Generación de virus Tacaribe recombinantes con modificaciones genéticas atenuantes

Fernández, J(1); Gallo, GL(1); Sepulveda, C(2,3); Brignone, J(4), Gamboa, G(4); Riera, L(4); Maiza, A(4); Saavedra, MC(4); López, N(1).

(1) Centro de Virología Humana y Animal, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-Universidad Abierta Interamericana, Buenos Aires, Argentina (2) Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina (3) Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina (4)Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio I. Maiztegui, ANLIS-Malbrán, Ministerio de Salud de la Nación, Pergamino, Buenos Aires, Argentina
Contacto: jonasmfb@gmail.com

La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) es una severa enfermedad endemoepidémica de la región central de nuestro país, cuyo agente causal es el virus Junín (JUNV), género Mammarenavirus, familia Arenaviridae. JUNV se clasifica, junto con el virus Tacaribe (TCRV) y todos los arenavirus productores de fiebres hemorrágicas endémicas de Sudamérica, dentro del clado B del grupo de mammarenavirus del Nuevo Mundo. TCRV es apatogénico, es el prototipo y ha sido empleado como modelo de estudio de este grupo de virus. El genoma de TCRV consta de dos segmentos de ARN, cada uno de los cuales codifica dos proteínas: la nucleoproteína (NP) y el precursor (GPC) de las glicoproteínas de envoltura, en el segmento S; y, en el segmento L, la proteína de matriz (Z) y la ARN polimerasa dependiente de ARN (L). Ambos segmentos genómicos poseen regiones no codificantes (NCR) en sus extremos 5’ y 3’, que incluyen las secuencias promotoras de la replicación viral. Con el propósito de crear una nueva plataforma vacunal para la FHA, nuestro laboratorio implementó la metodología de genética reversa para generar TCRV recombinante (rTCRV). Sobre esa base, se introdujeron modificaciones genéticas controladas en el genoma viral, a fin de aumentar el grado de atenuación de rTCRV. Específicamente, se diseñaron mutaciones en la secuencia NCR 5’ del ARN S y en dos posiciones clave del sitio catalítico exonucleasa (Exo) de NP. Estas últimas fueron introducidas para anular o reducir la capacidad de la proteína para suprimir la vía del interferón de tipo I. En ensayos in vivo en modelo murino, el virus doble mutante (rTCRV sNCR ExoN2) mostró un grado de atenuación mayor que el exhibido por el rTCRV salvaje, y similar al de la cepa vacunal Candid#1 de JUNV. No obstante, encontramos que rTCRV sNCR ExoN2 revirtió al genotipo salvaje, en contraste con el simple mutante rTCRV sNCR, que conservó la mutación. Esto indicó que la combinación de mutaciones en ambas regiones (en NCR y en Exo) aumenta la inestabilidad genética del virus. Como alternativa, se generó otra mutante con cuatro sustituciones puntuales en el sitio catalítico Exo de NP que demostró ser estable hasta el pasaje 4, pero revirtió a

genotipo salvaje en dos de las posiciones mutadas al cabo de los siguientes dos pasajes. Paralelamente, se generó rTCRV F425I, que contiene una sustitución de aminoácido en la región transmembrana de la glicoproteína viral, en la misma posición que el determinante de atenuación F427I de la cepa vacunal Candid#1 de JUNV. Luego de ser sometido a 10 pasajes sucesivos en cultivo celular, el virus conservó el genotipo mutante. Su grado de atenuación será evaluado tanto en cultivo celular como in vivo. Los resultados sugieren que el sitio Exo de NP jugaría un rol importante (aun desconocido) en la multiplicación viral y por lo tanto no es elegible, mientras que el residuo F427 parece ser un blanco promisorio para la generación de rTCRV sobre-atenuado.