



Facultad de Ciencias
Escuela de Ciencias

Profesor Patrocinante:
Dr. Eugenio Ramírez V.
Instituto de Salud Pública
de Chile

Profesor Co-Patrocinante: Dr.
Luis Zaror Instituto de
Microbiología Clínica
Universidad Austral de Chile.

Estudio del Ciclo replicativo de Hantavirus Andes

Tesis de grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
grado de Licenciado en Ciencias
Biológicas

Marcelo Alejandro Barría Matus
Valdivia Chile 2004

Agradecimientos

Apelar a los recuerdos, disfrutando el presente es lo necesario para saber a quien agradecer en este paso fructífero, la tesis.

Me gustaría agradecer en primer lugar al Dr. Eugenio Ramírez V. por la dedicación y confianza brindada, así mismo por esos momentos de sana tertulia, contruidos sobre el único cimiento del aprender.

Agradecer también al Dr. Jorge Fernández por su disponibilidad y dedicación al desempeño de esta tesis; a las Doctoras Maritza Ríos, Maria Isabel Jersic y a sus respectivos laboratorios por entregar herramientas imprescindibles para el desempeño de este proyecto.

Al Sub-Departamento de Salud del Instituto de Salud Publica de Chile, considerando por supuesto a las secretarias, por cada uno de los favores brindados.

A la Dra. Gladis Ruiz D. por el apoyo en cada una de las “locuras” que tenían como única finalidad el aprender y crecer.

A mi familia, a mi madre la Sra. Delia Matus G. y al Sr. José González M; sin ellos estos sueños no serían realidad, les estaré siempre muy agradecidos. Los quiero mucho. A mis hermanos y sobrinos, por sus rezos y buenos deseos.

A mis otras familias: Araya García, Aguayo Matus; a cada uno de sus integrantes, por sus oraciones y apoyo.

A mis otros hermanos, mis hermanos espirituales de Serrano 999, a Claudio Araya, Claudio García, Claudio Rojas, Osvaldo Vidal, Ricardo González y Karen Yáñez, por disfrutar y crecer con los tragos dulces y amargos entregados por la Vida, además por ese apoyo incondicional y la simplicidad de las cosas...

A mis amigos-compañeros de laboratorio: Carlos Cáceres, Angélica Reyes, Paula Gálvez, Mayerling Ríos por los buenos momentos, por las alegrías y derrotas de algún resultado, por la retroalimentación.

A los integrantes de la Unidad de Desarrollo, a Pamela Araya, a la Sra. María Ibáñez, por enseñar con tanta dedicación y esmero el amor al trabajo. Al Sr. Luís Sánchez F. por la locura cuerda, por sus risas y buenos momentos, por todo la paciencia, gracias Don Luís.

A cada uno que confió y apoyo este trabajo.

A la Vida y a Valdivia, una siendo pilar fundamental de la otra.

INDICE DE MATERIAS

TITULO	I
INDICE DE MATERIAS	III
INDICE DE TABLAS	VI
INDICE DE ESQUEMAS	VI
INDICE DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCION	5
MATERIALES Y METODOS	11
1. Cultivo celular.	11
2. Infecciones en cultivos celulares	11
3. Inmunofluorescencia Indirecta	12
4. Ensayos antivirales	13
5. Amplificación mediante RT-PCR de los segmentos S, M y L virales.....	14
5.1 Purificación de RNA	14
5.2 Reacción para RT-PCR	14
5.3 Detección del DNA amplificado.....	18
6. Obtención de plásmidos con insertos de los productos de PCR para los segmentos S, M y L de hantavirus Andes	18
6.1 Purificación del amplificado	18
6.2 Ligamiento en el vector de clonamiento Pgem-T	19
6.3 Transformación de productos ligados en bacterias JM-109	20
6.3.1 Preparación de células electrocompetentes	20
6.3.2 Método de transformación	20
6.4 Detección de los transformantes	21

6.4.1 Identificación de colonias transformantes	21
6.4.2 PCR para la detección de los transformantes	21
6.4.3 Almacenamiento y mantención de las colonias positivas	22
7. Estimación semicuantitativa del número de copias	22
7.1 Determinación del número de copias	22
8. Construcción de RNA controles para los fragmentos S, M y L.....	23
8.1 Purificación de DNA plasmidial	23
8.2 Secuenciamiento genético.....	23
8.3 Análisis de secuencias	23
8.4 Orientación del inserto	24
8.5 Análisis computacional de sitios de restricción para el vector de clonamiento y los productos clonados para modificar	24
8.6 Modificación de los plasmidios mediante la delección de un fragmento por digestión con enzimas de restricción	25
8.7 Ligamiento de los controles plasmidiales modificados digeridas.....	26
8.8 Transcripción <i>in vitro</i> de los RNA controles	30
8.8.1 Purificación de los DNA plasmidiales modificados	30
8.8.2 Digestión del DNA plasmidial modificado y transcripción <i>in vitro</i> de los fragmentos S, M y L.....	30
8.8.3 Transcripción <i>in vitro</i> de los plasmidos	30
8.8.4 Purificación de RNA	31
8.8.5 Determinación concentración de RNA	31
8.9 Determinación del número de copias.....	32
9. Determinación número de copias mediante RT-PCR cuantitativo competitivo (QC-RT-PCR)	32
9.1 Reacción del RT-PCR competitivo cuantitativo.....	32

RESULTADOS	35
1. Determinación de la síntesis de proteínas virales en células Vero E6 infectadas con Virus Andes a un MOI de 0,1 pfu.	35
2. Síntesis de RNA de los fragmentos S y M en células Vero E6 utilizando una multiplicidad de 0,1 y 2,5 pfu	40
3. Determinación semi-cuantitativa de la síntesis de los RNA S y M en infecciones con virus Andes.....	44
4. Cuantificación de los niveles de RNA S, M y L sintetizados en células Vero E6 infectadas con virus Andes a MOI de 2,5 pfu	49
5. Determinación de RNA S en la fracción extracelular	53
6. Efectos de antivirales en el ciclo replicativo del virus Andes a un MOI 0,1 pfu	58
6.1 Actinomicina D.....	59
6.2 Puromicina	64
6.3 Tunicamicina	69
6.4 Cicloheximida	74
6.5 Ribavirina.....	74
DISCUSION	77
CONCLUSIONES	87
BIBLIOGRAFIA	88

INDICE DE TABLAS

TABLA I	Descripción de los partidores utilizados en los distintos ensayos	16
TABLA II	Enzimas de restricción utilizadas para la obtención de RNA controles	25
TABLA III	Enzimas de digestión utilizadas para linearización de plasmidios.....	30
TABLA IV	Número de copias de DNA y RNA de los segmentos S y M a distintas diluciones.....	46

INDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA I	Esquema de sitio de unión de los partidores y RT-PCR del Segmento S con los partidores S _{1 Forw} y S _{3 rev}	17
ESQUEMA II	Generación de controles plasmidiales modificados.....	28
ESQUEMA III	Trascrición <i>in vitro</i> para obtención de RNAs controles S, M y L.....	29

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cinética de la expresión de antígenos virales totales de Andes virus, en células Vero E-6, utilizando un suero de paciente infectado con SCPH	37
Figura 2. Cinética de la expresión de las proteínas virales N y G1 en células Vero E-6 infectadas con Andes virus, utilizando anticuerpos monoclonales contra N y G.....	38
Figura 3. Síntesis de los fragmentos RNA S y M en células Vero E6 infectadas con Andes virus a un MOI de 0,1.....	42
Figura 4 Síntesis de los fragmentos S y M en células Vero E6 infectadas con Andes virus a un MOI de 2,5.....	43
Figura 5. Determinación de las tasas de amplificación para el RT-PCR de los segmentos S y M, utilizando cantidades conocidas de RNA, en diluciones seriadas	46
Figura 6. Semi cuantificación del número de copias de RNA de los segmento S y M de Andes virus en células Vero E6 con MOI de 0,1 pfu a los distintos tiempos pi	47
Figura 7. Semi cuantificación del número de copias de RNA de los segmento S y M de Andes virus en células Vero E6 a un MOI de 2,5 pfu a los distintos tiempos pi.....	48
Figura 8. QC-RT PCR para los fragmento S y L a un MOI de 2,5 a distintos tiempo pi.....	51
Figura 9. Determinación de sensibilidad de los RT-PCR para los fragmentos S, M y L, utilizando cantidades conocidas de RNA templado	56
Figura 10 (A) RT-PCR de los segmentos S y M de muestras intracelulares y extracelulares correspondientes a las 24 hrs. pi.	57
Figura 10 (B) RT-PCR de los segmentos S, M y L de muestras intracelulares y extracelulares correspondientes a las 24 hrs. pi.	57
Figura 10 (C) Semi-Nested PCR de muestras del segmento S intra y extracelulares amplificadas, correspondientes a las 24 hrs pi con un MOI de 2.5.....	57
Figura 11 Cinética de la expresión de antígenos virales totales de Andes virus, en células Vero E-6 utilizando Actinomicina D.	61

Figura 12 Cinética de la expresión de la proteína N viral de Andes virus, en células Vero E-6, utilizando Actinomicina D.	62
Figura 13 Síntesis de RNA S, M y L en células Vero E6 infectadas con Andes virus a un MOI de 0,1, utilizando Actinomicina D	63
Figura 14 Cinética de la expresión de antígenos virales totales de Andes virus, en células Vero E-6, utilizando Puromicina.	66
Figura 15 Cinética de la expresión de la proteína N viral de Andes virus en células Vero E-6, utilizando Puromicina.	67
Figura 16 Síntesis de RNA S, M y L en células Vero E6 infectadas con Andes virus a un MOI de 0,1, utilizando Puromicina	68
Figura 17 Cinética de la expresión de antígenos virales totales de Andes virus en células Vero E-6, utilizando Tunicamicina.	71
Figura 18 Cinética de la expresión de la proteína N viral de Andes virus en células Vero E-6, utilizando Tunicamicina.	72
Figura 19 Síntesis de RNA S, M y L en células Vero E6 infectadas con Andes virus a un MOI de 0,1, utilizando Tunicamicina	73
Figura 20 Síntesis de RNA S, M y L en células Vero E6 infectadas con Andes virus a un MOI de 0,1, utilizando Cicloheximida	75
Figura 21 Síntesis de RNA S, M y L en células Vero E6 infectadas con Andes virus a un MOI de 0,1, utilizando Ribavirina.....	76

ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico.
FIT C	Isotiocianato de fluoresceína.
H ₂ O _{depc}	Agua bidestilada tratada con dietilpirocarbonato.
hpi	Horas post infección.
ml	Mililitros.
mM	Milimolar.
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensajero .
RNA _t	Ácido Ribonucleico de transferencia.
MOI	Multiplicidad de Infección.
ng	Nanogramos.
nM	Nanomolar.
PBS	Solución balanceada de sales de fosfato pH 7,2 .
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasas .
PCR _{Nested}	Reacción anidada de PCR.
pg	Picogramos.
pfu	Unidad formadora de placas .
pi	post infección.
pM	picomoles
RNA	Ácido ribonucleico.
QC-RT-PCR	RT-PCR Competitivo Cuantitativo
RT-PCR	PCR acoplada con Reacción de Transcripción Reversa (del inglés Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction)

Seg. L	Segmento de RNA viral grande (del inglés Large)
Seg. M	Segmento de RNA viral mediano (del inglés Medium)
Seg. S	Segmento de RNA viral pequeño (del inglés Small)
SBF	Suero bovino fetal.
μg	Microgramos.
μl	Microlitros.
μM	Micromolar.

Resumen

Los Hantavirus son virus pertenecientes a la familia *Bunyaviridae* causantes del Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus (SCPH). Los primeros casos en América se reportaron en el año 1993 en los Estados Unidos, detectándose más de un centenar de casos con una letalidad del 30 al 40% causados por el virus Sin Nombre. A partir de 1996 se han diagnosticado 370 casos de SCPH en Chile, generados por el virus Andes. Hasta el momento no existe información sobre el ciclo replicativo de este virus. Los objetivos de esta tesis fueron caracterizar la síntesis *in vitro* de los RNAs y las proteínas del virus Andes, y evaluar el efecto de antivirales en el ciclo infectivo. Se infectaron células Vero E6 con virus Andes con un MOI de 0,1 y 2,5 pfu, deteniendo la infección a distintos tiempos pi. La síntesis y nivel de los RNAs virales se determinó mediante RT-PCR y QC-RT-PCR, respectivamente. La síntesis de las proteínas N, G1 y totales fueron evaluadas mediante inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales y suero de pacientes infectados. Se analizó el efecto de la Actinomicina-D, Cicloheximida, Puromicina, Ribavirina y Tunicamicina en infecciones con MOI de 0,1.

A un MOI de 0,1, las proteínas N y G1 fueron detectadas a partir de las 24 y 48 horas pi, respectivamente. El RNA S se detectó a partir de las 18 y 48 horas pi a nivel intracelular y extracelular, respectivamente. El RNA M se detectó a partir de las 48 horas pi simultáneamente en el intracelular y extracelular. A un MOI de 2,5 el RNA S se detectó a partir de las 4 horas pi ($9,25 \times 10^6$ copias totales) en el intracelular, aumentando posteriormente hasta las 24 hrs pi ($6,52 \times 10^7$ copias). Los RNA M y L se detectaron a partir de las 6 horas pi en las células ($1,87 \times 10^6$ copias), aumentando hasta las 24 hrs pi ($8,17 \times 10^7$ copias). A las 24 horas pi hubo

sólo detección de los fragmentos M y L en el extracelular. La actinomicina-D afectó la síntesis de los RNA virales. La cicloheximida y puromicina retrasaron la síntesis de los RNA y proteínas virales. La Ribavirina inhibió la síntesis de los RNA y proteínas virales. Estos resultados demuestran que el virus Andes tiene una cinética de síntesis de RNA y proteínas similares a otros Hantavirus. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el crecimiento *in vitro* de virus Andes sería más rápido del virus Sin Nombre. Los hallazgos muestran la utilidad de los antivirales para estudiar diferentes etapas del ciclo replicativo viral, y el eventual uso como estrategia terapéutica en pacientes infectados.

Summary

Hantaviruses are viruses belonging to the family Bunyaviridae that cause Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome (HCPS). HCPS is produced by Sin Nombre Virus that has been identified since the syndrome was first reported in the United States in 1993, an hundred cases with a 30-40% mortality rate. In Chile, 370 cases of HCPS caused by Andes virus infection have been reported since 1996. There are not reports on the replication cycle of this virus until now. The goals of this thesis were to characterize the *in vitro* synthesis of RNAs and proteins of Andes virus, and to evaluate the effect of antiviral drugs in the replication cycle. Vero E6 cells were infected with Andes virus at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 and 2.5, and then incubated during different times post-infection (pi). The synthesis and level of the viral RNAs was detected by RT-PCR and QC-RT-PCR, respectively. The synthesis of N, G1, and totals viral proteins were detected by immunofluorescence assay with monoclonal antibodies and seropositive human sera. The effect of Actinomycin-D, Cycloheximide, Puromycin, Ribavirin and Tunicamycin was analyzed in infections with MOI of 0.1.

N and G1 proteins were detected at 24 and 48 hours pi at an MOI 0.1, respectively. The S RNA was detected at 18 and 48 hrs pi in the cells and extracellular, respectively. The M RNA was detected simultaneously at 48 hrs pi in the cells and extracellular. The S RNA was detected at 4 hrs pi (9.25×10^6 copies) in the cells at an MOI 2.5, and then it increased until 24 hrs pi (6.52×10^7 copies). The M and L RNAs were detected at 6 hrs pi in the cells (1.87×10^6 copies), later these increased until 24 hrs pi (8.17×10^7 copies). M and L RNAs were only detected in extracellular fraction at 24 hrs pi. Actinomycin-D inhibited the synthesis of viral

RNAs. Cycloheximide and puromycin delayed the synthesis of viral RNA and proteins. The Ribavirin inhibited the synthesis viral RNA and proteins. These results show that Andes virus has a similar kinetics of RNAs and proteins synthesis than other Hantavirus. However, our results suggest that replication cycle of Andes virus would be quicker than Sin Nombre virus. The findings show the useful of the antiviral drugs to study different stages of the replication cycle, and the eventual use as therapeutic strategy in infected patients.

Introducción

Los hantavirus son virus que pertenecen al género Hantavirus y a la familia Bunyaviridae. Estos virus están distribuidos mundialmente en dos zonas geográficas: Euroasia y América. La infección viral en humanos produce dos cuadros clínicos diferentes: Fiebre hemorrágica con síndrome renal (HFRS) en Europa y Asia y Síndrome Pulmonar (SPH) o Cardiopulmonar por Hantavirus (SCPH) en las Américas. El SCPH se compone de 4 etapas: el prodromo febril, la fase cardiopulmonar que normalmente puede durar de 2 a 10 días y presentarse como una suave enfermedad caracterizada por el acortamiento de la respiración y la necesidad de suplementar oxígeno o hasta un severo compromiso cardiopulmonar con falla respiratoria, acidosis láctica, shock y muerte. En algunos casos los pacientes presentan convalecencia y diuresis (Duchin J y cols, 1994). El reservorio natural del virus son los roedores silvestres, en los cuales se presenta una infección asintomática mediada por una rápida respuesta inmune contra las proteínas que conforman la envoltura y el core viral (Schmaljohn C y cols, 1997).

En 1993, en la región del sur-oeste de los Estados Unidos se diagnosticaron los primeros casos de personas infectadas por hantavirus producto de un brote de SPH. Estudios epidemiológicos han demostrado que durante este brote se generó más de un centenar de casos, detectándose pacientes con SPH en 23 estados de los Estados Unidos (Khan A, y cols 1996). El brote fue producido por el hantavirus denominado Sin Nombre. A partir de esa fecha se han diagnosticado casos en Argentina, Brasil, Canadá, Chile, Panamá, Paraguay y

Uruguay, con un rango de mortalidad que fluctúa entre el 40 y 50% (Hjelle C, y cols, 1994),y (<http://www.minsal.cl>)

Los reservorios naturales varían de un serotipo viral a otro, es así como el huésped natural del virus Sin Nombre es el roedor *Peromyscus maniculatus* y del virus Andes es el *Oligorysomys longicaudatus* (López N y cols, 1997)

La forma de transmisión del virus desde el roedor infectado con hantavirus al humano es mediante el contacto de fluidos biológicos como excretas o saliva. Una vez que el virus ha ingresado por las vías respiratorias se produce una infección de las células de la mucosa respiratoria. Las células blanco de la infección son las células endoteliales de los vasos sanguíneos y eventualmente las células mononucleares periféricas sanguíneas (Kaki S R y cols 1995). Recientemente se ha reportado además infección de hantavirus en células dendríticas, lo que ayudaría a comprender un poco más la patogenia de este virus (Raftery MJ y Cols 2002). Posteriormente, los virus pasan al torrente sanguíneo donde se inicia su multiplicación generalizada (Zaki S R y cols, 1995).

En el año 2001, investigadores del Instituto de Salud Pública de Chile lograron aislar por primera vez el virus Hanta a partir de un paciente asintomático infectado que posteriormente desarrolló un SCPH (Galeno H y cols, 2001). Este hallazgo demostró, por primera vez a nivel mundial, el virus en una persona asintomática y permitió cultivar *in vitro* la cepa Andes del virus Hanta.

Los hantavirus son virus esféricos de un tamaño aproximado, entre 90 a 120 nm de diámetro, constituidos por un genoma tri-segmentado de hebra única y de sentido negativo, denominados S, M y L (Small, Medium, y Large). Estos segmentos codifican respectivamente la proteína de la nucleocápside denominada

N de 50 Kd, dos glicoproteínas de membrana denominada G1 y G2 de 58 y 68Kd y una polimerasa viral dependiente de RNA de 247 Kd.

El proceso de replicación de los Bunyaviridae se inicia con la unión del virus a la célula blanco. Algunos estudios han descrito que este proceso de unión estaría mediado por la interacción de las glicoproteínas virales (G1 y G2) con integrinas celulares (Gavrilovskaya I, 1998 y 1999). Otros investigadores proponen que una proteína celular de 50Kd estaría directamente involucrada en el proceso de unión del virus a la célula (Kim T y cols, 2002). Luego, se produce la entrada y el desnudamiento del virus probablemente mediado por endocitosis y fusión de la membrana viral a los endosomas. Posteriormente hay un evento de transcripción primaria en el cual el RNA viral de sentido negativo produce la síntesis de RNA mensajero (RNAm), empleando partidores derivados del RNAm de la célula huésped y la polimerasa asociada al virus (Bouloy M y cols, 1976). A continuación se realiza el proceso de traducción de los RNAm de los fragmentos L y S en los ribosomas libres; y los RNAm del fragmento M en los ribosomas asociados a la membrana del aparato de Golgi. Aquí también ocurre la glicosilación de las proteínas de la envoltura. En la actualidad se sabe que las glicoproteínas G1 y G2 de hantavirus Sin Nombre pueden ser expresadas en forma independiente, por un codón de inicio distinto (Spiropoulou C. y cols, 2003). Estudios realizados con virus Seoul describen la síntesis de proteínas virales a partir de las 2 hrs pi y la detección de RNA a partir de 1 hr pi (Kariwa H. y cols, 2003). Posteriormente, hay una síntesis de RNA complementario de sentido positivo, el cual sirve de templado para la formación de RNA viral y para el proceso de replicación viral. Los distintos RNA interactúan con las proteínas N ya sintetizadas formando complejos RNA-

Nucleoproteína. Se ha demostrado la presencia de RNAs virales, complementarios y mensajeros deletados en los extremos 3' y 5' en infecciones con hantavirus Seoul. Se ha propuesto que los RNAs deletados de menor tamaño estarían involucrados en procesos de autorregulación viral de la síntesis de partículas infectivas (Meyer B. y cols, 2002).

Las señales de empaquetamiento para el ensamblaje de hantavirus no son bien conocidas, pero basándose en estudios de microscopía electrónica con virus Sin Nombre (Goldsmith C. y cols, 1995) y virus Black Creek Canal (Ravkov y cols, 1997) sugieren que los hantavirus del nuevo mundo se ensamblarían en zonas celulares asociados a la membrana plasmática, en contraste de los hantavirus del viejo mundo que lo harían en el retículo de Golgi. Finalmente se produce la fusión de las vesículas plasmáticas con las membranas plasmáticas y, por consiguiente, la liberación de partículas víricas maduras.

El uso de drogas para conocer las etapas del ciclo infectivos de los virus está ampliamente documentado (Veza A y cols, 1979; Eshita Y y cols, 1985; Short N y cols, 1982). Sin embargo, existe muy poca información sobre el efecto de compuestos antivirales en hantavirus. Recientemente, se ha descrito que en infecciones *in vitro* con virus Hantaan, la ribavirina tendría un efecto mutágeno en los RNA virales y por lo tanto decrecería la síntesis de los distintos RNA virales (Severson W. y cols, 2003). La cicloheximida y la actinomicina D han tenido efectos sobre el ciclo replicativo de algunos Bunyavirus, como por ejemplo virus Bunyanwera (Eshita Y. y cols, 1985 y Short N. y cols, 1982).

Considerando los antecedentes descritos anteriormente y teniendo la posibilidad de utilizar la cepa de hantavirus Andes aislada en Chile, y la

caracterización *in vitro* del ciclo replicativo de ésta. Esta tesis plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

Hipótesis de trabajo:

La cepa Andes tendría un crecimiento "*in vitro*" más rápido respecto a la cepa Sin Nombre, lo que correlacionaría con la mayor virulencia sugerida para esa cepa de los virus Hanta.

Objetivo del proyecto:

Caracterizar el crecimiento "*in vitro*" de la cepa Andes CH-7913 del virus Hanta aislado en Chile.

Objetivo Específicos:

1. Caracterizar la cinética de síntesis de polipéptidos virales durante el ciclo infectivo de la cepa Andes en células Vero E-6.
2. Determinar la cinética de síntesis de RNA virales de los distintos fragmentos de la cepa Andes en células Vero E-6.
3. Evaluar el efecto antiviral de algunas drogas como la Ribavirina, Tunicamicina, Cicloheximida, Puromicina y Actinomicina-D en el ciclo infectivo del virus Andes.

Materiales y Métodos

1. Cultivo celular.

Para los ensayos de infecciones se utilizaron células Vero E6 (células epiteliales de riñón de mono verde africano), las cuales fueron cultivadas con medio mínimo esencial Eagle, suplementadas con suero bovino fetal (S.B.F) al 10% (Gibco 16000-044) y 2 mM L-glutamina. El medio fue cambiado cada 4 a 5 días. La línea celular utilizada en todos los experimentos fue obtenida a través de la ATCC (American Type Culture Collection) en Estados Unidos.

2. Infecciones en cultivos celulares.

La cepa de hantavirus Andes Chi-7913 fue usada para infectar células Vero E6 a una multiplicidad de infección de 0,1 y 2,5 pfu (Galeno y cols, 2002). Todos los procedimientos para manipular la cepa Andes fueron realizados en un laboratorio de bioseguridad clase III con prácticas de laboratorio específicas para éste.

Las células fueron crecidas en microplacas de 16 pocillos (Nalgene Nunc 178599) con 300 µl de medio Eagle con 2% de S.B.F. e incubadas a 37° C y 5% CO₂. Posteriormente se tomaron muestras intracelulares y extracelulares con un MOI de 0,1 pfu a las 0, 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 169 hrs pi y a las 2, 4, 6, 12, y 24 hrs pi con un MOI de 2,5 pfu. Para obtener las muestras intracelulares, las monocapas de células fueron despegadas de las microplacas utilizando 100 µl de tripsina/EDTA (0,005% de tripsina y 0,53 mM de EDTA) (Gibco 15400-054). La suspensión celular obtenida fue centrifugada a 227 xg por 5

minutos. El sobrenadante fue eliminado y las células almacenadas a -70°C . Las muestras intracelulares correspondieron al lisado de estas células una vez que fueron descongeladas. Las muestras extracelulares correspondieron a la totalidad del medio de cultivo ($600\ \mu\text{l}$), con el cual se mantuvieron las células durante la infección; es decir era el sobrenadante de los cultivos celulares. Estas muestras también fueron almacenadas a -70°C hasta ser utilizadas.

3. Inmunofluorescencia Indirecta.

Alrededor de 15.000 células Vero E6 (correspondiente a un pocillo) infectadas con virus Andes fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS). Luego, las células fueron fijadas con 30 ml de metanol/acetona al 50% por 10 minutos a 4°C . Posteriormente, a las células ya fijadas se les agregó en forma separada $20\ \mu\text{l}$ de anticuerpo monoclonales contra la proteína N (7B3/F7), contra la glicoproteína G1 (3C7/B10) y un suero policlonal de paciente infectado con hantavirus (703329) diluido 1/100 en PBS por pocillo. Se incubó a 37°C por 30 minutos, en cámara húmeda. Luego se lavó tres veces por 5 minutos con PBS. A continuación se agregó $20\ \mu\text{l}$ de conjugado FITC 1/600 en cada pocillo. Posteriormente se incubó 30 minutos a 37°C para finalmente montar las muestras y observar en microscopio de fluorescencia. Las células fueron consideradas positivas cuando presentaron un patrón de fluorescencia granular en el citoplasma celular y también asociadas a membranas de Golgi.

4. Ensayos antivirales.

Para evaluar la citotoxicidad de los antivirales, las células se mantuvieron por 7 días en medio DMEM al 2% SBF en micropocillos Nunc, probando distintas concentraciones de los antivirales (los ensayos se realizaron en quintuplicado).

Las concentraciones ensayadas fueron las siguientes:

Actinomicina D: 67 - 133 – 333 - 667 pg/ μ l

Cicloheximida: 83 – 167 – 417 - 833 pg/ μ l

Puromicina: 333 – 667 – 1.667 – 3.333 pg/ μ l

Ribavirina: 17 - 33 – 67 - 100 ng/ μ l

Tunicamicina: 83 – 167 – 417 - 833 pg/ μ l

Posteriormente se realizaron infecciones de células Vero E6 con virus Andes, utilizando un MOI de 0,1 PFU y agregando antivirales en las concentraciones antes señaladas. Los cultivos fueron mantenidos por 5 días en medio DMEM al 2% SBF. Luego se tomaron las células y los medios de cultivo (sobrenadantes) en forma separada como se describió anteriormente (ver punto 2).

Para evaluar el efecto de los antivirales sobre la síntesis de proteínas virales se realizaron ensayos de Inmunofluorescencia Indirecta utilizando un suero de paciente y un anticuerpo monoclonal para la proteína N. También se realizaron RT-PCR con la finalidad de determinar la síntesis de los fragmentos de RNA de los segmentos S, M y L virales.

5. Amplificación mediante RT-PCR de los segmentos S, M y L virales.

5.1 Purificación de RNA

El RNA de las muestras extracelulares e intracelulares fue extraído utilizando el sistema NucliSens de Biomeriux (Boom R y cols, 1990). Este sistema es un método automatizado de extracción de ácidos nucleicos que utiliza tiocianato de guanidina y sílica para la purificación del RNA. El RNA extraído fue resuspendido en un volumen final de 55 μ l para ambos tipos de muestras.

5.2 Reacción para RT-PCR.

Se realizó RT-PCR para los segmentos S, M y L virales, amplificando un fragmento de 589 pb (pares de bases), 626 pb, y 671 pb, respectivamente. Se usaron los partidores que se describen en la tabla 1. Para la amplificación se utilizó el kit One-Step RT-PCR con Platinum *Taq* System de Invitrogen (10928-042).

Para cada amplificación se preparó una mezcla de reacción que consistió en: 6,25 μ l de tampón mezcla de reacción 2X (0,4 mM de dNTPs, 2,4 mM de $MgSO_4$), 2 μ l de sulfato de magnesio ($MgSO_4$) 5 mM, 2 μ l de agua tratada con dietilpirocarbonato, 0,5 μ l de cada uno de los partidores 50 pM (Ver Tabla 1), 0,25 μ l de las enzimas Transcriptasa reversa / *Taq* DNA polimerasa (mezcla de enzimas) y 2 μ l RNA purificado (ver obtención de RNA). La reacción se realizó en

termociclador Applied Biosystems Gene Amp (PCR System 2700); y consistió en 30 minutos a 50°C para el proceso de la transcripción reversa, seguido de 94°C por 2 minutos y 35 ciclos que consistieron en una denaturación de 94°C por 1 minuto , 55°C por 1 minuto de hibridación para el segmento S y 50°C de hibridación para el segmento M y L, seguido de 72°C por 2 minutos de extensión y finalmente 72°C por 5 minutos para la extensión final. Los productos finales fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa, visualizados con Bromuro de Etidio y posteriormente almacenados a -20°C.

Los ensayos para determinar la síntesis de RNA con un MOI de 0,1 y 2,5 pfu se realizaron utilizando partidores específicos para los segmentos S y M. Esto debido a condiciones metodológicas, ya que la amplificación del segmento L no estaba implementada al momento de estos ensayos. Posteriormente se implementó la técnica de amplificación para el segmento L, lo que permitió cuantificar los segmentos S, M y L mediante PCR competitivo cuantitativo.

Tabla 1.

Descripción de los partidores utilizados en los distintos ensayos.

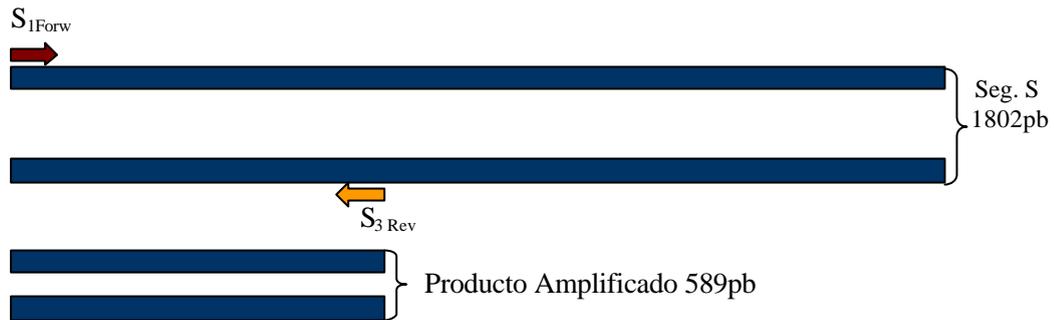
Segmento	Nombre partidor	Secuencia del partidor (5'-3')	Tamaño amplificado en (pb)	Posición
Segmento S	S1 Forw	agtagactccttgagaagctac	589	5-26
	S3 Rev	gcagtaggcatggaaacata		574-594
Segmento M	HAndes M Forw	aagcaaaaaattaaagaagtg	626	23-44
	HAndes M Rev	gataatgacagtggtgtgctg		627-649
Segmento L	HAndes L Forw	agaaaaatggaaaagtatagaga	671	30-53
	HAndes L Rev	aatttagggaatgacacatgaa		679-701

Esquema 1

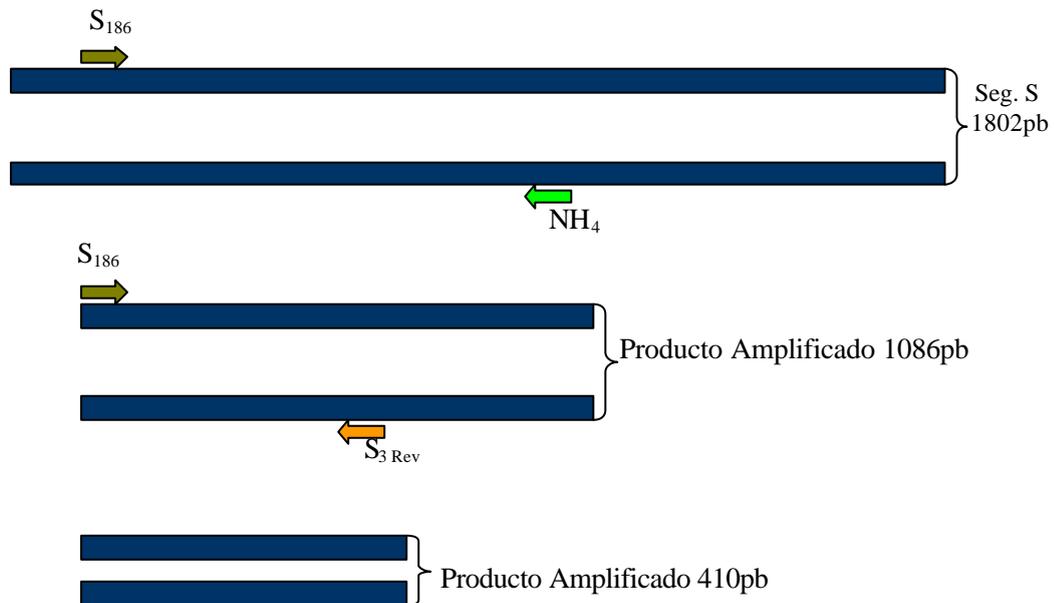
A. Esquema del sitio de unión de los partidores y los productos esperados mediante RT-PCR del segmento S con los partidores $S_{1\text{ Forw}}$ y $S_{3\text{ Rev}}$.

B Esquema del sitio de unión de los partidores para el PCR semi-Nested del fragmento S.

A



B



5.3 Detección del DNA amplificado.

Para la detección de los productos amplificados se realizó electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón TAE con una concentración final de 0,2 µg/ml de Bromuro de Etidio (BrEt). Se mezcló 2 µl del producto final de reacción con 1 µl de tampón de carga para DNA 2X (EDTA 12 mM, glicerol al 25 %, azul de bromofenol al 0,05 % y xilencianol al 0,05 %). Posteriormente se hizo la electroforesis a 120 volts constantes por 30 minutos. La migración de los productos amplificados fue comparada con los controles positivos y estándares de tamaño molecular para DNA de bajo rango Fermentas (SM0383).

La visualización de los productos se realizó en un transiluminador ultravioleta Gel Doc 2000 Bio-Rad. Los resultados fueron analizados y almacenados en el programa computacional Quantity One versión 4.0.3 de Bio-Rad.

6. Obtención de plásmidos con insertos de los productos de PCR para los segmentos S, M y L de hantavirus Andes.

6.1 Purificación del amplificado.

Para la purificación de los productos del RT-PCR del los segmento S, M y L virales, se utilizó el Kit ENZA de Omega (D2501-01). Este sistema se basa en la purificación de los productos amplificados a partir del gel de agarosa. Para esto se utilizó agarosa de bajo punto de fusión Bio-Rad (161-3112) al 1 % disuelta en tampón TAE, con una concentración final de 0,1 µg/ml de Bromuro de Etidio (BrEt). Los productos amplificados se mezclaron con 2 µl de tampón de carga para DNA 2X (EDTA 12 mM, glicerol al 25 %, azul de bromofenol al 0,05 % y xilencianol

al 0,05 %) y se realizó la electroforesis en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Una vez verificado el producto del RT-PCR se procedió a cortar el trozo de agarosa y se depositó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Luego, se agregó 700 μ l de tampón de unión y se incubó a 55°C por 7 minutos hasta la disolución de la agarosa. La mezcla fue depositada en columnas de purificación y centrifugada a 18.338 xg por 1 minuto. La solución colectada fue descartada. A continuación se agregó 600 μ l de tampón de lavado y se centrifugó a 19.722 xg por 1 minuto (esta etapa se repitió 2 veces). Finalmente se agregó en la columna 20 μ l de tampón de elusión y se centrifugó por 2 minutos a 19.722 xg. Los productos eluidos fueron almacenados a -20°C.

6.2. Ligamiento en el vector de clonamiento Pgem-T.

Para ligar los productos purificados del RT-PCR de los segmentos S, M y L, se utilizó el kit de clonamiento Pgem-T de Promega (A3600). Para esto se mezcló en hielo 1 μ l de vector Pgem-T (50 ng/ μ l), diluido 1/5, 2 μ l de tampón de ligación Promega (60 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10 % polietilenglicol 8000, 1 μ l de enzima ligasa (3 U/ μ l) y 6 μ l de producto purificado del RT-PCR de los segmentos S, M y L. La mezcla fue mantenida a 14°C por 14 hrs. Una vez que las muestras fueron ligadas se conservaron a -20°C, hasta el momento de la transformación.

6.3 Transformación de productos ligados en bacterias JM-109.

6.3.1 Preparación de células electrocompetentes

A 4 ml de caldo de cultivo Luria se agregó 20 μ l de stock de células electrocompetentes JM-109 (Promega) y se dejó crecer a 37°C toda la noche. A la mañana siguiente se traspasó 500 μ l del cultivo bacteriano a 50 ml de caldo Luria y nuevamente se dejó crecer a 37 °C por 2 a 3 horas hasta alcanzar una Densidad Óptica ₆₀₀(D.O) de 0,6 a 0,8. Luego, se centrifugó a 629 xg por 10 minutos a 4°C. El sedimento bacteriano se resuspendió en 6 ml de agua desionizada estéril y se volvió a centrifugar a 629 xg por 10 minutos. Posterior al segundo lavado, el concentrado se resuspendió en glicerol estéril al 10 % y se centrifugó bajo las mismas condiciones previamente mencionadas. Finalmente el sedimento se resuspendió en 1 ml de glicerol estéril al 10 %.

6.3.2 Método de transformación

Para la transformación de los productos ligados de cada uno de los segmentos (S, M y L), se mezcló en una cubeta de electroporación (BioRad 165-2086), 60 μ l de células electrocompetentes previamente tratadas (ver protocolo de preparación de células electrocompetentes) con 2 μ l de producto de ligación de los distintos fragmentos. La mezcla fue electroporada en Gene Pulser II de Biorad. Luego, se agregó 700 μ l de medio SOC y se dejó crecer a 37°C por 2 horas con agitación constante. A continuación las células se centrifugaron y el precipitado bacteriano se resuspendió en 100 μ l del mismo sobrenadante. Las bacterias fueron sembradas en Placas Petri con agar Luria, suplementado con 36 μ l de ampicilina (50 mg/ml) e incubadas en estufa a 37°C durante toda la noche.

6.4 Detección de los transformantes

6.4.1 Identificación de colonias transformantes.

Todas las colonias transformadas fueron analizadas mediante PCR para verificar la presencia del inserto. Para esto se tomó una porción de las colonias crecidas en las placas de Petri con agar Luria/ampicilina y resuspendidas en 50 μ l de agua destilada desionizada estéril. Las bacterias fueron lisadas por ebullición para posteriormente realizar la detección de los transformantes por PCR.

6.4.2 PCR para la detección de los transformantes.

La detección de los transformantes se realizó por PCR, utilizando el Kit de reacción Taq DNA Polymerase de Invitrogen (18038-042). La mezcla de reacción de cada una de las amplificaciones consistió en: 2,5 μ l de tampón 10X, 1 μ l de Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) 25 mM, 1 μ l de partidor Forward 50 pM y 1 μ l de partidor reverse 50 pM, 13,5 μ l de agua libre de nucleasas, 0,2 μ l de enzima Taq DNA polimerasa y 5 μ l de sobrenadante del lisado bacteriano. Los partidores utilizados fueron los partidores M13/pUC: Forward: 5' CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3' y Reverse: 5' AGCGGATAACAATTCACACAGG 3', los cuales se ubican a 110 pb del lugar de inserción del fragmento ligado en el vector Pgem-T.

La amplificación se realizó en un termociclador Applied Biosystems Gene Amp (PCR System 2700), y consistió en 94°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos que consistieron en 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minutos y

finalmente 72°C por 7 minutos para la extensión final. Los productos finales fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa, siguiendo el protocolo antes descrito y posteriormente almacenados a -20°C. La migración de los amplificados fue comparada con estándares de tamaño molecular Fermentas (SM0383).

6.4.3 Almacenamiento y Mantención de las colonias positivas

Las colonias transformantes positivas para los segmentos S, M y L fueron crecidas en 16 ml de caldo de cultivo Luria suplementado con 36 µl de ampicilina (50 mg/ml) e incubadas a 37°C durante toda la noche. Luego se tomó 700 µl del caldo de cultivo y se mezcló con 300 µl de glicerol estéril al 100 %. Posteriormente fueron almacenadas y mantenidas a -70°C hasta ser utilizadas.

7. Estimación semicuantitativa del número de copias.

7.1 Determinación del número de copias.

La determinación del número de copias de los distintos fragmentos se realizó calculando el peso de los fragmentos ligados en el vector de clonamiento P-gem T de acuerdo al siguiente análisis matemático:

$$\mathbf{P.M. = Gr / Mol}$$

Donde:

P.M = molecular.

Gr = Gramos

Mol = Número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$).

Una vez conocido en valor en gramos, se calculó N_0 , que es el número de copias de RNA iniciales.

N_0 se calculó siguiendo la siguiente ecuación:

$$N_0 = \text{ng reales de RNA inicial} \times 6,023 \times 10^{14} / \text{PM (ng)}, \text{ o}$$

$$N_0 = \text{g reales de RNA inicial} \times 6,023 \times 10^{23} / \text{PM (g)} \times 1 \times 10^9$$

8. Construcción de RNA controles para los fragmentos S, M y L

8.1 Purificación de DNA plasmidial

Para la purificación de DNA plasmidial se utilizaron los protocolos descritos por Birinboim y Doly (1979) e Ish-Horowicz y Burque (1981). Además se realizó amplificación del DNA plasmidial siguiendo el protocolo de amplificación ya descrito (punto 6.4.3). Para el secuenciamiento genético se purificaron los productos del PCR, obtenidos de los transformantes positivos para los insertos modificados de los segmentos S, M y L, utilizando el protocolo antes descrito (ver punto 6.1).

8.2 Secuenciamiento genético

Las muestras fueron secuenciadas en el secuenciador automático ABI PRISM 310, utilizando el Kit de secuenciamiento DNA Sequencing, BigDye™ Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction, de ABI PRISM. (4390242)

8.3 Análisis de secuencias

El análisis de las secuencias obtenidas para cada uno de los segmentos se realizó utilizando los programas computacionales Bio Edit y Cromas. Cada una de

las secuencias obtenidas fue comparada con secuencias prototipos obtenidas del Gene Bank.

8.4 Orientación del inserto

A cada una de las secuencias se les determinó la orientación del inserto, con la finalidad de obtener el sentido de los fragmentos clonados de los segmentos S, M y L modificados. Para esto se utilizó los partidores Forward y Reverse M13/pUC, cuyas zonas complementarias están en el vector Pgem-T. Al alinear la secuencia del vector P-gem-T, con las secuencias obtenidas, se logró determinar la orientación de los insertos. Para esto se comparó con las secuencias prototipos presentes en Gene Bank. En el caso de la secuencia del segmento S, se comparó con la secuencia número de registro AY228237, el segmento M se comparó con la secuencia número de registro AY228238 y la secuencia del segmento L se comparó con la secuencia número de registro AY228239. Cada una de las secuencias patrones prototipo corresponden a la secuencia del serotipo Hantavirus Andes chileno, número de registro CHI-7913.

8.5 Análisis computacional de sitios de restricción para el vector de clonamiento y los productos clonados a modificar.

Se realizó un análisis de restricción del vector Pgem-T y de las secuencias de los productos clonados de los segmentos S, M y L, mediante el programa computacional y base de datos Web Cutter 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>.)

El criterio utilizado para el análisis, fue identificar aquellas enzimas de restricción que no cortaran el vector Pgem-T y que solo cortaran en dos sectores

el producto ligado, o dos enzimas distintas que cumplieran con esta condición; teniendo la precaución de que el lugar del corte de la enzima de restricción fuese en un sitio distinto al lugar de unión de los partidores. Para el caso del segmento S se utilizó la enzima KspAI, quedando un fragmento inserto modificado en el vector Pgem-T de 395 pb. Para el fragmento M se utilizaron las enzimas Eco 109I y Hind III, quedando un fragmento inserto modificado en el vector Pgem-T de 469 pb. Finalmente para el segmento L se utilizó la enzima Eco 147 I, quedando con un tamaño de inserto modificado de 445 pb (Ver tabla 2 y Esquema 1).

Tabla 2.

Enzimas de restricción utilizadas para la obtención de RNA controles

Segmento	Enzima de restricción	Lugar del Corte	Secuencia	Tamaño liberado (pb)
S	KspAI	160	gtt* aac	194
		354	caa* ttg	
M	Eco 0109I	361	g*gncc ccng *g	157
	Hind III	204	a*agctt ttcga*a	
L	Eco147 I	172	agg*cct	226
		398	tcc*gga	

8.6 Modificación de los plasmidios modificados mediante la delección de un fragmento por digestión con enzimas de restricción.

Cada uno de los plasmidios que contenían los insertos de los segmentos S, M y L fueron sometidos a reacciones de digestiones en forma separada. Para las distintas reacciones se mezcló 6 µl de DNA plasmidial purificado, 2 µl del tampón apropiado para cada una de las enzimas (en la reacción del segmento S y L se

utilizó en tampón B+ (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA) y para el segmento M se utilizó en tampón Y⁺/Tango (33 mM Tris-Acetato, pH 9,3, 10 mM Mg-acetato, 66 mM K-acetato y 0,1mg/ml BSA), 10 µl de agua destilada desionizada estéril y 1 µl de enzima de restricción apropiada para cada uno de las reacciones (para la reacción del segmento S se utilizó la enzima KspA I (10 U/µl) Fermentas (ER1031), para el segmento M se utilizaron las enzimas EcoO109I (U/µl) Fermentas (ER0261) y la enzima de restricción Hind III (10 U/µl) Fermentas (ER0501) y para la reacción del segmento L se utilizó la enzima Eco147 I (10 U/µl) Fermentas (ER0421). Las reacciones de digestión fueron incubadas a 37 °C durante toda la noche.

8.7 Ligamiento de los Controles Plasmidiales Modificados digeridas.

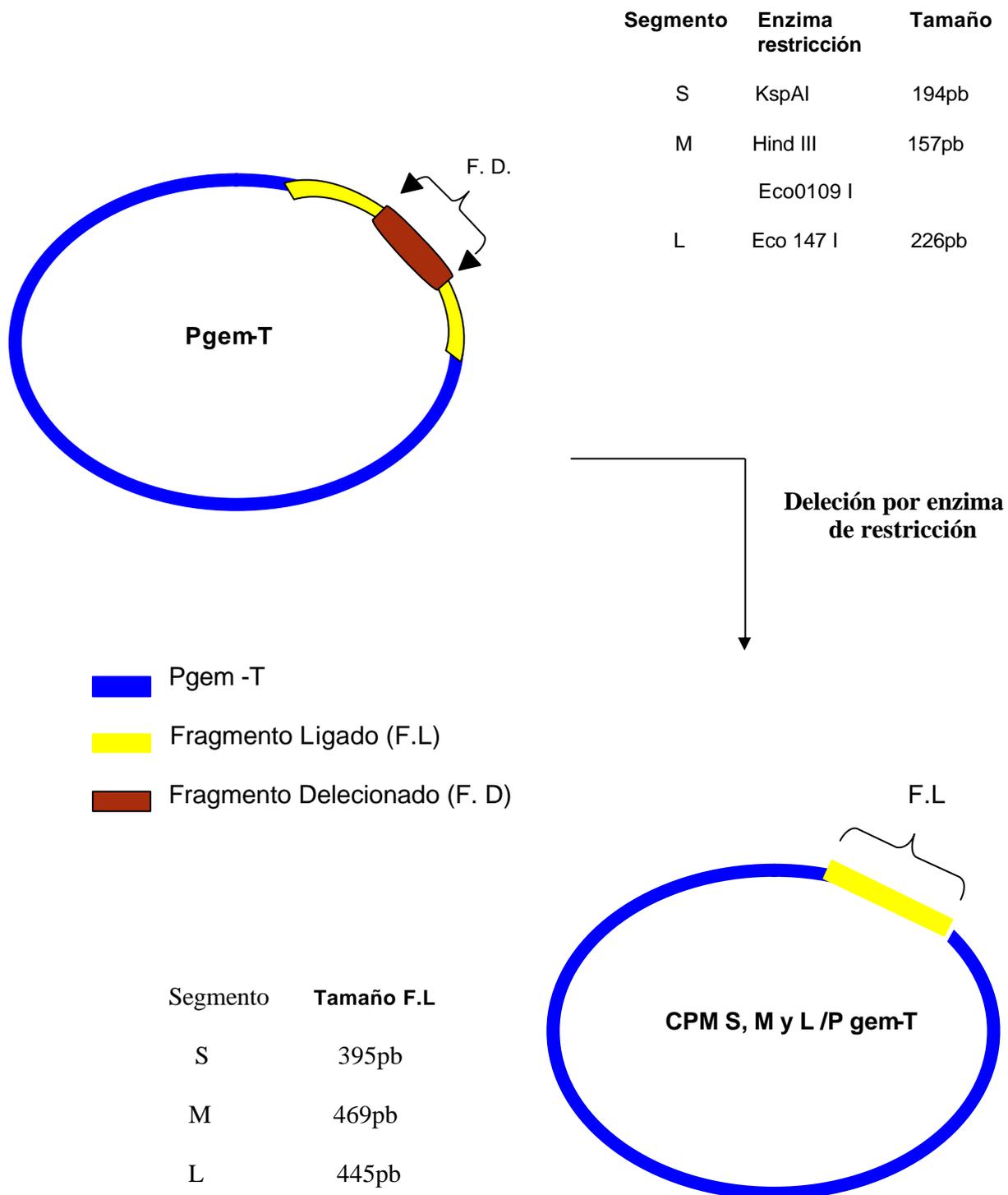
Antes de realizar la ligación de las muestras digeridas, estas fueron visualizadas en geles de agarosa al 2 % como se describe en punto 5.3 y purificadas utilizando Kit de extracción E.N.Z.A (ver punto 6.1). Para el segmento S se visualizaron dos bandas, una de mayor tamaño de 3.395 pb la cual fue purificada para posteriormente ser ligada y una banda de 194 pb, la cual fue eliminada. Para los segmentos M y L las bandas de 3.469 y 3.445 pb fueron purificadas y las bandas de 157 y 226 pb fueron descartadas.

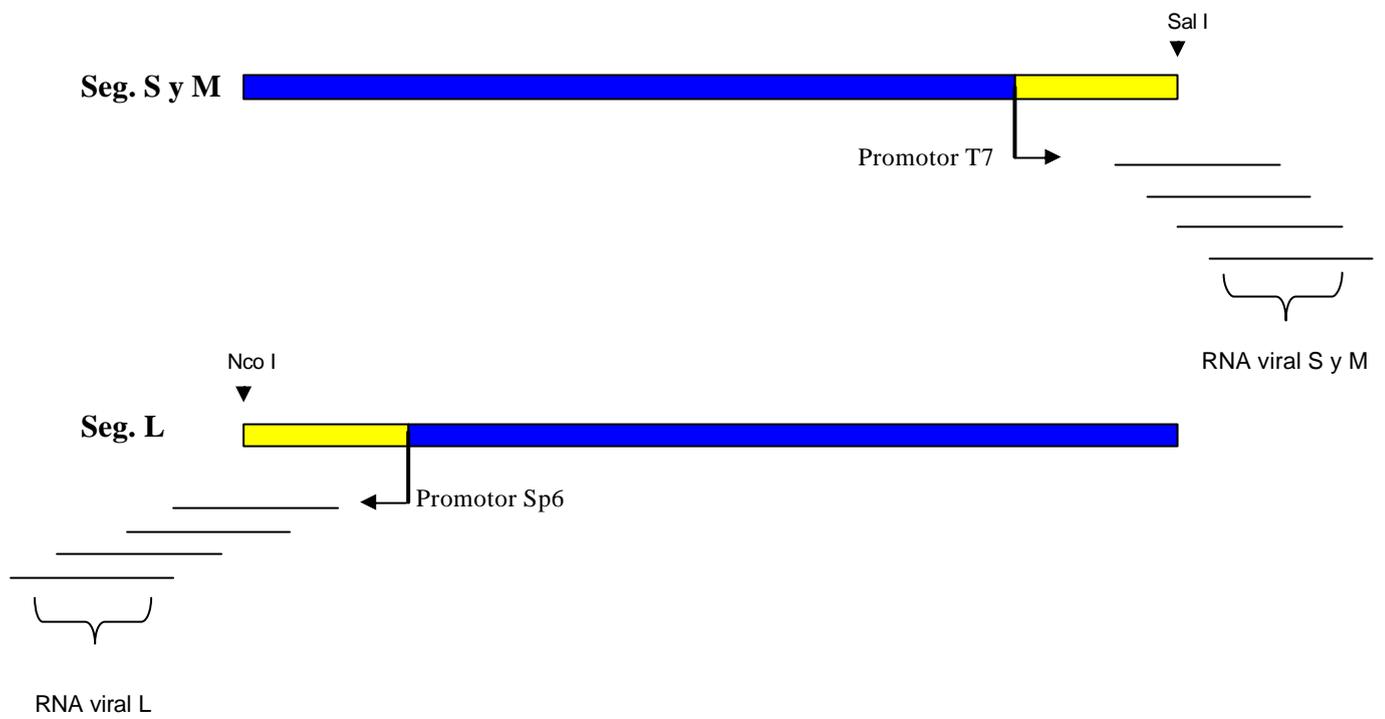
Para la ligación de los productos clonados y purificados con delección de los segmentos S, M y L se mezcló en hielo, 5 µl de tampón de ligación Promega (60 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% polietilenglicol 8000)1 µl de enzima ligasa Promega (3 U/µl), 6 µl de producto del plasmidio purificado y

linearizado con deleción con 2 μ l de agua libre de nucleasas. Las mezclas fueron mantenidas a 14°C por 14 horas. Las muestras ya ligadas, fueron conservadas a -20°C, hasta el momento de ser transformadas. Los controles modificados fueron transformados de acuerdo a protocolo de transformación descrito previamente. (punto 6.3.2). Los controles plasmidiales modificados fueron denominados CPM S/ Pgem-T para el control S, CPM M/ Pgem-T para el control M y CPM L/ Pgem-T para el control L. Al igual que las transformaciones anteriores, los productos transformados fueron analizados por PCR utilizando protocolo ya descrito (ver punto 6.4.3 y esquema 1).

Esquema 2

Generación de controles plasmidiales modificados



Esquema 3Trascrición *in vitro* para obtención de RNAs controles S, M y L

8.8 Transcripción *in vitro* de los RNA controles

8.8.1 Purificación de los DNA plasmidiales modificados.

Para la purificación de DNA plasmidial se utilizaron los protocolos de purificación plasmidial descrito por Birinboim y Doly (1979) e Ish-Horowitz y Burque (1981).

8.8.2 Digestión del DNA plasmidial modificado y transcripción *in vitro* de los fragmentos S, M y L.

Con el objetivo de linearizar los plasmidios y posteriormente transcribir el fragmento ligado de acuerdo a la orientación de los insertos se realizó la digestión de los controles CPM S/Pgem-T, CPM M/Pgem-T y CPM L/Pgem-T. Para los CPM S/Pgem-T y CPM M/Pgem-T se utilizó la enzima de restricción Sal I y para el CPM L/Pgem-T se utilizó la enzima Nco I (Ver tabla 3).

Tabla 3.

Enzimas de digestión utilizadas para linearización de plasmidios

Segmento	Enzima de Restricción	Promotor de Transcripción	Tamaño RNA
CPM S/Pgem-T	Sal I	T7	395
CPM M/Pgem-T	Sal I	T7	469
CPM L/Pgem-T	Nco I	SP6	445

8.8.3 Transcripción *in vitro* de los plasmidios.

El RNA de sentido negativo de los controles plasmidiales modificados (CPM) linearizados se obtuvo utilizando el Kit Riboprobe Combination, Sistema SP6/T7 de Promega (P1460). Para esto, se activaron los promotores de transcripción ya

sea Sp6 o T7, dependiendo de la orientación de los insertos modificados (Ver tabla 3 y esquema 2).

8.8.4 Purificación de RNA

La purificación del RNA de sentido negativo de los C.P.M se realizó utilizando columnas de purificación Quick Spin Columns, Sephadex G-50 de Roche (127015). La mezcla de reacción de transcripción, de cada uno de los fragmentos modificados, se llevó a un volumen final de 70 μ l con agua libre de nucleasas. A continuación, la solución se depositó en las columnas y se centrifugó por 4 minutos a 1.600 xg. Al eluido que contenía el RNA purificado de cada uno de los C.P.M, se le agregó 0,5 volúmenes de acetato de amonio 7,5 M y 2,5 volúmenes de etanol al 100 %. La mezcla se dejó durante 2 horas a -70°C . Posteriormente se centrifugó por 30 minutos a 18.338 xg. El precipitado fue resuspendido en 20 μ l de agua libre de nucleasas y se almacenó a -70°C hasta su utilización.

8.8.5 Determinación concentración de RNA.

El RNA purificado de los distintos fragmentos modificados fue medido por absorbancia en un espectrofotómetro Smart Spec 3000 de Bio-Rad. Para los cálculos de la determinación de concentración se utilizó la equivalencia:

$$1 \text{ valor de absorbancia} = 40 \mu\text{gr /ml de RNA.}$$

8.9 Determinación del número de copias.

La determinación del número de copias de los fragmentos modificados se realizó calculando el peso de las distintas moléculas modificadas de acuerdo al siguiente análisis matemático:

$$P.M. = Gr / Mol$$

Donde:

P.M =Peso molecular.

Gr = Gramos

Mol = Número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$).

Una vez conocido el valor en gramos, se calculó N_0 , que es el número de copias de RNA iniciales.

N_0 se calculó siguiendo la siguiente ecuación:

$$N_0 = ng \text{ reales de RNA inicial} \times 6,023 \times 10^{14} / PM (ng), \text{ o}$$

$$N_0 = g \text{ reales de RNA inicial} \times 6,023 \times 10^{23} / PM (g) \times 1 \times 10^9$$

9. Determinación número de copias mediante RT-PCR Cuantitativo Competitivo (QC-RT-PCR).

9.1 Reacción del RT-PCR competitivo cuantitativo.

La reacción del RT-PCR se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito. (ver punto 5.2). Para esto se agregó cantidades conocidas del RNA

purificado modificado como competidor (2 μ l), y también la muestra de origen intracelular o extracelular (2 μ l). La visualización de los productos amplificados se realizó siguiendo el protocolo ya descrito.

Para la cuantificación de los amplificados competidores modificados y las muestras se utilizó el programa computacional Quantity One versión 4.0.3 de Bio-Rad. A cada una de las bandas del competidor y la muestra se les determinó Densidad Óptica (D.O.). Los valores de D.O. de las muestras fueron multiplicados por un factor de corrección (F.C) que fue relativo para cada uno de los segmentos amplificados:

$$F.C = \text{Longitud del competidor (S-M-L)} / \text{Longitud de las muestras (S-M-L)}.$$

Este Factor de Corrección iguala el tamaño del competidor y la muestra, para así tener valores con menor sesgo.

Los F.C fueron: 0,670 para el segmento S, 0,716 para el segmento M y 0,663 para el segmento L.

Posteriormente se determinó la razón entre las D.O del competidor y la muestra corregida. A este valor se le determinó P_0

$$P_0 = D.O. C.P.M / D.O M_C.$$

Donde:

$D.O_{C.P.M}$ = es la densidad óptica de los distintos competidores (S, M y L)

$D.O M_C$ = es la densidad óptica de las muestras corregidas.

El valor de P_0 se graficó en función del número de copias de RNA agregadas al inicio de la reacción del QC- RT-PCR. En la ecuación obtenida para cada una de las muestras, se reemplazó el valor de Y por 1. Este valor simboliza el punto donde los valores de D.O C.P.M y D.O M_c se igualan y por lo tanto, el valor obtenido correspondió al número de copias iniciales de RNA de la muestra. Posteriormente, todos los valores de número de copias fueron graficados y correlacionados de acuerdo al tipo y características de las muestras.

Resultados

Determinación de la síntesis de proteínas virales en células Vero E6 infectadas con virus Andes a un MOI de 0,1 pfu.

Con el suero de un paciente en fase convalesciente (n° 702339), de una persona infectada con hantavirus que previamente cursó un síndrome cardiopulmonar por hantavirus, se detectó la presencia de antígenos virales totales en zonas circunscritas de fluorescencia en cada uno de los campos visuales a partir de 24 hrs pi, (figura 1B) aumentando levemente a las 72 hrs pi (figura 1C). Los antígenos virales se distribuyeron en el citoplasma, y posteriormente en menor intensidad asociados a las membranas celulares (figuras 1 B y E). A partir de las 120 hrs pi los focos con fluorescencia aumentaron en forma progresiva hasta las 168 hrs pi, donde casi la totalidad de las células infectadas expresaban antígenos virales (figuras 1 E y F).

La proteína N fue detectada intracelularmente en zonas aisladas a partir de las 24 hrs pi (figura 2A), incrementándose a las 48 hrs pi (figura 2C). Durante este periodo se visualizó una distribución predominantemente intracitoplasmática. Posteriormente a las 72 hrs pi alrededor del 20 a 30% de las células infectadas expresaba la proteína N (figura 2E), lo cual aumentó 60 a 70% a las 120 hrs pi. En algunas células se observó una distribución perinuclear del antígeno (figura 2I). A las 168 hrs pi la totalidad de las células expresaban la proteína N, presentando una nivel de fluorescencia similar al visto al mismo tiempo pi con el suero de paciente (figuras 1F y 2I).

La glicoproteína G1 fue detectada en un bajo porcentaje de células a partir de las 48 hrs pi (figura 2D), aumentando escasamente a las 72 hrs pi (figura 2F). A

las 168 hrs pi alrededor del 80 % de las células infectadas expresaban G1 (figura 2J). Durante todo el período de tiempo, la glicoproteína G1 estuvo predominantemente asociada a membranas celulares (figuras 2D y J), además fue visualizada con menor intensidad y porcentaje de células respecto a la proteína N y a los antígenos totales (figuras 1F, 2I y 2J).

Figura 1.

Cinética de la expresión de antígenos virales totales de virus Andes, en células Vero E-6. Para la detección del antígeno se utilizó un anticuerpo policlonal (antisuero de paciente)

(A) Células Vero E-6 no infectadas a las 24 hrs pi (B) Células Vero E-6 infectadas a las 24 hrs p.i. (C) Células Vero E-6 infectadas a 48 hrs p.i. (D) Células Vero E-6 infectadas 72 hrs p.i. (E) Células Vero E-6 infectadas a 120 hrs p.i. (F) Células Vero E-6 infectadas a las 168 hrs p.i. Para esta cinética se utilizó un M.O.I de 0,1 pfu.

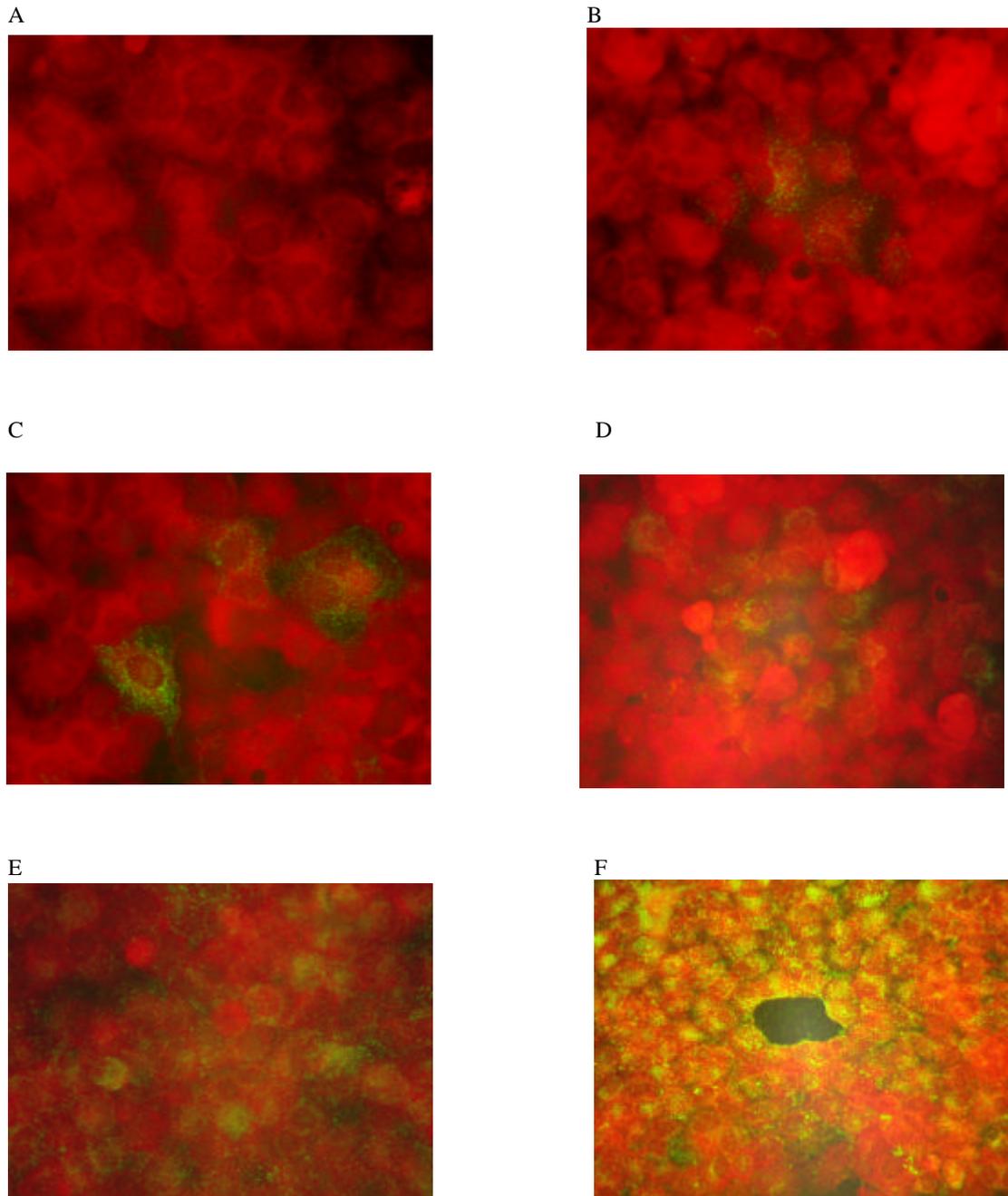
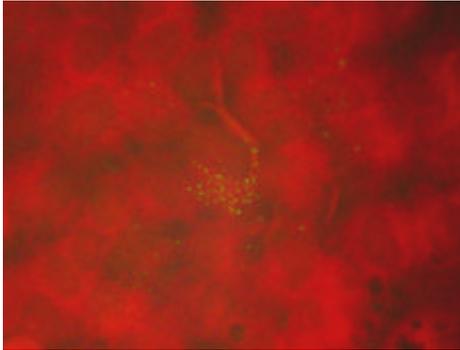


Figura 2.

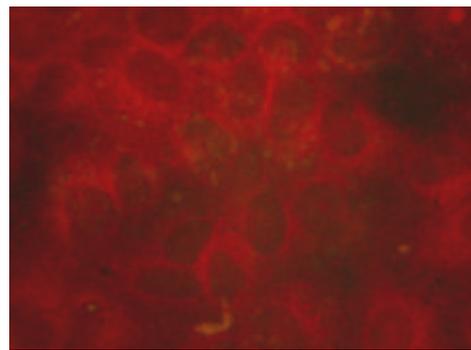
Cinética de la expresión de las proteínas virales N y G1 en células Vero E6 infectadas con virus Andes. Para la detección del antígeno se utilizaron anticuerpos monoclonales contra la proteína de la nucleocapside N (figuras A, C, E, G y I) y la glicoproteína G1 (figuras B, D, H, F y J).

(A) y (B) Células Vero E6 infectadas a las 24 hrs p.i, (C) y (D) Células Vero E-6 infectadas a 48 hrs p.i, (E) y (F) Células Vero E-6 infectadas 72 hrs p.i, (G) y (H) Células Vero E6 infectadas a 120 hrs p.i, (I) y (J) Células Vero E-6 infectadas a las 168 hrs p.i. Para esta cinética se utilizó un M.O.I de 0,1 pfu.

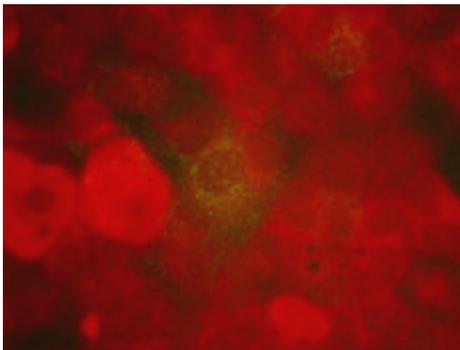
A



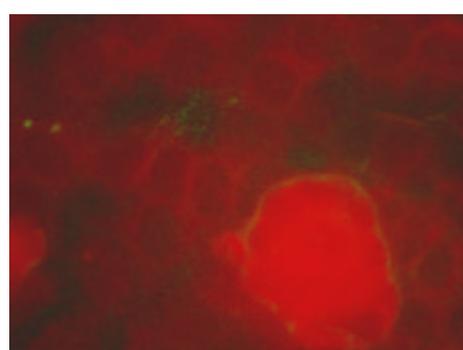
B



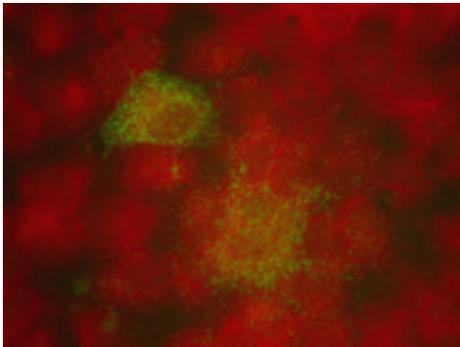
C



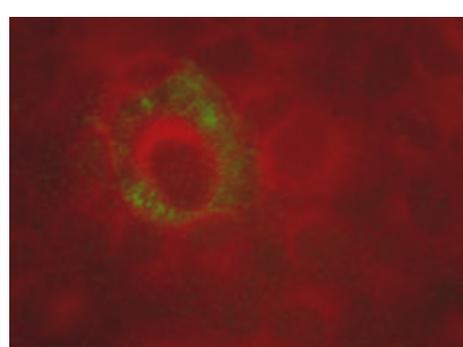
D



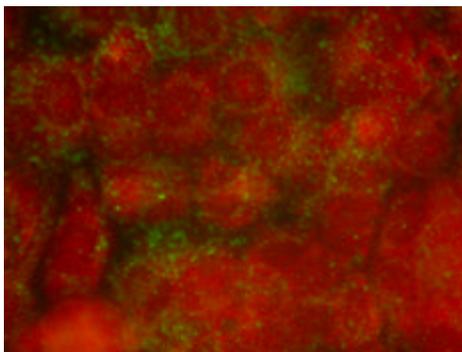
E



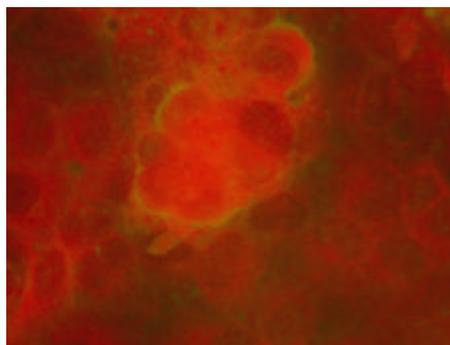
F



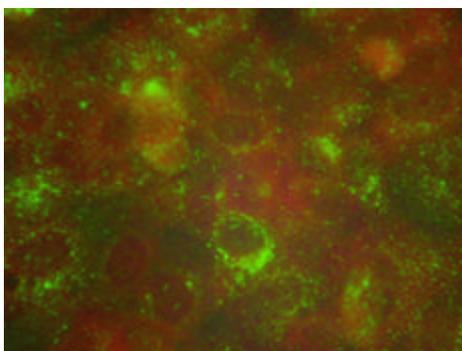
G



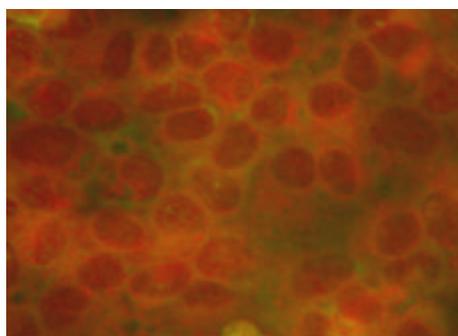
H



I



J



Síntesis de RNA de los fragmentos S y M en células Vero E6 utilizando una multiplicidad de 0,1 y 2,5 pfu.

A un MOI de 0,1 pfu se detectó RNA del fragmento S intracelularmente a partir de las 12 hrs pi (figura 3A carril 7), manteniendo un nivel de síntesis similar a las 18 horas pi (figura 3A carril 9). A partir de las 24 hrs pi la síntesis de RNA intracelular aumentó progresivamente (figura 3A carril 13), alcanzando el plateau (o nivel superior) a partir de las 96 hrs pi hasta las 168 hrs pi (figura 3A carriles 19, 21, 25 y 27). A las 24 hrs pi no se detectó síntesis de RNA en el extracelular y sólo, partir de los 48 hrs pi se pesquisó RNA del fragmento S en el sobrenadante (figura 3A carriles 14 y 16, respectivamente). Posteriormente la síntesis de RNA S aumentó rápidamente, alcanzando el nivel máximo de detección a partir de los 120 hrs pi (figura 3A carril 22). En los controles no infectados intracelular y extracelular no se detectó síntesis de RNA. (figura 3B carriles 29 y 30).

A la misma MOI, antes de las 24 hrs pi no hubo detección del fragmento M a nivel intracelular ni extracelular (figura 3B carriles 7, 9, 8, y 10 respectivamente). A partir de las 48 horas pi, el RNA M fue detectado intracelularmente (figura 3B carril 15) y al mismo tiempo pi, pero con menor intensidad, en el medio extracelular (figura 3B carril 16). A partir de las 48 horas pi hubo un aumento en la síntesis de RNA en las muestras intracelulares hasta las 96 hrs pi (figura 3B carriles 15, 17 y 19), hasta llegar al plateau a las 96 hrs pi. El RNA M aumentó en la fracción extracelular desde las 48 hrs pi hasta las 96 hrs pi (figura 3B carriles 16, 18 y 20 respectivamente), pero no se detectó diferencia a partir de 120 hrs pi con 144 y 168 hrs pi (figura 3B carriles 22, 24, y 26). No existió detección de RNA

M en las muestras de los controles no infectados intracelular y extracelular (figura 3B carriles 27 y 28).

En infecciones de células Vero E6 utilizando un MOI 2,5 se observó el segmento S en la fracción intracelular a partir de las 4 hrs pi (figura 4A carril 3), aumentando rápidamente a partir de las 6 hrs pi hasta las 24 hrs pi (figura 4A carriles 5, 7 y 9). A las 24 hrs pi no se detectó RNA S en la fracción extracelular (figura 4A carril 10). El RNA M se detectó a partir de las 4 hrs pi en muestras intracelulares (figura 4B carril 3), aumentado posteriormente su nivel (figura 4B carriles 5, 7 y 9). En las muestras extracelulares no se detectó el RNA M durante las 12 hrs pi (figura 4B carriles 2, 4, 6, y 8), pero se detectó a las 24 hrs pi (figura 4B carril 10), a diferencia de lo observado con el fragmento S.

Figura 3

Síntesis de los fragmentos RNA S y M en células Vero E6 infectadas con virus Andes a un MOI de 0,1. (A) Síntesis del fragmento S a distintos tiempos pi. Las muestras intracelulares corresponden a los carriles: 1, 3, 5, 7, 9 y las muestras extracelulares corresponden a los carriles 2, 4, 6, 8, 10.

(B) Síntesis del fragmento M a distintos tiempos pi. Las muestras intracelulares corresponden a los carriles: 1, 3, 5, 7, 9. Muestras extracelulares carriles 2, 4, 6, 8, 10.

El carril C corresponde a control positivo de células infectadas y los carriles 29 y 30 corresponden a controles no infectados intra y extracelulares respectivamente. Para ambos casos los carriles M corresponden a marcador de tamaño molecular de 100 pb

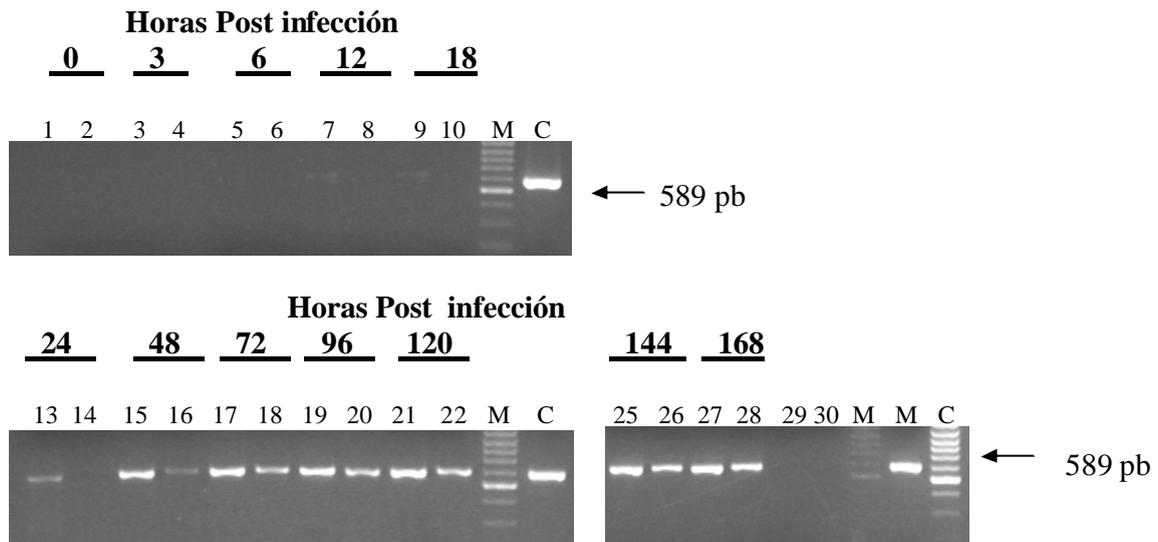
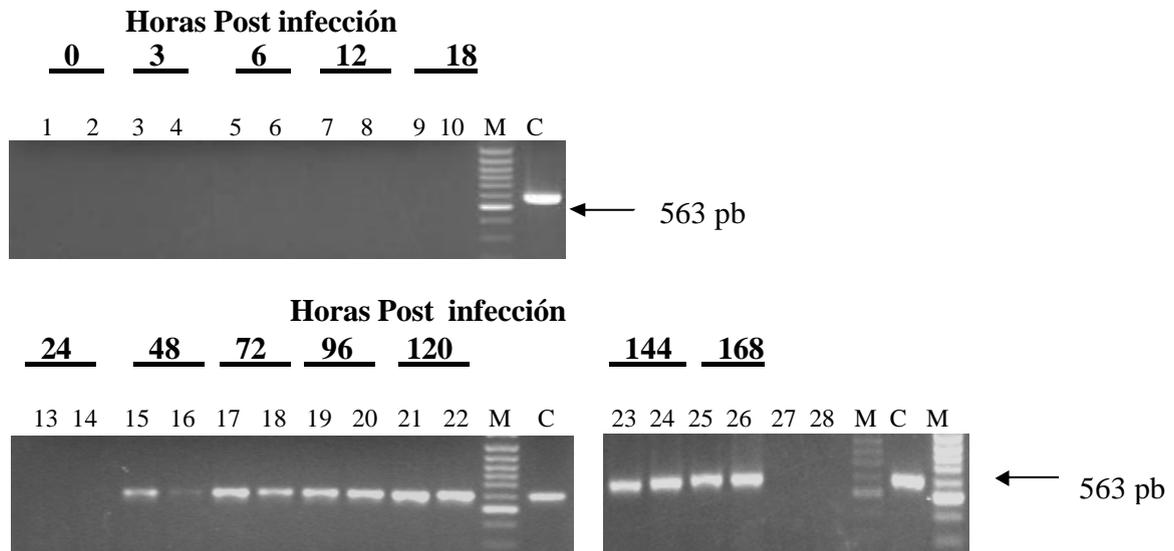
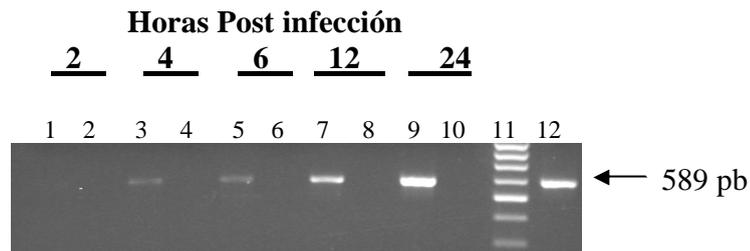
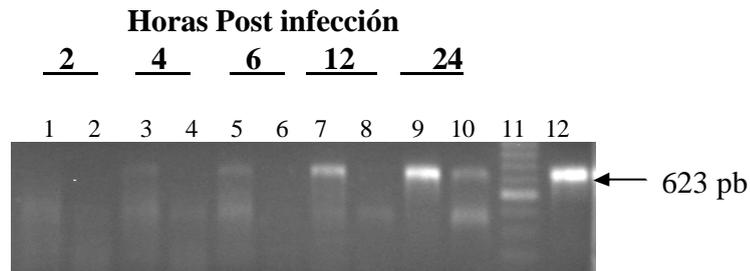
A**B**

Figura 4

Síntesis de los fragmentos S y M en células Vero E6 infectadas con virus Andes a un MOI de 2,5. (A) Síntesis del fragmento S a distintos tiempos p.i. Las muestras intracelulares corresponden a los carriles: 1, 3, 5, 7, 9. Las muestras extracelulares corresponden a los carriles 2, 4, 6, 8, 10.

(B) Síntesis del fragmento M a distintos tiempos p.i. Las muestras intracelulares corresponden a los carriles: 1, 3, 5, 7, 9. Las muestras extracelulares corresponden a los carriles 2, 4, 6, 8, 10.

Para ambos casos los carriles M corresponden a marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los carriles C corresponden a control positivo de células infectadas y los carriles 29 y 30 corresponden a controles no infectados intra y extracelulares respectivamente.

A**B**

Determinación semi-cuantitativa de la síntesis de los RNA S y M en infecciones con virus Andes.

Para determinar en forma semi-cuantitativa los niveles de RNA virales, se determinó la eficiencia de los RT-PCR para los segmentos S y M utilizando diluciones seriadas con cantidades iniciales conocidas de los RNA S y M (Figura 5 y tabla 4). Los valores de las tasas de amplificación para las reacciones de los segmento S y M fueron de 1,4550 y 1,4646, respectivamente. Considerando que la tasa máxima de amplificación teórica para cada una de las reacciones es 2, se determinó la eficiencia del RT-PCR, siendo de 72,75 % para la reacción de RNA S y 73,32 % para RNA M. Posteriormente se logró determinar el número de copias para las muestras intra y extracelulares a los distintos tiempos post infección.

A las 12 hrs pi y utilizando un MOI de 0,1pfu, se determinó $3,2 \times 10^6$ copias de RNA S intracelular, es decir 107 copias de RNA/célula. Posteriormente, aumentó rápidamente hasta alcanzar un plateau entre 27 y 30×10^6 copias de RNA a las 120 y 144 hrs pi (Figura 6A). Por su parte, el segmento M comenzó a detectarse a partir de las 48 horas pi con $12,6 \times 10^6$ copias de RNA totales o 420 copias RNA/célula. El RNA M aumentó hasta las 96 hrs pi con $2,17 \times 10^7$ copias de RNA, es decir 725 copias RNA/célula; alcanzando luego el plateau entre $1,90$ y $2,02 \times 10^7$ copias de RNA (Figura 6A).

En la fracción extracelular a las 48 hrs pi se detectó simultáneamente el segmento S y M con valores de copias muy similares (Figura 6B). Así, a las 48 hrs pi habían $4,7 \times 10^6$ y $4,5 \times 10^6$ copias de RNA S y M respectivamente. A partir de este período hasta las 96 hrs pi el número de copias de ambos segmentos fue

similar, alcanzado el plateau a las 96 hrs pi con $22,4 \times 10^6$ y $23,3 \times 10^6$ copias de RNA de los segmentos S y M (Figura 7). Estos resultados muestran una producción extracelular equimolecular de los RNA S y M, lo que pone de manifiesto que estos RNA provendrían de los viriones maduros liberados desde las células infectadas al espacio extracelular.

A las 4 hrs p.i, utilizando un MOI de 2,5 pfu se detectaron intracelularmente $4,9 \times 10^6$ copias de RNA S o 166 copias de RNA/célula. Posteriormente, a las 12 hrs pi, el número de copias intracelulares aumentó a $2,41 \times 10^7$ copias de RNA totales u 803 copias RNA/célula (Figura 7). A las 24 hrs pi se detectó un nivel máximo de $2,99 \times 10^7$ copias de RNA es decir 996 copias de RNA/célula. Por su parte el fragmento M se detectó a partir de las 6 hrs pi con $4,01 \times 10^6$ copias de RNA, es decir 138 copias RNA/célula. Al igual que para el fragmento S, el RNA M aumentó rápidamente a las 12 hrs pi detectándose $1,36 \times 10^7$ copias de RNA; alcanzando su máximo valor a las 24 hrs pi con $2,86 \times 10^7$ copias totales o 952 copias de RNA/célula. A las 12 hrs pi se observó un 76,7% mayor síntesis de RNA S respecto de M; sin embargo, a las 24 hrs pi la síntesis de ambos fragmentos se igualaron con solo una diferencia de 4,6% superior el fragmento S sobre el M (Figura 7).

Figura 5

Determinación de las tasas de amplificación para el RT-PCR de los segmentos S y M, utilizando cantidades conocidas de RNA, en diluciones seriadas. La concentración inicial del RNA (1×10^0) para el segmento S fue de 148,46 ng/ μ l y para el segmento M fue de 156,32 ng/ μ l. El carril C corresponde al control positivo y el carril M corresponde a marcador de tamaño molecular de 100 pb.

(A) RT-PCR con cantidades conocidas de RNA para el segmento S.

(B) RT-PCR con cantidades conocidas de RNA para el segmento M.

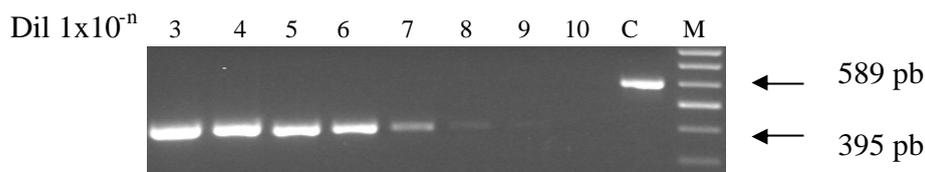
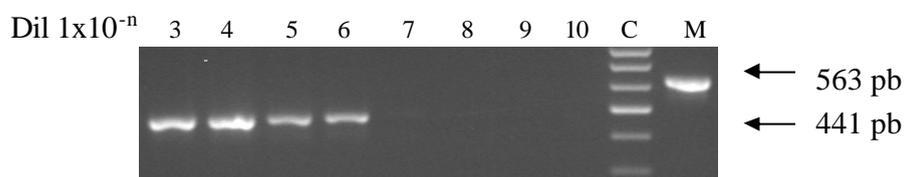
A**B**

Tabla 4

Número de copias de DNA y RNA de los segmentos S y M a distintas diluciones seriadas.

Dilución del RNA	RNA S		RNA M	
	Número copias DNA	Número copias RNA	Número copias DNA	Número copias RNA
1×10^{-3}	$1,6407 \times 10^{12}$	$1,41 \times 10^9$	$1,1971 \times 10^{12}$	$1,05 \times 10^9$
1×10^{-4}	$1,5482 \times 10^{12}$	$1,41 \times 10^8$	$1,1880 \times 10^{12}$	$1,05 \times 10^8$
1×10^{-5}	$1,4513 \times 10^{12}$	14.112.357	$7,5967 \times 10^{11}$	10.528.546
1×10^{-6}	$1,2769 \times 10^{12}$	1.411.236	$7,0217 \times 10^{11}$	1.052.857
1×10^{-7}	$5,2351 \times 10^{11}$	141.124	$6,3151 \times 10^{10}$	105.285
1×10^{-8}	$1,0312 \times 10^{11}$	14.112	0	10.528
1×10^{-9}	$9,9047 \times 10^{10}$	1.411	0	1.053
1×10^{-10}	0	141	0	105

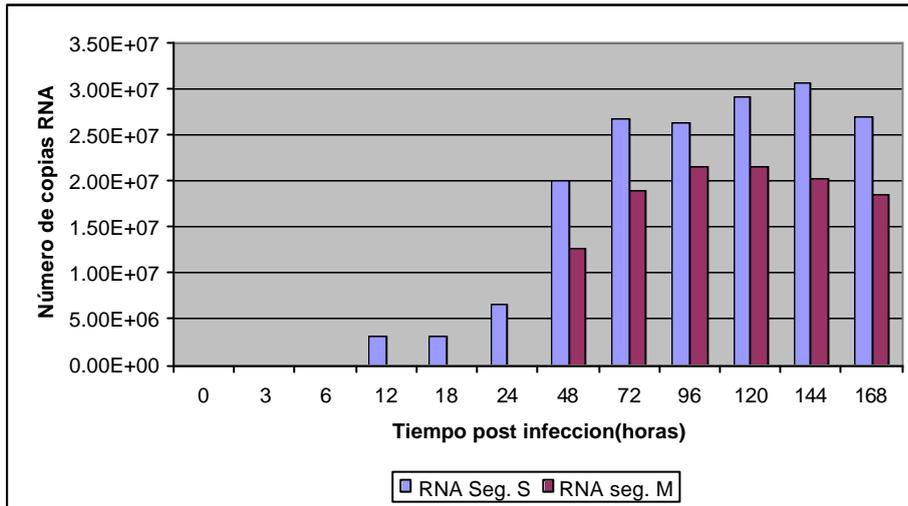
Figura 6

Semi cuantificación del número de copias de RNA de los segmento S y M de virus Andes en células Vero E6 con MOI de 0,1 pfu a los distintos tiempos pi.

(A) Grafica del número de copias de RNA en la fracción intracelular de células Vero E6 a las 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 hrs p.

(B) Grafica del número de copias de RNA en la fracción extracelular de células Vero E6 a las 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 hrs p.

A



B

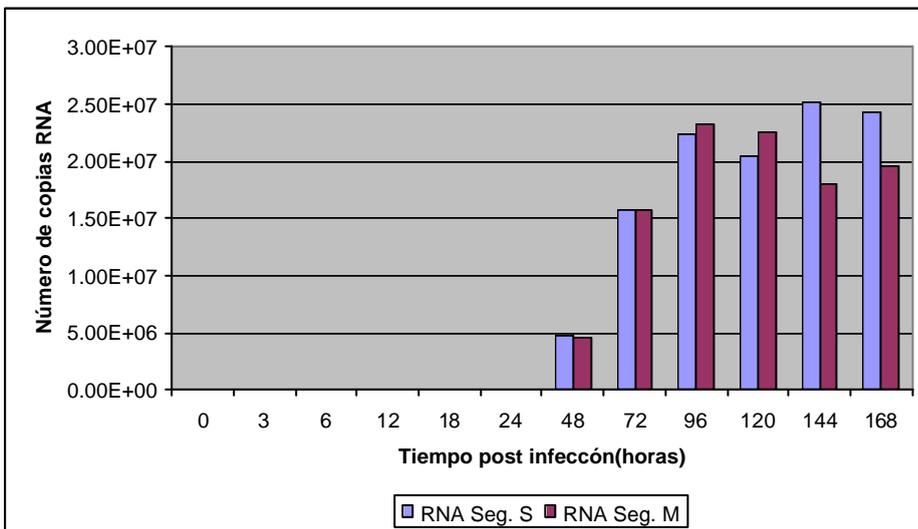
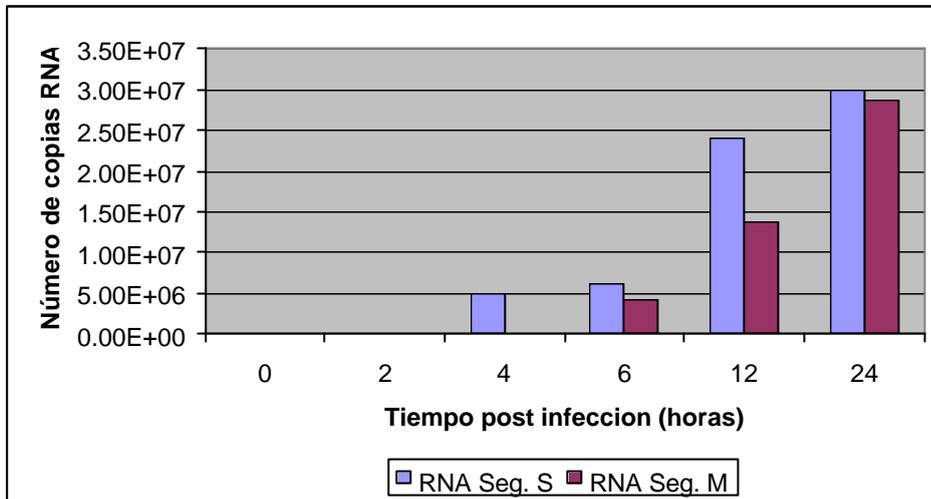


Figura 7

Semi cuantificación del número de copias de RNA intracelular de los segmentos S y M de virus Andes en células Vero E6 a un MOI de 2,5 pfu a los distintos tiempos pi.



Cuantificación de los niveles de RNA S, M y L sintetizados en células Vero E6 infectadas con virus Andes a MOI de 2,5 pfu.

A las 2 horas pi en las muestras intracelulares no hubo detección del RNA S (figura 8 A carriles 1, 2, 3 y 4) y sólo partir de las 4 hrs p.i se detectó RNA S con $9,25 \times 10^5$ copias totales, es decir 31 copias RNA/célula (figura 8 A carriles 5, 6, 7, y 8). A las 6 y 12 hrs pi el número de copias aumentó rápidamente, cuantificándose $1,32 \times 10^6$ y $1,27 \times 10^7$ copias de RNA S, respectivamente; es decir 41 y 425 copias RNA/célula (figura 8 A carriles 5 al 8 y 9 al 12). A las 24 hrs pi el número de copias de RNA S aumentó hasta $6,52 \times 10^7$ copias totales, es decir 2.173 copias de RNA/célula. Para las muestras de origen extracelular, no se detectó la presencia de RNA S en ninguno de los tiempos estudiados (figura 8 A carriles del 17 al 20).

El segmento M fue detectado a partir de las 6 hrs pi con un valor de $3,5 \times 10^5$ copias de RNA totales, es decir 12 copias de RNA/célula. A las 12 hrs pi el número de copias aumentó cuantificando $6,5 \times 10^6$ copias de RNA totales, lo que equivale a 217 copias de RNA/célula. Finalmente a las 24 hrs pi la síntesis del fragmento M aumentó exponencialmente detectándose $7,37 \times 10^7$ copias de RNA totales, lo que corresponde a 2458 copias de RNA/célula. En el extracelular solo se detectó RNA M a las 24 hrs pi con $7,1 \times 10^6$ copias de RNA totales.

El segmento L fue detectado a partir de las 4 hrs pi con $1,78 \times 10^5$ copias de RNA totales, es decir 7 copias de RNA/célula. Este valor es inferior al calculado para el fragmento S al mismo tiempo pi (figura 8 B carriles 1 al 4). A las 6 y 12 hrs el número de copias de RNA L aumentó a $6,17 \times 10^5$ y $8,25 \times 10^6$ copias, respectivamente. Finalmente a las 24 hrs pi se determinaron $8,17 \times 10^7$ copias de

RNA L, es decir 2.724 copias RNA/célula (figura 8 B carriles 16 al 20). Sólo las 24 hrs pi se detectó RNA L en el extracelular, determinándose $7,95 \times 10^6$ copias de RNA (figura 8 B carriles 21 al 25).

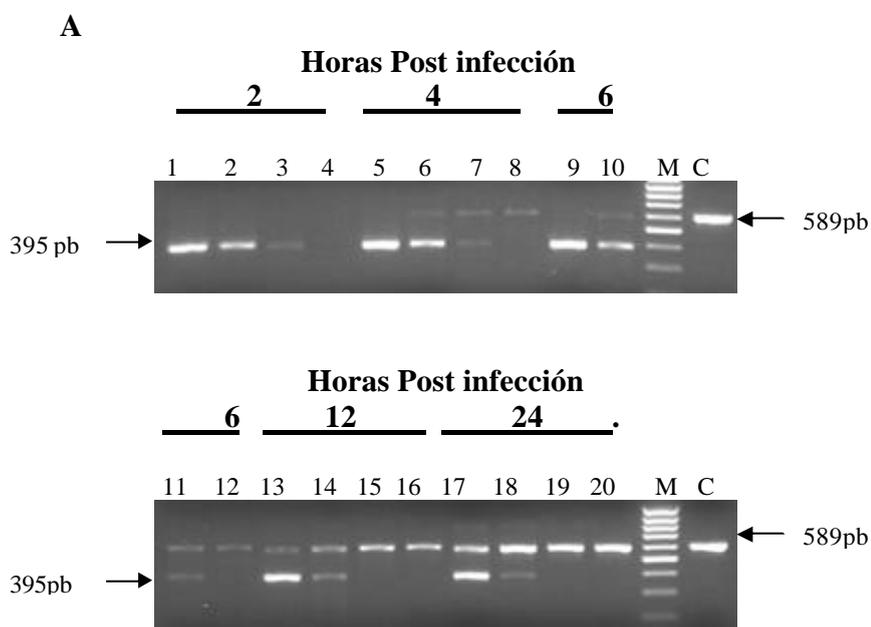
Figura 8

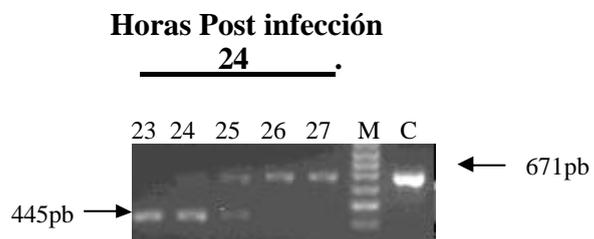
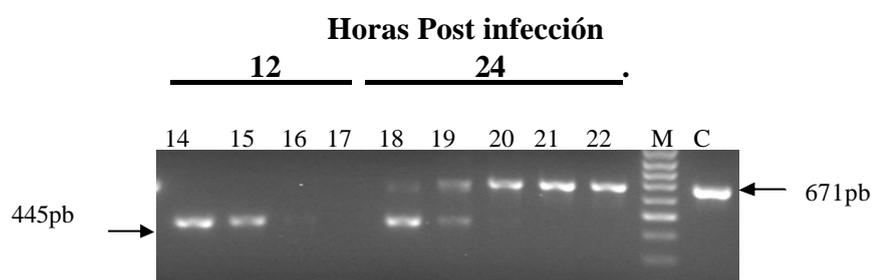
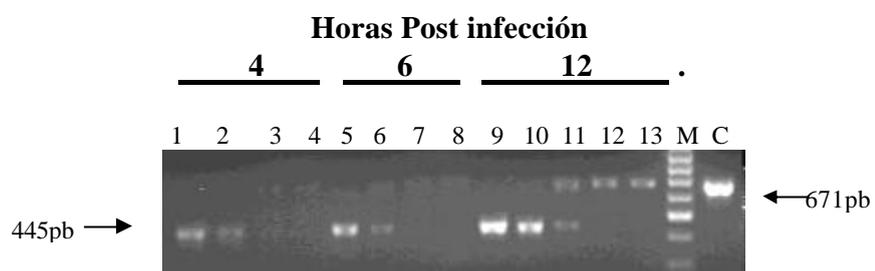
QC-RT PCR para los fragmento S y L a un MOI de 2,5 a distintos tiempo pi.

(A) QC-RT PCR para los fragmento S. Los carriles 1 al 4 corresponden a la fracción intracelular a las 2 hrs pi. Los carriles 5 al 8 corresponden a la fracción intracelular a las 4 hrs pi. Los carriles 9 al 12 corresponden a la fracción intracelular a 6 hrs pi. Los carriles 13 al 16 corresponden a la fracción intracelular a las 12 hrs pi. Los carriles 17 al 20 corresponden a la fracción intracelular a las 24 hrs pi. El carril C corresponde a control positivo de células infectadas.

(B) QC-RT PCR para los fragmento L. Los carriles 1 al 4 corresponden a la fracción intracelular a las 2 hrs pi. Los carriles 5 al 8 corresponden a la fracción intracelular a las 4 hrs pi. Los carriles 9 al 12 corresponden a la fracción intracelular a 6 hrs pi. Los carriles 13 al 16 corresponden a la fracción intracelular a las 12 hrs pi. Los carriles 17 al 20 corresponden a la fracción intracelular a las 24 hrs p.i. Los carriles 21 al 24 corresponden a la fracción extracelular a las 24 hrs p.i. Los carriles 25 al 28 corresponden a la fracción extracelular a las 24 hrs p.i. El carril C corresponde a control positivo de células infectadas.

En ambos casos el carril M corresponde a a marcador de tamaño molecular de 100 pb.



B

Determinación de RNA S en la fracción extracelular

Los resultados anteriores mostraron diferencias en la presencia de RNA M y L en la fracción extracelular a un MOI de 2,5, pero no así del fragmento S. Para analizar si esta diferencia se debía a un problema de sensibilidad de los RT-PCR de los distintos fragmentos virales, se realizaron amplificaciones para S, M y L con cantidades iniciales conocidas de RNA (figura 9). Para ello se realizaron diluciones seriadas de la muestra intracelular tomadas a las 24 hrs pi con un MOI de 2,5. En la reacción de RT-PCR para el fragmento S se detectó hasta un mínimo de 374 copias iniciales de RNA (figura 9 carril 3). En la reacción para el segmento M se detectó hasta 425 copias de RNA (figura 9 carril 7) y finalmente, para el segmento L se detectó hasta 469 copias de RNA (figura 9 carril 13).

Posteriormente, para verificar la reproducibilidad de los ensayos se volvió a reamplificar la muestra extracelular de las 24 hrs pi con MOI 2,5. Para esto se realizó un nuevo RT-PCR amplificando los segmentos S y M virales (figura 10 A). Coincidente con los resultados anteriores, el fragmento S fue detectado en la fracción intracelular (figura 10 A, carril 1), pero no fue posible pesquisarlo en el extracelular (figura 10 A, carril 2). En cambio, el RNA M se detectó simultáneamente en la muestra intracelular (figura 10 A, carril 4) y extracelular (figura 10 A, carril 5).

Para descartar un problema en la complementariedad en la secuencia de los partidores de RNA S, que pudiese explicar una diferencia en las amplificaciones en muestras extracelulares, se realizó un RT-PCR amplificando otra zona del fragmento S. Para este ensayo se utilizaron los partidores S₁₈₆ y

NH₄ que amplificaban un segmento de 1.086 pb (Esquema 1B). Además se amplificaron los segmentos M y L con los partidores previamente utilizados. El tamaño del amplificado del segmento M fue de 626 pb y del fragmento L fue de 671pb (figura 10B). En el RT-PCR del fragmento M se pudo detectar RNA en la muestra intracelular y en menor intensidad en la fracción extracelular (figura 10B carriles 4 y 5, respectivamente). El segmento L fue detectado en el intracelular (figura 10B carril 7) y en el extracelular (figura 10B carril 8). El segmento S fue detectado en la muestra intracelular correspondiente a las 24 hrs pi (figura 10B carril 1), pero no fue detectado en el extracelular (figura 10B carril 2). Estos resultados confirman la ausencia o el muy bajo número de copias de RNA del segmento S en la fracción extracelular.

Para indagar si el fragmento S se encontraba en baja tasa, se realizó un Semi-Nested PCR, utilizando como templado las muestras amplificadas correspondientes al segmento S intra y extracelulares de las 24 hrs pi (figura 10B carriles 1, 2 y 3, 4, respectivamente). Los partidores utilizados para esta reacción fueron S₁₈₆ y S₃ rev (Esquema 4, parte B), los cuales amplificaron un segmento de 410 pb. Para la reacción de amplificación se utilizaron las muestras intra y extracelulares concentrada y diluida 1/10. Mediante estos ensayos se detectó amplificación en las muestras correspondiente al extracelular concentrada (figura 10C, carril 1) y en mayor intensidad con la muestra diluida 1/10 (figura 10C, carril 2). Al reamplificar la muestra intracelular, se detectó muy tenuemente amplificación al utilizar la muestra concentrada (figura 10C, carril 3), pero cuando se diluyó 1/10 hubo una mayor amplificación (figura 10C, carril 4). Estos

resultados podrían ser explicados por un efecto de inhibición por exceso de DNA en la reacción.

Figura 9

Determinación de sensibilidad de los RT-PCR para los fragmentos S, M y L, utilizando cantidades conocidas de RNA templado. Los carriles 5, 10 y 15 corresponden a controles positivos de la amplificación de los segmentos S, M y L respectivamente. Los carriles M corresponden a marcador de tamaño molecular 100 pb.

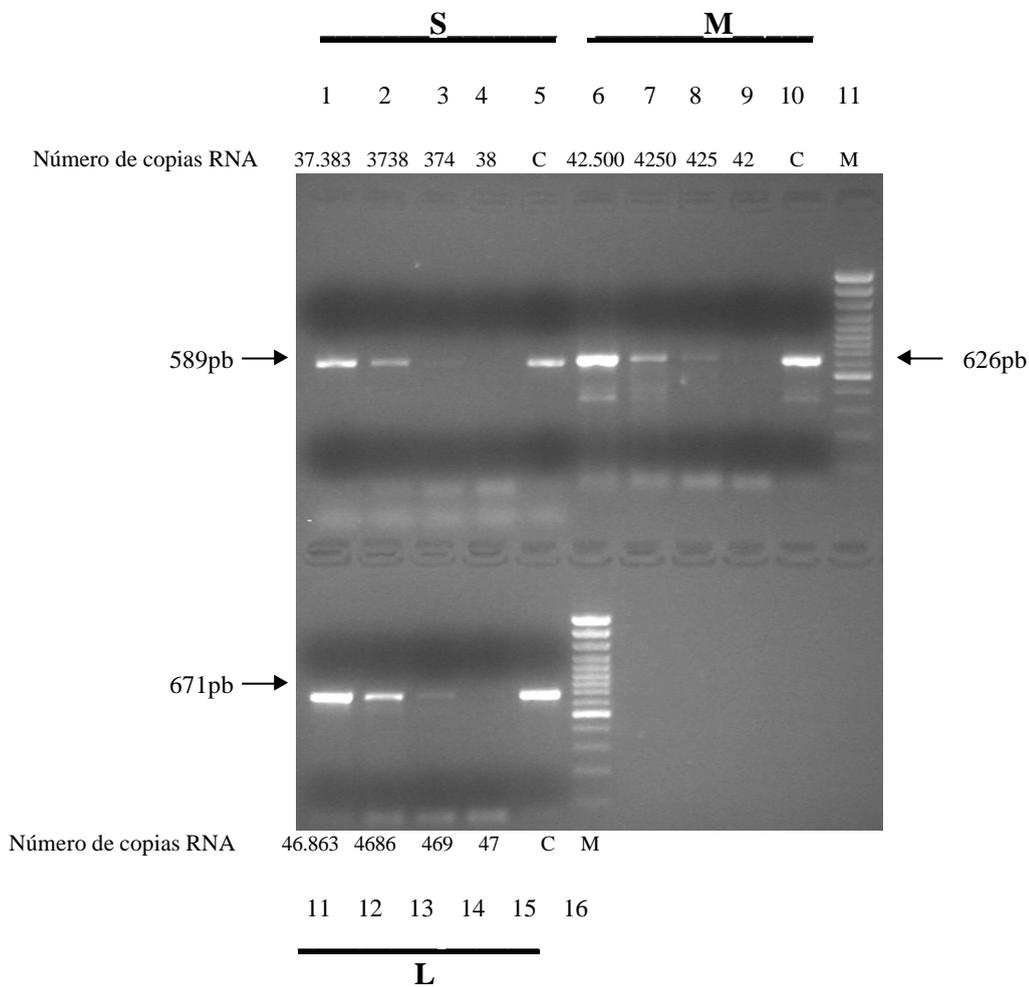


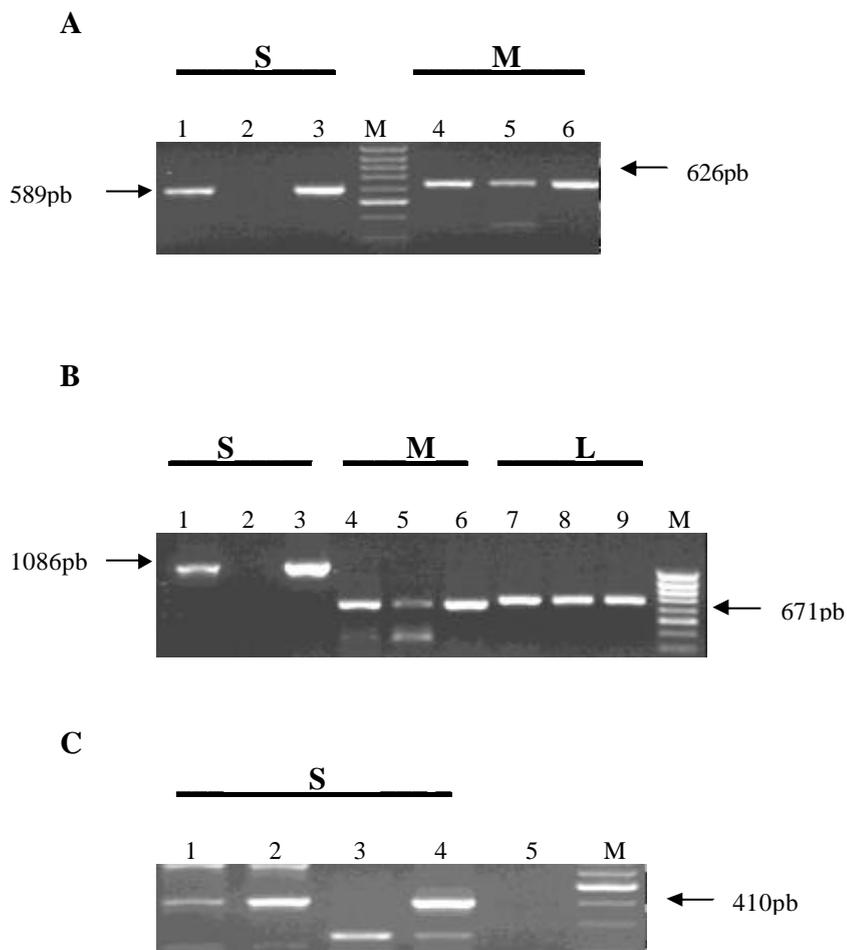
Figura 10

(A) RT-PCR de los segmentos S y M de muestras intracelulares y extracelulares correspondientes a las 24 hrs. pi. Los carriles 1 y 4 corresponden a muestras de origen intracelular. Los carriles 2 y 5 corresponden a muestras de origen extracelular. Los carriles 3 y 6 corresponden a controles positivos de células infectados.

(B) RT-PCR de los segmentos S, M y L de muestras intracelulares y extracelulares correspondientes a las 24 hrs. pi. Los carriles 1, 4 y 7 corresponden a muestras intracelulares. Los carriles 2, 5 y 8 corresponden a muestras extracelulares. Los carriles 3, 6 y 9 corresponden a controles positivos de S, M y L respectivamente.

(C) Semi-Nested PCR de muestras del segmento S intra y extracelulares amplificadas, correspondientes a las 24 hrs pi con un MOI de 2.5. Los carriles 1 y 2 corresponden a la muestra extracelular concentrada y diluida 1/10 respectivamente y los carriles 3 y 4 corresponden a la muestra intracelular concentrada y diluida 1/10 respectivamente. El carril 5 corresponde a la reacción blanco.

El carril M corresponde a a marcador de tamaño molecular de 100 pb.



Efectos de antivirales en el ciclo replicativo del virus Andes a un MOI 0,1 pfu

Para evaluar el efecto de distintas drogas antivirales sobre el ciclo replicativo de hantavirus Andes, previamente se evaluaron diferentes concentraciones de drogas para evaluar el efecto de citotoxicidad en las células. De acuerdo a los resultados obtenidos se encontró que la Actinomicina D a concentraciones iguales o superior a 333 pg/ μ l; la Cicloheximida a 417 pg/ μ l; la Puromicina a 1.667 pg/ μ l y Tunicamicina a 417 pg/ μ l eran tóxicos para las células Vero E6. La Ribavirina a ninguna de las concentraciones probadas fue tóxica. Por lo tanto, las drogas se usaron a las siguientes concentraciones finales:

Actinomicina D: 133 pg/ μ l

Cicloheximida: 167 pg/ μ l

Puromicina: 667 pg/ μ l

Tunicamicina 167 pg/ μ l

Ribavirina: 100 ng/ μ l

Actinomicina D

Mediante el ensayo de Inmunofluorescencia indirecta con el suero policlonal se detectó expresión de proteínas virales en zonas aisladas a partir de 48 hrs pi, presentando una distribución de antígenos predominantemente intracitoplasmática (figura 11 C). A las 96 hrs pi, alrededor del 50 a 60% de las células infectadas expresaba antígenos virales. Además se visualizó una distribución de fluorescencia intracitoplasmática, pero en algunos casos una distribución perinuclear (figura 11E). La máxima expresión de las proteínas virales se detectó a las 120 hrs pi, en donde la totalidad de las células expresaban antígenos virales intracitoplasmática y perinuclearmente (figura 11F). Utilizando el anticuerpo monoclonal contra la proteína N, se pudo detectar expresión de antígenos virales sólo en algunas células a partir de las 48 hrs pi (figura 12C). Posteriormente a las 72 hrs pi el número de células que expresaba el antígeno N aumentó (figura 12D). A las 96 hrs pi gran parte de las células expresaba antígeno, mostrando una distribución predominantemente perinuclear (figura 12E). Finalmente a las 120 hrs pi todas las células expresaba el antígeno N, pero en menor intensidad respecto al observado al mismo tiempo pi utilizando el suero policlonal (figura 12F).

Mediante RT-PCR se detectó RNA S en la fracción intracelular a partir de las 48 hrs pi (figura 13A carril 3), aumentando a las 72 hrs pi (figura 13A carril 5). A partir de las 96 hrs pi la detección llegó al plateau, no presentando diferencia con la muestra intracelular de las 120 hrs pi (figura 13A carriles 7 y 9). En el extracelular se pesquisó RNA del fragmento S sólo a partir de las 96 hrs pi (figura 13A carril 8), aumentando la detección a las 120 hrs pi (figura 13A carril 10). El

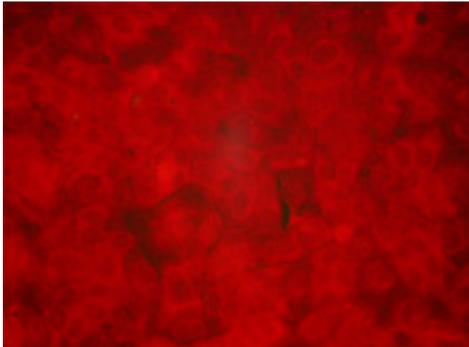
segmento M fue detectado intracelularmente en forma muy tenue a las 48 hrs pi aumentando a las 72 hrs pi (figura 13B carriles 3 y 5). Posteriormente a las 96 hrs pi, la detección del fragmento M intracelular llegó al plateau, no determinándose una diferencia con las 120 hrs pi (figura 13B carriles 7 y 9). En el extracelular se detectó RNA M tenuemente a las 72 hrs pi, incrementando a las 96 y 120 hrs pi (figura 13 B carriles 6, 8 y 10).

El segmento L se pesquisó intracelularmente a las 48 hrs pi (figura 13C carril 3), al igual que el RNA de los segmentos S y M. A las 72 y 96 hrs pi, la síntesis de RNA L intracelular aumentó en forma gradual y paulatina (figura 13 C carriles 5, 7), llegando a un máximo a las 120 hrs pi (figura 13C carril 9). En la fracción extracelular el RNA L se determinó a las 48 hrs pi (figura 13C carril 4), incrementándose a las 72 y 96 hrs pi (figura 13C carriles 6 y 8). A las 120 hrs pi el RNA L presentó la mayor síntesis, igual que lo observado en la fracción intracelular (figura 13C carriles 9 y 10).

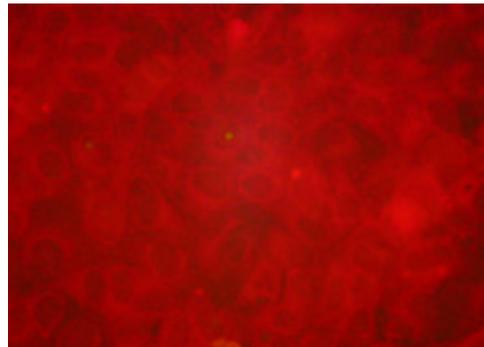
Figura 11

Cinética de la expresión de antígenos virales totales de virus Andes, en células Vero E-6 utilizando Actinomicina D. Para la detección del antígeno se utilizó un anticuerpo policlonal (antisuero de paciente) (A) Células Vero E-6 no infectadas a las 24 hrs pi (B) Células Vero E-6 infectadas a las 24 hrs pi. (C) Células Vero E-6 infectadas a 48 hrs pi. (D) Células Vero E-6 infectadas 72 hrs pi. (E) Células Vero E-6 infectadas a 96 hrs pi. (F) Células Vero E-6 infectadas a las 120 hrs pi. Para esta cinética se utilizó un M.O.I. de 0,1 pfu.

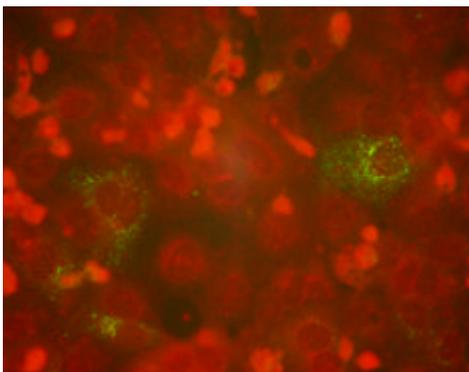
A



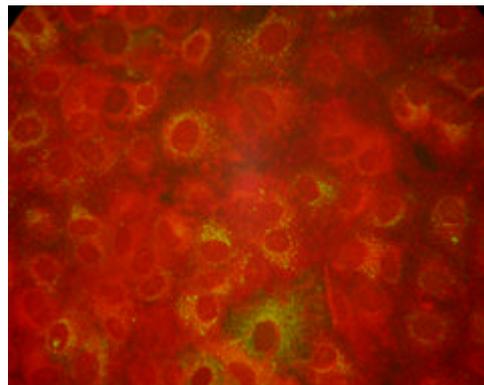
B



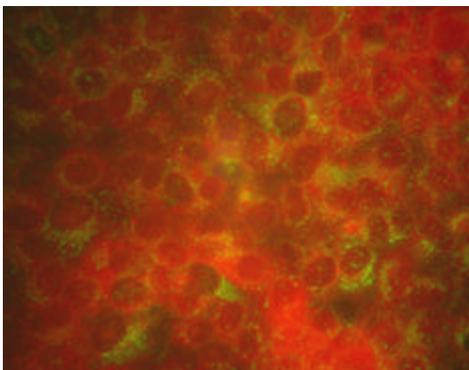
C



D



E



F

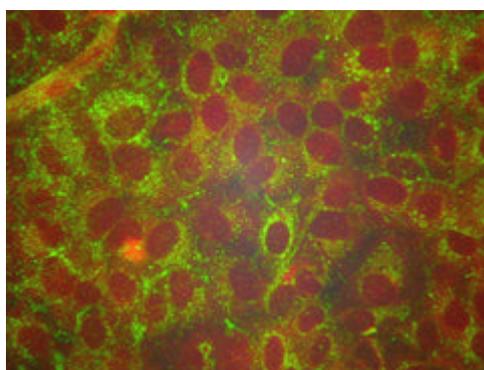
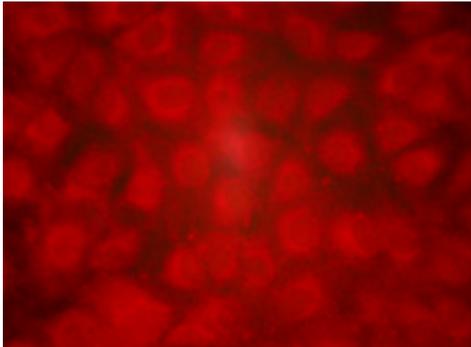


FIGURA 12

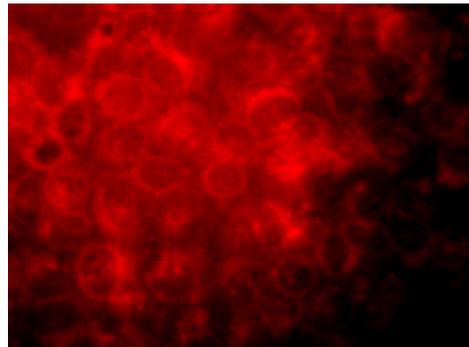
Cinética de la expresión de la proteína N viral de virus Andes, en células Vero E6, utilizando Actinomicina D. Para la detección del antígeno se utilizó un anticuerpo monoclonal contra la proteína N.

(A) Células Vero E-6 no infectadas a las 24 hrs pi (B) Células Vero E-6 infectadas a las 24 hrs pi. (C) Células Vero E-6 infectadas a 48 hrs p.i. (D) Células Vero E-6 infectadas 72 hrs p.i. (E) Células Vero E-6 infectadas a 96 hrs pi. (F) Células Vero E-6 infectadas a las 120 hrs pi. Para esta cinética se utilizó un M.O.I de 0,1 pfu.

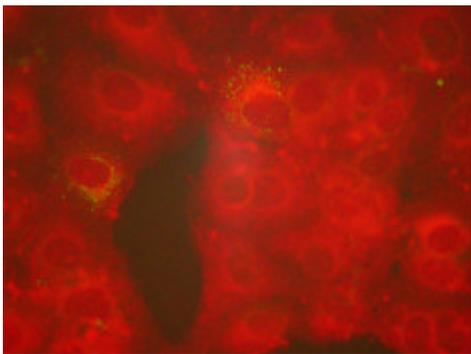
A



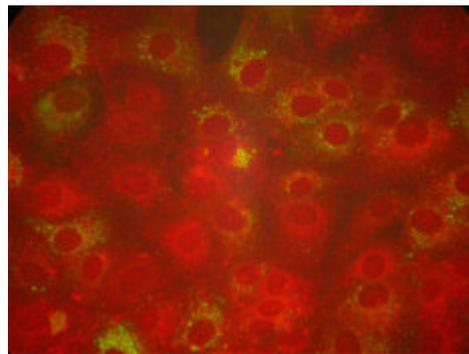
B



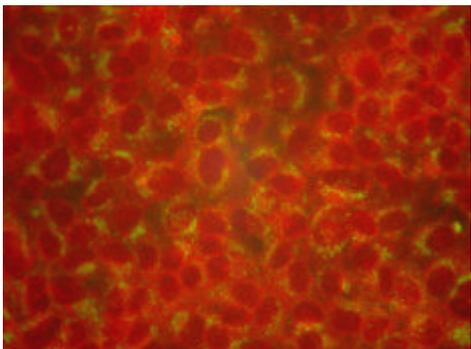
C



D



E



F

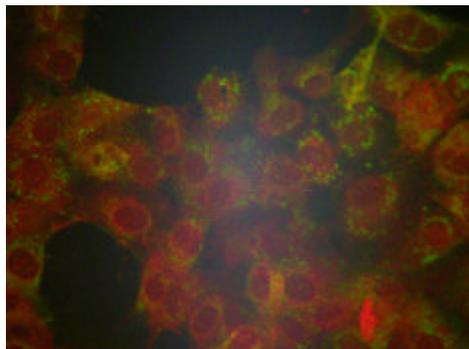
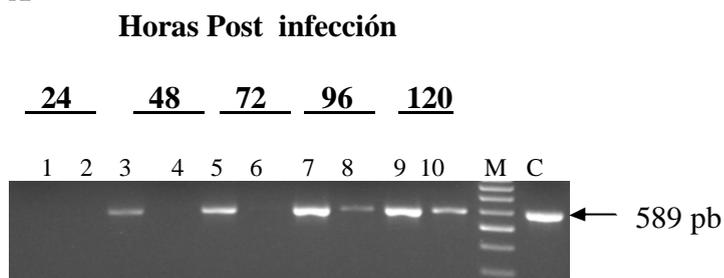
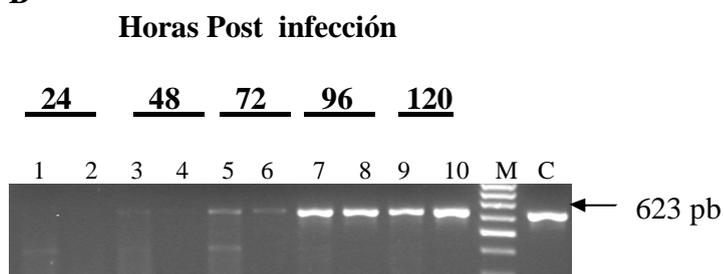
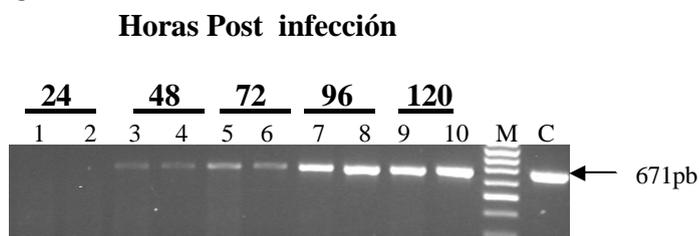


Figura 13

Síntesis de RNA S, M y L en células vero E6 infectadas con virus Andes a un MOI de 0,1. Además se utilizó Actinomicina D a una concentración de 133 pg/ μ l. (A) Cinética de expresión del fragmento S a distintos tiempos pi. (B) Cinética de expresión del fragmento M a distintos tiempos pi. (C) Cinética de expresión del fragmento L a distintos tiempos pi. Para (A), (B) y (C) las muestras intracelulares corresponden a los carriles: 1, 3, 5, 7, 9 y las muestras extracelulares corresponden a los carriles 2, 4, 6, 8, 10. Los carriles C corresponden a controles positivos de células infectadas y los carriles M corresponden a marcador de tamaño molecular de 100 pb.

A**B****C**

Puromicina.

Mediante Inmunofluorescencia indirecta y utilizando el suero de paciente se detectaron antígenos virales totales a partir de las 48 hrs pi (figura 14C), aumentado rápidamente a las 96 y 120 hrs pi (figura 14E y F). La distribución de los antígenos presentó un patrón intracitoplasmático, pero en algunos casos presentó distribución perinuclear. Utilizando el anticuerpo monoclonal contra la proteína N se detectó una clara fluorescencia a las 72 hrs pi, aumentando la intensidad y el número de células que expresaban antígenos virales a las 96 y 120 hrs pi (figura 15D, E y F). A las 120 hrs pi se observó fluorescencia distribuida perinuclearmente (figura 15F). Al igual que para Actinomicina D, la intensidad de la fluorescencia visualizada con el anticuerpo monoclonal fue inferior a la observada con el suero policlonal a los mismos tiempo pi (figura 14 y 15 E).

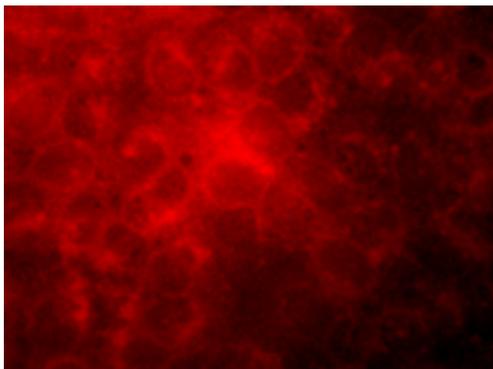
Mediante RT-PCR, el segmento S fue pesquisado intracelularmente a las 72 hrs pi (figura 16A carril 5), aumentando a las 96 y 120 hrs pi (figura 16A carriles 7 y 9). En la fracción extracelular el RNA del segmento S se detectó a partir de las 72 hrs pi, pero en menor intensidad que en el espacio intracelular (figura 16A carril 6). Sólo a las 120 hrs pi se detectó un aumento en la síntesis de RNA S extracelular (figura 16A carril 10). El segmento M se detectó intra y extracelularmente a las 96 hrs pi (figura 16B carriles 7 y 8), incrementando en ambos casos a las 120 hrs pi (figura 16B carriles 9 y 10). Finalmente, el segmento L fue detectado intracelularmente a las 48 hrs pi (figura 16C carril 3) y en forma similar se determinó en el extracelular al mismo tiempo pi (figura 16C carril 4). A las 72 hrs pi, los niveles de RNA L intra y extracelular fueron similares a los

observados a las 48 hrs pi (figura 16C carriles 5 y 6), pero a partir de las 96 hrs pi y hasta las 120 hrs pi se detectó un claro aumento en la síntesis de RNA intracelular y extracelular (figura 16C carriles 7, 8, 9 y 10 respectivamente).

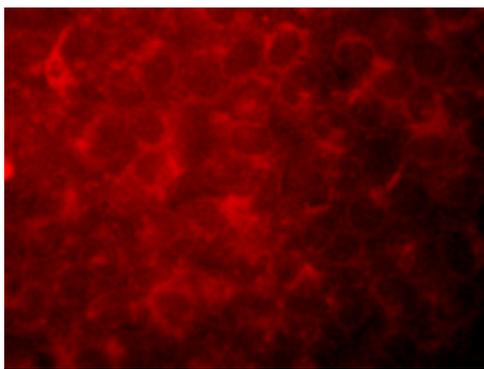
Figura 14

Cinética de la expresión de antígenos virales totales de virus Andes, en células Vero E-6 utilizando Puromicina. Para la detección del antígeno se utilizó un anticuerpo policlonal (antisuero de paciente)
(A) Células Vero E-6 no infectadas a las 24 hrs pi (B) Células Vero E-6 infectadas a las 24 hrs pi. (C) Células Vero E-6 infectadas a 48 hrs pi. (D) Células Vero E6 infectadas 72 hrs p.i. (E) Células Vero E-6 infectadas a 96 hrs pi. (F) Células Vero E-6 infectadas a las 120 hrs pi. Para esta cinética se utilizó un M.O.I de 0,1 pfu.

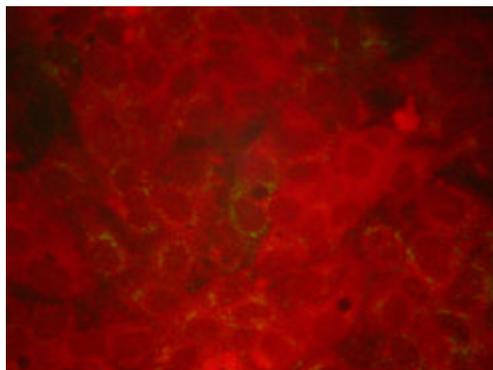
A



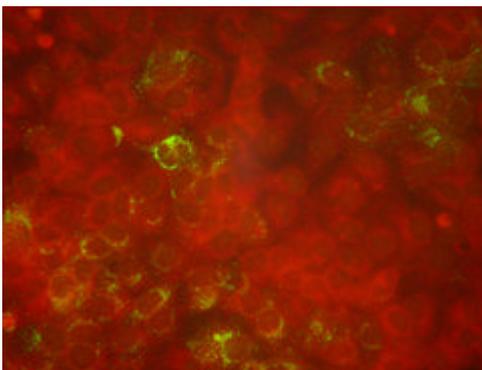
B



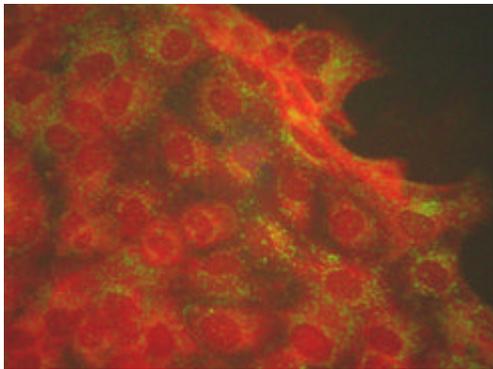
C



D



E



F

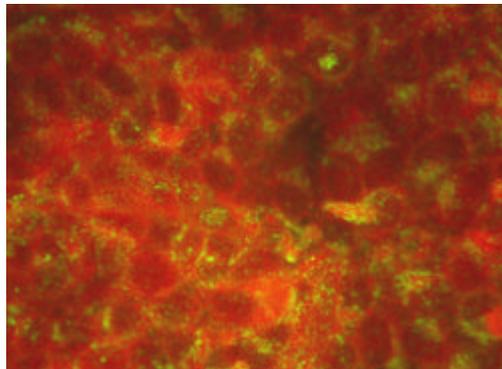
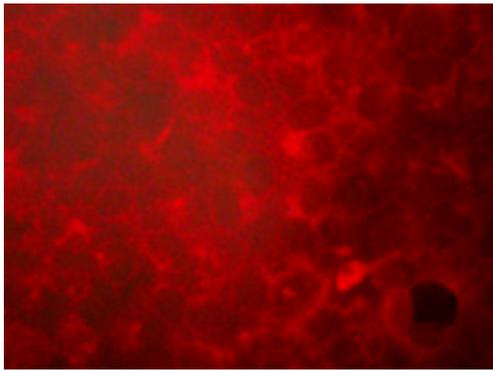


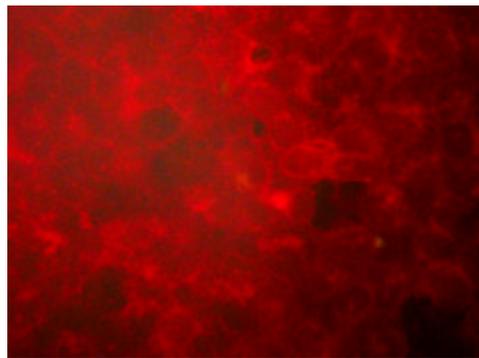
Figura 15

Cinética de la expresión de la proteína N viral de virus Andes, en células Vero E6 utilizando Puromicina. Para la detección del antígeno se utilizó un anticuerpo monoclonal contra la proteína N.

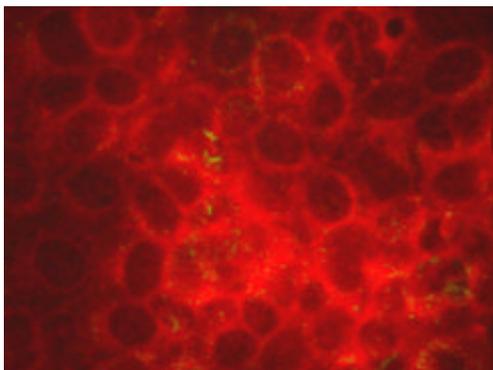
(A) Células Vero E-6 no infectadas a las 24 hrs pi (B) Células Vero E-6 infectadas a las 24 hrs pi. (C) Células Vero E-6 infectadas a 48 hrs pi. (D) Células Vero E-6 infectadas 72 hrs pi. (E) Células Vero E6 infectadas a 96 hrs pi. (F) Células Vero E-6 infectadas a las 120 hrs pi. Para esta cinética se utilizó un M.O.I de 0,1 pfu.



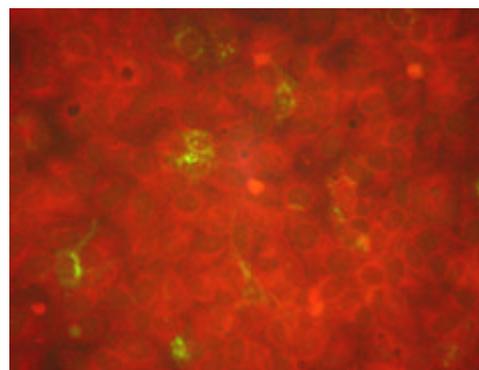
C



D



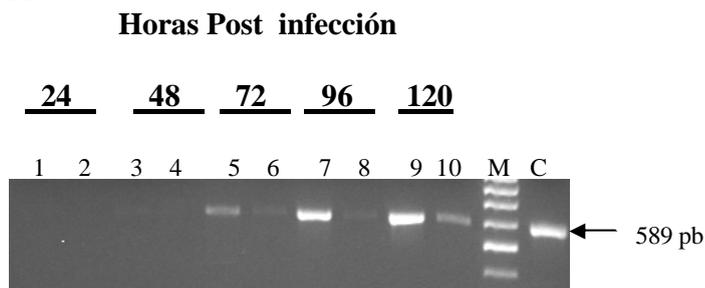
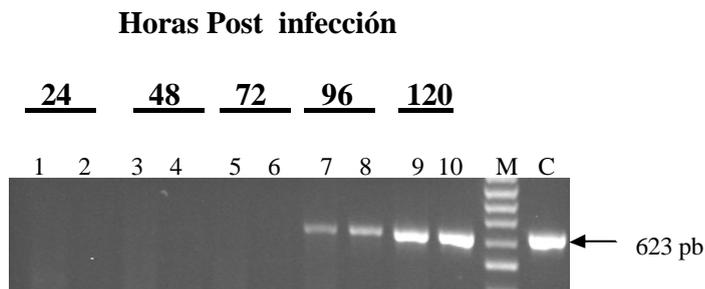
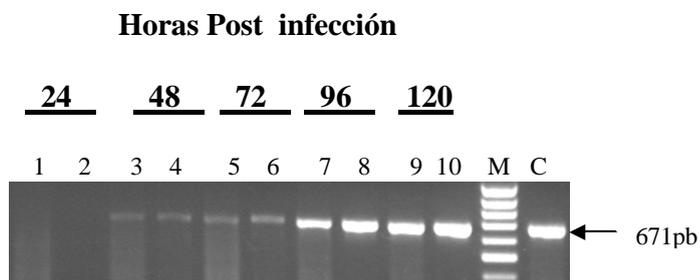
E



F

Figura 16

Síntesis de RNA de los fragmentos S, M y L en células vero E6 infectadas con virus Andes a un MOI de 0,1. Además se utilizó Puromicina una concentración de 667 pg/ μ l. **(A)** Cinética de expresión del fragmento S a distintos tiempos pi. **(B)** Cinética de expresión del fragmento M a distintos tiempos pi. **(C)** Cinética de expresión del fragmento L a distintos tiempos pi. Para **(A)**, **(B)** y **(C)** las muestras intracelulares corresponden a los carriles: 1, 3, 5, 7, 9 y las muestras extracelulares corresponden a los carriles 2, 4, 6, 8, 10. Los carriles C corresponden a controles positivos de células infectadas y los carriles M corresponden a marcador de tamaño molecular de 100 pb.

A**B****C**

Tunicamicina.

Con el suero policlonal se detectó la presencia de antígenos virales en algunas células aisladas a partir de las 48 hrs pi (figura 17C), aumentando a las 72 hrs pi (figura 17D). A las 96 hrs pi alrededor del 50% de las células expresaban antígenos (figura 17E), y a las 120 hrs pi casi la totalidad de las células expresaban proteínas virales. Las células presentaron un patrón de fluorescencia intracitoplasmático y perinuclear (figura 17F). Con el anticuerpo monoclonal contra la proteína N se pesquisó la presencia de antígenos virales en algunas células a partir de las 24 hrs pi (figura 18B) manteniéndose a las 48 hrs pi (figura 18C). A las 72 hrs pi el número de células que expresaban la proteína N incrementó (figura 18D). Finalmente a las 120 hrs pi gran parte de la células expresaban antígenos N con una distribución predominantemente perinuclear (figura 18F).

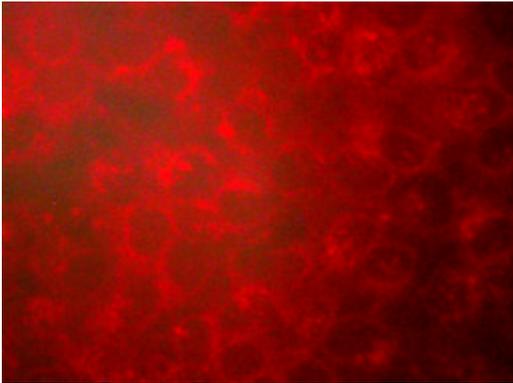
Por RT-PCR se determinó la presencia del RNA S a partir de las 24 hrs pi (figura 19A carril 1), posteriormente la síntesis de RNA S intracelular aumentó en forma progresiva a las 48, 72, 96 y 120 hrs pi (figura 19A carriles 3, 5, 7 y 9). En la fracción extracelular sólo se detectó RNA S a las 120 hrs pi (figura 19A carril 10). El segmento M, se pesquisó intracelularmente a partir de las 72 hrs pi (figura 19B carril 5) y al mismo tiempo en el medio extracelular (figura 19B carril 6). A las 96 hrs pi la síntesis de RNA aumentó en el medio intra y extracelular (figura 19B carriles 7 y 8). A las 120 hrs pi la síntesis de RNA M se mantuvo constante para ambas fracciones (figura 19B carriles 9 y 10). El segmento L intracelularmente fue escaso a partir de las 48 hrs pi (figura 19C carril 3), aumentando a las 72 hrs pi (figura 19C carril 5). Posteriormente, a las 96 y 120 hrs pi la síntesis de RNA se mantuvo constante (figura 19C carriles 7 y 9). Extracelularmente, el RNA L fue

detectado a las 72 hrs pi (figura 19C carril 6), no presentando diferencias con la muestra de las 96 hrs pi (figura 19C carril 8), pero se observó un incremento de la síntesis a las 120 hrs pi (figura 19C carril 10).

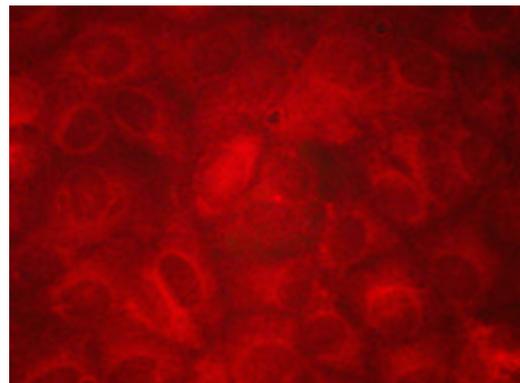
Figura 17

Cinética de la expresión de antígenos virales totales de virus Andes, en células Vero E-6 utilizando Tunicamicina. Para la detección del antígeno se utilizó un anticuerpo policlonal (antisuero de paciente)
(A) Células Vero E-6 no infectadas a las 24 hrs pi (B) Células Vero E-6 infectadas a las 24 hrs pi. (C) Células Vero E-6 infectadas a 48 hrs pi. (D) Células Vero E-6 infectadas 72 hrs pi. (E) Células Vero E6 infectadas a 96 hrs pi. (F) Células Vero E-6 infectadas a las 120 hrs p.i. Para esta cinética se utilizó un M.O.I de 0,1 pfu.

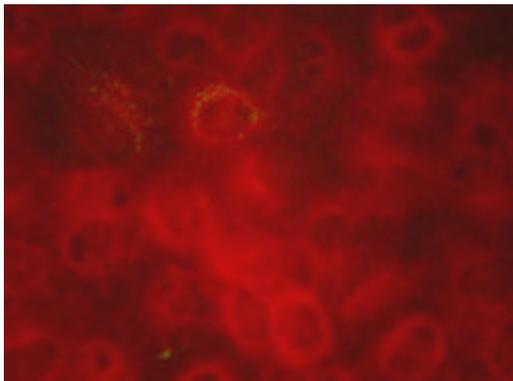
A



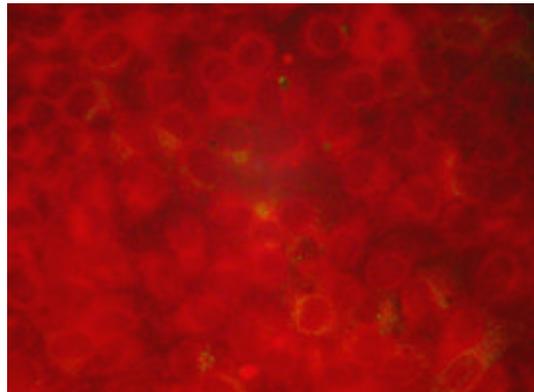
B



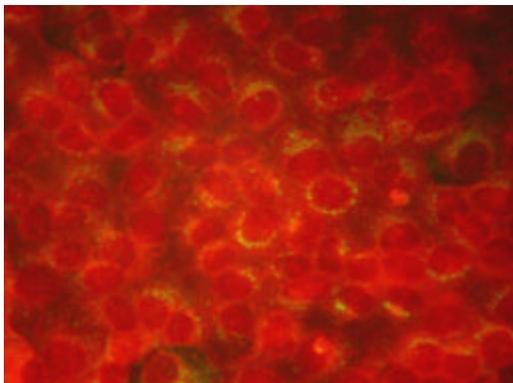
C



D



E



F

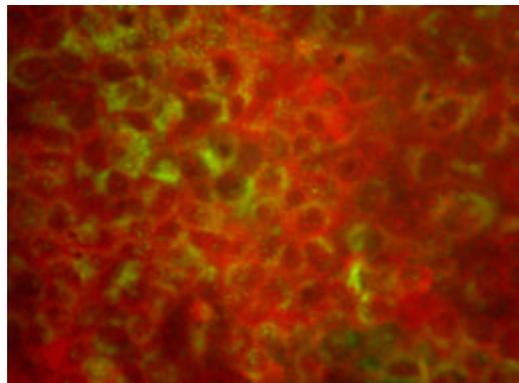
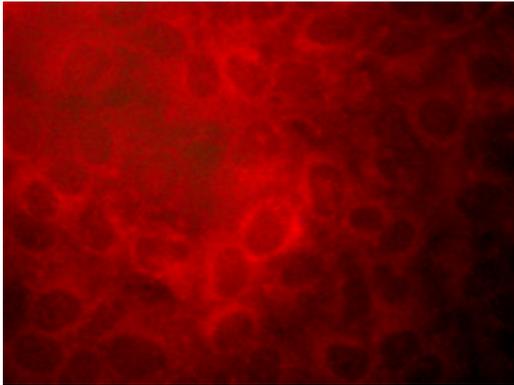


Figura 18

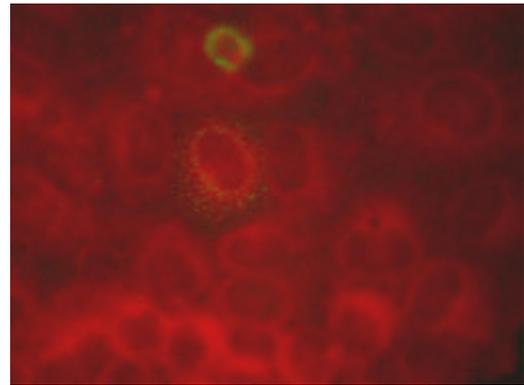
Cinética de la expresión de la proteína N viral de virus Andes, en células Vero E-6 utilizando Tunicamicina. Para la detección del antígeno se utilizó un anticuerpo monoclonal contra la proteína N.

(A) Células Vero E6 no infectadas a las 24 hrs pi (B) Células Vero E6 infectadas a las 24 hrs p.i. (C) Células Vero E6 infectadas a 48 hrs pi. (D) Células Vero E6 infectadas 72 hrs pi. (E) Células Vero E-6 infectadas a 96 hrs pi. (F) Células Vero E-6 infectadas a las 120 hrs pi. Para esta cinética se utilizó un M.O.I de 0,1 pfu.

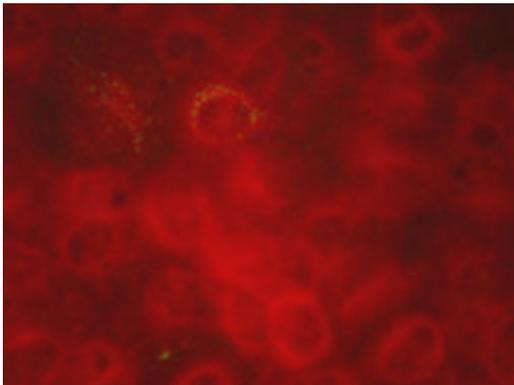
A



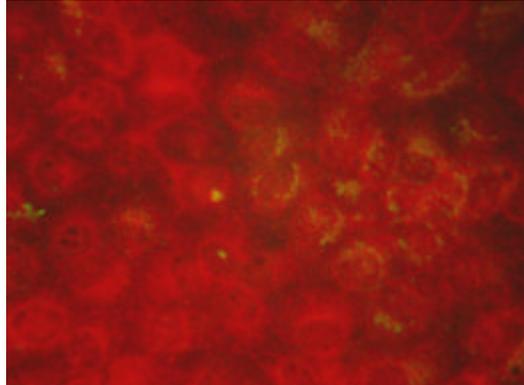
B



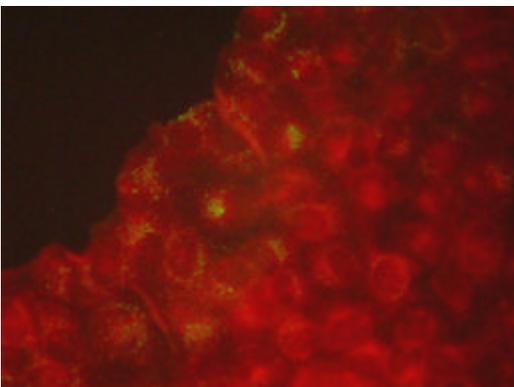
C



D



E



F

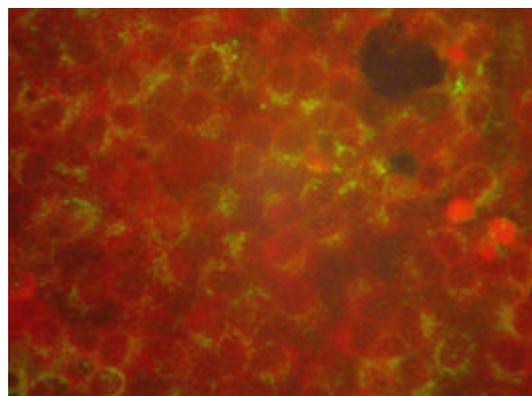
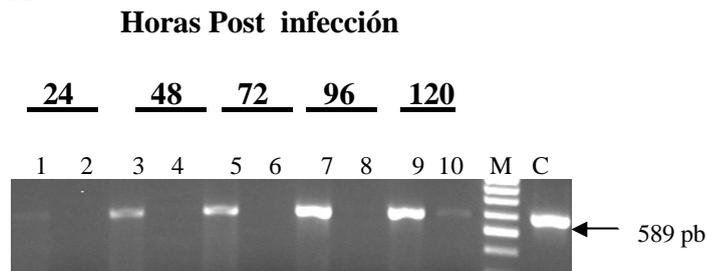
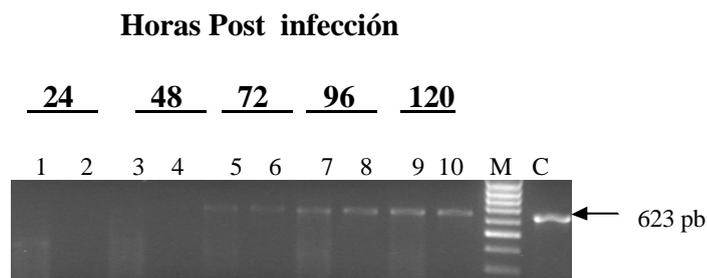
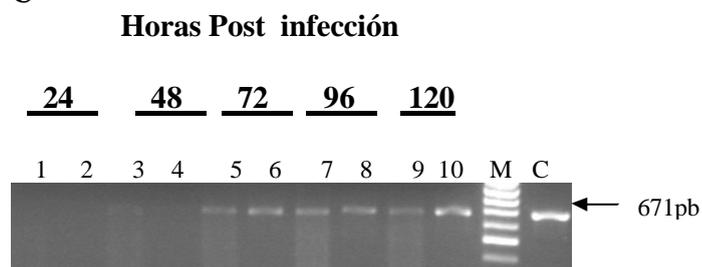


Figura 19

Síntesis de RNA S, M y L en células vero E6 infectadas con virus Andes a un MOI de 0,1. Además se utilizó Tunicamicina a una concentración de 100 ng/ μ l. (A) Cinética de expresión del fragmento S a distintos tiempos pi. (B) Cinética de expresión del fragmento M a distintos tiempos pi. (C) Cinética de expresión del fragmento L a distintos tiempos pi. Para (A), (B) y (C) las muestras intracelulares corresponden a los carriles: 1, 3, 5, 7, 9 y las muestras extracelulares corresponden a los carriles 2, 4, 6, 8, 10. Los carriles C corresponden a controles positivos de células infectadas y los carriles M corresponden a marcador de tamaño molecular de 100 pb.

A**B****C**

Cicloheximida.

Mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando el suero policlonal y el anticuerpo monoclonal contra la Nucleoproteína, no se detectó antígenos virales a ningún tiempo pi.

Utilizando RT-PCR se determinó la presencia intracelular del segmento S en forma muy tenue a las 72 hrs pi (figura 20A carril 5), aumentado muy lentamente a las 96 hrs pi (figura 20A carril 7). A las 120 hrs pi el RNA S presentó una mayor síntesis (figura 20A carril 9). En la fracción extracelular no fue posible pesquisar RNA S en ningún tiempo pi (figura 20A carriles 2, 4, 6, 8, y 10). Al igual que el RNA S, el segmento M no fue detectado en ninguna de las muestras de origen extracelular pero sí en la fracción intracelular de las 120 hrs pi (figura 20B carril 9). El fragmento L se encontró débilmente a las 96 hrs pi en la fracción intracelular (figura 20C carril 7), aumentó a las 120 hrs pi (figura 20C carril 9). Al igual que para los fragmentos S y M, el fragmento L no fue detectado en ninguna muestra de origen extracelular de los distintos tiempos pi. (figura 20C carriles 2, 4, 6, 8, y 10)

Ribavirina.

En los ensayos realizados con ribavirina, no fue posible detectar la presencia antígenos virales en las células Vero E6 a los distintos tiempo pi.

Por RT-PCR no se determinó presencia de RNAs de los segmentos S, M y L en las muestras intra y extracelulares de las 24, 48, 72, 96 y 120 hrs p.i (figura 21A, B y C).

Figura 20

Síntesis de RNA de los fragmentos S, M y L en células Vero E6 infectadas con virus Andes a un MOI de 0,1. Además se utilizó Cicloheximida a una concentración de 167 pg/ μ l. **(A)** Cinética de expresión del fragmento S a distintos tiempos pi. **(B)** Cinética de expresión del fragmento M a distintos tiempos pi. **(C)** Cinética de expresión del fragmento L a distintos tiempos pi. Para **(A)**, **(B)** y **(C)** las muestras intracelulares corresponden a los carriles: 1, 3, 5, 7, 9 y las muestras extracelulares corresponden a los carriles 2, 4, 6, 8, 10. Los carriles C corresponden a controles positivos de células infectadas y los carriles M corresponden a marcador de tamaño molecular de 100 pb.

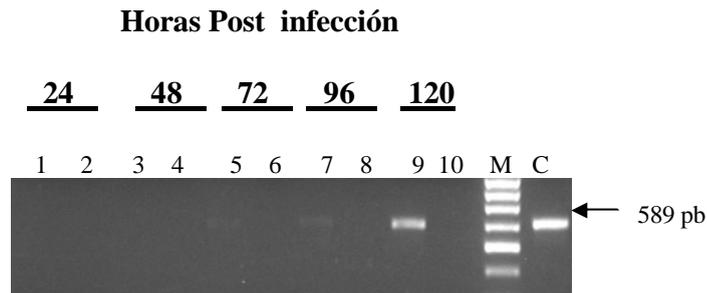
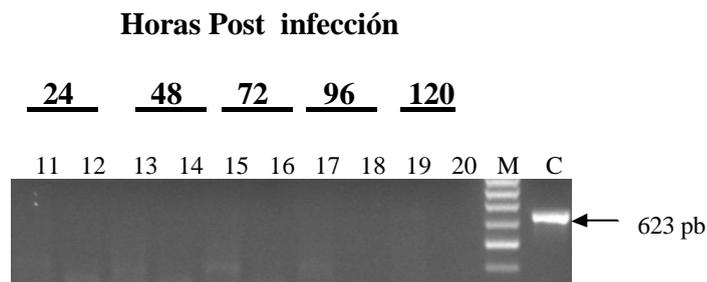
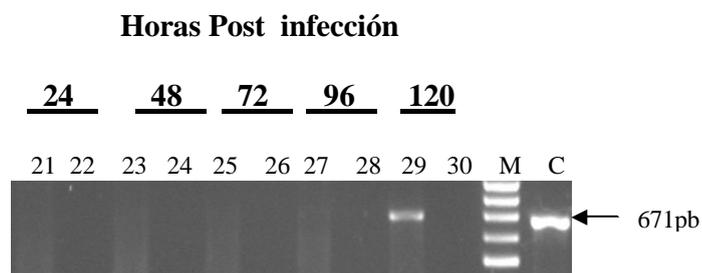
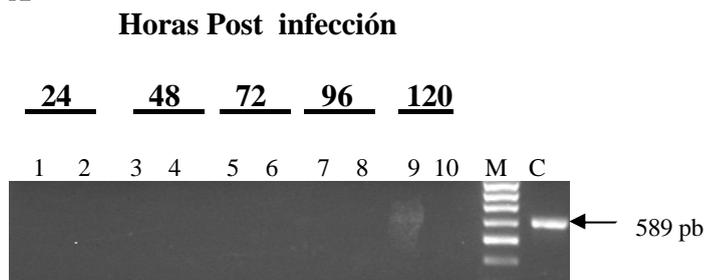
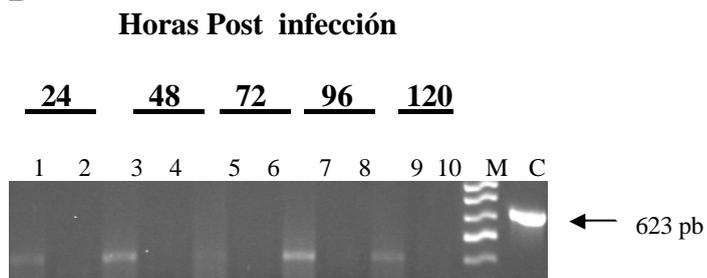
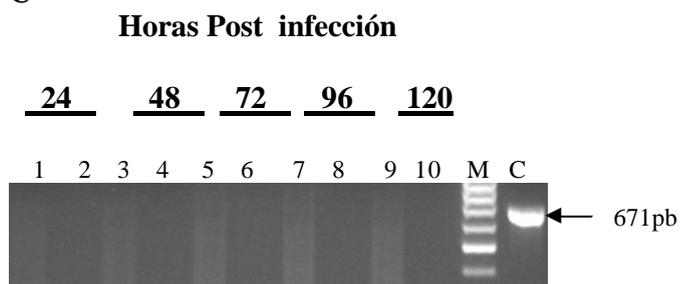
A**B****C**

Figura 21

Síntesis de RNA de los fragmentos S, M y L en células Vero E6 infectadas con virus Andes a un MOI de 0,1. Además se utilizó Ribavirina a una concentración de 100ng/μl. (A) Cinética de expresión del fragmento S a distintos tiempos pi. (B) Cinética de expresión del fragmento M a distintos tiempos pi. (C) Cinética de expresión del fragmento L a distintos tiempos pi. Para (A), (B) y (C) las muestras intracelulares corresponden a los carriles: 1, 3, 5, 7, 9 y las muestras extracelulares corresponden a los carriles 2, 4, 6, 8, 10. Los carriles C corresponden a controles positivos de células infectadas y los carriles M corresponden a marcador de tamaño molecular de 100 pb.

A**B****C**

Discusión

Para estudiar la expresión y la síntesis de proteínas y RNAs virales se realizaron infecciones en células Vero E6 a un MOI de 0,1 pfu con cepa Andes CHI-7913. Mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales para las proteínas N y G1 se determinó la expresión intracelular de la proteína N a partir de las 24 hrs pi y de la glicoproteína G1 a partir de las 48 hrs pi. La proteína N en los primeros días pi presentó una distribución predominantemente intracitoplasmática, pero al transcurrir la infección se detectó asociadas a zonas perinucleares. Estudios realizados con el virus Hanta Black Creek Canal, mostraron que la distribución de la proteína N está asociada predominantemente a las zonas perinucleares, esta relación sería producto de la interacción de antígenos virales con microfilamentos celulares (Rabkov y cols, 2001 y 1998). Por otro lado, el virus Haantan presenta una distribución de la proteína N predominantemente intracitoplasmática (Kariwa y cols, 2003). En esta tesis se determinó que el virus Andes presentó una distribución de la proteína N intracitoplasmática en los primeros días pi, pero posteriormente, en etapas más avanzadas esta proteína estaba asociada a zonas perinucleares, concordante con lo visto para el virus Black Creek Canal.

Por otra parte, en las mismas condiciones experimentales los fragmentos de RNA S y M fueron detectados a partir de las 12 y 48 hrs pi. Es decir los RNAs de los distintos fragmentos fueron detectados antes o simultáneamente que la expresión de las proteínas N y G1. Específicamente, el RNA S fue pesquisado 12 hrs antes que la expresión de la proteína N y el RNA M y la glicoproteína G1

fueron determinados simultáneamente a las 48 hrs pi. Kariwa y cols (2003) demostraron que al realizar infección con virus Seoul, a un MOI de 0,33 pfu, la proteína N se detectaba a partir de las 2 hrs pi y la glicoproteína G2 a partir de las 8 hrs pi; además la síntesis del RNA S fue a partir de las 2 hrs pi, es decir, en forma simultánea a la expresión de la proteína N. Estos resultados muestran que en ambas cepas de virus Hanta, primero hay una expresión de la proteína N y más retrasado en el tiempo la aparición de la glicoproteína G1. Otros investigadores han señalado que la cepa Asiática Hantaan tendría una expresión de proteínas virales más lenta respecto de otros bunyavirus; detectándose éstas no antes de las 6 hrs pi (Schmaljohn CS y cols, 1984). En la actualidad, no está claro los factores moleculares que regularían estas diferencias en las distintas cepas de virus Hanta.

En el espacio extracelular se detectaron simultáneamente los RNA S y M a partir de las 48 hrs pi, con 22.4×10^6 y $23,3 \times 10^6$ copias de RNA S y M respectivamente. Los resultados mostraron una equivalencia equimolecular de RNA S y M hasta las 120 hrs pi. Esta relación puede ser atribuida a la presencia de partículas víricas maduras liberadas al extracelular por las células infectadas a los distintos tiempos pi. Además se observó que la presencia de los distintos fragmentos de RNA en el espacio extracelular fue posterior a la acumulación de estos RNAs dentro de las células infectadas.. Cuando se aumentó la dosis infectiva y se utilizó un MOI de 2,5 pfu se observó un desplazamiento en la detección de RNA de los fragmentos S y M, detectándolos a partir de las 4 hrs pi para el fragmento S y a las 6 hrs pi para el fragmento M. Esto demostró que a una mayor MOI se produce un acortamiento del período de aparición de los

fragmentos virales intracelulares, y se mantiene la aparición del fragmento S antes del fragmento M. Además al utilizar un MOI de 2,5 pfu, se observó la ausencia de RNA S en el medio extracelular, pero la presencia del segmento M y L a las 24 hrs pi en el sobrenadante. A partir de los resultados mostrados se puede sugerir que la liberación de las partículas víricas maduras no estaría directamente relacionada con un aumento en la dosis infectiva. Para analizar más en detalle los resultados que mostraban la presencia de los segmentos M y L en el medio extracelular y la ausencia de S a un MOI de 2,5 pfu, se determinó la sensibilidad de los RT-PCR de los distintos fragmentos. Estos resultados mostraron una sensibilidad similar de las distintas reacciones, detectándose hasta 374 copias de RNA S, 425 copias de RNA M y 479 copias de RNA L. Por lo tanto, los resultados señalan que la ausencia del fragmento S en el extracelular no sería explicada por una diferencia en la sensibilidad de los RT-PCR, sino que por una disminución del fragmento S en viriones maduros liberados al extracelular. Para descartar que esta diferencia fuese debido a un problema en la reacción de unión de los partidores al RNA templado, se decidió amplificar una zona distinta del RNA S. Los resultados mostraron que usando un par de partidores distintos, tampoco se observó amplificación del RNA S. Esto sugirió que el RNA S no estaba presente en extracelular o quizás en un nivel muy bajo. Para averiguar si el RNA estaba en un bajo nivel, se realizó un nested PCR con el producto ya amplificado. Los resultados mostraron amplificación en el Nested PCR, lo que sugiere que a un MOI de 2,5 se sintetizaron partículas víricas madura liberadas al extracelular en dos poblaciones virales distintas. Una de ellas, con la ausencia del fragmento S y la otra con la presencia de los tres fragmentos virales (S, M y L), pero en menor

número respecto al grupo viral que no posee los tres segmentos. Se ha comunicado la presencia de partículas víricas deleteadas dentro del ciclo replicativo del virus Seoul (Meyer B y Schmaljohm C, 2000), pero hasta el momento no se ha descrito la presencia de poblaciones víricas distintas con virus Andes. Estos resultados muestran que al realizar infecciones con virus Andes a un MOI bajo, no sería posible detectar las distintas poblaciones virales, pero al aumentar el valor de MOI, se detectarían los dos grupos virales. Al revisar los resultados podemos sugerir que al aumentar el MOI la producción de partículas víricas se vería afectada, lo que podría explicarse por una elevada tasa de error en el proceso de formación de las partículas víricas.

Hutchinson K y cols (1996) realizaron cuantificaciones de RNA S y M en infecciones de células Vero E6 a un MOI de 6 pfu con virus Sin Nombre detectando RNA del segmento S y M a las 4 y 8 hrs pi, respectivamente. Al homologar los valores a una MOI de 0,1 pfu, se determinó un nivel de plateau de 300-325 y 125-150 copias de RNA/célula de los respectivos fragmentos. Al realizar infecciones en Vero E6 con virus Andes a un MOI de 0,1 se determinó un plateau de 950-1,000 y 650-700 copias de RNA/célula intracelular de S y M. Estos resultados sugieren que con un MOI similar de virus Andes respecto a Sin Nombre; Hantavirus Andes produciría una mayor síntesis de los fragmentos S y M a los distintos tiempos pi, lo cual sugiere que Andes tendría un crecimiento *in vitro* más rápido y en mayor nivel que Sin Nombre. Estos hallazgos son muy interesantes de continuar estudiando con mayor profundidad, ya que sugiere una mayor virulencia *in vitro* de virus Andes respecto de Sin Nombre. Quizás ello

podría ayudar a entender, al menos en parte, la diferencia en agresividad que se ha sugerido para ambas cepas virales (Toro J y cols, 1998). Las infecciones con virus Sin Nombre son prevalentes en Norteamérica y tienen una tasa de mortalidad cercana al 30%; en cambio en Chile las infecciones con virus Andes son prevalentes con una tasa de mortalidad cercana al 48% (Galeno y cols, 2002). Además, sólo en el caso de infecciones con virus Andes se ha reportado la transmisión de persona a persona (Padula P y cols, 1998).

Con la finalidad de determinar en forma más exacta el número de copias de RNA S, M y L en las distintas muestras intracelulares y extracelulares se implementó un sistema de RT-PCR competitivo cuantitativo (QC-RT-PCR). Este método se basa en la competencia entre el RNA templado de la muestra y un RNA templado control con delección (Gilliland G y cols, 1990). Al realizar la determinación de carga viral de los distintos fragmentos en la cinética de infección utilizando un MOI de 2,5 se determinó que a las 4 hrs pi se cuantificaron alrededor de 31 copias de RNA/célula, comparado con las 166 copias de RNA/célula determinadas semi cuantitativamente. Mediante RT-PCR se determinó que el número de copias de RNA del fragmento S fluctuaba entre 31 y 2172 copias de RNA/célula durante los días pi, y para el fragmento M variaron desde 12 a 2457 copias de RNA/célula. Todos los valores cuantificables de S y M fueron menores en el número de copias en las distintas muestras intra y extracelulares de los diferentes días pi, pero solo la muestra de las 24 hrs pi tuvo un aumento de alrededor de 2,8 veces respecto de la estimación semicuantitativa del RNA S y de 2,57 veces para el RNA M. Los resultados mostrados permiten afirmar que los valores cuantificados por QC-RT-PCR son más exactos debido a que las

variaciones inherentes en las condiciones experimentales de cada ensayo fueron controladas y afectaron de la misma forma al RNA templado de la muestra como al RNA templado competidor. Además en los ensayos de semicuantificación y de QC-RT-PCR se determinó la tendencia en la síntesis de RNA, las cuales fueron similares, manteniéndose las diferencias con el virus Sin Nombre lo que demuestra la concordancia de ambos resultados. (Hutchinson K y cols, 1996)

Para estudiar más en detalle el ciclo replicativo de Andesvirus se realizaron infecciones en células Vero E6 a un MOI de 0,1 pfu, incorporando distintas drogas las cuales tenían implicancias en el proceso replicativo del virus.

La ribavirina es un potente antiviral que produce mutaciones en virus RNA como por ejemplo virus Polio. Severson W y cols (2003) señalaron que utilizando ribavirina a una concentración de 12 ng/ μ l en infecciones en células Vero E6 con virus Seoul y a un MOI de 0,1 y 0,01 pfu, disminuía la síntesis del RNA S mensajero a las 24, 48 y 72 hrs pi. Además demostraron que la ribavirina produce mutaciones en el RNA S de virus Seoul a una tasa de 9,5 de cada 1000 nucleótidos. Otros investigadores han reportado que al utilizar ribavirina a una concentración de 100 ng/ μ l, y manteniéndola durante 5 días en el cultivo celular, se inhibe la síntesis de RNA en virus Seoul.(Murry M y cols, 2001). A diferencia de lo observado por Severson con virus Seoul, al realizar infecciones con Andesvirus a un MOI de 0,1 pfu y adicionado ribavirina a una concentración de 100 ng/ μ l; es decir, 8,3 veces más que lo agregado en infecciones realizadas por Severson con virus Seoul, se observó una total inhibición en la síntesis de los fragmentos S, M y L, no detectándose ninguno de ellos por RT-PCR en las muestras intra y

extracelulares. Esto es similar a lo observado por Murphy al utilizar la ribavirina a una concentración de 100 ng/μl. Estos resultados muestran que al aumentar la concentración de ribavirina en cultivos *in vitro* se inhibiría la síntesis de los distintos tipos de RNAs, ya sea complementarios, virales o mensajeros.

La Actinomicina D es un antibiótico que se une no covalentemente al DNA entre pares de bases C-G centrales, inhibiendo la transcripción en eucariontes y procariontes. Ramaswany R y Kolakofsky D (1988) observaron que antes de las 24 hrs pi a un MOI de 20 a 50 pfu con el virus La Crosse y adicionando 5 ng/μl de actinomicina D no afectaba la síntesis de RNA S mensajero. Previamente Short N y cols (1982) mostraron que la actinomicina D tendía a disminuir la expresión de las proteínas p50, p16, y p13, además de las proteínas N, G1, G2 y L de Bunyamwera. Nuestros resultados muestran que la actinomicina D a una concentración de 0,133 ng/μl en infecciones con virus Andes se retrasaría la síntesis de RNA S, M y L intracelular, detectándose solo a partir de las 48 hrs pi intracelularmente, a diferencia de lo observado en la sintética de infección a MOI 0,1, sin la presencia de ninguna droga, donde se detectó RNA a partir de las 24 hrs pi. En el extracelular se detectó primeramente L, seguido de M y finalmente S. La expresión de las proteínas se detectó simultáneamente a las 48 hrs pi utilizando el anticuerpo monoclonal y el antisuero de paciente, lo que pone en evidencia la expresión del conjunto de proteínas virales involucradas en el ciclo replicativo de virus Andes. No se observó alteraciones en la expresión de proteínas virales a los distintos tiempos pi.

La puromicina es un inhibidor de la síntesis de proteínas causante de una prematura terminación de las cadenas proteicas, ya que actúa como un análogo de la región 3' terminal de los aminoacil tRNA. Eshita y cols, realizaron análisis de los distintos RNAs S y M virales mensajeros involucrados en los procesos de transcripción y traducción en Bunyavirus. Ellos demostraron que al agregar puromicina a una concentración de 100 ng/ μ l existe una inhibición en la síntesis de RNA mensajero S y RNA viral S, al igual que para el fragmento M. Al realizar infecciones con virus Andes en Vero E6 y utilizando puromicina a una concentración 150 veces inferior a la utilizado con Bunyavirus, pudimos observar un retraso en la síntesis de los distintos RNA virales. Es así, como el fragmento S fue detectado intra y extracelularmente a partir de las 72 hrs pi y el fragmento M fue detectado 24 hrs después que el fragmento S en el intra y extracelular. Nuevamente se observó un desplazamiento de 24 hrs pi en la síntesis de RNA S y M. A diferencia de los otros dos fragmentos, el fragmento L fue detectado a partir de las 48 hrs pi en el intracelular y en el sobrenadante. Estos resultados sugieren que en presencia de la droga se estarían produciendo partículas defectivas liberadas al extracelular, al igual que lo visto en las infecciones con un mayor MOI. La expresión de proteínas mostró una relación directa con la síntesis de los fragmentos virales, determinando sólo a las 48 y 72 hrs pi la presencia de la proteína N en las células infectadas con el suero policlonal y el anticuerpo monoclonal, respectivamente. La tunicamicina es una droga que inhibe la glicosilación de proteínas al competir con el transportador glicosídico dodecil pirofosfato. Algunos estudios realizados con virus Hantaan muestran que al tratar

las células con tunicamicina se reduce drásticamente la expresión de la proteína G2, en tanto que la proteína G1 no sería detectada (Schmaljohn C y cols, 1983). Nosotros observamos que en infecciones con virus Andes y utilizando tunicamicina a una concentración de 0,167 ng/ μ l, los RNAs intracelulares no son afectados, apareciendo el RNA S a las 24 hrs pi seguido del segmento L y M a las 48 y 72 hrs pi respectivamente. La síntesis de RNA S y M intracelular sería similar a la observada en las infecciones sin utilizar ninguna droga. Esto muestra que la tunicamicina no afecta la síntesis de los distintos RNAs intracelulares. A nivel extracelular hubo detección de RNA S solo a las 120 hrs pi y de RNA M y L a partir de las 72 hrs pi. Estos resultados sugieren que la tunicamicina afectaría el proceso de glicosilación de las proteínas G1 y G2, lo que significaría una detección tardía de RNA en el extracelular. El RNA viral extracelular está directamente relacionado con la presencia de partículas víricas y por consiguiente con las glicoproteínas G1 y G2 presentes en la envoltura viral. Por lo tanto si no existe glicosilación de proteínas virales, no habría liberación de partículas víricas maduras al extracelular y por ende no habría o se retrasaría la detección de RNA de los distintos fragmentos virales. Esto explicaría el desplazamiento en la detección del RNA en el extracelular.

La cicloheximida es otra droga que bloquea la traducción de RNA mensajeros, inhibiendo la peptidiltransferasa sobre la subunidad 60 S ribosomal. Estudios han descrito que en infecciones de células BHK-21 con Bunyavirus y en presencia de cicloheximida a una concentración de 100 ng/ μ l, existe una inhibición en la síntesis de RNA viral S y M. (Eshita y cols, 1985). En los ensayos realizados

con virus Andes y a una concentración de cicloheximida mucho menor (alrededor de 600 veces menos) la síntesis de RNA M fue totalmente inhibida en las muestras intra y extracelulares, al igual que lo comunicado para Bunyavirus (Eshita y cols, 1985). A diferencia de lo observado para M, los fragmentos S y L fueron detectados en forma muy tenue a las 72 y 96 hrs respectivamente, aumentando la síntesis a las 120 hrs pi en ambos casos. Este aumento en la síntesis de RNA se explicaría por la degradación de la droga en el cultivo celular.

Estos resultados reflejan en parte el proceso replicativo *in vitro* de la cepa Andes aislada a partir de un paciente. Además demuestran que el virus Andes tiene una cinética de síntesis de RNA y expresión de proteínas similares, aunque con diferencias, a otras cepas de Hantavirus. Sin embargo, ellos sugieren que el crecimiento *in vitro* del virus Andes sería más rápido que el virus Sin Nombre.

Es importante destacar las proyecciones de los estudios realizados, ya que en investigaciones sucesivas se podría desarrollar ensayos con la finalidad de esclarecer más en detalle el proceso replicativo de virus Andes , al igual que evaluar la susceptibilidad del virus a determinadas drogas.

Conclusiones

- Durante el ciclo infeccioso *in vitro* normalmente se sintetizan primero el RNA S, luego los RNAs M y L.
- En los primeros días post infección con virus Andes se determinó una distribución antigénica intracitoplasmática; y posteriormente se observó una distribución antigénica asociada al aparato de Golgi.
- Hantavirus Andes tendría una mayor síntesis de los tres segmentos de RNA viral respecto a lo previamente informado para Hantavirus Sin Nombre, lo que se reflejaría en una mayor síntesis de virus Andes durante el ciclo infeccioso *in vitro*.
- Algunas drogas mostraron un claro efecto inhibitorio en el ciclo replicativo del virus Andes. La cicloheximida inhibió la síntesis de proteínas virales, produciendo un retardamiento en la síntesis de RNAs S, M y L. La ribavirina inhibió la síntesis de los distintos RNAs virales.

Bibliografía

1. Barbara J, Meyer B y Schmaljohn C. Accumulation of Terminally Deleted RNAs May Play a Role in Seoul Virus Persistence. *J. Virol.* 2000; 74: 1321-1331.
2. Barry RD. The effect of actinomycin D and ultraviolet irradiation on the production of fowl plague virus. *Virology.* 1964; 24: 563-569.
3. Birinboim, H.C. y Doly M. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 1979; 7:1513-1520
4. Boom, R. Sol, C.J, Salimans, M. M, Jansen, C. L. y Wertheim-van Dillen, Noorda, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acid. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 495-503.
5. Bouloy M y Hannoun C. RNA-dependent RNA polymerase associated with virions. *Virology* 1976; 69: 258-264.
6. Chomczynski P y Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162: 156-159.

7. Duchin J, Koster F y Peters C. A clinical description of 17 patients with a newly recognized disease. *N Engl. J Med.* 1994; 330: 949-955.
8. Elliott R, Schmaljohn C y Collet. Bunyavirus genome structure and gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1991; 169: 91-141.
9. Eshita Y, Ericson B, Romanowski V y Bishop D. Analyses of the mRNA transcription processes of snowshoe hare Bunyavirus S and M RNA species. *J. Virol.* 1985; 55: 681-689.
10. Galeno H, Mora J, Villagra E, Fernandez J, Hernandez J, Mertz G y Ramirez E. First Human Isolate of Hantavirus in the Americas: Isolation from Serum of a Patient who subsequently Developed Fatal Cardiopulmonary Syndrome (HCPS). *Emerging Infectious Diseases* 2002; 8: 657-661.
11. Gavrilovskaya I, Brown E, Ginsberg M y Mackow E. Cellular Entry of Hantaviruses Which Cause Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Is Mediated by beta 3 Integrins. *J. Virol.* 1999; 73: 3951-3959.
12. Gavrilovskaya I, Shepley M, Shaw R, Ginsberg M y Mackow E. Beta 3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; 95: 7074-7079.

13. Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990; 87: 2725-2729.
14. Goldsmith C, Elliott L, Peters C y Zaki S. Ultrastructural characteristics of Sin Nombre virus, causative agent of hantavirus pulmonary syndrome. *Arch. Virol.* 1995; 140: 2107-2122.
15. Hjelle B, Jenison S y Torrez-Martinez N. A novel hantavirus associated with an outbreak of fatal respiratory diseases in southwestern United States: Evolutionary relationships to known hantavirus. *J. Virol.* 1994; 68: 592-596.
16. Hutchinson K, Peters C y Nichol, S. Sin Nombre virus mRNA synthesis. *Virol.* 1996; 224: 139-149.
17. Ish-Horowicz, D. y Burke J.F. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 1981; 9: 2989-2996.
18. Kariwa H, Tanabe H, Mizutani T, Kon Y, Iwasa M, Lokugamage K y Lokugamage N. Synthesis of Seoul virus RNA and structural proteins in cultured cells. *Arch. Virol.* 2003; 148: 1671-1685.
19. Khan A, Khabbaz R, Armstrong L, Armstrong L, Holman R, Bauser S, Graber J, Strine T, Miller G, Reef S, Tappero J, Rollin P, Nichol S, Zaki S, Bryan R,

- Chapman L, Peters C y Ksiazek T. Hantavirus pulmonary syndrome: The first 100 US cases. *J. Infect Dis.* 1996; 173: 1297-1303.
20. Kim T, Choi Y, Cheong H y Choe J. Identification of a cell surface 30 Kda protein as a candidate receptor for Hantaan virus. *J. G. Virol.* 2002; 83: 767-773.
21. Lopez N, Padula P, Rossi C, Miguel S, Edelstein A, Ramirez E y Franze-Fernandez M. Genetic characterization and phylogeny of Andes virus and variants from Argentina and Chile. *Virus Res.* 1997; 50: 77-84.
22. Meyer B y Schmaljohn C. Accumulation of terminally deleted RNAs may play role in Seoul virus persistence. *J. Virol.* 2002; 74: 1321-1331.
23. Murphy M, Kariwa H, Mizutani T, Tanabe H, Yoshimatsu K, Arikawa J y Takashima I. Characterization of in vitro and in vivo antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. *J. Vet. Med. Sci.* 2001; 63: 637-645.
24. O'Farrell P.H. High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 1975; 250: 4007-4021.
25. Raftery MJ, Kraus A, Ulrich R, Kruger DH y Schonrich G. Hantavirus infection of dendritic cells. *J Virol.* 2002; 76:10724-10733.

26. Ramaswamy R y Kolakofsky D. La Crosse infection of mammalian cells induces mRNA instability. *J. Virol.* 1988; 62: 27-32.
27. Ravkov E y Compans R. Hantavirus nucleocapside protein is expressed a membrane-associated protein in the perinuclear region. *J. Virol.* 2001; 75: 1808-1815.
28. Ravkov E, Nichol S y Compans R. Polarized entry and release in the epithelial cells of Black Creek Canal virus, a new world Hantavirus. *J. Virol.* 1997; 71: 1147-1154.
29. Ravkov E, Nichol S, Peter's C y Compans R. A role of actin microfilaments in Black Creek Canal virus morphogenesis. *J. Virol.* 1998; 72: 2865-2870.
30. Saki S, Greer P, Coffield L, Goldsmith C, Nolte K, Foucar K, Feddersen R, Zumwalt R, Miller G, Khan A y cols. Hantavirus pulmonary syndrome: pathogenesis of a emerging infectious disease. *Am. J. Pathol.* 1995; 146: 552-579.
31. Schmaljohn C y Hjelle B. Hantavirus: A Global Disease Problem. *Emerging Infectious Diseases.* 1997; 3: 95-104.

32. Schmaljohn C. Bunyaviridae. The Viruses and the Replication. En: Fields B, Knipe D, Chanock R, Menick J, Roizman B, Shope R (eds). Virology. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1996; 1447-1472.
33. Schmaljohn CS, Hasty SE, Harrison SA y Dalrymple JM. Characterization of Hantaan virions, the prototype virus of hemorrhagic fever with renal syndrome. J. Infect Dis. 1983; 148: 1005-1012.
34. Severson W, Schmaljohn C, Javadin A y Jonsson C. Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication. J. Virol. 2003; 77:481-488.
35. Shatkin AJ. Actinomycin and the differential synthesis of reovirus and L cells RNA. Biochemical and biophysical Research Communications. 1965; 19: 506-510.
36. Short N, Meek A y Dalgarno L. Seven infection-specific polypeptides in BHK cells infected with Bunyawera virus. J. Virol. 1982; 43: 840-843.
37. Spiropoulou C.F , Gloldsmith C.S, Shoemaker T.R, Peters C.J, Compans R.W. Sin Nombre glycoprotein trafficking. Virology. 2003; 308: 48-63.
38. Vezza A, Repik P, Phillip C, Bishop D. In vitro transcription and protein synthesis capabilities of Bunyawera: Wild type snowshoe hare virus and its

temperature-sensitive group I, Group II, and group I/II mutants. *J. Virol.* 1979; 31:426-436.

39. Wang H, Calisher C, Schmaljohn C. Manual of Hemorrhagic fever with Renal Syndrome and Hantavirus pulmonary Syndrome. 1999; WHO Collaborating Center for Virus Reference and Research.