantavirus

Andes/ARG, aislado de pulmón de un ratón de cola larga *Oligoryzomys longicaudatus* (5).

2.2 Obtención de los stocks virales

Células VeroE6 fueron crecidas en monocapa en botellas planas de 75 cm² de superficie en medio DMEM suplementado con 10% SFB, 1% (P/S) y 1% fungizona, mantenidas en estufa de cultivo a 5% de CO₂ a 37°C, fueron infectadas con 500 µL del stock ANDV (CHI-7913) correspondientes a un MOI de 0.5. La adsorción del virus se realizó por 1 hr 30 min en agitación constante. Posteriormente, el medio fue eliminado y se agregó 10 mL de DMEM al 2% de SFB. A los 14 días post infección (d.p.i) el sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 1600 revoluciones por minuto (r.p.m) durante 5 min. El sobrenadante obtenido fue alicuotado en fracciones de 500 uL y conservado a -80°C hasta su posterior titulación por el ensayo de Unidades Formadoras de Focos (UFF).

2.3 Titulación viral

El número de partículas infecciosas de ANDV se determinó mediante un ensayo de Unidades Formadoras de Focos (UFF). Para esto, células VeroE6 fueron sembradas sobre placas de 12 pocillos y mantenidas hasta una confluencia de 90%. A partir del stock viral descrito anteriormente, se prepararon diluciones seriadas 1/10 hasta la

dilución final $1/10^{-6}$. Posteriormente, 200 μL de cada dilución se depositó sobre células VeroE6, previa eliminación del medio de cultivo. Luego se dejó adsorber las partículas virales por 1 hr 30 min en la estufa a una atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C en agitación. Pasado el tiempo de adsorción del virus se eliminó el medio. Posteriormente se agregó 1mL de medio DMEM suplementado con 2% SFB, 1% penicilina/estreptomicina y 2,4% metilcelulosa (MD512-1006, Sigma). Luego de 7 días, el medio se eliminó y se lavaron las células 3 veces con PBS 1X. Para fijar las células se agregó 1 mL de metanol frio (-20°C) 0,5% de H_2O_2 y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. La solución de fijación se eliminó y las células se lavaron 3 veces con PBS 1X.

La visualización de las UFF se realizó mediante la técnica de inmunoperoxidasa. Cada pocillo fue incubado con 200 μL de anticuerpo primario policlonal anti-N-ANDV (dilución 1:1000) por 1 hr a 37°C . Pasado el tiempo de incubación se lavó 3 veces con PBS 1X por 5 min. Luego, 200 μL del anticuerpo secundario anti-conejo conjugados a la enzima peroxidasa de rabanita (HRP) (dilución 1:1000) fue agregado a cada pocillo y se incubó por 1 hr a 37°C . Pasado el tiempo de incubación se lavó con PBS 1X 3 veces por 5 min. Posteriormente se agregó 200 μL del substrato DAB (diaminobenzidine) 1X, diluido en tampón substrato peroxidasa (Thermo scientific) y se incubó a temperatura ambiente por 30 min en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación se lavó con agua destilada y se procedió a contar los focos bajo el microscopio óptico. El cálculo del título viral se realizó en base al número de focos de la última dilución.

2.4 Infección de células VeroE6 con ANDV

Se sembraron 2×10^5 de células VeroE6 en placas de 3 mm sobre cubre objetos redondos de 1,5 cm de diámetro. Se utilizó un MOI de 0,5 de la cepa CHI-9713 para la infección de las células VeroE6, previa aspiración del medio de cultivo. Luego se incubó por 1 hr 30 min en una estufa a una atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C en agitación. Pasado el tiempo de adsorción del virus se eliminó el medio y se reemplazó por DMEM complementado con 2% SFB. Luego, a los distintos tiempos requeridos post infección, se eliminó medio de cultivo y se lavó las células con PBS 1X. Las infecciones con ANDV se realizaron en un laboratorio de bioseguridad nivel 3 (BSL-3) (Centro de Investigaciones Médicas, Escuela de Medicina, PUC).

2.5 Infección de Hámster Sirio Dorado con ANDV

Los animales Hámster Sirio Dorado se anestesiaron con la droga ketamina (3 mg/100g de peso corporal) con una inyección intramuscular, para luego ser infectados con 2×10^5 (PFU)/mL de ANDV, cepa Andes/ARG (5) obtenidos de los sobrenadantes de células VeroE6 infectadas. Los animales controles fueron inoculados con sobrenadantes de células VeroE6 no infectadas. Después de la infección, los animales fueron colocados en una jaula dentro de un medio ambiente aséptico con presión negativa de aire (A130SN-

Flufrance) en una instalación para animales de uso exclusivo para estos experimentos. (Administración nacional de laboratorios e institutos de Salud, Departamento de Virología, B. Aires, Argentina). El desarrollo de la enfermedad se evaluó por falta de movimiento, inapetencia y disnea. A los 8 d.p.i, los animales fueron sacrificados y el tejido pulmonar se fijó por inmersión en líquido de Bouin (ácido pícrico 33%, formaldehído 30% y ácido acético glacial) durante 2-3 días. A continuación, las muestras de tejido se deshidrataron con alcohol y fueron embebidos en parafina. Las muestras se seccionaron en serie (4-6 μm de espesor) y se utilizaron para tinción por inmunohistoquímica (IHQ).

2.6 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anticuerpo monoclonal anti-actina (69100, MP, Biomedicals), anticuerpo monoclonal anti-HA (H 9658, Sigma-Aldrich), anticuerpo monoclonal anti-poliHistidina (anti-His) (H1029, Sigma-Aldrich), anticuerpo policlonal anti-poliHistidina (anti-His) (CAPPEL 59257; MP Biomedicals), anticuerpo monoclonal anti-NSs-ANDV (NS2-5E7/D9) (Dra. Nicole Tischler), anticuerpo monoclonal anti-NSs-ANDV (NS2-2B11/C2) (Dra. Nicole Tischler), anticuerpo monoclonal Anti-N-ANDV (Dra. Nicole Tischler) (80-82), anticuerpo policlonal anti-N (4), anticuerpo policlonal anti-IRF-3 (sc-9082, Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo policlonal anti-p65 (sc-109, Santa Cruz Biotechnology).

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anticuerpo anti-ratón hecho en cabra conjugado con Alexa Fluor® 488 (A11001, Life technologies™), anticuerpo anti-ratón hecho en cabra conjugado con Alexa Fluor® 555 (A21422, Life technologies™), anticuerpo anti-conejo hecho en cabra conjugado con Alexa Fluor® 555 (A21429, Life technologies™), anticuerpo anti-ratón hecho en cabra conjugado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (172-1806; KPL Inc.), anticuerpo anti-mouse conjugado a la enzima peroxidasa de rabanito (HRP) (074-1806; KPL Inc).

2.7 Plásmidos

Los plásmidos utilizados durante el desarrollo de esta tesis fueron: pN-ANDV que codifica para la proteína N de ANDV, pNSs-ANDV que codifica para la proteína no estructural del segmento S (NSs) de ANDV(83) ambas proteínas están fusionados al tag de Histidina. Como control de una proteína irrelevante para este estudio se utilizó pUNR-His (*Upstream of N-ras*) (Tesis doctoral María Inés Barría) y como plásmido de relleno se utilizó psP64 (Promega), pEGFP-C1-hIRF3 que codifica para el factor de regulación de interferón (IRF3) fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP, *green fusion protein*) (84) y el plásmido pNS1-Influenza que codifica para la proteína no estructural 1 (NS1) del virus Influenza (85) donados por el Dr. Adolfo García-Sastre, Mount Sinai School of Medicine, NY, USA. El plásmido pVEOZ-VP35, que codifica para la proteína VP35 del virus Ebola-Zaire (84) fue donado por el Dr. Yoshihiro

Kawaoka, University of Wisconsin-Madison, Madison, USA. Para realizar el ensayo de activación del promotor $\text{INF-}\beta$, se utilizó un plásmido con dicha región promotora río arriba del gen reportero luciferasa de Luciérnaga (FLuc) denominado p125-Luc (85), donado por el Dr. García-Sastre. Para realizar el ensayo con el promotor $\text{NF}\kappa\text{B}$, se utilizó un plásmido pIgK-Luc que presenta dicha región promotora comandando la expresión del gen reportero luciferasa de Luciérnaga (86), donado por Dr. Zheng Xing (Veterinary and Biomedical Sciences, University of Minnesota, Minnesota).

2.8 Inmunofluorescencia



Células VeroE6 fueron sembradas sobre cubre objetos redondos y luego transfectadas con los plásmidos pN-ANDV, pNSs-ANDV, pUNR-His, pEGFP-IRF3 o infectadas con ANDV cepa CHI-7913. Las muestras fueron fijadas con paraformaldehído 4% (Merck) en PBS 1X por 15 min. Luego las células se bloquearon y permeabilizaron con una solución PBS 1X con 1% de BSA y 0,3% Tritón X-100 por 30 min a temperatura ambiente en una cámara húmeda. La expresión de las proteínas fue detectada por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) usando los anticuerpos correspondientes diluidos en PBS 1X 1% BSA. Posteriormente, se incubó con los anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal anti-NSs NS2-5E7/D9 de ANDV a la dilución 1:200 por 16 hrs, anticuerpo monoclonal anti-N de ANDV a la dilución 1:200 por 16 hrs, anticuerpo policlonal anti-N de ANDV a la dilución 1:800 por 2 hrs, anticuerpo policlonal anti-

IRF-3 a la dilución 1:200 por 2 hrs, anticuerpo policlonal anti-p65 diluido 1:200 por 2 hrs, anticuerpo monoclonal anti-His a la dilución 1:200 por 2 hrs, anticuerpo policlonal anti-His a la dilución 1:200 por 2 hrs. Todos los anticuerpos fueron diluidos en BSA al 1% en PBS 1X. Pasado el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se lavó 3 veces por 5 min con PBS 1X más Tween-20 al 0.01 %. Como anticuerpos secundarios se utilizaron los anticuerpos anti-ratón hechos en cabra conjugado con Alexa Fluor® 488 (color verde), el anticuerpo anti-ratón hecho en cabra conjugado con Alexa Fluor® 555 (color rojo) y el anticuerpo anti-conejo hecho en cabra conjugado con Alexa Fluor® 555 (color Rojo), todos diluidos 1:200 en 1% de BSA en PBS 1X e incubados por 2 hrs en una cámara húmeda. Para las inmunofluorescencias dobles, se incubaron los distintos anticuerpos hechos en ratón más los anticuerpos hechos en conejo, y se utilizaron los anticuerpos secundarios correspondientes. Los núcleos celulares fueron teñidos con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) diluido 1:1500 en PBS 1X por 7 min. Pasado el tiempo de incubación se realizó 3 lavados de 5 min con PBS 1X más Tween-20 al 0.01 %. Los cubreobjetos redondos fueron montadas con medio de montaje de fluorescencia (DAKO) sobre los porta objetos.

Las muestras fueron observadas y analizadas en los microscopios: Olympus con un objetivo de 40X, acoplada a la cámara fotográfica MicroPublisher 3.3 RTV IEEE 1394 y las imágenes fueron visualizadas con el programa QCapture Pro 6. Las imágenes de microscopia confocal fueron obtenidas utilizando el microscopio Nikon Eclipse, C2si, se

utilizó el objetivo Apo VC 60x, AN1.4. Las imágenes se visualizaron con el programa Nis Elements AR 4.0.

2.9 Western blot

Se sembraron 2×10^5 células VeroE6 en placas de 30 mm y transfectadas con el plásmido pNSs-ANDV o pN-ANDV. Pasado las 48 hrs post transfección (h.p.t), las células fueron lisadas con 50 μ L de tampón RIPA 1X (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % NP-40, 1 % ácido desoxicolato de Sodio, 2,5 mM pirofosfato de sodio, 1 mM β - Glicerofosfato, 1 mM Na_3VO_4 , 1 μ g/mL leupeptina) por 15 min a 4°C. Los homogenizados se recolectaron y se centrifugaron a 14.000 r.p.m por 20 min a 4°C. El sobrenadante fue rescatado y la concentración de proteínas totales se cuantificó mediante el ensayo de Bradford usando el reactivo "Bio-Rad Protein Assay" (Bio-Rad) según instrucciones del fabricante. Estos extractos se utilizaron para realizar la detección de las proteínas por la técnica de *Wester blot*.

De los lisados obtenidos de los ensayos de luciferasa se utilizó 1,5 μ L para cuantificar la concentración total de proteínas por espectrofotometría (Nanodrop 1000, Thermo Scientific). Se utilizaron 20 μ g de proteína total, utilizando un tampón de carga 2X (4g SDS, 20 mL glicerol, 25 mL Tris Cl/SDS, pH 6,8, 2 mL M 2-mercaptoetanol; 1 mg Azul

de bromofenol, 100 mL H₂O) y fueron resueltos en un gel de tricina-SDS-poliacrilamida denaturante al 15%, utilizando con tampón Tris-Tricina (Tampón cátodo: 0,1 M Tris, 0,1 M tricina y 0,1 % SDS; Tampón Ánodo: 0,02 M Tris-HCl pH 8,9) a 100V constante y transferidos a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) en tampón de transferencia (0,25 M Tris-HCl pH 8,3, 192 mM Glicina, 10 % SDS y 20 % metanol) por 1 hr a 100V constante. Posteriormente las membranas se incubaron por 1 hr en solución de bloqueo (PBS 1X al 0.05% de Tween 20 con 5% de leche en polvo descremada Svelty, Nestlé). A continuación las membranas se incubaron con el anticuerpo correspondiente diluido en PBS 1X al 0,01% de Tween 20, el anticuerpo anti-NSs (NS2-2B11/C2) fue diluido 1:200 e incubado por 16 hrs, el anticuerpo anti-actina fue diluido 1:5000 incubado por 2 hrs, el anticuerpo anti-HA fue diluido 1:10000 incubado por 2 hrs, el anticuerpo anti-polihistidina monoclonal diluido 1:3000 incubado por 2 hrs. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-mouse conjugado a la enzima peroxidasa de rabanito (HRP) a una dilución de 1:10000 por 1 hr (074-1806; KPL Inc). La reacción enzimática se visualizó por quimioluminiscencia utilizando el kit SuperSignal® West Femto sensitivity substrate (Thermo Scientific). La membrana se expuso sobre los films autoradiográfico (Fuji) y se reveló con los reactivos fotográficos correspondientes (058K073, 0377K0753, Kodak).

2.10 Inmunohistoquímica

Para la inmunohistoquímica, se utilizó el método de la inmunoperoxidasa descrita por Sternberger et al. (87). Cortes de tejido de pulmón de Hámster Sirio Dorado fueron montados sobre porta objetos, y a continuación se desparafinaron e hidrataron en envases de coplin con Xilol I y Xilol II por 10 min cada uno. A continuación la muestra fue tratada con Etanol absoluto, etanol 95%, etanol 80% y etanol 70% por 5 min cada uno. Luego los cortes fueron hidratados con agua destilada. Con el fin de inactivar la peroxidasa endógena, las muestras se trataron con 3% de H₂O₂ durante 15 min y luego se lavó con agua destilada durante 5 min. Para el desenmascaramiento de los epítomos se utilizó una solución de ácido cítrico 10 mM pH 6.0 la cual fue incubada con el corte de tejido en un horno microonda a potencia media 3 veces por 4 min. Posteriormente, los cortes fueron incubados con los anticuerpos primarios Anti-N ANDV diluido 1:2000 o anti-NSs ANDV diluido 1:200. Cada anticuerpo fue diluido en tampón Tris, pH 7,8, que contiene 0,7% de carragenina de tipo lambda, soluble en frío, no gelificante (Sigma), 0,5% de Triton X-100 (Sigma). La incubación se realizó en una cámara húmeda durante 16 hrs a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron lavadas 3 veces por 5 min con PBS 1X con Tris-HCl pH 8,5 y luego se utilizó el método de la biotina-estreptavidina-peroxidasa utilizando el kit DAKO (DAKO LSAB + System-HRP, K0679 Kit). El anticuerpo secundario conjugado con biotina se detectó con estreptavidina-HRP (DAKO LSAB + System-HRP) y se visualizó mediante el uso del reactivo DAB. La tinción nuclear fue realizada utilizando por método

hematoxilina/eosina por 1 min. Posteriormente los cortes fueron deshidratados en envases de coplin que contenían etanol 70%, etanol 80%, etanol 95%, y etanol absoluto por un minuto por cada uno. Luego se utilizó Xilol fenicado, Xilol I y Xilol II cada uno por 5 min. Para el montaje de los cortes se utilizó Bálsamo de Canadá, resina líquida que se utiliza para la conservación de la muestra.

Como control de la especificidad de la técnica, se utilizó el tejido de pulmón de Hámster Sirio infectado pero se omitió el anticuerpo primario. Los controles negativos se realizaron a partir de pulmones de hámster sirio no infectados. Las muestras se observaron en un microscopio Zeiss Axoskope A1 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania) acoplado a una cámara de vídeo digital Nikon DXM1200. (Colaboración con la Dra. Carola Otth, Instituto de Microbiología Clínica, U. Austral de Chile).

2.11 Inducción con poly(I:C)

Para los experimentos de translocación de la proteína p65, células VeroE6 sembradas en placas de 12 pocillos fueron transfectadas con 2 µg de poly (I: C) (TLR-pic, InvivoGen, San Diego, CA). Pasado 6 h.p.t, las células se fijaron y se utilizaron para la detección de los diversos anticuerpos por la técnica de inmunofluorescencia (ver sección 2.8). Para los experimentos de translocación de la proteína IRF-3 se añadió directamente poly (I:C) en el medio de cultivo a una concentración final de 20 µg/mL. Para la activación del promotor INF-β se añadió directamente poly (I:C) en el medio de cultivo a una

concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para la activación del promotor de NF κ B se añadió directamente poly (I:C) en el medio de cultivo a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{uL}$ (88).

2.12 Ensayo de activación de los promotores de INF- β y NF κ B

Se contaron $9,6 \times 10^5$ células VeroE6, las cuales fueron transfectadas en suspensión con 2,4 μg del plásmido pINF- β -Luc o pIgK-Luc usando lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante, luego fueron sembradas en placas de 12 pocillos. Pasado 4 h.p.t se cambió el medio de cultivo y se transfectó con los plásmidos pNS1-Influenza, pVP35-VEOZ y pNSs-ANDV a las concentraciones 0,25, 0,5 y 1,0 μg por pocillo. El plásmido pSP64 fue utilizado como plásmido de relleno de manera de asegurar que todos los pocillos fueron transfectados con igual cantidad de DNA. 24 h.p.t las células fueron tratadas con poly(I:C) por 24 hrs. Pasado este tiempo las células fueron lisadas con 50 μL de tampón de lisis pasiva 1X (Promega). 20 μl de lisado fueron utilizados para medir la actividad luciferasa de Luciérnaga utilizando 15 μL tampón de luciferasa I (LARI) (Promega) siendo medida su luminiscencia en un luminómetro (Sirius Berthold Lumat 9507, Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim, Alemania).

2.13 Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular en presencia de las proteínas virales se determinó utilizando el kit comercial 96® Aqueous One Solution (G3580, Promega). Para esto, células VeroE6 fueron transfectadas en suspensión con 0,25 o 1,0 µg/µL del plásmido que codifica para la proteína NS1 de Influenza, la proteína VP35 del Ebola Zaire o de la proteína NSs-ANDV. 24 h.p.t según se describe en la sección 2.12 y luego se sembró 10.000 células por pocillos, en una placa de 96 pocillos. 22 h.p.t se agregó 20µl del reactivo CellTiter 96® AQueous One Solution por pocillo y la reacción fue incubada por 2 hrs en estufa de cultivo a 37°C con una atmosfera con 5% de CO₂. Cumplido el plazo de incubación, se midió la absorbancia a 490 nm de longitud de onda en un lector de microplacas (biochrom EZ read 400). La viabilidad de las células en ausencia de las proteínas virales se fijó como 100%.

2.14 Detección de RNA de ANDV mediante RT-PCR

Para la extracción y análisis de RNA viral desde células VeroE6 infectadas a las 2, 6, 12, 24, y 48 h.p.i. se extrajo el RNA utilizando el kit High Pure viral nucleic acid (Roche Molecular Biochemicals) siguiendo el protocolo del fabricante. Los RNAs se resuspendieron en 20 µL con agua libre de nucleasas y posteriormente 3 µL de RNA

fueron utilizados para las reacciones de RT-PCR utilizando el kit SuperScript III One-Step RT-PCR con Platinum Taq (Invitrogen). Las secuencias de los partidores utilizados para amplificar la región codificante del segmento S de ANDV son: 5'ACA CGA ACA ACA GCT CGT GAC '3 para el partidor sentido, y 5'AGG CTC AAG CCC TGT TGG ATC '3 para el partidor anti-sentido. Como control positivo se utilizó RNA extraído desde sobrenadante de células VeroE6 infectadas, y como control negativo se utilizó RNA extraído de células no infectadas. Los ciclos térmicos para la reacción de RT-PCR fueron de 50°C durante 30 min y 95 °C durante 10 min seguido de 35 ciclos a 95°C durante 30 seg, 60°C durante 30 s y 72 °C durante 30 seg, con una extensión final de 72°C durante 10 min. Los amplicones fueron analizados mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 2% para confirmar el tamaño del producto de PCR.



3. RESULTADOS

3.1 Expresión de la proteína NSs-ANDV en el contexto de una infección viral *ex vivo*

3.1.1 Detección de las proteínas N y NSs-ANDV por las técnicas de Western blot e inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Con el fin de estudiar la proteína NSs-putativa de ANDV se procedió primero a desarrollar y validar las herramientas experimentales necesarias. En este contexto se desarrollaron anticuerpos monoclonales específicos contra el extremo C-terminal de la proteína NSs-ANDV cepa CHI-7913 (colaboración con la Dra. Nicole Tischler). En paralelo se desarrolló un sistema de expresión para la proteína NSs-putativa recombinante con un tag de GST (NSs-GST), con un "tag" de histidina (pNSs-ANDV). Los anticuerpos fueron seleccionados por su capacidad de reconocer la proteína recombinante NSs-GST en estado nativo o denaturado en un ensayo de inmunoblot (SIA) (Descrito en la tesis doctoral, Jorge Vera-Otárola) (113). Los anticuerpos seleccionados fueron denominados: NS2-2B11/C2, el cual reconoce la proteína NSs-GST recombinante en estado denaturado y NS2-5E7/D9 capaz de reconocer la proteína NSs-GST recombinante en estado nativo (83).

especifico anti-NSs. Como control adicional células VeroE6 se transfectaron con el plásmido pN-ANDV. La proteína fue detectada utilizando los anticuerpos anti-His y el anticuerpo monoclonal específico para la proteína N-ANDV (Figura 9A y Figura 9B).

Posteriormente, se evaluó la expresión de la proteína recombinante NSs-ANDV mediante IFI, utilizando el anticuerpo anti-NSs-ANDV (NS2-5E7/D9). Para ello se transfectó el plásmido pNSs-ANDV en células VeroE6 sembradas sobre cubre objetos. Como experimento control, células VeroE6 fueron transfectadas con el plásmido pN-ANDV (Figura 8A). Las células transfectadas fueron fijadas y la expresión de la proteína N de ANDV fue evaluada usando el anticuerpo policlonal anti-His y el anticuerpo monoclonal específico para proteína N descrito por Tischler y cols (89). Como se observa en la figura 10, paneles A y B, ambos anticuerpos, anti-His y anti N-ANDV, detectan la proteína N de ANDV, no así el anticuerpo NS2-5E7/D9 desarrollado para detectar de manera específica la proteína NSs-ANDV.

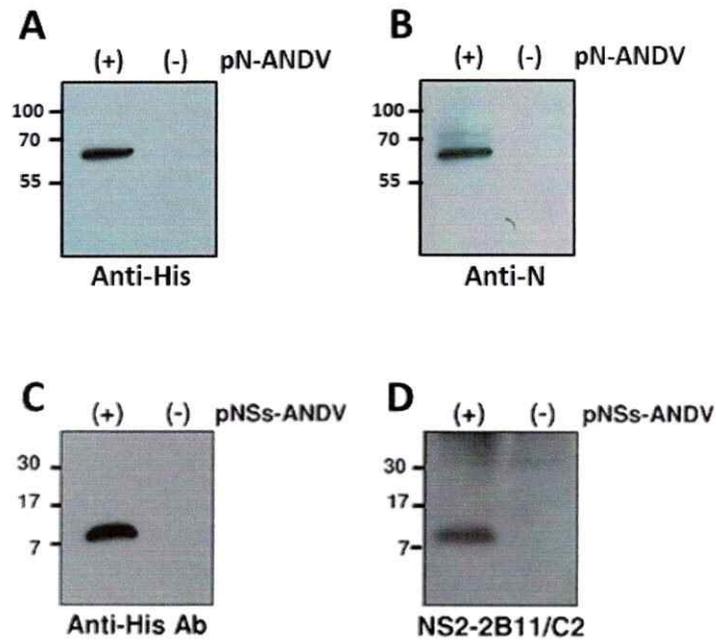


Figura 9. Expresión transiente de las proteínas NSs-ANDV y N-ANDV detectadas por *Western blot*. Los plásmidos pN-ANDV y pNSs-ANDV fueron transfectados en la línea celular VeroE6. A las 48 hrs post transfección se extrajeron las proteínas totales. La expresión de las proteínas recombinantes se detectó por la técnica de *Western blotting* utilizando los anticuerpos monoclonales anti-His (A) y (C), para detectar de forma específica las proteínas se utilizó el anticuerpo anti-NSs monoclonal NS2-2BII/C2 (B) y el anticuerpo anti-N (D).

Luego se procedió a transfectar el plásmido pNSs-ANDV en las células VeroE6 (Figura 8B) en las células VeroE6. Las células fueron fijadas y se procedió a la detección de la proteína recombinante NSs ANDV usando el anticuerpo policlonal anti-His y el anticuerpo monoclonal anti-NSs NS2-5E7/D9 (Figura 10 A,B). La proteína recombinante His-NSs de ANDV fue detectada con el anticuerpo policlonal anti-His y el anticuerpo monoclonal anti-NSs ANDV NS2-5E7/D9, pero no con el anticuerpo anti N ANDV (Figura 10B). El análisis de las imágenes obtenidas al utilizar el anticuerpo policlonal anti-His y el anticuerpo monoclonal anti-NSs NS2-5E7/D9 muestra que ambos colocalizan (Figura 10B, merge). Esta observación sugiere que ambos anticuerpos reconocen a la proteína NSs-ANDV. La imagen muestra además que la proteína NSs-ANDV presenta una distribución granular citoplasmática (Figura 10B). Esta localización difiere de aquella exhibida por la proteína N-ANDV, la cual presenta una distribución citoplasmática. Esta última observación está en acuerdo a lo descrito previamente en la literatura para la proteína N-ANDV (81).

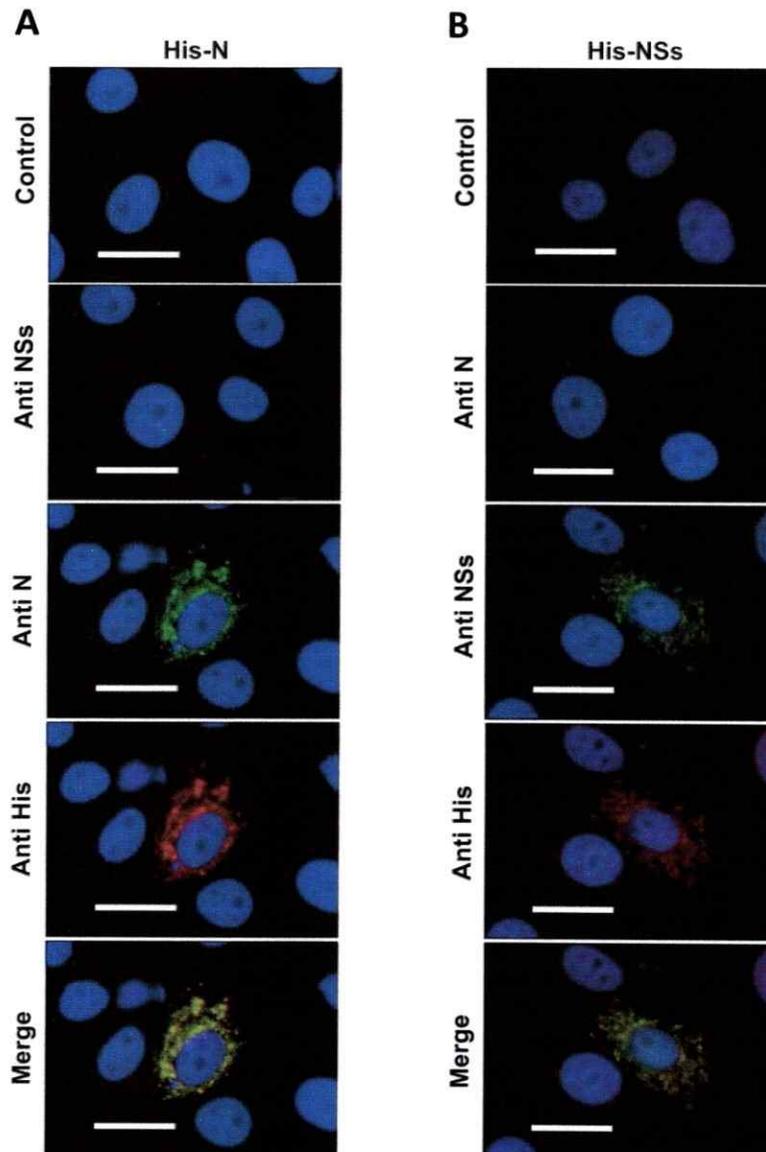


Figura 10. Expresión transiente de las proteínas N-ANDV y NSs-ANDV, detectadas por inmunofluorescencia. Proteína N-ANDV (A) o proteína NSs-ANDV (B), las muestras fueron fijadas y la expresión de las proteínas detectada por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) usando un anticuerpo policlonal anti-His, un anticuerpo monoclonal anti-NSs NS2-5E7/D9 o anticuerpo anti-N de ANDV. Como anticuerpos secundarios se utilizaron los anticuerpos hechos en cabra anti-ratón conjugado con FITC (color verde) y el anticuerpo hecho en cabra anti-conejo Alexa Fluor 555 conjugado (color Rojo). Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (color azul). El tamaño de las barras corresponde a 20 μm .

Para validar los resultados obtenidos con el anticuerpo anti-NSs (Figura 10) y establecer que el anticuerpo detecta la proteína NSs-ANDV y no el tag de Histidina (His) acoplado a ella, se realizó una serie de transfecciones con los plásmidos pNSs-ANDV, pN-ANDV, y una proteína no relacionada, *upstream of N-ras* (UNR) acoplada al mismo tag (His-UNR). Como se observa en la figura 11, se utilizaron los anticuerpos anti-His y el anticuerpo específico para la proteína NSs NS2-5E7/D9. Como se observó en la Figura 10B, el anticuerpo NS2-5E7/D9 es específico para la proteína NSs y no tiene reacción cruzada con la proteína His-N de ANDV (Figura 10A) ni con la proteína His-UNR (Figura 11). Esto confirma que el anticuerpo anti-NSs no reconoce al tag de histidina acoplado a la proteína.

3.2 Detección *ex vivo* de la proteína NSs-ANDV durante la infección viral en células VeroE6.

Habiendo desarrollado y validado las herramientas necesarias para detectar las proteínas virales, se procedió a evaluar si la proteína NSs-ANDV se expresa en el contexto de una infección viral. Para esto procedió a infectar la línea celular VeroE6 con el aislado de ANDV CHI-7913 (4). Las infecciones con ANDV se realizaron en un laboratorio de bioseguridad tipo 3 (BSL-3) (Centro de Investigaciones Médicas, Escuela de Medicina, PUC) siguiendo los protocolos de seguridad establecidos por la institución. Como control de infección se detectó la proteína N de ANDV. Utilizando los anticuerpos específicos anti-NSs-ANDV y anti-N-ANDV se procedió a evaluar la presencia de las

proteínas virales por la técnica de inmunofluorescencia indirecta a las 6 , 12 , 24 y 48 horas postinfección (h.p.i) (Figura 12A). Los resultados muestran que ambas proteínas virales, N y NSs, son detectadas a lo largo del ensayo, 6, 12, 24 y 48 h.p.i. Como se observó en la expresión transiente de His-NSs (Figura 10B), en el contexto de una infección la proteína NSs-ANDV también presenta una distribución granular y citoplasmática (Figura 12A). Como control adicional de la infección de ANDV, se procedió a evaluar la presencia del RNA-S. (RNA-S genómico, SmRNA, y RNA complementario) a las 2, 6, 12, 24, y 48 h.p.i. (Figura 12B). Para esto el RNA total fue extraído desde las células infectadas como se explica en la sección 2.14. Los resultados muestran que el RNA-S comienza a ser detectado a partir de las 6 h.p.i. Esta observación confirma que en las células infectadas ANDV replica. En resumen los resultados demuestran que la proteína NSs-ANDV es expresada durante la infección viral en células VeroE6. Además se establece que la distribución de la proteína NSs es similar a lo que se ha descrito previamente para la proteína NSs del hantavirus TULV (41). Por tanto se concluye que la proteína NSs se expresa en el contexto de una infección viral.

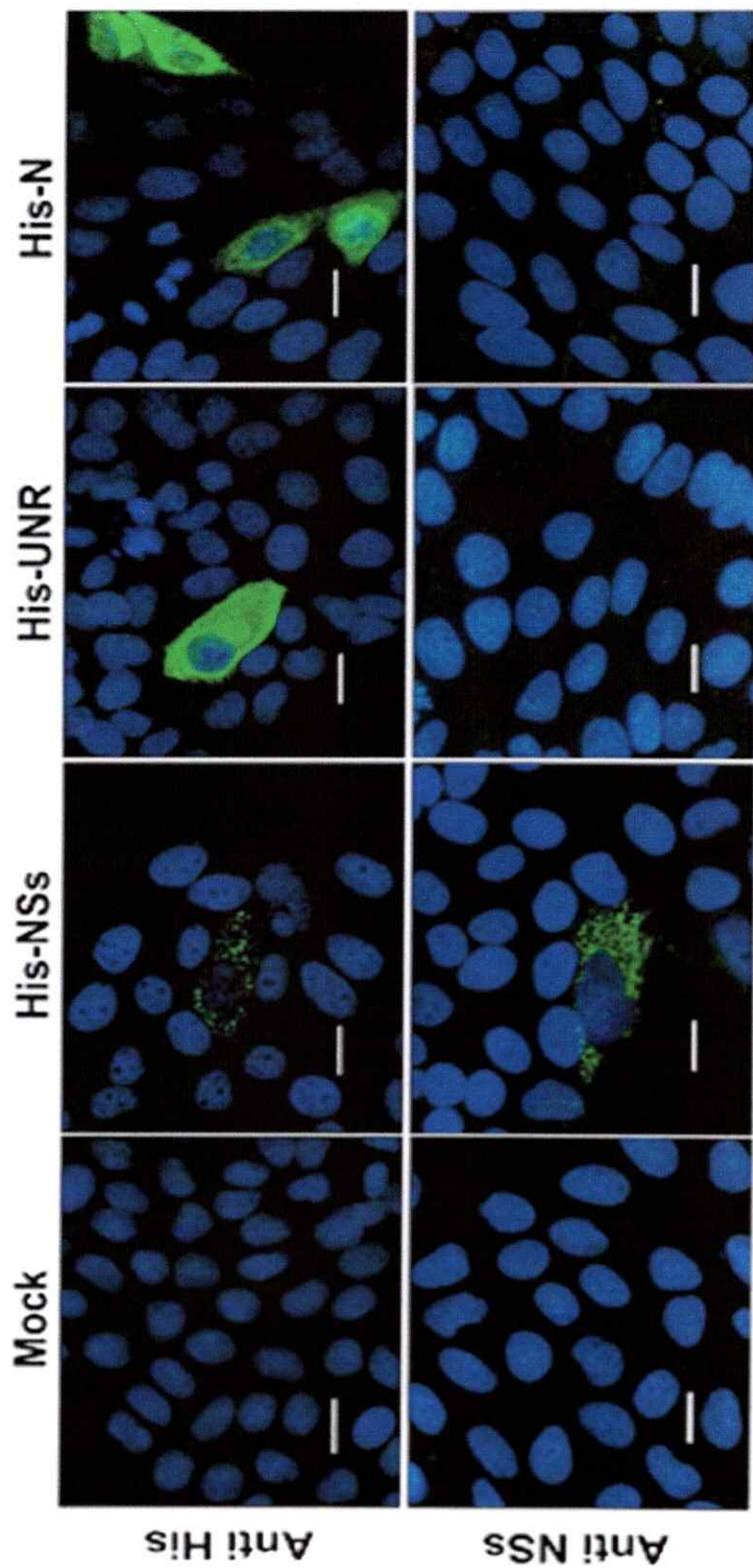


Figura 11. Células VeroE6 fueron transfectadas con los plásmidos pNSs-ANDV, pN-AND y pHis-UNR y detectadas por inmunofluorescencia. Se utilizaron los anticuerpos anti-His monoclonal (color verde). La proteína His-NSs de ANDV fue específicamente detectado por NS2-5E7/D9, por anticuerpo anti-mouse marcado con FITC (color verde). Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (color azul). El tamaño de las barras corresponde a 20 μm .

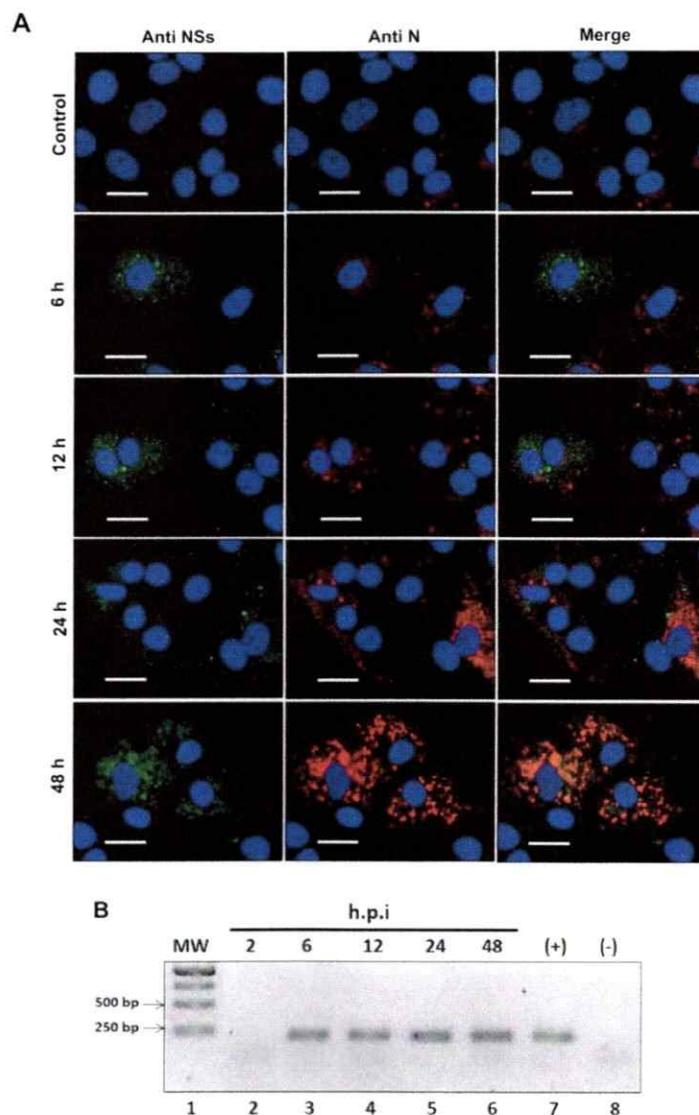


Figura 12. Detección de la proteína NSs-ANDV en células VeroE6 infectadas. **(A)** Se utilizó la cepa CHI-7913 y a las 6, 12, 24 y 48 h.p.i, las células fueron fijadas y la presencia de la proteína NSs-ANDV fue evaluada por IFI usando un anticuerpo NS2-5E7/D9 detectado por un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a FITC (color verde). En forma paralela se detectó la proteína N-ANDV usando un anticuerpo policlonal detectado por un anticuerpo secundario anti-conejo Alexa 555 (color rojo). Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (color azul). El tamaño de las barras corresponde a 20 μ m. **(B)** Extracción total de RNA desde células infectadas a distintos h.p.i y usando una reacción RT-PCR para amplificar específicamente el S-RNA viral. El ensayo incluye un control positivo de células VeroE6 infectadas (stock viral, carril 7), un control negativo el que corresponde a agua (carril, 8). MW corresponde al marcador de peso molecular (carril 1).

3.3 Detección *in vivo* de la proteína NSs-ANDV durante la infección viral en Hámster Sirio Dorado.

Una limitante importante de los resultados anteriores es que muestran la expresión de la proteína NSs-ANDV sólo en el contexto de una infección en cultivo celular. Con el fin de validar las conclusiones anteriores se procedió a evaluar si la proteína NSs-ANDV se expresa en el contexto de una infección en roedores. En el año 2001, Hooper y cols establecieron que el animal Hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*) podía ser utilizado como un modelo animal para el estudio de (90). El hámster Sirio cuando es inoculado con ANDV desarrolla una neumonía grave con edema pulmonar, que se asemeja al HCPS desarrollando una enfermedad histopatológicamente similar a la del humano (90, 91). Basados en estos antecedentes y en colaboración con la Dra. Paula Padula (Administración nacional de laboratorios e institutos de Salud, Departamento de Virología, B. Aires, Argentina), se procedió a infectar Hámster Sirio con ANDV cepa Andes/ARG aislado desde pulmón de ratón *O. longicaudatus* capturado en bosque patagónico en Argentina (5, 91). Luego se realizaron cortes histológicos de pulmón para determinar la expresión de la proteína NSs-ANDV mediante la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) (Colaboración con la Dra. Carola Otth, Instituto de Microbiología Clínica, U. Austral de Chile). Basado en experiencias anteriores del grupo de la Dra. Paula Padula (92) se procedió a evaluar la presencia de la proteína NSs-ANDV en los cortes del tejido de pulmón del Hámster a los 8 d.p.i con el anticuerpo específico anti-NSs (NS2-5E7/D9) descrito anteriormente en la sección 2.10. Como

controles de infección se detectó la proteína N con un anticuerpo anti-N de ANDV (81). Como controles negativos se utilizó un tejido de pulmón de hámster no infectado y se utilizó el anticuerpo anti-N (Figura 13A), el anticuerpo anti-NSs (Figura 13B). Como tercer control se utilizó un tejido de pulmón de hámster infectado donde durante el proceso de detección se omitió el anticuerpo primario, y se utilizó sólo el anticuerpo secundario anti- ratón (Figura 13C).

Los resultados muestran que ambas proteínas virales son detectadas a las 8 d.p.i utilizando anticuerpos para la proteína N (Figura 13 D) y para la proteína NSs-ANDV (Figura 13 E). Esta observación es de gran relevancia ya que demuestra por primera vez la expresión de la proteína NSs-ANDV en el contexto de infección en un modelo *in vivo*.

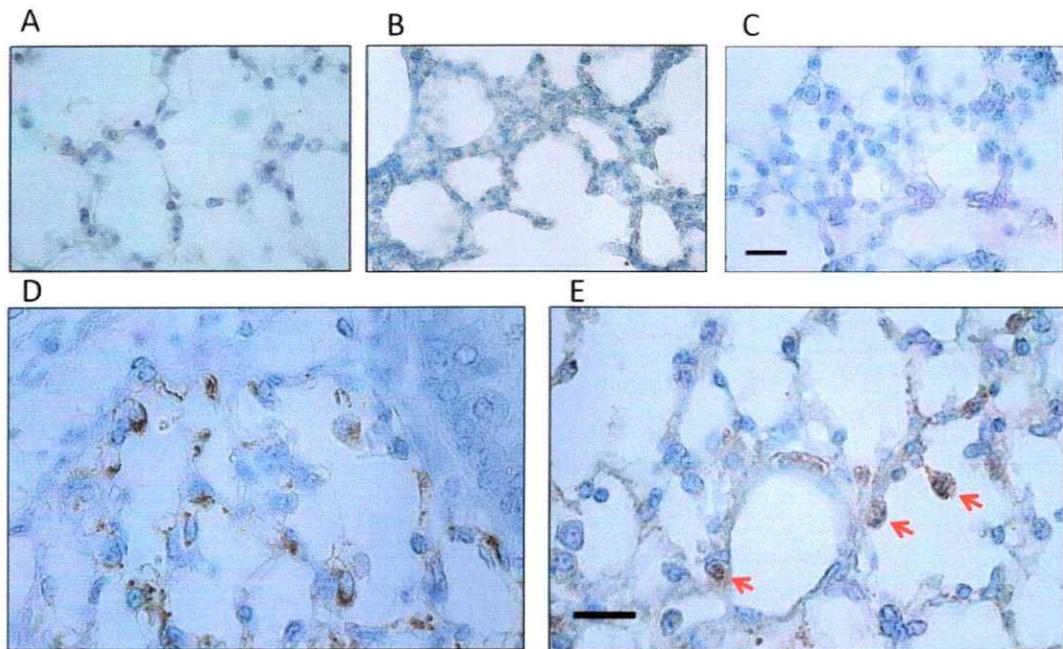


Figura 13. Detección de la proteína NSs-ANDV en tejido de pulmón de Hámster Sirio Dorado. A los 8 d.p.i. se realizó la técnica inmunohistoquímica. A) Como control negativo se utilizó tejido de pulmón de hámster no infectado detectado con el anticuerpo anti-N. B) Control negativo en tejido de pulmón de hámster no infectado se utilizó el anticuerpo anti-NSs. C) Como control de la técnica se utilizó un corte de tejido de pulmón de hámster infectado pero se omitió el anticuerpo primario. D) Detección de la proteína N de ANDV con un anticuerpo policlonal anti-N. E) Detección de la proteína NSs-ANDV usando el anticuerpo NS2-5E7/D9. El tamaño de las barras corresponde a 40 μm .

3.4. La proteína NSs-ANDV inhibe la activación del promotor de IFN- β

IFN- β es una citoquina que es inducida durante la infección viral y que activa diversos genes que codifican para proteínas con actividad antiviral (66). Durante la infección con ANDV en células endoteliales de pulmón se detectó IFN- β , indicador de la activación de la vía IFN-I (75). Levine y cols, observaron que las proteínas N y GPC de ANDV son capaces de inhibir la activación del promotor IFN- β , pero no en su totalidad (93). Como primera aproximación para determinar una posible función, de la proteína NSs-ANDV como modulador de la vía IFN-I, se evaluó su efecto sobre el promotor de IFN- β . Para ello se utilizó un plásmido que presenta la región promotora IFN- β río arriba del gen reportero luciferasa de luciérnaga (FLuc) (IFN- β -Luc) (94). Como control positivo de modulación de la vía IFN-I, se utilizaron las proteínas NS1 del virus Influenza y VP35 del virus Ebola Zaire, ambas descritas como capaces de inhibir la activación del promotor de IFN- β (86, 95, 96). A las 24 h.p.t, las células fueron estimuladas con el análogo de RNA de doble hebra, poly(I:C), una molécula conocida por inducir una respuesta inmune antiviral específica en las células y en diferentes modelos animales (97, 98). El efecto de las proteínas virales sobre el promotor fue evaluado al determinar la actividad luciferasa (Figura 14C). Los mismos extractos utilizados para determinar la actividad FLuc fueron utilizados en un ensayo de *Western blot* para determinar la expresión de las proteínas virales (Figura 14A). Para la inmunodetección se utilizaron anticuerpos específicos contra los tag asociados a las proteínas NSs-ANDV, NS1 de Influenza y VP35 de Ebola Zaire, como se describió en la sección de Material y Método. Los

resultados confirman la expresión de las proteínas virales (Figura 14A). En paralelo se realizó un ensayo de viabilidad celular, demostrando, que la expresión de las proteínas virales no altera la viabilidad de las células VeroE6 (Figura 14B). Luego se procedió a determinar actividad Fluc, la cual se expresa como actividad luciferasa relativa (RLA), con respecto a la actividad FLuc obtenida en presencia de poly(I:C), pero en ausencia de las proteínas virales la cual se fijó como 100%. Como se esperaba en las células tratadas con poly(I:C) y transfectadas con el plásmido vacío se observó una fuerte inducción del promotor de IFN- β , pero esta inducción se bloqueó al transfectar las células con los plásmidos que expresaron las proteínas virales NS1, VP35, o NSs-ANDV, de una manera concentración dependiente (Figura 18C). Estos resultados sugieren que al igual que NS1 y VP35 (84, 96), la proteína NSs-ANDV inhibe la activación del promotor de IFN- β .

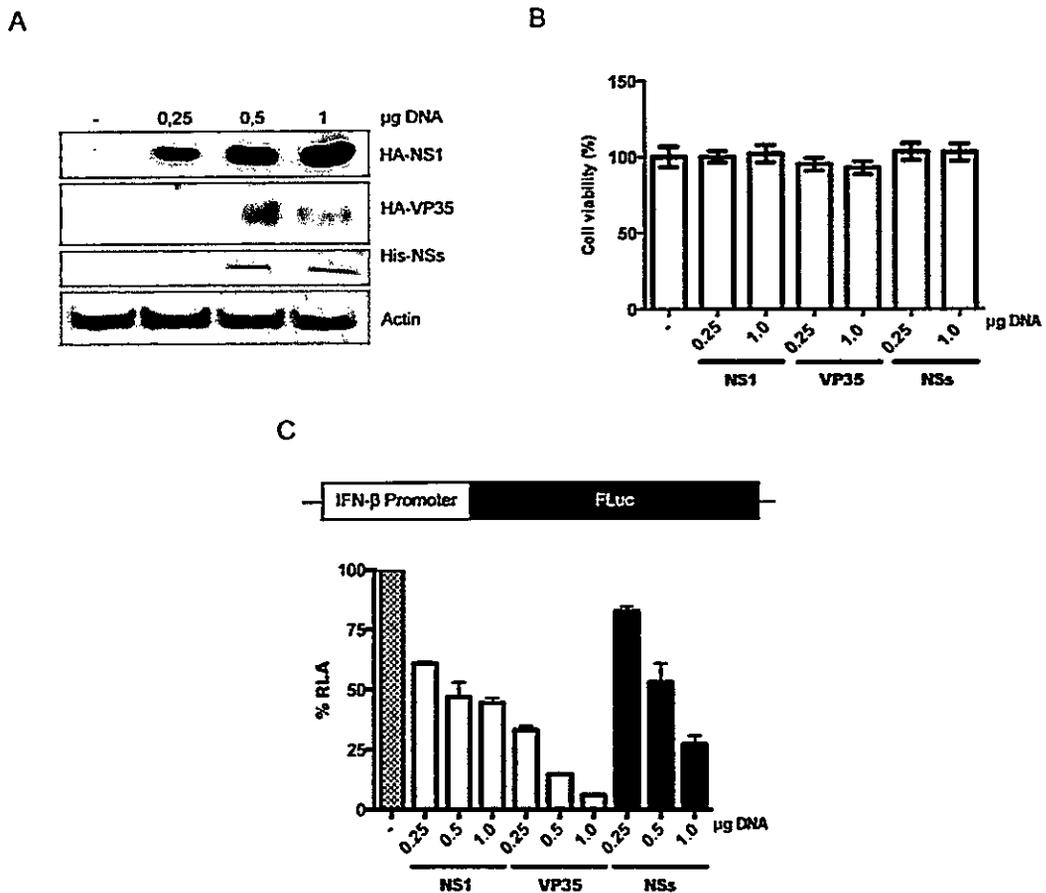


Figura 14. La proteína NSs-ANDV inhibe la activación del promotor IFN-β (A) Células VeroE6 fueron transfectadas con el plásmido psP64 o con 0.25, 0.5 o 1.0 µg/µL de un plásmido de expresión para la proteínas NS1 de Influenza, VP35-Ebola Zaire, o NSs-ANDV. La expresión de las diferentes proteínas se confirmó por WB. (B) Células VeroE6 fueron transfectadas con 0.25 o 1.0 µg/µL de un plásmido de expresión para la proteínas NS1, VP35, o NSs. 24 h.p.t se determinó la viabilidad celular utilizando el Ensayo de proliferación celular, CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega). (C) Esquema del plásmido pIFN-β-luc que contiene el promotor del IFN-β seguido del gen reportero de luciferasa de luciérnaga (Firefly). Células VeroE6 fueron transfectadas en suspensión con el plásmido pIFN-β-luc, luego las mismas células fueron transfectadas con 0.25, 0.5 o 1.0 µg/µL de un plásmido de expresión para la proteína NSs-ANDV. Como control positivo se utilizaron las proteínas NS1 y VP35. A las 24 h.p.t el promotor IFN-β fue inducido con poly(I:C), y a las 24 h. p.inducción se lisaron las células. Los valores se expresan en % de RLA. Células VeroE6 fueron transfectadas en suspensión

3.5 La Infección con ANDV en células VeroE6 no activa IRF-3

Spiropolou y col, observaron que durante la infección de células epiteliales de pulmón con ANDV, IRF-3 no transloca al núcleo, sugiriendo que ANDV antagoniza la activación de IRF-3 (75). IRF-3 es parte de los primeros factores transcripcionales que participan en la activación de la expresión de IFN-I en respuesta a la infección por virus (72, 99). Al activarse IRF-3 este desencadena una cascada de señalización que lleva finalmente a la expresión de proteínas con actividad antiviral (72, 99).

Dado que la proteína NSs-ANDV inhibe la función del promotor de IFN- β (Figura 14), se procedió a evaluar si la activación de IRF-3 es blanco para la NSs- ANDV. Se decidió realizar los experimentos utilizando células VeroE6, descritas como células permisivas a la infección y replicación de ANDV (4, 100). Estas células se caracterizan porque no expresan IFN-I debido a la ausencia del locus de los genes que lo expresan (101). Sin embargo, expresan todos los factores de transcripción que se requieren para la inducción de INF incluyendo los receptores para IFN-I. Se postuló que una ventaja asociada al uso de Vero E6 se relaciona con la ausencia de una respuesta a INF-I ya que esto permitiría observar sólo los eventos temprano de activación de la respuesta antiviral sin la consecuente amplificación de ella asociada a la expresión de los genes de respuesta a IFN-I.



Con el fin confirmar que las células VeroE6 son realmente un modelo adecuado para estudiar la activación temprana de la respuesta inmune innata, estas se estimularon con poly(I:C) (97, 98). En este experimento la activación de IRF-3 se determinó por inmunodetección usando un anticuerpo específico para IRF-3 (Figura 15). La activación de la proteína IRF-3 se determinó por inmunofluorescencia observando su translocación desde el citoplasma al núcleo celular. Como se observa en el control de células VeroE6 sin poly(I:C), IRF-3 presentan una localización citoplasmática (Figura 15). Sin embargo, al tratar las células con poly(I:C) se observó que IRF-3 transloca al núcleo, evento que confirma su activación (figura 15). Este resultado muestra además que el tratamiento con poly(I:C) activa las etapas tempranas la vía de señalización de INF-I en las células VeroE6 (Figura 15).

A continuación se procedió a determinar la activación de IRF-3 en VeroE6 durante una infección con ANDV. Para ello células VeroE6 fueron infectadas como se ha descrito previamente (81). El seguimiento de la activación de IRF-3 se realizó visualizando su translocación al núcleo. La replicación de ANDV en las células infectadas se evaluó detectando las proteínas virales N y NSs usando anticuerpos específicos (sección 3.2.). Los resultados mostraron que IRF-3 (Figura 16A y 16B) no translocan al núcleo durante la infección con ANDV. Estos resultados que recapitulan hallazgos reportados por otros autores (75), y sugieren que durante su replicación ANDV podría antagonizar la activación de IRF-3. Con el fin de evaluar esta posibilidad células VeroE6 infectadas con ANDV fueron tratadas con poly(I:C). Los resultados mostraron que el tratamiento

con poly(I:C) es capaz de activar IRF-3 en células infectadas con ANDV (Figura 16). Esta observación sugiere que durante la primeras etapas de la infección, ANDV es incapaz de antagonizar IRF-3 por activación con poly(I:C).

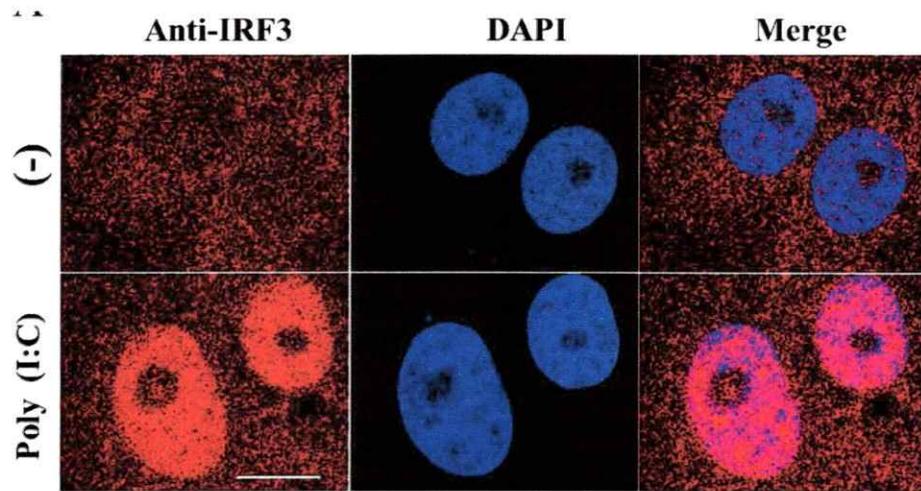


Figura 15. Detección de IRF-3 en células VeroE6. Células VeroE6 fueron tratadas con poly(I:C) o no fueron tratadas (-). Se detectó la activación de IRF-3 utilizando un anticuerpo policlonal específicos descritos en materiales y métodos en la sección 2.6, seguido por un anticuerpo secundario Alexa Fluor® 555 (color rojo, columna de la izquierda). Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (color azul, columna central). El merge de las imágenes se puede ver en la columna de la derecha. La barra de tamaño corresponde a 20 μm .

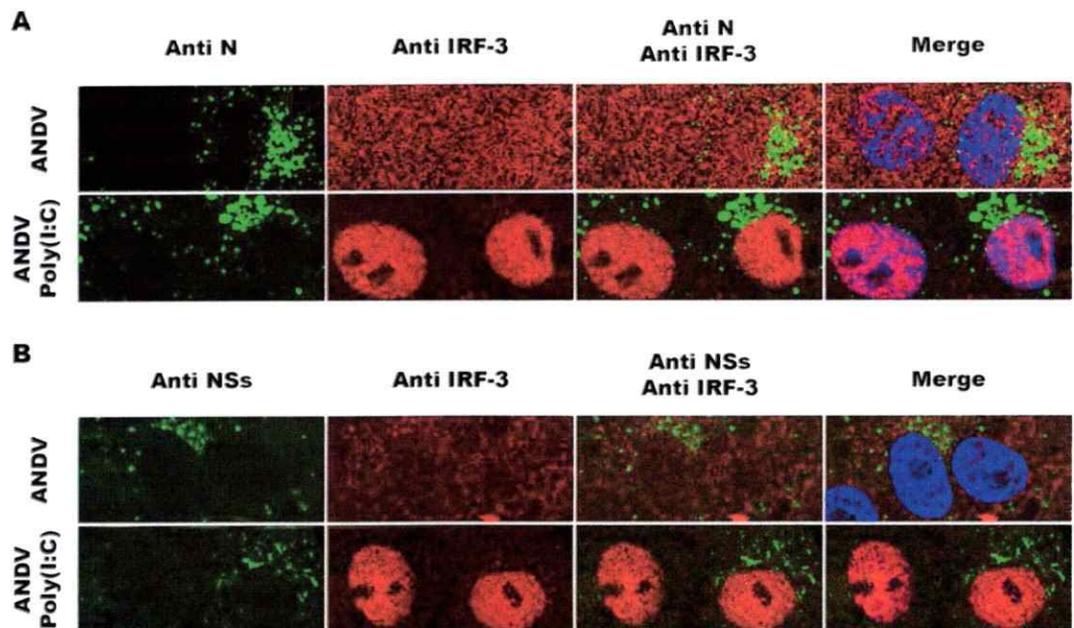


Figura 16. La infección con ANDV no activa IRF-3. Células VeroE6 fueron infectadas con la cepa CHI-7913 de ANDV. A las 24 h.p.i las células fueron tratadas con 20 µg/ml de poly (I:C) (ANDV poly (I:C) por 2 h. Las proteínas N-ANDV (A) o NSs-ANDV (B) se detectaron utilizando anticuerpos monoclonales específicos y anticuerpos secundarios Alexa fluor® 488 (color verde, columna izquierda). IRF-3 fue detectado usando anticuerpos policlonal descrito en materiales y métodos, seguido por el anticuerpo secundario Alexa fluor® 555 (color rojo, columna central de la izquierda). El merge se puede ver en la columna de la derecha. Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (color azul, columna central). La barra de tamaño corresponde a 20 µm.

3.6 La infección de ANDV en células VeroE6 no antagoniza la activación de IRF-3

Estudios muestran que al infectar células de carcinoma de pulmón humano (células A549) o células de carcinoma hepatocelular humanas que expresan TLR3 (células Huh7-TLR3) con ANDV células de, no hay activación de ISG56 y MxA, siendo ambas vías dependientes de IRF-3 (102, 103). En la figura 16A y 16B se observa que al infectar células VeroE6, IRF-3 no se activa. Sin embargo, se ha descrito que en células Vero hay baja respuesta antiviral producto de la baja expresión de IRF-3. Por tanto, es posible que la falta de respuesta de IRF-3 observada en células Vero E6 infectadas con ANDV se deba a una baja expresión del IRF3 en dichas células. Considerando esta posibilidad el plásmido de expresión IRF3-GFP se transfectó en células VeroE6. La proteína IRF-3-GFP se ha utilizado ampliamente para caracterizar la vía de señalización de IRF-3 (86, 98, 99, 104). De acuerdo a lo previamente descrito, se observa que la proteína IRF-3-GFP se localiza en citoplasma celular (Figura 17A, panel superior). Como se espera al tratar las células con poly(I:C) la proteína IRF-3-GFP relocaliza al núcleo celular (Figura 17A, panel inferior). Esta observación confirma la capacidad de la proteína IRF-3-GFP de ser activada con el dsRNA sintético (poly(I:C)). Posteriormente, se procedió a infectar las células VeroE6 que expresan la proteína de fusión IRF-3-GFP con ANDV. En este ensayo la replicación del virus se confirmó por la detección de la proteína N-ANDV. En acuerdo con los resultados presentados en la figura 17, la infección con ANDV no induce translocación IRF-3-GFP hacia el núcleo (Figura 17B, panel superior).

Con el fin de validar esta observación trató las células IRF-3-GFP infectadas con ANDV con poly(I:C). Los resultados muestran que en células infectadas IRF-3-GFP transloca al núcleo en respuesta al tratamiento con poly(I:C) (Fig. 17B, panel inferior). Por lo tanto, se concluye que durante su infección, ANDV no induce la activación de IRF-3-GFP. Los resultados también sugieren que en células VeroE6 ANDV no antagoniza la activación de IRF-3-GFP mediada por poly(I:C). Así mismo, estos resultados sugieren que ANDV no es reconocido por los factores que activan la vía de IRF-3. El mecanismo por el cual ANDV evade el reconocimiento por los factores que activan la vía de IRF-3 no fue abordado en este trabajo de investigación.

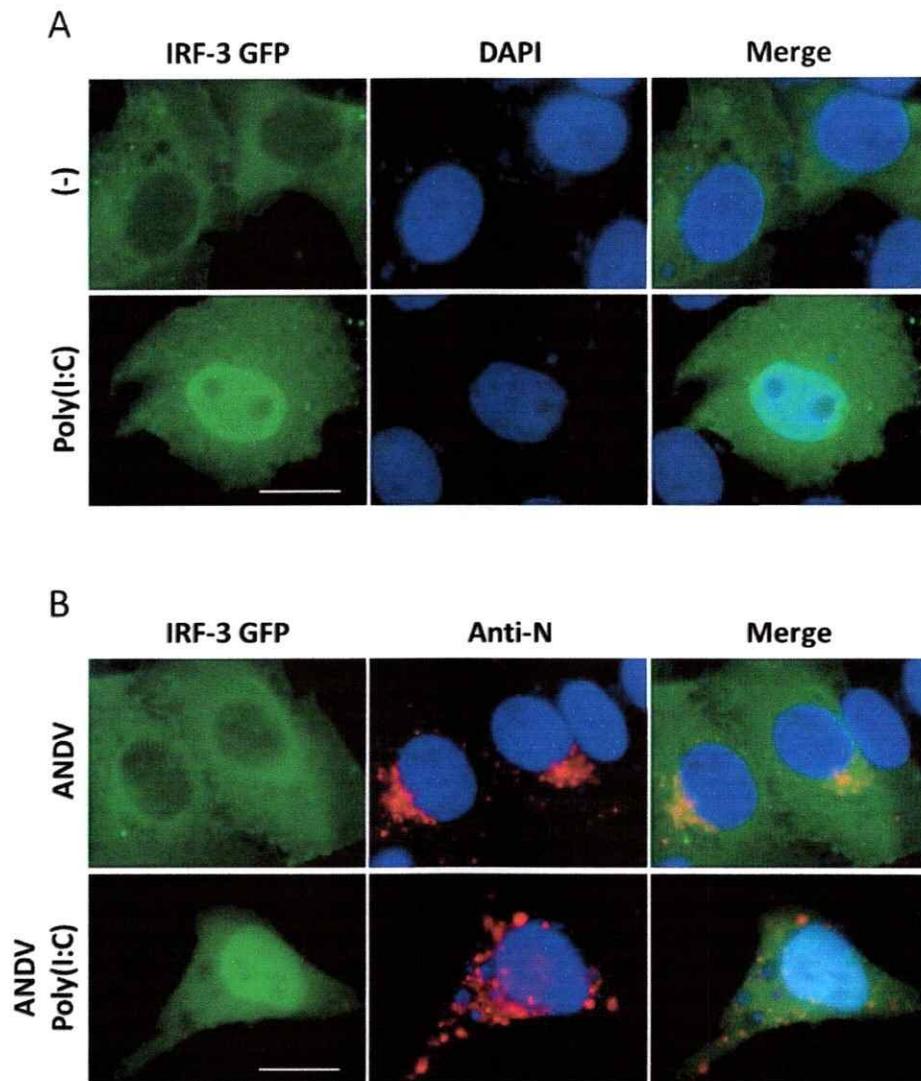


Figura 17. Durante la infección con ANDV no se inhibe la translocación de IRF-3. Las células VeroE6 fueron transfectadas con el plásmido que expresa IRF-3 acoplado a GFP. A las 22 hrs post-infección (h.p.i.), las células fueron inducidas con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de poly(I:C) por 2 hrs, luego fueron fijadas y se realizó inmunofluorescencia, utilizando el anticuerpo anti-N (color rojo, columna del medio), IRF-3 GFP (color verde, columna de la izquierda). Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (color azul). La columna de la derecha muestra el “merge”. El tamaño de las barras corresponde a 20 μm .

3.7 La Infección con ANDV en células VeroE6 antagoniza la activación de NFκB.

NFκB al igual que IRF-3, participa en la activación de la expresión de IFN-I en respuesta a la infección por virus. (68, 72, 74, 105). Para determinar si la inhibición del promotor de IFN-β se asocia a la modulación de NFκB, nos centramos en su activación en células VeroE6 durante la infección con ANDV. Como primer paso se procedió a establecer si NFκB se activa en células VeroE6, tratadas con poly(I:C) (97). La activación de la proteína NFκB se determinó por inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo específico para la subunidad p65, observando su translocación desde el citoplasma al núcleo celular. Como se observa en los controles, NFκB (Figura 18, panel superior) presentan una localización citoplasmática y que al activar las células con poly(I:C) se observó que NFκB (Figura 18, panel inferior) transloca al núcleo. Estos resultados confirman que poly(I:C) es capaz de activar ésta vía de señalización en las células VeroE6.

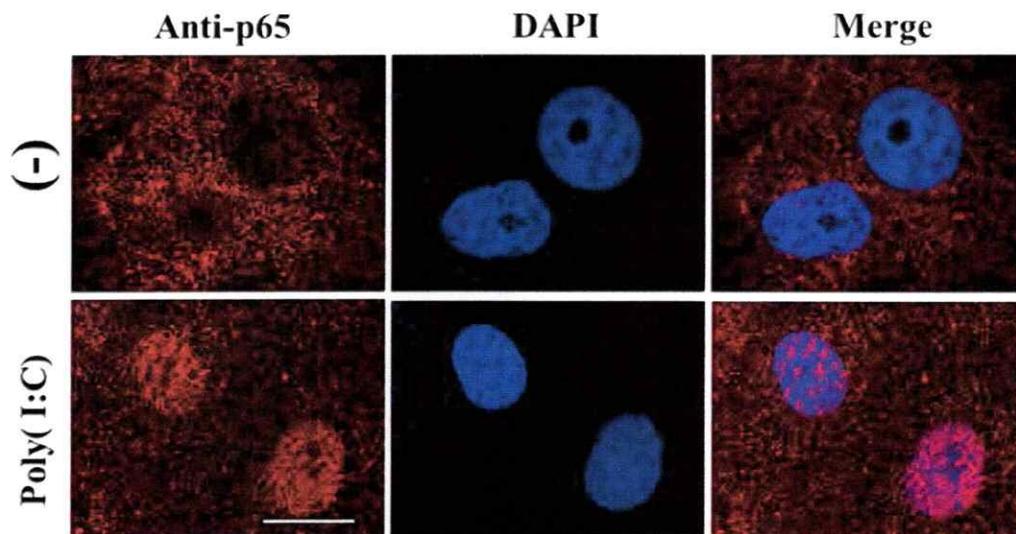


Figura 18. Detección y activación de NFκB en células VeroE6. Células VeroE6 fueron tratadas con poly(I:C) o no fueron tratadas (-). Se detectó la activación de NFκB utilizando un anticuerpo Anti-p65 policlonal específicos descritos en materiales y métodos en la sección 2.6, seguido por un anticuerpo secundario Alexa Fluor® 555 (color rojo, columna de la izquierda). Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (color azul, columna central). El merge de las imágenes se puede ver en la columna de la derecha. La barra de tamaño corresponde a 20 μm.

Se procedió luego a determinar si en las células VeroE6 NFκB se activa como respuesta a la infección con ANDV. El estado de activación de NFκB se evaluó visualizando la translocación de la proteína al núcleo. La replicación de ANDV se confirmó detectando las proteínas virales N y NSs usando anticuerpos específicos (sección 3.2.). Los resultados mostraron que NFκB (Figura 15A y 15B, panel superior) no translocan al núcleo durante la infección con ANDV. Estos resultados sugieren que durante su replicación ANDV podría antagonizar la activación NFκB. Con el fin de evaluar esta posibilidad células VeroE6 infectadas con ANDV fueron tratadas con poly(I:C). Los resultados mostraron que en células infectadas con ANDV el tratamiento con poly(I:C) es incapaz de inducir la translocación de NFκB (Figura 19A y 19B, paneles inferiores). Esta observación sugiere que la activación de NFκB por poly (I:C) es antagonizada en células VeroE6 infectadas con ANDV.

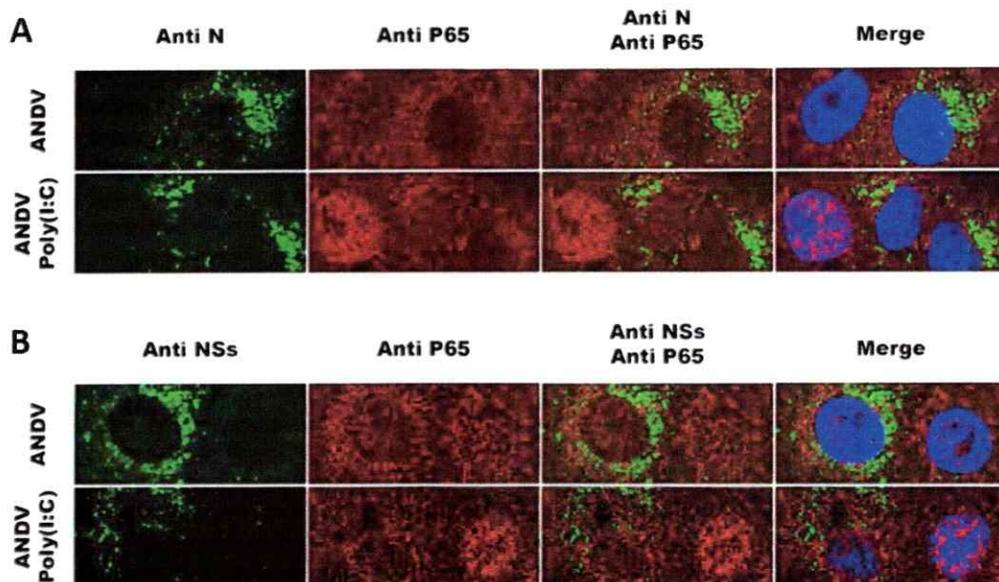


Figura 19. La infección con ANDV antagoniza la activación de NF κ B. Células VeroE6 fueron infectadas con la cepa CHI-7913 de ANDV. A las 24 h.p.i las células fueron tratadas con 50 μ g/mL de poly (I:C) (ANDV poly (I:C) por 2 h. Las proteínas N-ANDV (A) o NSs-ANDV (B) se detectaron utilizando anticuerpos monoclonales específicos y anticuerpos secundarios Alexa fluor® 488 (color verde, columna izquierda). p65 fueron detectados usando anticuerpos policlonales descrito en materiales y métodos, seguido por el anticuerpo secundario Alexa fluor® 555 (color rojo, columna central de la izquierda). El merge se puede ver en la columna de la derecha. Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (color azul, columna central). La barra de tamaño corresponde a 20 μ m.

3.8 La proteína NSs-ANDV antagoniza la activación de NFκB.

Diversos trabajos han documentado que las glicoproteínas Gn/Gc y la proteína N de algunos hantavirus son capaces de antagonizar la respuesta inmune innata de la célula huésped (38, 75). Por tanto, en el contexto de una infección con ANDV es complejo establecer cual proteína o proteínas virales son las responsables de la inhibición de NFκB. (29, 38, 75, 77, 106, 107). Por ello, se procedió a determinar si la proteína NSs-ANDV es capaz de inhibir la activación de NFκB mediada por poly(I:C) en un contexto libre de virus. Para esto, células VeroE6 fueron transfectadas con el plásmido pNSs-ANDV que expresa la proteína viral NSs-ANDV. Luego de la transfección, las células fueron tratadas o no con poly(I:C). En estos ensayos, NFκB se detectó con un anticuerpo específico para la subunidad p65. Los resultados muestran que la expresión de la proteína NSs-ANDV no induce translocación de NFκB al núcleo (Figura 20, panel superior). Al tratar las células con poly(I:C) se observa translocación de NFκB al núcleo solo en aquellas células que no expresan la proteína NSs-ANDV (Figura 20, panel inferior). Estos resultados sugieren que la proteína NSs-ANDV por si sola es capaz de antagonizar la activación de NFκB inducida por poly(I:C).

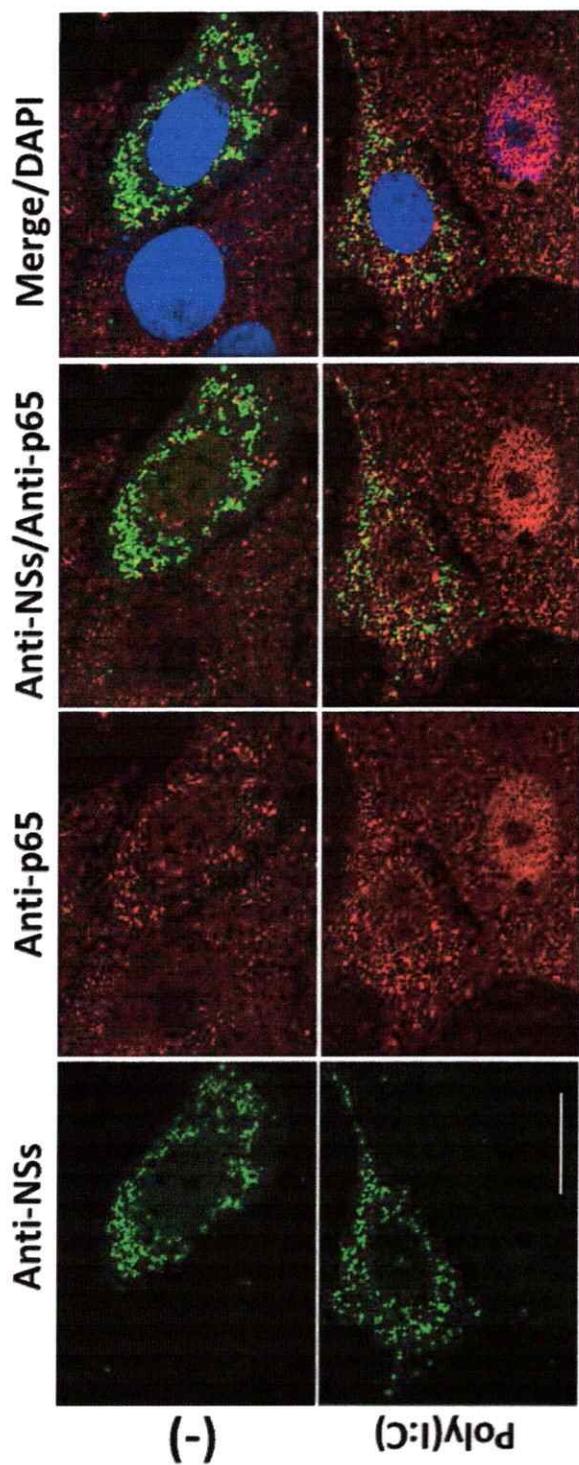


Figura 20. La proteína NSs-ANDV antagoniza la activación de NFkB durante la inducción con poly (I:C). Células VeroE6 fueron transfectadas con el plásmido pNSs-ANDV, que codifica para la proteína NSs-ANDV. A las 24 h.p.t las células fueron inducidas con 50 µg/mL de poly (I:C) durante 6 hrs,. La expresión de la proteína NSs-ANDV se detectó usando anticuerpo monoclonal anti-NSs, seguido por un Alexa Fluor®488 (color verde, columna de la izquierda). NFkB fue detectado usando el anticuerpo policlonal anti-p65 seguido por un Alexa Fluor® 555 de anticuerpo secundario conjugado (color rojo, columna de la izquierda centro). Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (color azul). El tamaño de las barras corresponde a 20 µm.

3.9 La proteína NSs-ANDV inhibe la activación del promotor de NFκB

NFκB se encuentra en el citoplasma en una forma inactiva asociado a su inhibidor IκB (71). Cuando se activa NFκB, este transloca al núcleo donde interactúa con los sitios de reconocimiento del DNA para activar la transcripción de diversos genes (93). Si la proteína NSs-ANDV bloquea la translocación de NFκB al núcleo, entonces se puede anticipar que al ser estimulados con poly(I:C), la expresión de los genes regulados por la NFκB también se verían alterados en la presencia de la proteína NSs-ANDV. Con el fin de evaluar esta posibilidad, se procedió a evaluar el impacto de la proteína NSs-ANDV en la regulación del promotor de NFκB, el que es dependiente de la proteína NFκB. Para ello se utilizó un plásmido pIgK-Luc, que codifica un gen reportero FLuc bajo el control de un promotor dependiente de la unión a NFκB (86). Los experimentos se llevaron a cabo en presencia o ausencia de la proteína NSs-ANDV y a diferentes concentraciones del plásmido. Como control positivo de modulación de la vía IFN-I, se utilizó la proteína NS1 del virus Influenza (85). En estos ensayos la actividad FLuc se expresa en RLA, siendo la actividad FLuc obtenida en presencia de poly(I:C) pero en ausencia de proteínas virales fijadas en 100%. Como se esperaba, se observó una fuerte inducción del promotor de NFκB en las células tratadas con poly(I:C) y transfectadas con el plásmido control, pero esta inducción disminuyó en presencia de las proteínas virales NS1 o NSs-ANDV(Figura 21). Como se ha descrito previamente (86), la proteína NS1-Influenza antagoniza la activación del promotor dependiente de NFκB (Figura 21). Por tanto se concluye que al igual que la proteína NS1 de Influenza la proteína NSs-ANDV antagoniza la activación del promotor dependiente de NFκB.

4. DISCUSION

En varios hantavirus se ha señalado que el SmRNA codifica para una segunda proteína no estructural, NSs (46, 79, 108). Hasta la fecha de inicio de este trabajo de tesis, solo la proteína NSs de los hantavirus TULV y PUUV habían sido descritas (43, 78). En este trabajo de tesis (83), se establece que ANDV también expresa una proteína NSs. Debido a la carencia de anticuerpos comerciales para detectar la proteína putativa NSs-ANDV, el trabajo de tesis se inició con el desarrollo y caracterización de anticuerpos específicos para la proteína NSs putativa de ANDV. El desarrollo de esta herramienta de trabajo como así también de los vectores de expresión para la proteína NSs putativa de ANDV, permitió evaluar la expresión de la proteína NSs-ANDV. La expresión de la proteína NSs-ANDV se demostró en el contexto de una infección en células VeroE6 y en el contexto de una infección experimental en Hámster Sirio Dorado. Como se observa en la figura 12, la proteína NSs-ANDV se expresa en células VeroE6 infectadas y el patrón de expresión citoplasmática de la proteína en células es similar a la descrita para la proteína NSs del hantavirus TULV (41). Mediante la técnica de IHQ se detectó la proteína NSs-ANDV en un corte histológico de pulmón de Hámster Sirio infectado con ANDV (Figura 13). Esta observación establece que la proteína NSs-ANDV se expresa en el contexto de una infección en un modelo animal y puede ser detectada mediante los anticuerpos desarrollados para este trabajo de tesis.

Una vez que es establecida la expresión de la proteína NSs-ANDV (83), se decidió evaluar su posible su función. Al realizar un alineamiento nucleotídico entre el SmRNA de TULV y ANDV, se observa una identidad de 81%, lo que indica un parecido entre ambas secuencias, sin embargo, al realizar una comparación de la secuencia aminoacídica de las proteínas NSs de TULV y ANDV, se observa una identidad de 40%, lo que hace a ambas proteínas diferentes. La proteína NSs-TULV ha sido descrita como capaz de inhibir la inducción de IFN- β y la activación de los promotores de IRF-3 y NF κ B (45, 79). En el sistema inmune innato, el interferón es parte de los primeros mecanismos de defensa contra las infecciones virales (63). Se ha demostrado que muchos virus han desarrollado estrategias para antagonizar la respuesta a IFN-I (76, 109) y ANDV no es la excepción. Estudios anteriores han establecido que las proteínas estructurales de ANDV son capaces de antagonizar la respuesta a IFN (75, 77, 106, 107). La activación de IFN-I es mediada por el reconocimiento de los PAMPs virales por parte de los PRRs celulares. Este reconocimiento PAMPs/PRRs gatilla la respuesta inmune innata activando diversas vías que inducen la respuesta de IFN y la expresión de los genes estimulados por IFN (ISGs) estableciendo un estado antiviral en la célula. Uno de los resultados inesperados de este trabajo muestra que ANDV es capaz de evadir el reconocimiento de los PRRs. La infección de ANDV no induce la activación de la vía IRF-3 (Figura 16). Como control se utilizó el RNA de doble hebra sintético poly(I:C) que es capaz de activar la vía IRF-3. Como se observa en la figura 15, en presencia de poly(I:C) IRF-3 transloca al núcleo lo que indica su activación. Este control es de gran importancia porque las células VeroE6 son deficientes en la producción de IFN, por no tener el locus que lo codifica (101), pero como se establece en la figura 15 son capaces

de inducir las vías de activación de IFN intactas en presencia de poly(I:C). Por lo anterior, se consideró que Vero E6 sería un buen sistema para estudiar las etapas tempranas de la modulación del sistema inmune innato. Los resultados obtenidos confirman lo previamente observado por otros grupos que indican que la infección con ANDV no activa IRF-3 en diversas líneas celulares y cultivos primarios que presentan un sistema IFN intacto (38, 75, 91). Sin embargo, en los trabajos previos se concluyó que ANDV antagonizaba la activación de IRF-3. A pesar de proponer este mecanismo ninguno de los trabajos evaluó de manera directa este fenómeno. Al activar las células infectadas con poly(I:C) se observó que IRF-3 transloca al núcleo aún en presencia del virus, lo que sugiere que ANDV es capaz de evadir el reconocimiento de los PRRs, pero no es capaz de antagonizar la activación de IRF-3. La capacidad de evadir IRF-3 no es una característica única de ANDV, de hecho se ha descrito que el hantavirus SNV tampoco activa IRF-3 (110). El mecanismo mediante el cual ANDV evade la activación de IRF-3 no fue abordada en este trabajo de Tesis. Otra de las vías importantes que participa en la activación del sistema inmune innato es aquella asociado al factor de transcripción NFκB. Al evaluar la activación de NFκB en células infectadas con ANDV, se observó que ésta no es activada. Sin embargo y a diferencia de lo observado con IRF-3, nuestros resultados muestran que en el caso de NFκB, ANDV antagoniza su activación mediada por poly(I:C).

ANDV no solo es capaz de evadir el reconocimiento por parte del sistema inmune innato celular durante el inicio de la infección viral, sino que también ha desarrollado

1.

estrategias para antagonizar la inducción de la expresión de IFN. La capacidad de antagonizar el sistema de defensa innato celular no es un atributo restringido a ANDV o a los hantavirus. Por ejemplo, el virus Sendai (SENV) actúa sobre MDA-5 inhibiendo la activación de IRF-3 y NF κ B (111). El virus Ebola Zaire codifica la proteína VP35 que impide la activación de IRF-3 por unión al RNA doble hebra, impidiendo el reconocimiento de RIG-I (84, 95, 112). La proteína no estructural, NS1 del virus Influenza A, es capaz de inhibir por varios mecanismos la activación de IFN (86, 104). La expresión de la proteína NS1 en el citoplasma antagoniza inhibiendo PKR y RIG-1. En el núcleo celular NS1 inhibe el procesamiento de mRNA, impidiendo la expresión de genes celulares (96). Diversos estudios han mostrado que la proteína N-ANDV, así como las glicoproteínas Gn/Gc de ANDV por sí solas o en acción combinada son capaces de antagonizar la expresión INF- β (38, 75, 107). No obstante, los datos sugieren que la expresión de las proteínas virales N-ANDV y Gn/Gc-ANDV sólo o en combinación no explica completamente la reducción de INF- β observada en el contexto de células infectadas (38).

La expresión de las proteínas NSs-TULV y NSs-PUUV en células, inhibe la actividad del promotor de IFN- β , NF κ B e IRF-3 (45). En el caso de TULV, se ha establecido que la expresión de la proteína NSs incrementa la supervivencia del virus en células que son deficientes a IFN (79). Basados en estos antecedentes resultó de interés evaluar si la proteína NSs-ANDV podría antagonizar la respuesta inmune innata celular. Un informe reciente, indica que la proteína N-ANDV tiene la capacidad de bloquear las respuestas

de RIG-I/MDA5 durante las primeras etapas de la infección (106). En este estudio se sobre expresa solo la proteína N-ANDV, ya que en el plásmido utilizado, se mutó el codón de inicio de la proteína NSs (106). Este mismo trabajo se observa que al activar NFκB con el factor de necrosis tumoral (TNF)-α, este puede translocar al núcleo aún en presencia de la proteína N-ANDV (106). Por lo tanto, la proteína N-ANDV, por sí sola no es suficiente para bloquear todas las posibles vías de activación de NFκB. De acuerdo a estos resultados, fue razonable proponer que la proteína NSs-ANDV podría complementar a la proteína N- ANDV en el bloqueo de la activación de NFκB durante la replicación viral. El factor de transcripción NFκB es componente del “*enhanceosome*” que es activado en etapas tempranas durante la infección por virus (68). La expresión de la proteína NSs-ANDV en etapas tempranas podría antagonizar la activación de NFκB, ya que en nuestro estudio la proteína NSs-ANDV se detecta en etapas tempranas, 6 h.p.i (Fig. 12). Nuestros resultados confirman el rol de la proteína NSs-ANDV como un antagonista de la inducción de la vía de señalización mediada por poly(I:C). Se muestra que en presencia de NSs-ANDV NFκB se mantiene en el citoplasma de la célula, incluso cuando en la presencia de poly (I: C) (Fig. 19). Sugiriendo que durante etapas tempranas de la infección viral se activan estrategias virales para suprimir la respuesta inmune innata.

En resumen, en este estudio se establece que la proteína NSs-ANDV se expresa durante la replicación viral tanto en células infectadas y en los animales infectados experimentalmente. Además, se establece que la proteína NSs-ANDV podría actuar

como un antagonista de la respuesta celular innata inhibiendo la actividad de los promotores de IFN- β y NF κ B. Finalmente los resultados de este trabajo de Tesis sugieren que la proteína NSs-ANDV podría ser capaz de inhibir la activación de NF κ B inducida por el reconocimiento de dsRNA.

5. CONCLUSIONES

- La proteína NSs-ANDV se expresa en el contexto de una infección viral.
- La proteína NSs inhibe la actividad de los promotores de IFN- β y NF κ B.
- La inhibición del promotor IFN- β no es mediada por el factor de transcripción IRF-3.
- La proteína NSs antagoniza la activación de NF κ B.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. **Vaheri A, Strandin T, Hepojoki J, Sironen T, Henttonen H, Mäkelä S, Mustonen J.** 2013. Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nat. Publ. Gr.* **11**:539–550.
2. **Schountz T, Prescott J.** 2014. Hantavirus immunology of rodent reservoirs: current status and future directions. *Viruses* **6**:1317–35.
3. **Jonsson CB, Figueiredo LTM, Vapalahti O.** 2010. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**:412–41.
4. **Galeno H, Mora J, Villagra E, Fernandez J, Hernandez J, Mertz GJ, Ramirez E.** 2002. First human isolate of Hantavirus (Andes virus) in the Americas. *Emerg. Infect. Dis.* **8**:657–61.
5. **Padula PJ, Sanchez a J, Edelstein a, Nichol ST.** 2002. Complete nucleotide sequence of the M RNA segment of Andes virus and analysis of the variability of the termini of the virus S, M and L RNA segments. *J. Gen. Virol.* **83**:2117–22.
6. **Schmaljohn C, Hjelle B.** 1997. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg. Infect. Dis.* **3**:95–104.
7. **Mir M a.** 2010. Hantaviruses. *Clin. Lab. Med.* **30**:67–91.
8. **Plyusnin a, Hörling J, Kanerva M, Mustonen J, Cheng Y, Partanen J, Vapalahti O, Kukkonen SK, Niemimaa J, Henttonen H, Niklasson B, Lundkvist a, Vaheri a.** 1997. Puumala hantavirus genome in patients with nephropathia epidemica: correlation of PCR positivity with HLA haplotype and link to viral sequences in local rodents. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1090–6.
9. **Medina RA, Torres-perez F, Galeno H, Navarrete M, Vial PA, Palma RE, Ferres M, Cook JA, Hjelle B, Cato PU.** 2009. Ecology , Genetic Diversity , and Phylogeographic Structure of Andes Virus in Humans and Rodents in Chile □ **83**:2446–2459.
10. **Padula PJ, Edelstein a, Miguel SD, López NM, Rossi CM, Rabinovich RD.** 1998. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology* **241**:323–30.

11. **Medina R a, Torres-Perez F, Galeno H, Navarrete M, Vial P a, Palma RE, Ferres M, Cook J a, Hjelle B.** 2009. Ecology, genetic diversity, and phylogeographic structure of andes virus in humans and rodents in Chile. *J. Virol.* **83**:2446–59.
12. **Pensiero MN, Hay J.** 1992. The Hantaan virus M-segment glycoproteins G1 and G2 can be expressed independently. *J. Virol.* **66**:1907–14.
13. **Löber C, Anheier B, Lindow S, Klenk HD, Feldmann H.** 2001. The Hantaan virus glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA. *Virology* **289**:224–9.
14. **Sanchez AJ, Vincent MJ, Nichol ST.** 2002. Characterization of the Glycoproteins of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *J virol* **76**:7263–7275.
15. **Hussein ITM, Haseeb A, Haque A, Mir M a.** 2011. Recent advances in hantavirus molecular biology and disease. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1st ed. **74**:35–75.
16. **Barr JN, Wertz GW.** 2004. Bunyamwera Bunyavirus RNA Synthesis Requires Cooperation of 3' - and 5'-Terminal Sequences. *J. Virol.* **78**:1129–1138.
17. **Plyusnin a, Vapalahti O, Vaheiri a.** 1996. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J. Gen. Virol.* **77** (Pt **11**):2677–87.
18. **Kukkonen SKJ, Vaheiri a, Plyusnin a.** 2005. L protein, the RNA-dependent RNA polymerase of hantaviruses. *Arch. Virol.* **150**:533–56.
19. **Reguera J, Weber F, Cusack S.** 2010. Bunyaviridae RNA polymerases (L-protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription. *PLoS Pathog.* **6**:e1001101.
20. **Mir M a, Duran W a, Hjelle BL, Ye C, Panganiban a T.** 2008. Storage of cellular 5' mRNA caps in P bodies for viral cap-snatching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:19294–9.
21. **Novoa RR, Calderita G, Cabezas P, Elliott RM, Risco C.** 2005. Key Golgi Factors for Structural and Functional Maturation of Bunyamwera Virus **79**:10852–10863.
22. **Branch S.** 1991. Formation and Intracellular Transport of a Heterodimeric Viral Spike Protein Complex **112**:257–266.

23. **Deyde VM, Rizvanov A a, Chase J, Otteson EW, St Jeor SC.** 2005. Interactions and trafficking of Andes and Sin Nombre Hantavirus glycoproteins G1 and G2. *Virology* **331**:307–15.
24. **Ramanathan HN, Jonsson CB.** 2008. New and Old World hantaviruses differentially utilize host cytoskeletal components during their life cycles. *Virology* **374**:138–50.
25. **Ravkov E V, Nichol ST, Compans RW.** 1997. Polarized entry and release in epithelial cells of Black Creek Canal virus, a New World hantavirus. *J. Virol.* **71**:1147–54.
26. **Wang H, Alminait A, Vaheri A, Plyusnin A.** 2010. Interaction between hantaviral nucleocapsid protein and the cytoplasmic tail of surface glycoprotein Gn. *Virus Res.* **151**:205–12.
27. **Cifuentes-Muñoz N, Salazar-Quiroz N, Tischler ND.** 2014. Hantavirus gn and gc envelope glycoproteins: key structural units for virus cell entry and virus assembly. *Viruses* **6**:1801–22.
28. **Tischler ND, Gonzalez A, Perez-Acle T, Roseblatt M, Valenzuela PDT.** 2005. Hantavirus Gc glycoprotein: evidence for a class II fusion protein. *J. Gen. Virol.* **86**:2937–47.
29. **Alff PJ, Gavrillovskaya IN, Gorbunova E, Endriss K, Chong Y, Geimonen E, Sen N, Reich NC, Mackow ER.** 2006. The pathogenic NY-1 hantavirus G1 cytoplasmic tail inhibits RIG-I- and TBK-1-directed interferon responses. *J. Virol.* **80**:9676–86.
30. **Mir MA, Panganiban AT.** 2005. The Hantavirus Nucleocapsid Protein Recognizes Specific Features of the Viral RNA Panhandle and Is Altered in Conformation upon RNA Binding **79**:1824–1835.
31. **Cheng E, Wang Z, Mir M a.** 2014. Interaction between hantavirus nucleocapsid protein (N) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) mutants reveals the requirement of an N-RdRp interaction for viral RNA synthesis. *J. Virol.* **88**:8706–12.
32. **Mir MA, Panganiban AT.** 2004. Trimeric Hantavirus Nucleocapsid Protein Binds Specifically to the Viral RNA Panhandle **78**:8281–8288.
33. **López- Lastra M, Ramdohr P.** 2010. Translation initiation of viral mRNAs. *Rev. Med. ...* **20**:177–195.

34. **Mir M a, Panganiban AT.** 2008. A protein that replaces the entire cellular eIF4F complex. *EMBO J.* **27**:3129–39.
35. **Haque A, Mir M a.** 2010. Interaction of hantavirus nucleocapsid protein with ribosomal protein S19. *J. Virol.* **84**:12450–3.
36. **Vera-otarola J, Soto-rifo R, Ricci EP, Darlix J, Lo M.** 2010. The 3' J Untranslated Region of the Andes Hantavirus Small mRNA Functionally Replaces the Poly (A) Tail and Stimulates Cap-Dependent Translation Initiation from the Viral mRNA □ **84**:10420–10424.
37. **Lindgren L, Lindkvist M, Overby A, Ahlm C, Bucht G, Holmström A.** 2006. Regions of importance for interaction of puumala virus nucleocapsid subunits. *Virus Genes* **33**:169–74.
38. **Levine JR, Prescott J, Brown KS, Best SM, Ebihara H, Feldmann H.** 2010. Antagonism of type I interferon responses by new world hantaviruses. *J. Virol.* **84**:11790–801.
39. **Taylor SL, Krempel RL, Schmaljohn CS.** 2009. Inhibition of TNF- α -induced activation of NF- κ B by hantavirus nucleocapsid proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1171**:E86–93.
40. **Taylor SL, Frias-Staheli N, García-Sastre A, Schmaljohn CS.** 2009. Hantaan virus nucleocapsid protein binds to importin α proteins and inhibits tumor necrosis factor α -induced activation of nuclear factor κ B. *J. Virol.* **83**:1271–9.
41. **Virtanen JO, Jääskeläinen KM, Djupsjöbacka J, Vaheri A, Plyusnin A.** 2010. Tula hantavirus NSs protein accumulates in the perinuclear area in infected and transfected cells. *Arch. Virol.* **155**:117–21.
42. **Kaukinen P, Minskaya ES, Plyusnina A, Ja KM, Vapalahti O, Elliott RM, Weber F, Vaheri A, Plyusnin A.** 2007. Tula and Puumala Hantavirus NSs ORFs Are Functional and the Products Inhibit Activation of the Interferon-Beta Promoter **1536**:1527–1536.
43. **Plyusnin A.** 2010. Tula hantavirus NSs protein accumulates in the perinuclear area in infected and transfected cells **117–121**.
44. **Yadani FZ, Kohl a, Préhaud C, Billecocq a, Bouloy M.** 1999. The carboxy-terminal acidic domain of Rift Valley Fever virus NSs protein is essential for the formation of filamentous structures but not for the nuclear localization of the protein. *J. Virol.* **73**:5018–25.

45. **Kaukinen P, Minskaya ES, Plyusnina A, Ja KM, Vapalahti O, Elliott RM, Weber F, Vaheiri A, Plyusnin A.** 2007. Tula and Puumala Hantavirus NSs ORFs Are Functional and the Products Inhibit Activation of the Interferon-Beta Promoter **1536:1527–1536.**
46. **Plyusnin A.** 2002. Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. *Arch. Virol.* **147:665–682.**
47. **Colón-Ramos D, Irusta P.** 2003. Inhibition of translation and induction of apoptosis by Bunyaviral nonstructural proteins bearing sequence similarity to reaper. *Mol. Biol. Cell* **14:4162–4172.**
48. **Colón-Ramos D a, Shenvi CL, Weitzel DH, Gan EC, Matts R, Cate J, Kornbluth S.** 2006. Direct ribosomal binding by a cellular inhibitor of translation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13:103–11.**
49. **Weber F, Bridgen A, Fazakerley JK, Streitenfeld H, Kessler N, Randall RE, Elliott RM.** 2002. Bunyamwera Bunyavirus Nonstructural Protein NSs Counteracts the Induction of Alpha / Beta Interferon **76:7949–7955.**
50. **Blakqori G, Delhaye S, Habjan M, Blair CD, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Attarzadeh-Yazdi G, Frangkoudis R, Kohl A, Kalinke U, Weiss S, Michiels T, Stacheli P, Weber F.** 2007. La Crosse bunyavirus nonstructural protein NSs serves to suppress the type I interferon system of mammalian hosts. *J. Virol.* **81:4991–9.**
51. **Jääskeläinen KM, Plyusnina A, Lundkvist A, Vaheiri A, Plyusnin A.** 2008. Tula hantavirus isolate with the full-length ORF for nonstructural protein NSs survives for more consequent passages in interferon-competent cells than the isolate having truncated NSs ORF. *Virol. J.* **5:3.**
52. **Irina N. Gavrilovskaya, Michael Shepley, Robert Shaw, Mark H. Ginsberg, Erich R. Mackow.** 1998. beta 3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause **95:7074–7079.**
53. **Gavrilovskaya IN, Gorbunova EE, Mackow N a, Mackow ER.** 2008. Hantaviruses direct endothelial cell permeability by sensitizing cells to the vascular permeability factor VEGF, while angiopoietin 1 and sphingosine 1-phosphate inhibit hantavirus-directed permeability. *J. Virol.* **82:5797–806.**
54. **Mackow ER, Gavrilovskaya IN.** 2009. Hantavirus regulation of endothelial cell functions. *Thromb. Haemost.* **102:1030–41.**

55. **Choi Y, Kwon Y-C, Kim S-I, Park J-M, Lee K-H, Ahn B-Y.** 2008. A hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome requires gC1qR/p32 for efficient cell binding and infection. *Virology* **381**:178–83.
56. **Krautkrämer E, Zeier M.** 2008. Hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome enters from the apical surface and requires decay-accelerating factor (DAF/CD55). *J. Virol.* **82**:4257–64.
57. **Petersen J, Drake MJ, Bruce E a, Riblett AM, Didigu C a, Wilen CB, Malani N, Male F, Lee F-H, Bushman FD, Cherry S, Doms RW, Bates P, Briley K.** 2014. The major cellular sterol regulatory pathway is required for Andes virus infection. *PLoS Pathog.* **10**:e1003911.
58. **Cifuentes-Muñoz N, Barriga GP, Valenzuela PDT, Tischler ND.** 2011. Aromatic and polar residues spanning the candidate fusion peptide of the Andes virus Gc protein are essential for membrane fusion and infection. *J. Gen. Virol.* **92**:552–63.
59. **Fields BN, Knipe DM, Howley PM.** 2007. *Fields Virology, 5th Edition* Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins.
60. **Mir M a, Panganiban AT.** 2008. A protein that replaces the entire cellular eIF4F complex. *EMBO J.* **27**:3129–39.
61. **Cifuentes-Muñoz N, Darlix J-L, Tischler ND.** 2010. Development of a lentiviral vector system to study the role of the Andes virus glycoproteins. *Virus Res.* **153**:29–35.
62. **Khaiboullina SF, St Jeor SC.** 2002. Hantavirus immunology. *Viral Immunol.* **15**:609–25.
63. **Sadler AJ, Williams BRG.** 2008. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat. Rev. Immunol.* **8**:559–68.
64. **Takeda K, Akira S.** 2004. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* **16**:3–9.
65. **Kawai T, Akira S.** 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* **21**:317–37.
66. **Seth RB, Sun L, Chen ZJ.** 2006. Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res.* **16**:141–7.
67. **Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T.** 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential

- function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* **5**:730–7.
68. **Balachandran S, Beg A a.** 2011. Defining emerging roles for NF- κ B in antiviral responses: revisiting the interferon- β enhanceosome paradigm. *PLoS Pathog.* **7**:e1002165.
 69. **Chinenov Y, Kerppola TK.** 2001. Close encounters of many kinds : Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory speci @ city 2438–2452.
 70. **Ford E, Thanos D.** 2010. The transcriptional code of human IFN-beta gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1799**:328–36.
 71. **Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S.** 2011. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat. Immunol.* **12**:695–708.
 72. **Versteeg G a, Garcia-Sastre A.** 2010. Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**:508–16.
 73. **Haller O, Staeheli P, Kochs G.** 2007. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* **89**:812–8.
 74. **Haller O, Kochs G, Weber F.** 2006. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* **344**:119–30.
 75. **Spiropoulou CF, Albariño CG, Ksiazek TG, Rollin PE.** 2007. Andes and Prospect Hill hantaviruses differ in early induction of interferon although both can downregulate interferon signaling. *J. Virol.* **81**:2769–76.
 76. **May N Le, Bouloy M.** 2011. Antiviral escape strategies developed by bunyaviruses pathogenic for humans. *Front. Biosci. (Schol. Ed).* 1065–1077.
 77. **Matthys VS, Cimica V, Dalrymple N a, Glennon NB, Bianco C, Mackow ER.** 2014. Hantavirus GnT elements mediate TRAF3 binding and inhibit RIG-I/TBK1-directed beta interferon transcription by blocking IRF3 phosphorylation. *J. Virol.* **88**:2246–59.
 78. **Kaukinen P, Minskaya ES, Plyusnina A, Ja KM, Vapalahti O, Elliott RM, Weber F, Vaheri A, Plyusnin A.** 2007. Tula and Puumala Hantavirus NSs ORFs Are Functional and the Products Inhibit Activation of the Interferon-Beta Promoter. *J. Med. Virol.* **79**:1527–1536.
 79. **Jääskeläinen KM, Plyusnina A, Lundkvist A, Vaheri A, Plyusnin A.** 2008. Tula hantavirus isolate with the full-length ORF for nonstructural protein NSs

survives for more consequent passages in interferon-competent cells than the isolate having truncated NSs ORF. *Viol. J.* 5:3.

80. **Godoy P, Marsac D, Stefas E, Ferrer P, Tischler ND, Pino K, Ramdohr P, Vial P, Valenzuela PDT, Ferrés M, Veas F, López-Lastra M.** 2009. Andes virus antigens are shed in urine of patients with acute hantavirus cardiopulmonary syndrome. *J. Virol.* 83:5046–55.
81. **Marsac D, García S, Fournet A, Aguirre A, Pino K, Ferrés M, Kalergis AM, Lopez-Lastra M, Veas F.** 2011. Infection of human monocyte-derived dendritic cells by ANDES Hantavirus enhances pro-inflammatory state, the secretion of active MMP-9 and indirectly enhances endothelial permeability. *Viol. J.* 8:223.
82. **Tischler ND, Roseblatt M, Valenzuela PDT.** 2008. Characterization of cross-reactive and serotype-specific epitopes on the nucleocapsid proteins of hantaviruses. *Virus Res.* 135:1–9.
83. **Vera-Otarola J, Solis L, Soto-Rifo R, Ricci EP, Pino K, Tischler ND, Ohlmann T, Darlix J-L, López-Lastra M.** 2012. The Andes hantavirus NSs protein is expressed from the viral small mRNA by a leaky scanning mechanism. *J. Virol.* 86:2176–87.
84. **Basler CF, Wang X, Mühlberger E, Volchkov V, Paragas J, Klenk HD, García-Sastre a, Palese P.** 2000. The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:12289–94.
85. **Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Sato M, Ozato K, Fujita T.** 1996. Autocrine amplification of type I interferon gene expression mediated by interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3). *J. Biochem.* 120:160–9.
86. **Wang X, Li M, Zheng H, Muster T, Palese P, Beg a a, García-Sastre a.** 2000. Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J. Virol.* 74:11566–73.
87. **Sternberger L a., Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG.** 1970. the Unlabeled Antibody Enzyme Method of Immunohistochemistry Preparation and Properties of Soluble Antigen-Antibody Complex (Horseradish Peroxidase-Antihorseradish Peroxidase) and Its Use in Identification of Spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* 18:315–333.
88. **Qu B, Qi X, Wu X, Liang M, Li C, Cardona CJ, Xu W, Tang F, Li Z, Wu B, Powell K, Wegner M, Li D, Xing Z.** 2012. Suppression of the interferon and NF-κB responses by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *J. Virol.* 86:8388–401.

89. **Tischler ND, Roseblatt M, Valenzuela PDT.** 2008. Characterization of cross-reactive and serotype-specific epitopes on the nucleocapsid proteins of hantaviruses. *Virus Res.* **135**:1–9.
90. **Hooper JW, Larsen T, Custer DM, Schmaljohn CS.** 2001. A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* **289**:6–14.
91. **Safronetz D, Zivcec M, Lacasse R, Feldmann F, Rosenke R, Long D, Haddock E, Brining D, Gardner D, Feldmann H, Ebihara H.** 2011. Pathogenesis and host response in Syrian hamsters following intranasal infection with Andes virus. *PLoS Pathog.* **7**:e1002426.
92. **Martinez VP, Padula PJ.** 2012. Induction of Protective Immunity in a Syrian Hamster Model Against a Cytopathogenic Strain of Andes Virus **95**:87–95.
93. **Hoffmann a, Natoli G, Ghosh G.** 2006. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* **25**:6706–16.
94. **Dimitris, Thanos y Maniatis T.** 1995. Virus Induction of Human IFN beta Gene Expression Requires the Assembly of an Enhanceosome. *Cell* **83**:1091–1100.
95. **Cárdenas WB, Loo Y-M, Gale M, Hartman AL, Kimberlin CR, Martínez-Sobrido L, Saphire EO, Basler CF.** 2006. Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling. *J. Virol.* **80**:5168–78.
96. **Hale BG, Randall RE, Ortín J, Jackson D.** 2008. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* **89**:2359–76.
97. **Reimer T, Brcic M, Schweizer M, Jungi TW.** 2008. poly(I:C) and LPS induce distinct IRF3 and NF-kappaB signaling during type-I IFN and TNF responses in human macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **83**:1249–57.
98. **Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM.** 1998. Virus-Dependent Phosphorylation of the IRF-3 Transcription Factor Regulates Nuclear Translocation , Transactivation Potential , and Proteasome-Mediated Degradation Virus-Dependent Phosphorylation of the IRF-3 Transcription Factor Regulates Nuclear Translo.
99. **Kumar KP, McBride KM, Weaver BK, Dingwall C, Reich NC.** 2000. Regulated nuclear-cytoplasmic localization of interferon regulatory factor 3, a subunit of double-stranded RNA-activated factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **20**:4159–68.

100. **Prescott J, Hall P, Acuna-Retamar M, Ye C, Wathelet MG, Ebihara H, Feldmann H, Hjelle B.** 2010. New World hantaviruses activate IFN λ production in type I IFN-deficient vero E6 cells. *PLoS One* **5**:e11159.
101. **Emeny JM, Morgan MJ.** 1979. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *J. Gen. Virol.* **43**:247–52.
102. **Levine JR, Prescott J, Brown KS, Best SM, Ebihara H, Feldmann H, Diseases I, Program SP, Laboratories RM.** 2010. Antagonism of Type I Interferon Responses by New World Hantaviruses.
103. **Khaiboullina SF, Rizvanov A a, Deyde VM, St Jeor SC.** 2005. Andes virus stimulates interferon-inducible MxA protein expression in endothelial cells. *J. Med. Virol.* **75**:267–75.
104. **Talon J, Horvath CM, Polley R, Basler CF, Muster T, Palese P, García-Sastre a.** 2000. Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.* **74**:7989–96.
105. **Bhatt D, Ghosh S.** 2014. Regulation of the NF- κ B-Mediated Transcription of Inflammatory Genes. *Front. Immunol.* **5**:71.
106. **Cimica V, Dalrymple NA, Roth E, Nasonov A, Mackow ER.** 2014. An Innate Immunity-Regulating Virulence Determinant Is Uniquely Encoded within the Andes Virus Nucleocapsid Protein **5**:1–10.
107. **Matthys V, Mackow ER.** 2012. Hantavirus regulation of type I interferon responses. *Adv. Virol.* **2012**:524024.
108. **Tischler ND, Fernández J, Müller I, Galeno H, Villagra E, Mora J, Ramírez E, Roseblatt M, Pablo DT.** 2003. Complete sequence of the genome of the human isolate protein structure analysis 201–210.
109. **Rang A.** 2010. Modulation of innate immune responses by hantaviruses. *Crit. Rev. Immunol.* **30**:515–27.
110. **Prescott JB, Hall PR, Virginie S, Ye C, Hjelle B, Bondu-hawkins VS.** 2007. Early Innate Immune Responses to Sin Nombre Hantavirus. *J. Immunol.* **179**:1796–1802.
111. **Bowie AG, Unterholzner L.** 2008. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **8**:911–22.

112. **Basler C, Mikulasova A.** 2003. The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J. Virol.* **77**:7945–7956.
113. **Vera-Otarola, Jorge.** 2009. Estudio de la Traducción del mRNA del segmento S del Hantavirus Andes: Caracterización de elementos moduladores en *cis* y en *trans*. Universidad de Santiago de Chile.