Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Estrategia del genoma del virus Junín

Mersich, Susana E.

1980

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Mersich, Susana E.. (1980). Estrategia del genoma del virus Junín. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1652_Mersich.pdf

Cita tipo Chicago:
Mersich, Susana E.. "Estrategia del genoma del virus Junín". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1652_Mersich.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPTO DE QUIMICA BIOLOGICA. CATEDRA DE VIROLOGIA

ESTRATEGIA DEL GENOMA DEL VIRUS JUNIN

LIC. SUSANA E. MERSICH

DIRECTORA: Dra CELIA COTO DE RAVASCHINO

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1980

1652
Ej = 2

A MIS PADRES

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Celia E. Coto por su inapreciable apoyo y estimulante dirección.

A mis compañeros del laboratorio de Virología: Elsa Damonte, Guillermina Help y Marta León por su valiosa ayuda; a Cristina D'Aiutolo, Jorge Lampuri y María del Carmen Vidal por su desinteresada colaboración y a Mabel Prado por su eficiente tarea dactilográfica.

A todos aquellos profesores cuyo oportuno y generoso consejo me permitió continuar este trabajo:

Dr. Azcurra, Dra A. M. Brunengo, Dr. R. de Torres, Dra. N. González, Dr. O. Peso

A los integrantes de las Cátedras de Biología Molecular, Inmunoquímica y Microbiología que tantas veces me ayudaron...

INDICE

. Objetivo del presente trabajo 1

INTRODUCCION 2

1. Arenavirus 2

1.1. Introducción 2

1.2. Clasificación del virus Junín 2

1.3. Características antigénicas 4

1.4. Características biológicas 4

2. Estrategia de los genomas virales 9

2.1. Generalidades sobre la multiplicación de los virus 9

2.2. Relación de los virus con sus células huéspedes 10

2.3. El virus Influenza como modelo para analizar el comportamiento del virus Junín 12

2.3.1. Relación del virus Influenza con la célula huésped 12

2.3.2. Aspectos bioquímicos 15

2.3.3. Efecto de inhibidores metabólicos: Actinomicina-D, Cordicepina y α-Amanitina 18

2.3.4. La α-Amanitina y la transcripción de los genes virales 24

2.3.5. La α-Amanitina y el virus de Influenza 25

2.4. Relación de los Arenavirus con la célula huésped 26

2.4.1. Relación del virus Junín con la célula huésped 27

2.4.2. Actinomicina-D 28

2.4.3. Acción de la Cordicepina y α-Amanitina 31

2.5. Expresión del genoma de los Arenavirus 31

3. Enzimas virales 36

3.1. Las enzimas de la clase V 37

3.2. RNA polimerasas 40

3.3. RNA polimerasa de Influenza en la célula huésped 42

3.4. RNA polimerasa en el virus Pichindé 44

MATERIALES Y METODOS 47

1. Cultivos celulares 47

1.1. Células Vero 47

1.2. Células RK_{13} 48

1.3. Células BHK_{21} 48

2. Virus 48

2.1. Junín 48

2.2. Tacaribe 48

2.3. VSV 49

3. Preparación de los stocks 49

3.1. En cerebro de ratón lactante 49

3.2. En células Vero 49

4. Determinación de la infectividad 50

4.1. Titulación por observación de la acción citopatogénica 50

4.2. Titulación por el método de formación de placas bajo agar 51

5. Determinación de viabilidad celular 52

6. Rendimiento viral 53

7. Fraccionamiento celular 53
8. Purificación de los núcleos 54
9. Determinación de RNA polimerasa dependiente de RNA en células 56
10. Determinación de RNA polimerasa dependiente de RNA en partículas virales 57
11. Precipitación del ácido insoluble 57
12. Determinación de proteínas 58
13. Sistema regenerador de ATP 59
14. Actividad de RNA polimerasa I y II 59
15. Purificación de virus Junín, cepa XJ.Cl_3 60
16. Calibración de una columna de Sephadex G-25 62
17. Proceso de sonicación 62
18. Saturación de RNAsas contaminantes 64
19. Tratamiento de virus con alta concentración de ClNa 64
20. Determinación de NTPasa 66
21. Método de separación de nucleótidos 66
22. Correlación entre la cantidad de células con la concentración de DNA 69
23. Medida de la incorporación de uridina marcada en monocapa de células crecidas en viales 71
24. Tratamiento de cultivos celulares con DEAE-dextrán 71

RESULTADOS 73

1. Aspectos bioquímicos de la replicación viral 73

1.1. Incorporación de uridina-H^3 en el RNA total 73

2. Participación del núcleo celular en la multiplicación del virus Junín 76

2.1. Alfa-amanitina 76

2.1.1. Efecto de la α-Amanitina sobre la multiplicación del virus Junín 76

2.1.2. Medida de penetración de la droga en células Vero 77

2.1.3. Efecto de la α-Amanitina sobre el virus VSV 79

2.1.4. Estadío de la replicación del virus Junín afectado por la droga 83

2.1.5. Acción de la α-Amanitina sobre el virus Tacaribe 83

2.2. Inducción de RNA polimerasa II por infección viral 86

2.2.1. Inhibición de la incorporación de uridina-H^3 por efecto de la α-Amanitina sobre la RNA polimerasa II 88

2.3. Síntesis de RNA en núcleos de células infectadas en la etapa temprana de la multiplicación 90

2.3.1. Efecto de la α-Amanitina sobre la síntesis de RNA 94

2.3.2. Influencia de la duración del pulso 96

3. Enzimas

3.1. Actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA en virus Junín, cepa $XJ.Cl_3$ 99

3.2. Actividad de Nucleósido-5'-trifosfato
fosfohidrolasas 103

DISCUSION 109

. Necesidad de la funcionalidad del núcleo celular
para la replicación viral 110

. Inducción de RNA polimerasa II por infección viral 112

. Síntesis de RNA nuclear 114

. Enzimas asociadas el virión:
RNA polimerasa dependiente de RNA 117
Nucleósido 5'-trifosfatasa 123

. Distintos aspectos del compromiso celular en el
proceso de replicación viral 126

CONCLUSION 129

BIBLIOGRAFIA 130

ABREVIATURAS

ACP: Acción citopatogénica

CEF: Células fibroblastos de embrión de pollo

CHO: Células de ovario de hamster chino

CPM: Cuentas por minuto

$DICT_{50}$: Dosis infectante cultivo de tejido 50%

DL_{50}: Dosis letal 50%

DNA: Acido deoxiribonucleico

D.O.: Densidad óptica

GR: Células de carcinoma mamario de ratón de cepa GR

hs: horas

i.c.: inoculación intracerebral

min: minutos

mμ: milimicrones

NDP: nucleósido difosfato

NTP: nucleósido trifosfato

PBS: solución salina fosfatada

p.i.: post-infección

pmoles: picomoles

RNA: Acido ribonucleico

S.N.: Sobrenadante

UFP: Unidades formadoras de placas

TCA: Acido tricloroacético

BHK: células de riñón de hamster

FPV: Fowl Plague Virus

L : células de fibroblasto de ratón

NDV: Newcastle Disease Virus

P.M.: Peso Molecular

VSV: Vesicular Stomatitis Virus

Objetivo del presente trabajo

Si bien se conocen algunas características del ciclo de replicación de los Arenavirus, como la carencia de inhibición significativa en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos celulares, aún subsisten muchos interrogantes sobre los hechos bioquímicos que ocurren durante la replicación, tanto en una infección primaria que termine con la destrucción celular, como en el establecimiento y mantenimiento de una infección persistente. En ninguno de los dos casos se conoce como ocurre el proceso de transcripción, cuáles son las variaciones en los niveles de actividad de distintas enzimas presentes o en la aparición de nuevas enzimas y cómo participa la célula huésped en la producción de los componentes virales.

Aunque los huéspedes naturales de los Arenavirus son los roedores silvestres, varios integrantes del grupo producen enfermedad en el hombre. De allí que el conocimiento de la replicación de los Arenavirus no tenga sólo un interés académico sino que trata de proveer nuevos aportes en el entendimiento de las infecciones que ocurren in-vivo.

INTRODUCCION

1. ARENAVIRUS

1.1. Introducción

La familia Arenaviridae comprende al virus de la Coriomeningitis Linfocitaria (LCM), al virus de Lassa y al complejo Tacaribe, formado por ocho virus distintos (Tabla 1). La mayoría de estos virus tiene un huésped determinado entre los roedores salvajes, en los que producen una infección persistente.

Si bien la diseminación natural a otros mamíferos no es un fenómeno comúnmente descrito, algunos miembros del grupo son patógenos para el hombre. La enfermedad que provocan se limita a ciertas regiones geográficamente separadas: Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) y Fiebre Hemorrágica Boliviana (FHB) en América del Sur, Fiebre de Lassa en el oeste de Africa y la Coriomeningitis Linfocitaria en todo el mundo, pero siempre existe el riesgo de una diseminación provocada por los portadores naturales o por viajeros cirscunstanciales.

1.2. Clasificación del virus Junín

El virus Junín, agente causal de la Fiebre Hemorrágica Argentina es clasificado taxonómicamente dentro de la familia Arenaviridae. Los virus de esta familia se caracterizan por su forma esférica o pleomórfica, con un diámetro de 50 a 300 nm, envoltura membranosa cubierta de espículas de

Tabla 1. Virus integrantes de la Familia Arenaviridae, ubicación geográfica y año de aislamiento

CORIOMENINGITIS LINFOCITICA: Distribución mundial (1934)	
LASSA: Africa Occidental (1969)	
COMPLEJO TACARIBE	
JUNIN: Argentina (1958)	
TAMIAMI: EE. UU. (Florida) (1963)	PARANA: Paraguay (1965)
TACARIBE: Trinidad (1963)	AMAPARI: Brasil (1966)
PICHINDE: Colombia (1965)	LATINO: Bolivia (1970)
MACHUPO: Bolivia (1965)	MOZAMBIQUE: Africa (1979)

10 nm de largo y poseen como material genético RNA de cadena simple[38]. La nucleocápside presenta simetría helicoidal.

La densidad del virión es de 1,17 a 1,18 g/ml en sacarosa y sus coeficientes de sedimentación varían de 325 a 500 S. La infectividad es destruída por los solventes de lípidos, por los ácidos (pH = 5,5) y radiaciones UV y gamma.

1.3. Características antigénicas

La familia Arenaviridae comparte un antígeno demostrable por inmunofluorescencia, mientras el complejo Tacaribe comparte un antígeno fijador de complemento, diferenciándose por reacciones de neutralización e inmunoprecipitación. Una excepción la constituyen los virus Junín y Tacaribe, que no se pueden distinguir por la técnica de fijación de complemento, debido a un alto grado de reactividad cruzada. Esta estrecha relación antigénica se demuestra también en los niveles significativos de anticuerpos neutralizantes anti-Junín determinados en los cobayos inoculados con virus Tacaribe y en la sólida protección de los mismos contra la FHA[26].

1.4. Características biológicas

La característica única de estos virus, de donde ha derivado el nombre de la familia, es la presencia de partículas en su interior, que se ven claramente en los cortes preparados para microscopía electrónica,como gránulos de arena. Dichos gránulos, de 20 a 25 nm de diámetro, son ribosomas de origen celular.

Tabla 2. Polipéptidos constitutivos[a] de algunos integrantes del complejo Tacaribe[b]

VIRUS	TOTAL	GLICOPROTEINAS	PROTEINAS MENORES
JUNIN	6[c]	1[c] ó 2	3[c]
Machupo	6	1[c] ó 3	2
Tacaribe	4	1	2
Pichindé	4	2	1 ó 2
Tamiami	4	1	2

(a) La proteína asociada a nucleocápside (N), que no se incluye, es común a todos ellos.

(b) Sobre los virus Paraná, Latino y Amaparí no hay datos publicados.

(c) Los datos para virus Junín son variables según los autores (11), (75).

Las características biológicas del virus Junín son similares al resto de los Arenavirus, con algunas excepciones que se detallan en la Tabla 2.

El virus Junín posee 4 especies de RNA[73] de coeficientes de sedimentación 33 S, 22 S, 28 S y 18 S. Para la familia están descritas[86,114] dos especies de ácidos ribonucleicos virales, una de PM = 3,2 x 10^6 y 33 S y otra de PM = 1,6 x 10^6 y 22 S. Las otras dos especies son de origen ribosomal, ya que presentan una movilidad electroforética característica de los RNA ribosomales y sensibilidad frente a bajas dosis de Actinomicina-D. Sus proporciones dependen del stock de virus del cual se han aislado y de las condiciones de crecimiento[114]. A veces suelen aparecer moléculas 15 S,de origen viral, y moléculas de RNA con coeficiente de sedimentación 4 S, cuya composición de bases y porcentaje de metilación es igual al tRNA de la célula hospedera (Tabla 3).

Si bien para el virus Junín se han descrito un total de 6 polipéptidos integrando el virión, estos datos difieren de los componentes proteicos del resto de la familia, que a su vez presenta una heterogeneidad, tanto en el número de subunidades encontradas como en su peso molecular. Todos los arenavirus poseen un polipéptido libre de hidratos de carbono asociado con la nucleocápside y una o más glicoproteínas de membrana. Así, en el virus prototipo de la familia, LCM, se han descrito recientemente 3 proteínas: 1 mayor, no glicosilada de PM = 63.000 y 2 glicosiladas de PM = 54.000 y 35.000. Las variaciones en la cantidad de polipéptidos del complejo Tacaribe se resumen en la Tabla 2. Los virus Paraná, Latino y Amaparí no se han incluído por no existir bibliografía al respecto.

Tabla 3. Características estructurales de los RNA de los Arenavirus

.- Son de cadena simple.

.- Poseen 4 piezas grandes, de 31 S, 28 S, 22 S y 18 S, y varias pequeñas (Los 28 S y 18 S son de origen celular).

.- Carecen de poli-A en el extremo 3' y estructura metilada en el extremo 5'.

El análisis estructural permitió caracterizar a través de los estudios realizados por distintos investigadores:

a) un polipéptido de la nucleocápside no glicosilado,de PM = 60.000 a 70.000 que representa la mayor parte de la masa del virión,clasificado como una ribonucleoproteína.

b) una glicoproteína mayor, externa que podría funcionar como componente de la membrana o de la nucleocápside, de PM = 54.000 a 64.000.

c) una glicoporteína menor de PM = 35.000 a 38.000, también ubicada externamente.

d) una cuarta proteína o bien varias proteínas menores, de localización y funcionamiento desconocido.

Estos cuatro componentes proteicos que se encontraron en el virus Pichindé[94,115], varían en los virus Tacaribe y Tamiami[114], ya que sólo se encuentra una glicoproteína.

La ribonucleoproteína presenta un aspecto lineal ó circular al microscopio electrónico en presencia de detergente, según se ha descrito recientemente en tres integrantes del complejo Tacaribe[75,115]. Su aspecto se asemeja así, al de los integrantes de la familia Bunyaviridae, que también poseen un genoma RNA segmentado, de cadena simple.

Solamente para uno de los integrantes de este grupo de virus, el virus Pichindé, se ha demostrado la existencia de 3 enzimas en el virión: una RNA polimerasa dependiente de RNA, una poli-U polimerasa y una poli-A polimerasa.

2. ESTRATEGIA DE LOS GENOMAS VIRALES

2.1. Generalidades sobre la multiplicación de los virus

Los estudios biológicos sobre los virus animales abarcan dos aspectos fundamentales: los cambios en el comportamiento celular, resultantes de la interacción virus-célula y los pasos secuenciales que integran un ciclo productivo, los que conducen a la formación y liberación de viriones maduros.

La liberación del material genético del virus en la célula lleva a la producción de una serie de fenómenos sucesivos y a veces simultáneos.

El primero de ellos es la adsorción, fenómeno que depende de la afinidad de los receptores celulares por los viriones, de acuerdo con las características de estos. Sigue luego la penetración dentro de la célula, que es explicada a través de distintos mecanismos, fagocitosis, fusión, etc.

En este momento las enzimas presentes en la célula o bien nuevas enzimas, destruyen la envoltura viral, parcial o totalmente, produciéndose la liberación del ácido nucleico. Como la infectividad de éste es menor que la que posee el virión completo,se produce un eclipse que corresponde a una disminución del número de unidades infectivas.

Cuando se libera el genoma, queda disponible la información para la síntesis de productos específicos virales y la correspondiente replicación. Claro que antes que dicha replicación comience pueden ocurrir una serie de procesos característicos de cada virus: puede tener lugar una fase intranuclear temprana para un mixovirus[3], o una síntesis temprana de DNA para un poxvirus[52]. Después de la transcripción a ácido ribonucleico mensajero, tiene lugar la traducción a proteínas virales características.

Los virus que hayan aportado pocos genes usarán las enzimas celulares existentes o transformadas para la biosíntesis de sus macromoléculas.

Las proteínas de la cápside, una vez sintetizadas, integran un "pool" de materiales que se requieren para un ensamble correcto. La incorporación del genoma en su cápside y cubierta definitiva (maduración),es el paso que precede a la liberación al medio externo del virión completo.

Dicho fenómeno puede ocurrir según el virus, por una brotación,con lisis celular, en forma individual o grupal, etc. Es común que en este proceso el virus incorpore elementos de la célula huésped. La morfogénesis es un proceso que se está conociendo actualmente en que las proteínas adoptan una forma final después de sufrir diversos clivajes.

Así con los procesos de síntesis regulados y la posterior liberación de las partículas virales se cumple un ciclo productivo viral.

2.2. Relación de los virus con sus células huéspedes

El efecto de un virus sobre la célula huésped infectada in-vitro sobre el animal huésped, depende de las características del virus (citolítico, virulento,etc) y del mencionado huésped. El análisis de las relaciones virus-células se hace dentro de un dado sistema y las conclusiones obtenidas no siempre son válidas para otros sistemas.

Las interacciones entre los virus y sus células huéspedes se pueden considerar en sus diferentes aspectos:

a.- el virus puede replicar activamente y finalmente destruír la célula, en una infección productiva ó lítica.

b.- la infección puede ser no productiva y conducir a una persistencia inaparente alterando las propiedades de la célula. Esta puede llegar a convertirse en una célula transformada.

c.- la infección que el virus produce puede permanecer latente por un largo período.

Las relaciones virus-célula que interesan en este trabajo corresponden al primer caso descrito, donde el virus replica cumpliendo sucesivamente todos los pasos de la multiplicación viral y la destrucción del huésped.

Uno de los fenómenos claves en esta interacción es la activación de las enzimas celulares implicadas en la síntesis de los ácidos nucleicos virales. Este proceso representa la inducción de enzimas con especificidades nuevas de sustrato u otras propiedades bioquímicas, a través de varios mecanismos de síntesis proteica:

a.- la síntesis aumentada de enzimas celulares,

b.- la derrepresión de enzimas celulares, que en condiciones normales estaban reprimidas,

c.- la síntesis de enzimas específicas del virus, codificadas por el genoma viral, o bien la síntesis de polipéptidos virales que puedan modificar las enzimas celulares existentes en el momento de la infección.

En general estas enzimas inducidas están implicadas en los procesos de replicación, transcripción y traducción viral. También existen proteínas que regulan el ciclo de crecimiento viral y otras que modifican el metabolismo de la célula huésped.

Las enzimas inducidas por los virus DNA y RNA pertenecen en especial a las clases conocidas como sintetasas o polimerasas, transferasas e hidrolasas.

También existen enzimas celulares cuya actividad no se ve afectada ni guarda relación con el daño morfológico producido por el virus que participarían, sin embargo, del proceso de multiplicación viral. Este es el caso de los virus DNA que replican en el núcleo de la célula y no afectan sus polimerasas, en cambio para los virus RNA existe un grupo que las inhibe pronunciadamente mientras otro no las altera en absoluto[59].

2.3. El virus Influenza como modelo para analizar el comportamiento del virus Junín

A pesar de pertenecer a una familia distinta, el virus Influenza presenta muchas semejanzas en su comportamiento con el virus Junín por eso nos pareció pertinente incluír aquí un resumen del conocimiento actual sobre este virus. En cuanto al justificativo de la elección de este modelo podemos referirnos al ensayo con éxito de antivirales sobre el virus Junín, previamente efectivos contra Influenza, realizados en nuestro laboratorio y como veremos luego los resultados que se presentan en esta tesis.

2.3.1. Relación del virus Influenza con la célula huésped

El virus Influenza se clasifica taxonómicamente dentro de la familia Orthomixoviridae. Las partículas de 80-120 nm de diámetro, son esféricas o alargadas con peplómeros que se proyectan a partir de su superficie externa. El material genético es RNA de cadena simple, con PM de 3,4 a 9,8 x 10^5, distribuído en 8 segmentos. La nucleocápside consta de varias proteínas (NP, P_1, P_2 y P_3) y los componentes externos son dos glicoproteínas (neuraminidasa y

hemaglutinina) y una proteína de membrana. La nucleocápside viral posee actividad de transcriptasa.

Como se ve en la Tabla 4 las semejanzas con el virus Junín son de tipo estructural y biológico. La estructura del material genético,el comportamiento frente a distintos inhibidores y la presencia de RNA polimerasa dependiente de RNA, son aspectos claves en la comparación de ambos virus, que apoyan la hipótesis de una estrategia similar en el proceso de replicación.El virus Influenza se ubica en la clasificación propuesta por Baltimore[7] en la clase V, que incluye a los virus con un genoma a RNA de cadena simple, transcripto por medio de una transcriptasa perteneciente a la ribonucleoproteína, en un RNA complementario que actúa como mensajero.

Durante mucho tiempo fue bastante incierto y discutido el sitio de síntesis del RNA inducido por el virus Influenza en las células que infectaba. En un primer trabajo de Scholtissek, C. en 1962, se sugirió que el RNA asociado al virión se sintetizaba en el núcleo, pero los descubrimientos posteriores respecto de la existencia de una RNA polimerasa asociada con elementos citoplásmicos celulares, pusieron en duda tal afirmación. El núcleo está implicado funcionalmente, al menos en la síntesis del ácido nucleico viral, ya que los distintos componentes virales no aparecen en células enucleadas o bien cuando la función del DNA está inhibida con Actinomicina D o por irradiación con luz UV. En efecto, la transcripción primaria se bloquea si se tratan las células con cualquiera de los dos agentes mencionados y también con α-amanitina o altas concentraciones de mitomicina. Debido a la estrecha relación de estos antibióticos con respecto a las distintas funciones del núcleo y a la reciente observación que el virus Influenza no

Tabla 4. Comparación del virus Influenza (I) y el virus Junín (J)

CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES	
Semejanzas	**Diferencias**
RNA de cadena simple y segmentado Nucleocápside helicoidal Presencia de envoltura	J tiene ribosomas

CARACTERISTICAS BIOLOGICAS	
Semejanzas	**Diferencias**
. Sensibilidad frente a distintos inhibidores: amantadina, rimantadina, UV, glucosamina, 2dG, Actinomicina D.	. I posee gran variabilidad genética. Aparentemente J no.
. Producción de partículas defectivas[38] producidas naturalmente e inducidas.	. I tiene un ciclo de multiplicación más corto.
. Presencia de RNA transcriptasa.	. I tiene hemaglutininas y neuraminidasa.
. Citopatogenicidad moderada (J sólo para células humanas o de mono).	. J origina persistencia.

infecta productivamente las células enucleadas[55], se sugirió que existe una proteína o un RNA, derivado del núcleo, que participa en la transcripción primaria o bien que la misma tiene lugar dentro y gracias a la adecuada organización nuclear.

Como contraste se hace notar que la replicación de Para-Influenza,que también pertenece a la clase V de la clasificación, no es afectado por la enucleación o por los tratamientos con los inhibidores nombrados. A nuestro criterio la clase V de Baltimore debería subdividirse en: Paramixovirus, Orthomixovirus y Arenavirus.

2.3.2. Aspectos bioquímicos

Existen además tres procesos bioquímicos inducidos por la infección con el virus Influenza, que aportan evidencias respecto de la participación nuclear.

a.- En el núcleo se acumulan las proteínas virales

Los primeros ensayos del año 1957 habían detectado en el núcleo un teñido específico para un antígeno temprano RNP, a las 3 hs p.i., que luego aparecería en el citoplasma. Los trabajos posteriores (1970) confirmaron,usando anticuerpos específicos, estas afirmaciones y aclararon que el polipéptido RNP, se sintetiza primero en el citoplasma y luego se acumula rápidamente en el núcleo de la célula. Dichas partículas RNP, aisladas ya a las 3 hs p.i. tienen el mismo tamaño que la ribonucleoproteína viral.

La exacta ubicación de las proteínas no estructurales en el nucleolo del núcleo se hizo utilizando técnicas de fluorescencia[36] que fueron confirmadas por las pruebas bioquímicas de aislamiento y caracterización: dicho

polipéptido es un real integrante del virión de Influenza[69].

b.- En el núcleo existe una RNA polimerasa dependiente de RNA inducida

En experimentos recientes se obtuvieron evidencias que sugieren la existencia de una síntesis de RNA inducida por el virus in-vivo, que es solo detectable en el núcleo[3]. Los experimentos se hicieron marcando con pulsos la célula infectada en presencia o ausencia de antibióticos, seguido de un examen por radioautografía que cuantifica la síntesis de RNA en la infección con FPV en el nucleoplasma y nucleolo.

El primero (donde está la RNA polimerasa II) tiene una importante incorporación entre 1 y 3 hs p.i. Aunque el análisis puede considerarse que no es lo suficientemente sensible para detectar el sitio de transcripción primaria, sugiere que la transcripción secundaria y la replicación podrían ser nucleares.

Las preparaciones de núcleos de células infectadas con el virus Influenza poseen, respecto de las células sin infectar, una RNA polimerasa dependiente de RNA, que es insensible a la acción de la Actinomicina D y α-amanitina in-vitro[47]. El tiempo de aparición de esta enzima es importante, ya que ocurre más temprano, aunque en menor cantidad, que una actividad enzimática citoplásmica que es máxima a las 5 hs p.i. Se ha demostrado que el producto de reacción sintetizado in-vitro es RNA viral y RNA complementario en iguales cantidades.

Esta actividad enzimática está realmente contenida en el núcleo de la célula infectada y no es debida a una contaminación citoplásmica, pero no se puede distinguir de la actividad enzimática microsómica en base al pH o requerimientos de cationes divalentes. Tampoco se sabe que relación existe en

tre la aparición de esta enzima y la acumulación nuclear de la ribonucleoproteína y polipéptidos mencionados en el punto anterior.

c.- En el núcleo hay una síntesis de RNA dirigida por el DNA celular durante los primeros estadíos de la replicación viral

De acuerdo con todas las evidencias respecto de la acción de la α-amanitina sobre una célula animal, el hecho que la replicación del virus Influenza sea inhibida por ella, es un indicador de la existencia de un requerimiento por la RNA polimerasa II (dependiente de DNA), enzima que sintetiza in-vivo un RNA semejante al DNA celular (mRNA), ya que ni la enzima del virión ni la RNA polimerasa inducida por el virus en el núcleo de la célula son sensibles a la droga en las etapas tempranas de la infección[69].

Las células CEF, que se infectan con FPV y se tratan con α-amanitina tienen una importante inhibición de la síntesis de RNA. Todo ocurre como si la infección viral determinara una alteración en el cociente de las actividades de la polimerasa II respecto de la polimerasa I, como se puede ver de las medidas de actividades de las dos enzimas a distintos tiempos p.i. ya que se estimula la RNA polimerasa II (máximo 1,30 horas) y disminuye la actividad de la RNA polimerasa I (que es insensible a la α-amanitina).

En contraste con estos resultados, las células infectadas con el virus Sendai (también de la clase V) no revelan estimulación alguna de la enzima; ésta más bien baja durante el curso de la infección.

La síntesis nuclear de RNA, dependiente de DNA, alcanza un máximo cerca de los 90 minutos post-infección, mientras que la que depende de RNA tiene un máximo a las 3 hs p.i. La adición de α-amanitina, al inhibir la RNA polimerasa II, suprime la primera fase de la síntesis, pero no la segunda. Por

eso se postula la existencia de dos fases nucleares distintas: una dependiente del DNA celular y la otra dependiente del virus. No se sabe si esta segunda fase representa un proceso de transcripción y/o replicación, ni si la transcripción primaria y secundaria ocurren en el núcleo y en el citoplasma.

Los resultados con Actinomicina D que luego se discuten apoyan la idea que la transcripción primaria es la única influenciada por un producto que depende del DNA celular.

2.3.3. Efecto de inhibidores metabólicos

Actinomicina D

La habilidad de un virus RNA para replicar en células cuya transcripción está inhibida por la Actinomicina D, da una medida de la dependencia de dicho virus con las funciones del DNA celular. Esta droga se une a los residuos de guanina del DNA y bloquea el templado para la DNA polimerasa y también para la RNA polimerasa dependiente de DNA[35,44]. En consecuencia inhibe la síntesis y transcripción del DNA.

Dentro de los pocos virus RNA sensibles a la acción de la Actinomicina D figura el virus de Influenza (ya que el NDV resiste a la acción de la droga). Las concentraciones bajas de la droga, desde 1 a 5 ug/ml según el tipo de célula usada, bloquean la multiplicación viral si se agregan en un estadio temprano del ciclo de crecimiento (antes de 2 hs p.i.), determinándose que no hay síntesis de RNA específico viral. Sin embargo, el agregado en tiempos posteriores da resultados conflictivos, probablemente debido a la variedad de células y cepas que se han usado; así se ha propuesto que lo que se inhibe es la síntesis de RNA de cadena negativa y de RNA de cadena doble[45]. La sensibilidad de los Mixovirus (subgrupo 1) a la inhibición por Actinomicina D sólo

durante las dos o tres primeras horas después de la infección, es un fenómeno que no está totalmente aclarado ya que si bien se ha sugerido que bloquea la transcripción primaria, no inhibe la actividad de transcriptasa in-vitro. Actualmente se han propuesto dos mecanismos distintos:

1.- La droga interfiere con ciertos componentes de la célula, cuya integridad estructural es necesaria para la replicación[36]. En efecto, las células tratadas con Actinomicina D presentan una importante alteración en la estructura del nucleolo, sólo con 1 ug/ml de la droga produciendo un agrandamiento del núcleo alrededor de 1 hora después de la exposición. Dicha alteración determinaría la ausencia de un antígeno nucleolar, esencial para la multiplicación viral, y consecuentemente la reducción de la síntesis de RNA viral.

2.- La droga bloquea la migración del RNA mensajero del virus Influenza, que es sintetizado en el núcleo (siempre y cuando la transcripción primaria ocurra en dicho lugar) cuando el mencionado RNA va desde el núcleo hacia el citoplasma[72].

Cordicepina

La cordicepina, cuyo nombre químico es 3'-deoxiadenosina, se incluye dentro de los análogos de la adenosina que las células transforman en su derivado trifosfatado. Tiene varios efectos sobre la síntesis de RNA[34] entre los cuales el más destacado es suprimir la producción de RNA ribosomal y de transferencia e impedir la adición de poli-A a la cadena de RNA hecho que ocurre en el núcleo celular[1]. Como la mayoría de los mRNA contienen secuencias de poli-A de 150 a 200 nucleótidos de longitud en sus extremos 3', la acción de la cordicepina inhibe la aparición de RNA mensajeros sobre los poliribosomas.

Los primeros estudios con cordicepina y los mixovirus indicaron que la replicación de FPV no es inhibida por la cordicepina.

Luego esta droga fue usada en 1975 para verificar la hipótesis que el virus de Influenza induce la síntesis de RNA en el núcleo celular. Los experimentos hechos por radioautografía usando uridina marcada, demostrando que en los núcleos de las células de embrión de pollo, la cordicepina inhibe especialmente la síntesis nucleolar y queda algo de síntesis en el nucleoplasma. Cuando se compara la incorporación en las células infectadas con FPV y tratadas con la droga, respecto de sus controles, se observa que sólo aumenta la síntesis de RNA nucleoplásmica a las 3 hs p.i.[3]. Este momento de la infección representa para otros investigadores la síntesis de RNA viral[47]. Resultaría así que la síntesis de RNA funcional para este virus no requiere la adición de secuencias de poli-A dependiente de cordicepina, no excluyéndose sin embargo algún otro mecanismo de adición[57].

Como los datos provistos por un mismo laboratorio para probar la acción de la droga con dos orthomixovirus distintos en dos líneas celulares diferentes, son contradictorios, se ha propuesto que el efecto de la cordicepina puede variar según la célula y el virus usado[98].

En contraste con estos resultados, la cordicepina no inhibe el proceso de transcripción citoplásmica de VSV en células HeLa (cuyo RNA nucleolar está inhibido), mientras inhibe al virus Newcastle y al Sendai, con una concentración de 50 ug/ml que determina una disminución de un 87% en la síntesis de RNA.

Alfa-Amanitina

Entre las sustancias tóxicas sintetizadas por el hongo Amanita Phalloides está el octapéptido α-Amanitina (Ver la Figura 1), que es una herramienta invaluable en la distinción in-vitro entre las múltiples RNA polimerasas existentes en el núcleo de células eucariotas[40,65,112].Numerosos estudios sobre dichas enzimas revelaron que el inhibidor actúa selectivamente sobre una de las polimerasas nucleoplásmicas: la RNA polimerasa II, que es inhibida por bajas concentraciones de α-Amanitina.

Las diferentes RNA polimerasas de los núcleos de las células animales (de anfibios, de ratón, de humanos, etc.) se diferencian entre sí por la diferente sensibilidad frente a la α-Amanitina, hecho que si bien no es siempre extensible a las enzimas correspondientes a otros eucariotes, ha determinado una clasificación:

a.- la clase A es insensible

b.- la clase B es extremadamente sensible

c.- la clase C es moderadamente sensible

Estas clases se corresponden con los números I, II y III que se usarán en este trabajo siguiendo la nomenclatura propuesta por Roeder, R.G.[99] (ver la Tabla 5).

Se observa que la clase III se puede inhibir en condiciones en que la clase I es completamente resistente, y cada una de ellas se ubica en un dado compartimiento subnuclear. Las tres RNA polimerasas, distinguibles cromatográficamente, y a su vez formadas por otros polipéptidos separables por electroforesis o cromatografía, difieren en sus requerimientos de cationes

Figura 1.

Estructura Química de la alfa-Amanitina

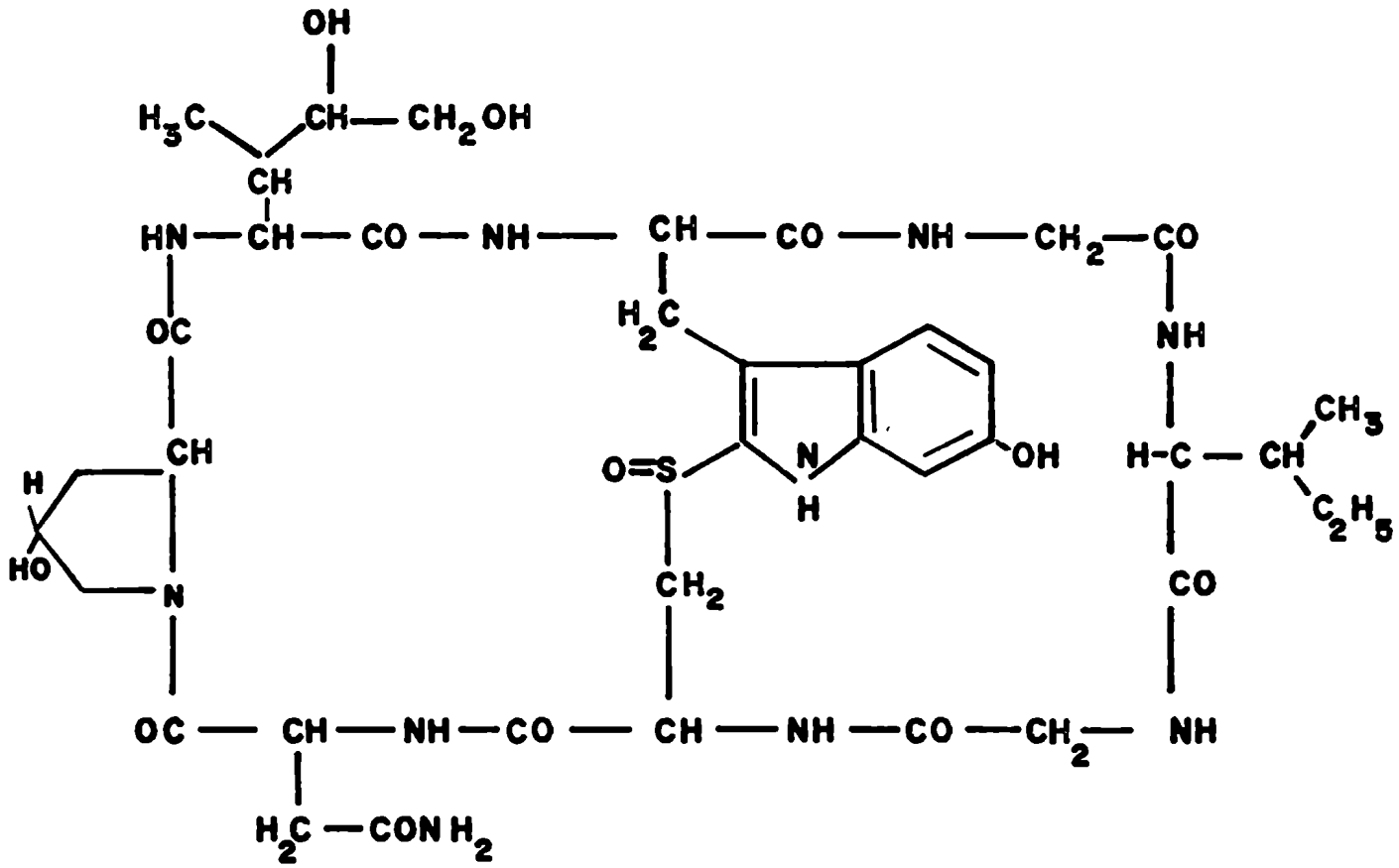


Tabla 5. Propiedades de las RNA polimerasas nucleares

CLASES DE ENZIMAS	I	II	III
Ubicación	nucleolo	nucleoplasma	nucleoplasma
Mezcla de reacción:			
Concentración óptima de $SO_4(NH_4)_2$[a]	≈0,05	≈0,1	≈0,05-0,2
Relación Mn^{++}/Mg^{+}	1-2	5-10	2
Relación poli (dA/dT)/DNA	1-1,5	0,5-1	5-15
Sensibilidad a α-Ama	insensible hasta 1 mg/ml	sensible 0,01-0,05[b]	sensible 10-25[b]
Genes celulares transcriptos	18S, 28S, RNA	RNAs y mRNA	tRNA y 5S-RNA

a: En Molaridad.

b: ug/ml que dan 50% de inhibición en células animales.

divalentes, fuerza iónica óptima y actividades relativas con diferentes templados.

Aún cuando estas propiedades catalíticas no se consideran invariables, pues se pueden alterar según el templado que se usa, el perfil de activación de la RNA polimerasa II, distingue a esta enzima de las clases I y III.

Con respecto al mecanismo de inhibición, las clases II y III se inhiben por bloqueo de la elongación de la cadena y una de las importantes subunidades de la clase II se une con la droga.

Las enzimas de las clases I, II y III tienen distinta funciones acorde con las distintas propiedades observadas y las distintas subunidades caracterizadas.

Las funciones de las polimerasas según figuran en la Tabla 5 son: la clase I transcribe los genes de RNA ribosomales, la clase II sintetiza el RNA nuclear heterogéneo y RNA mensajero y la clase III transcribe los genes que codifican los RNA ribosomales de bajo peso molecular 5S y los precursores de 4,5S.

2.3.4. La α-Amanitina y la transcripción de los genes virales

La actividad de RNA polimerasa II endógena en los núcleos aislados resultó inhibida en concentraciones de amanitina similares a aquellas usadas para inhibir la enzima purificada de la clase II. De manera que las funciones que cumplen las polimerasas de la célula huésped en la transcripción de los genes virales se ha establecido a partir de la sensibilidad de la síntesis específica de RNA viral, en núcleos aislados, frente a distintas dosis de la droga[111].

Así se ha comprometido a la RNA polimerasa II en la síntesis de importantes poblaciones de RNA viral mensajero o los correspondientes precursores, en células aviarias transformadas por virus tumorales a RNA, en células de roedores transformadas por adenovirus y en células de mono infectadas con SV_{40}, y en células humanas infectadas con SV_{40} y con adenovirus[12].

En cambio la RNA polimerasa III sintetiza especies de RNA de bajo PM solamente en infecciones de células humanas con adenovirus 2.

2.3.5. La α-Amanitina y el virus Influenza

En 1970 Rott, R. y Scholtissek, C., hicieron la primer publicación sobre la inhibición de la replicación del virus de Influenza por α-Amanitina[101], demostrándose más tarde que la toxina era efectiva sólo cuando estaba presente en las primeras horas p.i.[71]. Sin embargo esta droga no inhibe el proceso de transcripción in-vitro, realizada por la RNA polimerasa dependiente de RNA descartándose entonces que esta enzima sea el blanco de la acción inhibitoria observada.

Si bien distintos datos han sugerido que la expresión del DNA celular es un prerequisito para la transcripción de algunos virus a RNA, incluyendo el de Influenza, resultó incierto durante un tiempo saber si la toxina actuaba sobre el mecanismo transcripcional en el que está comprometida la polimerasa II o sobre algún otro mecanismo. Con el uso de células mutantes de ovario de hamster chino (CHO), cuya RNA polimerasa II es resistente a la α-Amanitina[66] se pudo demostrar que la replicación del virus Influenza no se afecta en dichas células[110]. En las mismas se demostró luego la síntesis de los polipép

tidos virales [58], de manera que la inhibición primitivamente observada se debe realmente a la acción de la droga sobre la enzima de la célula huésped.

La α-Amanitina permitió diferenciar dos fases nucleares distintas en la síntesis de RNA durante el proceso de replicación viral, la primera dependiente del DNA inhibida por la droga, tiene un máximo de 90 minutos p.i. y la segunda, insensible a la presencia de α-Amanitina, correspondería a la acción de la transcriptasa viral.

2.4. Relación de los Arenavirus con la célula huésped

Distintos estudios sobre morfogénesis de los Arenavirus muestran cambios morfológicos observables en los tejidos infectados, por el uso del microscopio electrónico, pero existe muy poco publicado sobre los cambios bioquímicos que inducen dichos virus en la célula huésped.

Así se conoce que las células infectadas con distintos arenavirus presentan cambios en su índice de refracción, condensaciones y una lisis que termina con necrosis [81]. En el citoplasma aparecen los denominados cuerpos de inclusión, tanto en los tejidos cultivados en monocapa como en las infecciones realizadas in-vivo. Dichas inclusiones representan masas de ribosomas dentro de una matriz electrónicamente densa, observándose además con los virus LCM y Tamiami filamentos mezclados con los agregados de ribosomas, cuya naturaleza es desconocida.

Los estudios realizados con distintos inhibidores de las funciones metabólicas claves, si bien han aportado datos sobre la transcripción primaria in-vivo, aún no se han podido integrar en forma coherente.

Así está determinado que la irradiación de las células con luz ultravioleta, previamente a la infección y en dosis que suprimen la síntesis de DNA y RNA, inhibe la síntesis viral del virus de LCM[113] y Junín[30]. Si bien se requiere la integridad del núcleo celular para la replicación de la familia Arenaviridae, por ejemplo en células enucleadas no hay síntesis de antígeno demostrable por inmunofluorescencia[95], no se necesita en cambio, la duplicación del DNA celular pues los inhibidores de la síntesis de DNA como arabinósido de citosina, iododeoxiuridina y bromodeoxiuridina no afectan la síntesis viral[30,74].

Este hecho, sumado a la ausencia de la DNA polimerasa, dependiente de RNA en LCM, sugiere que no existe una transferencia obligatoria de información genética viral al DNA celular como ocurre con los virus tumorales[91].

2.4.1. Relación del virus Junín con la célula huésped

Distintos estudios realizados en nuestro país por el Dr. Parodi, A. y colaboradores[103,27] (1965) trabajando con una cepa atenuada, XJ-Cl_3, y cerebro de ratón lactante, demostraron que los núcleos aparecen hinchados, con zonas de nucleolema roto. Si bien no se pudo decir en ese momento, ni tampoco ahora, donde tiene lugar el proceso de multiplicación viral, se concluyó que la etapa de maduración es citoplásmica. Como dato interesante la menor cantidad de viriones infectantes se ubicó justamente en el núcleo de la célula una vez realizado el correspondiente fraccionamiento, aunque también dichos viriones podrían provenir de contaminaciones citoplásmicas[27].

Aún cuando muchos virus, además de la acción citopatogénica, determinan profundos cambios en la célula, particularmente con respecto a la síntesis

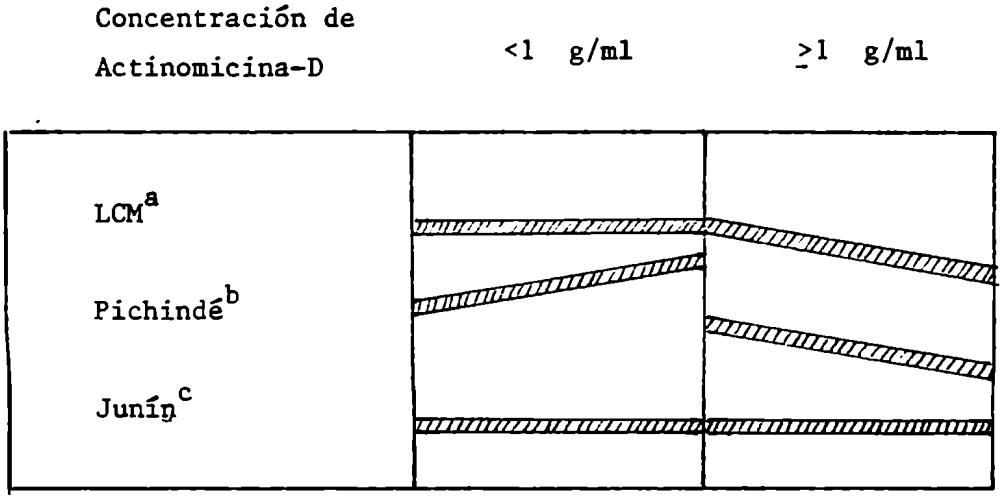
de sus macromoléculas, existe un solo trabajo publicado hasta ahora, referente a dicha síntesis. Coto, C. y col.[28], demostraron en 1970, usando la técnica de centros infecciosos que sólo el 3% de las células Vero son productoras de virus, proporción que coincide con la cantidad de células que fluorescen en presencia de naranja de acridina, pasadas las 12 hs p.i. En dichas células no está aumentada la velocidad de división, ni tampoco existe una incorporación importante de aminoácidos marcados. Sin embargo timidina y uridina marcadas presentan un máximo de incorporación al comienzo de la infección, que entre las 8 y 12 hs vuelve a los valores normales. Si bien dicho aumento en la síntesis de RNA no se observa en presencia de Actinomicina D o si la célula está irradiada con luz UV[31], ninguna de las dos síntesis de ácidos nucleicos ha sido hasta hoy fehacientemente caracterizada.

2.4.2. Actinomicina-D

El fenómeno de inhibición por la Actinomicina-D sobre los Arenavirus ha dado resultados dispares, según el virus sobre el cual se probó y la concentración de droga usada. Así, las bajas concentraciones, que suprimen la síntesis de RNA ribosomal en la célula animal, no inhiben, sino que por el contrario pueden aumentar la multiplicación de los arenavirus. En cambio cuando se usan concentraciones mayores de 1 ug/ml, mientras el virus Junín no es afectado, los virus LCM y Pichindé son inhibidos. Estos datos se resumen en el Gráfico 1 donde se muestran los niveles de producción viral a las 24 o 48 hs p.i. según los autores.

GRAFICO 1

Niveles de producción de los Arenavirus en presencia de dosis variables de Actinomicina-D



Ver referencias: a-18; b-96 y c-25

El efecto no se ejerce, sin embargo, sobre el virus directamente, ya que se sabe que la droga no afecta a la polimerasa viral[63] y las células BHK_{21} infectadas en presencia de la droga, muestran una inmunofluorescencia citoplasmática característica en presencia del correspondiente inmunosuero.

Se ha propuesto que cuando la Actinomicina-D está presente hay una expresión parcial del genoma del virus Pichindé, en forma de síntesis de antígeno fijador de complemento, en el citoplasma, el que se produce hasta en un 70% respecto de los ensayos control[96].

Los estudios realizados con el virus Junín, cepa $XJ.Cl_3$, demuestran que aún cuando la síntesis de RNA celular esté inhibida en un 90% y la droga esté presente durante 24 hs, tanto el virus liberado espontáneamente como el asociado a las células no es afectado. Se observa, sin embargo que la Actinomicina-D disminuye el fenómeno de autointerferencia para los stocks de virus Junín obtenidos de células Vero. El mecanismo de acción podría ser la inhibición de la síntesis de un factor celular que normalmente interfiere con la multiplicación del virus estándar[25], hecho coincidente con la existencia de un mecanismo antiviral en las células Vero, encontrado recientemente para infecciones por Sarampión[121], mediado por la misma droga.

La observación del incremento del antígeno de superficie en infecciones persistentes del virus Junín, cepa $XJ.Cl_3$ in-vitro[48,29], en presencia tanto de Actinomicina-D como de cicloheximida podría quizá ser explicado por un mecanismo semejante. Se supone que tanto el ciclo de multiplicación del virus estándar como el de las partículas defectivas se completaría indistintamente.

En conclusión, tanto los estudios de Rawls, W. y col. sobre la síntesis de antígeno del virus Pichindé, estudiados por pruebas de fijación de complemento e inmunodifusión, como los de Coto, C. y col. sobre la síntesis de antígeno de virus Junín, o el fenómeno de interferencia, proponen la existencia de una proteína celular que regula la producción viral. Dicha proteína sería requerida funcionalmente en el proceso de maduración.

2.4.3. Acción de la Cordicepina y α-Amanitina

No existen datos publicados sobre la acción de la cordicepina sobre los arenavirus, razón por la cual sería de interés usar dicha droga para aclarar la relación que establece el virus Junín con su célula huésped.

Tampoco existían datos conocidos sobre la acción de la α-amanitina sobre este grupo de virus, hasta que Leung, W.C., demostró en 1978[64], en un trabajo realizado paralelamente al nuestro[77] que la α-amanitina inhibe la multiplicación del virus Pichindé. En células sensibles a la droga, se reduce la síntesis de tres polipéptidos virales, hecho que contrasta con la presencia de los mismos polipéptidos y de la correspondiente multiplicación viral en células mutantes, cuya RNA polimerasa II es resistente a la acción de la α-amanitina.

Nosotros hemos estudiado la acción de la droga sobre dos integrantes del complejo Tacaribe: el virus Junín y Tacaribe, intentando ver si el comportamiento se correspondía también con el de Influenza.

2.5. Expresión del genoma de los Arenavirus

La forma de transcripción y traducción de los Arenavirus es prácticamente desconocida. Los estudios sobre la síntesis de RNA fueron hechos en 1969 por

Buck y Pfau[91], trabajando con virus LCM y células L, y en 1970 por Coto, C. y col.[28] trabajando con virus Junín y células Vero. Ya entonces se hizo notar que era poco probable poder detectar el RNA viral, con el fondo de RNA celular, que no siempre se puede disminuír sin afectar al virus (ver el punto 2.4.2.) Buck y Pfau encontraron que realizando la infección en condiciones tales que un máximo rendimiento extracelular aparece a las 16 hs p.i., la síntesis de RNA específica de LCM finaliza a las 8 hs p.i. En las células L se necesitarían así alrededor de 8 horas para la síntesis del genoma, el empaquetamiento y la liberación, mientras que este último paso requiere entre 3 y 4 horas, si el virus multiplica en BHK. En este último sistema, LCM-BHK, se probó que realmente la síntesis de RNA específica viral es muy baja: representa solo el 1% del RNA celular total.

Coto y col. encontraron que entre las 6 y 8 hs p.i. es notorio un incremento de RNA citoplásmico en todo el tejido, con focos celulares que presentan la tinción típica de RNA con naranja de acridina, tanto en el citoplasma como en el núcleo. A las 3 hs p.i. dicho RNA sería de naturaleza viral. Un estudio reciente realizado por León, M.[60] propone un tiempo de 6 horas para la liberación del virus Junín en células Vero.

Según las evidencias existentes hasta ahora, la forma de expresión del genoma de los Arenavirus puede asimilarse a la clase número V de la clasificación de Baltimore[7]. En efecto,por una parte las preparaciones de nucleocápsides de LCM no pueden infectar células BHK y L, por otra parte el ácido nucleico extraído de los viriones de LCM es incapaz de infectar en las condiciones en que lo hacen los virus de la clase IV, como el de Polio. Claro que en la realización de este ensayo hay que considerar que no es probable

que todas las piezas de RNA se conserven intactas a lo largo del proceso. Sería necesaria entonces la acción de una RNA polimerasa dependiente de RNA para la síntesis de los mRNA virales, infructuosamente buscada para el virus de LCM[120] y solo encontrada en el virión de Pichindé por Rawls, W. y col.[22].

Los virus usan los ribosomas celulares y los factores solubles en la traducción de su ácido nucleico mensajero, pero en el caso de los Arenavirus, su ácido nucleico no posee las características estructurales y funcionales de un RNA mensajero. Si bien existen mRNA de histonas que carecen de poli A, en general los virus presentan una cola de poli A variable en 3' y no todos poseen la estructura "cap" característica en 5' (por ejemplo virus Polio).

El RNA del virión de Pichindé no posee ninguna de las dos características mencionadas[61]. Mas aún, agregado a un sistema sintetizante de proteínas in-vitro, no se observa incorporación alguna al material ácido insoluble. Ambos criterios, uno estructural y el otro funcional, apoyan la hipótesis que el ácido nucleico de los Arenavirus es de cadena negativa. Las características estructurales y funcionales de estos RNA figuran en las Tablas 3 y 6 respectivamente.

Distintos estudios sobre el virus de LCM han caracterizado los ribosomas y dos complejos de ribonucleoproteínas, los que contienen principalmente RNA genómico[88]. Su estructura sería diferente a la de los Mixo y Paramixovirus, aunque tienen un contenido en proteínas similar a la de los Mixovirus. Esta particularidad de la ribonucleoproteína de los Arenavirus, es confirmada en los estudios de microscopía electrónica que revelan una peculiar forma circular y lineal en presencia de detergente[85,115].

Tabla 6. Características funcionales de los RNA de los Arenavirus

.- Carecen de infectividad, medida in-vitro.
.- Carecen de capacidad para incorporar aminoácidos marcados al material ácido insoluble, in-vitro.
.- Son complementarios al RNA polisómico de células infectadas.

Con respecto a los ribosomas que se encuentran en los viriones de los Arenavirus, tanto los componentes RNA de 28 S y 18 S, como la densidad y velocidad de sedimentación , han determinado su origen celular. Como dato interesante, se ha encontrado muy poco RNA 18 S, de origen ribosomal, en virus Tamiami o Pichindé especialmente adaptados[115,119].

El único ensayo bioquímico publicado, se realizó con ribosomas provenientes de células embrionarias de pulmón de hamster, denominadas ts-14. Si bien el virión incorpora dichas organelas durante el proceso de replicación, puede multiplicar en forma eficiente en las células de tipo salvaje, tanto a la temperatura permisiva de 33°C, como a la no permisiva de 39°C. De aquí se sugiere que los ribosomas no son requeridos por los Arenavirus para su multiplicación, y sólo son adquiridos por el virus en el proceso de brotación como un contaminante celular[62]. Sin embargo se ha encontrado recientemente en el virus Pichindé[63] dos polimerasas de origen polisómico, que son activas en las células ts-14, y podrían ser, una vez incorporadas al virus, los componentes ribosomales requeridos para la replicación.

Tampoco se ha podido demostrar que los ribosomas presentes en las preparaciones de LCM actúan en la síntesis de proteínas in-vitro, aún cuando los pertenecientes a la célula donde el virus multiplica, son totalmente activos [120]. Se han aportado nuevos datos a la estrategia del genoma en estudios realizados con infecciones de LCM y Pichindé en células BHK_{21}. En el primer caso se han logrado aislar no sólo complejos de transcriptasa, de aproximadamente 200 S, sino también los polipéptidos estructurales y no estructurales presentes en el citoplasma de células durante una infección aguda. En el ca

so de Pichindé se han caracterizado los antígenos inducidos por el virus en la célula, uno de los cuales se corresponde con un componente interno del virión.

Con respecto al proceso de traducción, las evidencias encontradas por Saleh y col. en 1979, trabajando en células BHK_{21}, sugieren que los polipéptidos de PM 79.000 podrían sintetizarse a partir de mRNA pequeños como ocurre en Rhabdovirus o Paramixovirus, mientras que las glicoproteínas virales se producen por ruptura proteolítica de un precursor encontrado en las células infectadas[104,17].

3. ENZIMAS VIRALES

Las primeras demostraciones acerca de la existencia de RNA polimerasas en los virus Pox (1967), marcaron un hito en la historia de la Virología, al probar que la partícula viral no era como una cápsula de información genética, totalmente dependiente de la célula huésped, sino que contenía un sistema para llevar a cabo la síntesis de RNA mensajero.

De allí en más se han encontrado distintas evidencias que indican la diversidad en los "estilos de vida" o estrategias genéticas virales. La mayoría de las enzimas descritas para los viriones se refieren a las que participan en el proceso de transcripción: polimerasas o sintetasas según la clasificación de las enzimas. Aunque últimamente se están descubriendo actividades de transferasas e hidrolasas, algunas de las cuales no serían de

origen celular, que probablemente cumplan una función importante en los procesos transcripcionales, en la traducción a proteínas virales y en sus respectivas regulaciones.

Así mientras los Poxvirus poseerían solo 7 actividades distintas, en los viriones de los Oncornavirus se han descrito 21 actividades enzimáticas diferentes, donde predominan las hidrolasas y transferasas. No se sabe si todas las actividades medidas actúan realmente durante el proceso de replicación o son proteínas de la célula incorporadas al virión en el momento de la brotación, pero es de destacar que varias de las enzimas asociadas a Vaccinia, VSV y NDV, que son operativas en la modificación de sus ácidos nucleicos, tienen, por lo menos para los dos últimos virus un comprobado origen celular.

3.1. Las enzimas de la clase V

Los virus cuyos genomas son RNA de cadena simple, opuestos en polaridad a sus mRNA, pertenecen a la clase V de la clasificación de Baltimore[7]. Tienen tres clases de enzimas que participan justamente en la producción de RNA mensajero (Tabla 7).

a.- transcriptasas, que obedecen las instrucciones de secuencia de bases en el templado del genoma viral, para producir la mayoría del mRNA.

b.- poliadenilato transferasas, que agregan pedazos cortos de residuos de adenilato a extremos 3' de RNA recién sintetizado. El mecanismo de acción correspondería a una forma que se utiliza en células de mamíferos: la síntesis de secuencias ricas en poli-A sin el uso del templado. Este proceso

Tabla 7. Enzimas presentes en virus de la clase V

Rhabdovirus	Orthomixovirus	Paramixovirus	Arenavirus
- Transcriptasa	- Transcriptasa	- Transcriptasa	- Transcriptasa
- Nucleósido trifosfatasa	- Nucleósido trifosfatasa	- Nucleósido trifosfatasa	- poli-U polimerasa
- Nucleósido fosfotransferasa	- Neuraminidasa	- Actividad metilante	- poli-A polimerasa
- Proteína quinasa	- Fosfotransferasa	- poli-A transferasa	
- Actividad metilante	- Ribonucleasa		
- poli-A transferasa			

descrito primero para Adenovirus se encontró en células de mamífero infectadas con VSV[41], el que a su vez no contiene secuencias de poli-A tan largas como para actuar de templado. Luego se encontró en el mismo virión de VSV[90, 9] así como en el de NDV[119]. El agregado de estas secuencias al RNA se considera post-transcripcional y sería realizado por la misma enzima transcriptasa transformada o bien por una enzima distinta según las características del virus que se estudie. La acción de la secuencia de poli-A es favorecer la unión que se establece entre el RNA mensajero y la subunidad ribosomal.

c.- RNA nucleotidil-transferasa que modifica el extremo 5', generalmente por metilación de uno o más nucleótidos o bien por adición de uno nuevo como el ácido 7-metil guanílico. Está descrita para VSV y NDV[23]. En este último caso la metilación se requiere para la traducción del mRNA viral en el sistema sintetizante de proteínas in-vitro y el dador de metilos es la S-adenosil metionina. Se ha sugerido que esta actividad enzimática se podría relacionar con una forma de regulación de la replicación de los Paramixovirus.

d.- Otras enzimas endógenas descritas son:

d_1.- una ribonucleasa en Orthomixovirus, cuya función sería pasar formas policistrónicas de RNA a formas monocistrónicas[100]. Recientemente se ha sugerido[4] que su acción influenciaría el metabolismo de la célula huésped con el objeto de favorecer la replicación viral.

d_2.- fosfotransferasas[102], que transfieren el grupo fosfato del ATP y dATP a una proteína, razón por la cual se las conoce como proteína-quinasas. Se han detectado en los viriones purificados de muchos virus con envoltura, entre ellos VSV[79,53,100], Influenza y Parainfluenza.

En el caso del virus VSV se ha propuesto que la fosforilación de proteínas virales está implicada en la penetración por fusión de la envoltura viral con la membrana citoplásmica o bien participa de la activación de la transcripción del genoma viral mediada por la RNA polimerasa. También se ha caracterizado dicha actividad como de origen celular.

d_3.- nucleótido fosfohidrolasas: que hidrolizan los nucleósidos trifosfatos (NTP) y probablemente regulan la actividad de la RNA polimerasa viral.

3.2. RNA polimerasas

Las ventajas de poseer una polimerasa en el virión, desde el punto de vista evolutivo, dependen de la necesidad y el papel que cumplan los productos transcriptos en el proceso infeccioso. Dentro de los virus que poseen una RNA polimerasa dependiente de RNA se encuentran los viriones cuyo genoma es RNA de cadena simple y con envoltura lipídica (Rhabdovirus, Ortomixovirus, Paramixovirus, Bunyavirus, Coronavirus y Arenavirus) y los que poseen RNA de doble cadena y carecen de dicha envoltura (Reovirus). Dichos virus tienen la ventaja, por una parte de poder producir copias múltiples de un solo genoma parental y por otra parte de tener sus complejos replicativos bien protegidos de la acción de la nucleasa. Así, mientras los Reovirus tienen los genomas segmentados encerrados en una coraza subviral, los Rhabdovirus, Orthomixovirus y Paramixovirus presentan un complejo formado por la nucleoproteína y RNA parental.

Claro que la presencia de un RNA polimerasa asociada con una preparación viral no es índice que todo el RNA viral o parte de él sea complementario o

idéntico a sus especies de RNA mensajero. Podría ocurrir que todo el RNA viral fuera mensajero y que la enzima tuviera solo una función replicativa. Para una RNA en trozos se podría pensar que algunas especies de RNA viral fueran complementarias a su RNA mensajero, pero que otras sean su propio mensajero. También la transcripción podría ser selectiva para las especies de RNA complementarias al mensajero. Ninguno de los experimentos in-vitro realizados con el virus Influenza, por ejemplo, excluye estas posibilidades[10].

Sólo si se identifican las cadenas y composición de las distintas especies virales mensajeras intracelulares, se puede afirmar alguna de las hipótesis anteriores, que sugieren múltiples formas de desarrollo selectivo de los procesos virales en una célula infectada.

En el caso de Influenza la actividad polimerásica detectada en los viriones[32,89,108], se clasifica dentro de las transcriptasas pues el análisis de los productos de reacción indican que al menos el 95% del mismo es complementario en su posición al RNA viral.

La actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA se puede determinar por ensayos in-vitro o bien en células infectadas en las que la síntesis proteica se ha inhibido con cicloheximida o puromicina. Esta última determinación no excluye la posibilidad que existan factores celulares que contribuyan a la actividad que se observa. Este requerimiento podría determinar el tropismo del virus por un cierto tipo de célula. Por ejemplo, en el caso de Influenza el producto sintetizado in-vitro es menor que el RNA viral y permanece asociado al templado, hecho que indica que el proceso medido carece de algún factor del huésped que es requerido para liberar el mRNA o bien

para que la transcripción sea eficiente.

Si la enzima es específica para su templado y no acepta como tal el RNA de un virus distantemente relacionado, que es el caso de VSV-Indiana respecto de VSV-New Jersey, se tiene la prueba clave que la enzima encontrada es la transcriptasa que se requiere para producir una infección viral productiva. No se sabe sin embargo si esta especificidad es debida a una secuencia de RNA o se relaciona con el proceso de reconocimiento de uno o varios polipéptidos transcripcionales para con el templado.

3.3. RNA polimerasa de Influenza en la célula huésped

Ho, P. y Walters, C[50], demostraron por primera vez la existencia de una RNA polimerasa en la fracción microsomal de las células infectadas con el virus Influenza, la que no existía en las células mantenidas como control. Esta actividad, medida in-vitro, resulta sensible a la RNAsa e inhibida por deoxicolato agregados a la mezcla de reacción, pero no es sensible a la DNAsa o a la Actinomicina-D. Su aparición sin embargo, resulta inhibida por la presencia de Actinomicina-D en la célula huésped.

Muchos laboratorios confirmaron estos resultados[105,70,108], usando la mayoría de las veces Fowl Plague Virus que multiplica en CEF y membrana coroalantoidea. La mayor parte de la actividad enzimática se pudo medir en la fracción microsomal y algo menos en la fracción nuclear aislándose un producto de reacción que consiste, al menos parcialmente, en cadenas dobles asociadas con especies de cadenas simples, algunas similares en tamaño a los RNA

virales. Por esta razón los resultados sobre el tipo de RNA sintetizado in-vitro resultaron a veces contradictorios. Actualmente se acepta que el mencionado producto es entre un 50 y un 70 por ciento complementario al RNA del virión. El resto podría bien ser RNA de tipo viral o RNA complementario que no hibridice en las condiciones ensayadas[24].

La actividad de RNA polimerasa no se ha podido purificar, ya que permanece asociada con el templado. En los distintos tipos de célula en que se ha ensayado la purificación, siempre se ubicó en la zona 50-70 S de un gradiente de sacarosa, tanto en presencia como en ausencia de detergente, indicando así que las estructuras con actividad enzimática no están asociadas a membranas[24]. Este hecho se refleja in-vitro por la capacidad que tiene la enzima de sintetizar RNA complementario viral, sin el agregado de detergente a la mezcla de reacción.

La naturaleza de las estructuras aisladas corresponde a una ribonucleoproteína, con una morfología semejante a los componentes de RNP aislados de los viriones. Peculiarmente en ellas se encuentra el polipéptido NP solamente y en contraste con las características de la RNA polimerasa implicada en la replicación de bacteriofagos pequeños a RNA, cuyos componentes esenciales son polipéptidos celulares, aquí no está presente ningún polipéptido de la célula huésped[24].

La relación exacta entre la actividad de polimerasa aislada en las células infectadas respecto de la polimerasa viral o de las enzimas que funcionan en la síntesis del RNA viral, no está aún determinada. En una publicación reciente Horisberger, M. y Brambilla, R.[51] proponen que la polimera

sa asociada a la célula en un complejo de ribonucleoproteína es idéntica a la que el virus encapsida comúnmente llamada "polimerasa asociada al virión".

En otros sistemas ensayados, el RNA sintetizado después de las 4 horas de infección, es predominantemente del mismo tipo que el que se encuentra en el virión y no su complemento. De modo que estas estructuras con actividad de polimerasa podrían resultar inactivas in-vitro o bien tener su actividad alterada después del tratamiento a que se sometieron al aislarse.

Bishop, D. ha propuesto que el tiempo en que se observa el máximo de actividad citoplásmica (5 a 6 hs p.i.) es indicativo que se están detectando los genomas virales, ya asociados con su correspondiente transcriptasa y esperando el proceso de empaquetamiento para convertirse en viriones de la progenie. Es posible entonces que exista otra estructura aún no identificada, completamente diferente a la descrita que sea la realmente activa en la síntesis del RNA viral in-vivo.

3.4. RNA polimerasa en el virus Pichindé

Distintas preparaciones de virus de LCM purificado se ensayaron en las condiciones de incubación óptimas para determinar la actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA, con resultados repetidamente negativos[120]. Por lo tanto los únicos resultados sobre dicha actividad enzimática conocidos hasta ahora, son los publicados por Carter, M.; Biswal, N. y Rawls, W.[22] en 1974.

Los requerimientos de la reacción son esencialmente los mismos usados para el Orthomixovirus Influenza A, cepa WSN: Mg^{++} y Mn^{++} como iones divalentes y un detergente no iónico que determinan una mayor síntesis de RNA

a la temperatura de 32°C respecto de 37°C. La enzima sin embargo, carece de requerimientos por un agente reductor.

Como está descrito en la Tabla 3 el virus Pichindé tiene las especies virales características 31 S y 22 S, así como los RNA ribosomales 28 S y 18 S; también se encontró un 4 S de origen desconocido[21]. El producto que se obtiene de la reacción enzimática es de dos tipos: un 22 a 26 S, resistente a la RNAsa y complementario al RNA viral y un 4 a 6 S sensible a la ribonucleasa, y por lo tanto de cadena simple. La enzima transcribe sólo un 23% del genoma viral.

Aún en preparaciones de virus Pichindé recién purificado, la RNA polimerasa dependiente de RNA no tiene el requerimiento estricto de la presencia de los cuatro ribonucleósidos trifosfatos, ya que sin GTP sintetiza un 90% del producto respecto de la mezcla completa.

El nivel de dicho requerimiento se ubica entre el que posee la enzima equivalente en el virión de VSV y el de la polimerasa polisómica poli-U. Por esta razón se sugirió la presencia de múltiples componentes en el sistema sintetizante de RNA asociado con el virus Pichindé[63], algunos de los cuales serían más lábiles que otros. Esta hipótesis fue comprobada al analizar las diferentes estabilidades de las distintas actividades enzimáticas encontradas en el virión de Pichindé frente a las bajas temperaturas.

Cuando los distintos componentes de la ribonucleoproteína del virus Pichindé tratado con detergente, se separan en un gradiente de sacarosa, aparecen dos picos: uno de sedimentación rápida que cosedimenta con la nucleo

cápside y tiene actividad de RNA polimerasa y otro pico de sedimentación lenta que cosedimenta con los ribosomas 80 S y tiene propiedades similares a una poli-U polimerasa y a una poli-A polimerasa (sintetizan un RNA homopolímero, dependiendo de Mg^{++} la primera y de Mn^{++} la segunda). Se cree que la actividad de estas dos polimerasa puede enmascarar la actividad de la transcriptasa y contribuír a las dificultades existentes para ensayar la RNA polimerasa en el virión entero. Por ejemplo, la poli-U polimerasa podría modificar el RNA que sintetiza la transcriptasa agregando nucleótidos adicionales o bien secuencias cortas de un "primer" RNA. Podrían también existir otras enzimas ribosomales como fosfodiesterasa que contribuya a las dificultades mencionadas.

El RNA del virus Pichindé aislado de fracciones polisómicas de células infectadas, contiene secuencias de poli-A[61], de manera que una RNA polimerasa asociada con los ribosomas podría funcionar in-vivo para dirigir la síntesis de las secuencias terminales en 3', para los RNA complementarios al RNA viral. El hecho que la función sintetizante de los ribosomas no se requiera para la iniciación de la replicación[62] como explicamos en la sección 2.5., no excluye la posibilidad que las polimerasas poli-A y poli-U, totalmente activas en las células mutantes t_s, sean uno de los componentes del huésped que participan en la replicación viral.

MATERIALES Y METODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. Células Vero

Se utilizaron distintas líneas de células Vero (riñón de mono verde africano Cercopithecus aethiops) crecidas en monocapas. A cada una de ellas se le dió una denominación de acuerdo a su procedencia como se indica a continuación.

Vero M: esta línea fue suministrada por la Cátedra de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina. Se mantuvo en medio H.L.S. compuesto por una solución salina de Hank's adicionada de un 10% de hidrolizado de lactoalbúmina al 5%, 8% de suero de ternero inactivado y 50 µg/ml de gentamicina. Se utilizó aproximadamente durante 50 pasajes.

Vero Z: esta línea fue provista por el Dr. O. Larghi del Centro Panamericano de Zoonosis y se mantuvo por repiques cada 3 ó 4 días con MEM (Medio Esencial Mínimo con sales de Earle) suplementado con 10% de suero bovino inactivado y 50 µg/ml de gentamicina. Se utilizó entre los pasajes 190-230.

Vero U: esta línea fue provista por la Dra. Weissenbacher quien la recibiera del Dr. Monath (U.S.A.). Se la mantuvo en iguales condiciones que a las células Vero Z. Se utilizaron entre los pasajes 30 y 50.

Vero C: esta línea proviene del Instituto de Investigaciones Bioquímicas Campomar (Bs. As.), se mantuvo en iguales condiciones que las Vero Z. se utilizó entre los pasajes 1 y 20.

En todos los casos el medio de mantenimiento fue Eagle, adicionado de 3% de suero de ternero inactivado y 50 µg/ml de gentamicina.

1.2. Células RK_{13}

La línea contínua RK_{13} de riñón de conejo se mantuvo en medio 199 o MEM suplementado con 8% se suero de ternero inactivado y 50 µg/ml de gentamicina. Se utilizó entre los pasajes 138 y 178.

1.3. Células BHK-21, clon 13

Esta línea fue provista por la Dra. A. M. Brunengo (Cátedra de Inmunoquímica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.). Se mantuvo por repiques cada 3 ó 4 días con MEM suplementado con 10% de suero bovino inactivado y 50 µg/ml de gentamicina. Se utilizó entre los pasajes 26 y 46.

2. VIRUS

2.1. Junín

Se utilizó la cepa atenuada de virus Junín denominada $XJ.Cl_3$[46] mantenida en el laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por pasajes en cerebro de ratón lactante albino suizo provenientes de nuestro bioterio. La cepa fue utilizada en el pasaje 9 posterior a su clonado. El título de los stocks fue del orden de 10^8 UFP/ml en células Vero.

2.2. Tacaribe

Se utilizó la cepa TRLV 11573 mantenida en iguales condiciones que el virus Junín. El título de los stocks fue del orden de 10^8 UFP/ml en células RK_{13}.

2.3. Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV)

Se trabajó con la cepa Indiana. Los stocks se prepararon en células Vero, donde se cosechó el virus de células y sobrenadantes a las 24 hs p.i. El título fue del orden de 10^8 UFP/ml en células RK_{13}.

3. PREPARACION DE LOS STOCKS

3.1. Cerebro de ratón lactante

Se inocularon ratones albino suizos de 24 a 48 hs de edad por vía i.c., con 10^3 DL_{50} de virus Junín. Los animales se sacrificaron al séptimo día después de la inoculación, cosechándose los cerebros. Luego se preparó un homogeneizado al 10% p/v de cerebro en una solución tamponada de fosfatos, isotónica de pH 7,4 suplementada con 10% de suero de ternero inactivado y antibióticos. La suspensión obtenida se centrifugó durante 60 min a 12.000 g, utilizándose el sobrenadante como fuente de virus. Toda este preparación se realizó a 4°C. Los stocks se fraccionaron y congelaron a -70°C, determinando su infectividad por el método de unidades formadoras de placas. Los títulos fueron del orden de 10^8 UFP/ml.

3.2. Células Vero

Se inocularon células Vero dentro de las 48 a 72 hs de sembradas, con una multiplicidad de infección de 1 UFP/célula del virus en estudio, durante 1 h a 37°C con agitación periódica. Al cabo de ese tiempo se descartó el inóculo y se cubrió con medio de mantenimiento. Las cosechas del sobrenadante comenzaron a efectuarse a las 24 o 48 hs p.i. si el experimento así lo

justificaba. Siempre después de cada cosecha se lavó dos veces la monocapa con solución fisiológica tamponada, ya que este procedimiento aumenta al título de virus Junín[73].

Con el objeto de eliminar los restos celulares se centrifugó la suspensión 15 min a 1.500 rpm. El stock se guardó a -70°C hasta su uso.

4. DETERMINACION DE LA INFECTIVIDAD

4.1. Titulación por observación de la acción citopatogénica (ACP)

Las células Vero crecidas en tubos de ensayo se inocularon a las 48 hs de su siembra con 0,2 ml de diluciones decimales crecientes de virus Junín. La adsorción fue de 1 h a 37°C con dos agitaciones y, descartando el inóculo, se agregó a cada tubo 1 ml de medio de mantenimiento, el que se renovó cada 3 ó 4 días. Los cultivos se observaron diariamente al microscopio óptico, registrándose la evolución e intensidad de la ACP. La titulación finalizó al día décimo p.i. Se usaron 4 tubos por dilución y la dosis infectante 50% para cultivo de tejidos $DICT_{50}$ se calculó de acuerdo al método de Reed y Müench[97].

La aparición de focos de células redondeadas y oscuras en la monocapa y la cantidad de células muertas en el medio de cultivo determinó el grado del efecto citopático, el cual se tabuló en forma cualitativa:

(1) correspondió a la presencia de un número regular de células en el sobrenadante, con la aparición esporádica de focos de ACP en la monocapa;

(2) los focos mencionados abarcaron la totalidad del tejido;

(3) aparecieron zonas de lisis;

(4) la lisis fue total y quedaron pocas células adheridas a las paredes del tubo de ensayo.

4.2. Titulación por el método de formación de placas bajo agar

Se utilizó el método de Damonte, E. y Coto, C. [33] con algunas variantes. Se infectaron monocapas confluentes de células Vero crecidas en botellas de capacidad variables (60 cm^3 ó 30 cm^3) dentro de las 48-72 hs de sembradas, con diluciones crecientes de material. El volúmen inoculado fue de 0,4 ml ó 0,3 ml para cada caso, el que se dejó adsorber durante 1 h a 37°C, con dos agitaciones intermedias. Una vez finalizada la adsorción se descartó el virus remanente, se lavaron las células con solución salina fosfatada y se cubrieron con un volúmen apropiado de agar nutritivo. Una vez solidificado éste a temperatura ambiente, las botellas se invirtieron y se incubaron a 37°C en oscuridad un período de 7 días para el caso en que se tituló el virus Junín y sólo de 3 días para el virus VSV.

Al cabo de ese tiempo las células se fijaron con formol al 10% durante 30 minutos. Se descartó la capa de agar lavando suavemente con agua corriente y las placas se revelaron mediante tinción con cristal violeta durante 15 min. Las monocapas se lavaron otra vez y se dejaron escurrir antes de contar. Se utilizaron de 2 a 4 botellas por dilución y los títulos se calcularon en base al número de placas, el volúmen del inóculo y la dilución considerada. El medio nutritivo usado, Earle 2x ó BAB 2x, se mezcló en volúmenes iguales con agar Oxoid (lavado 2 días con agua corriente) de manera que resulta finalmente una concentración de agar de 1% en presencia de 50 µg/ml de gentamicina.

Dichos medios que permiten conservar adecuadamente las monocapas de células Vero un período de 7 días están constituídos, el primero por una solución salina de Earle de doble concentración (2x), 6% de hidrolizado de lactoalbúmina al 5%, 6% de extracto de levadura al 1%, 10% de suero de ternero inactivado y 100 µg/ml de gentamicina, pH final 7,4. El segundo medio ha sido usado por Bablanian en 1965[5] y en él crecen exitosamente otros Arenavirus. El mismo consta de 20% de medio mínimo esencial (MEM) concentrado 10 veces, 20% de glucosa (35 g/l), 10% de nitrato férrico 0,1 g%, 1% de glutamina (29,2 g/l), 20% de piruvato de sodio 0,1 g/l y 10% de suero de ternero inactivado. Se ajustó el pH y se agregó gentamicina en la misma proporción que poseía el medio denominado Earle 2x. La mezcla con igual volumen de agar al 1% se hizo en el momento de usar.

5. DETERMINACION DE VIABILIDAD CELULAR

Se realizó por la prueba de exclusión del azul tripán en las células tripsinadas en un volúmen adecuado como para poder ser contadas.

Con una o dos gotas de azul tripán al 5% en 1 ml de suspensión celular y 30 minutos de incubación a temperatura ambiente se puede diferenciar entre las células muertas,de color azul, y las células viables que permanecen incoloras. Estas últimas se cuentan en la cámara de Neubauer en un total de 8 cuadrados por vez. Se calculó el promedio de lecturas a partir de la fórmula:

$$\frac{\text{N° de células total}}{\text{ml}} = V.N.10^4$$

donde, V: volúmen de la suspensión celular expresado en ml

N: N° de células contadas en 4 cuadrados

6. RENDIMIENTO VIRAL

Las células que se infectaron en forma semejante a 3.2. de Materiales y Métodos, se lavaron con PBS antes de cubrirse con el medio de mantenimiento. El rendimiento se hizo por lo general a las 24 hs p.i., recogiendo por una parte el sobrenadante (SN) y por otra el virus asociado a las células. Para esto último las células se congelaron y descongelaron dos veces en el mínimo volúmen de medio de mantenimiento, de acuerdo con el recipiente usado para la infección. La suspensión de células se centrifugó a baja velocidad para eliminar restos de membranas y células enteras. El SN se tituló por UFP.

7. FRACCIONAMIENTO CELULAR

Se dividió en dos etapas: en la primera se puso a punto el método de ruptura de células y en la segunda se bajaron las distintas organelas usando una centrífuga refrigerada International, rotor 269, y una ultracentrífuga Beckman, modelo L2 rotor SW50-1. Todas las operaciones se hicieron entre 0 y 4°C.

a.- Ruptura de células: se realizó suspendiendo las mismas en sacarosa S_1 = 0,3 M en buffer Tris-ClH 10^{-2} M, pH = 7, a 0°C y rompiéndolas con 10 golpes en un homogeneizador de mano, con una concentración final en Nonidet P-40 de 0,025%. Los núcleos se lavaron con S_1 y se resuspendieron en sacarosa 0,6 M en Tris ClH 10^{-2} M, pH = 7.

b.- Bajada de las distintas fracciones celulares:

.- núcleos, a 800 g - 10 min.

.- mitocondrias, a 12.000 g - 10 min.

.- microsomas, a 105.000 g, 1 hora.

Cuando se trabajó posteriormente con los microsomas esta fracción se resuspendió en el buffer S_1.

8. PURIFICACION DE LOS NUCLEOS

Como los núcleos no debían estar contaminados con material citoplásmico para poder ser usados, se buscó un método para purificarlos, partiendo de cultivos celulares de células Vero Z en monocapa. El ler paso consistió en probar la ruptura de las células por distintos métodos, con un posterior control en el microscopio de contraste de fase (Aumento 320 x). Las observaciones mostraron que:

a.- con el tratamiento de buffer TESS: sacarosa 0,25 M; EDTA 1 mM; Tris 5 mM pH = 7 en un Potter Elvejeheim, por una maceración de 5 min a 0°C, se observaron las células rotas en un 90% y los núcleos sueltos. Los restos citoplásmicos son granulados.

b.- con el congelamiento y descongelamiento con la maceración de (a), todos los campos presentaban granulación abundante y con pocos núcleos sueltos.

c.- con sacarosa 0,3 M en Tris 10^{-2} y Cl_2Mg 3 mM (pH = 8) · y la maceración de (a), las células se veían rotas y los núcleos bien.

En el segundo paso se probaron las distintas concentraciones de una columna de sacarosa que se podían usar para hacer purificación nuclear.

d.- con todas las concentraciones entre 1,73 y 2 M el pellet de núcleos quedaba con restos celulares gruesos.

e.- con la concentración 2,1. y 2,2. el pellet nuclear era abundante con muy poco material pulverizado fino.

Como en estas últimas condiciones el pellet nuclear sometido al tratamiento (c) prácticamente carecía de material contaminante, se eligió finalmente esta combinación (c) y (e) para obtener los núcleos biológicamente activos según se muestra en la Figura 2.

9. DETERMINACION DE RNA POLIMERASA DEPENDIENTE DE RNA EN CELULAS

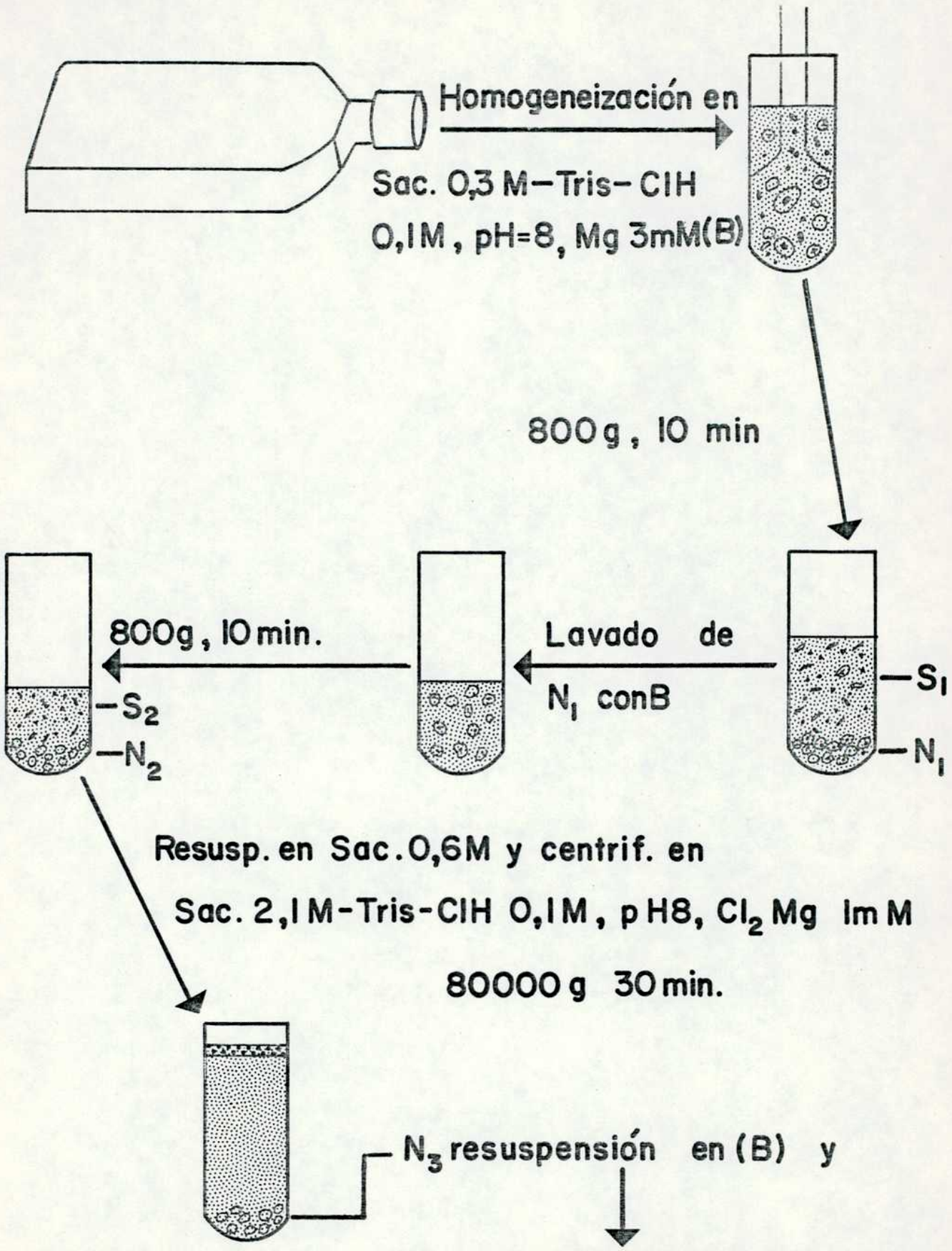
Se incubó en partes iguales la mezcla de la enzima, el nucleótido marcado NET-380 Uridina 5, H^{3-6}-5'-trifosfato de Na 29 Ci/mmol (diluído en forma adecuada). En general se usa 10 µCi/tubo y la muestra en que se quiere determinar la actividad enzimática se deja 15 min a 37°C. La mezcla de reacción tenía las siguientes concentraciones finales de los distintos reactivos: Tris-ClH 90 mM; ATP 0,3 mM; GTP y CTP 0,21 mM; UTP frío 8,4 µM; Cl_2Mg 7,4 mM; ditiotreitol 1 mM; fosfoenol piruvato 5 µmoles; P-quinasa (Sigma p 506) 50 µg y Actinomicina D, 25 µg/ml. El pH final fue de 7.

El tratamiento con detergentes se hizo con Nonidet 0,1% (final) y a pH = 8 a 0°C durante 5 minutos.

La precipitación del RNA sintetizado y las lecturas de radiactividad sobre 0,1 ml de muestra se realizó siguiendo el esquema descrito en la Sección 11.

Figura 2

Esquema de Purificación de los Núcleos de células Vero



10. DETERMINACION DE RNA POLIMERASA DEPENDIENTE DE RNA EN PARTICULAS VIRALES

La mezcla de reacción completa constó con los siguientes componentes de una concentración final de; Tris-ClH 50 mM, pH = 7,9; mercaptoetanol 6 mM; sulfato de amonio 25 mM, ATP, GTP y CTP 0,23 mM, Cl_2Mn 6 mM; Cl_2Mg 4 mM; Nonidet P-40 0,2%;RNA de levadura purificado 100 µg y sistema regenerador de ATP (Sección 13).

Se agregó 0,1 ml de mezcla de reacción 0,1 ml de virus (con 500 µg de proteína viral) y 0,1 trinucleótido marcado (GTP-H^3 de actividad específica 5,66 Ci/mM Schawz Bio Research ó UTP-H^3 de actividad específica 26,9 mC New England) diluído. Se incubó durante 30 min a 32°C, luego se detuvo la reacción pipeteando una alícuota de 0,1 ml sobre un disco de papel Whatman GF-82 previamente sumergido en TCA al 5%.

Se prosiguió la precipitación y la lectura del RNA sintetizado según la Sección 11. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

11. PRECIPITACION DEL ACIDO INSOLUBLE

Se realizó en un filtro de acero inoxidable especialmente diseñado en el que se colocaron los discos de papel Whatman GF-82, previamente sumergidos en TCA al 5%.

En cada uno de los discos se agregó sucesivamente:

a) 50 µg RNA, 20 µl de suero bovino estéril diluído 1:20; 0,5 ml de una mezcla constituída por pirofosfato de Na 0,4 M y fosfato disódico saturado, neutralizado con TCA;

b) 0,1 ml de la muestra a precipitar;

c) 0,5 ml de TCA 45%.

Luego se lavó cada disco sucesivamente con: 1,5 ml de TCA 5% mezclado con pirofosfato de sodio 0,1 M dos veces; 1 ml de TCA 1%, 2 veces; y 1 ml alcohol 96° , 3 veces.

Se colocó a secar en estufa de 37°C. Se leyó la radiactividad en un centelleador líquido Packard Tricarb con 10 ml de la mezcla constituída por PPO (4 g/l) y POPOP (0,25 g/l) en tolueno.

12. DETERMINACION DE PROTEINAS

1.- se precipitó la muestra en estudio con igual volúmen de TCA 40%. Se centrifugó a 800 g, 10 minutos y se decantó.

2.- se resuspendió el precipitado con NaOH 0,1 N, dejándolo a 37°C, durante 24 horas.

3.- se procedió en igual forma para los estándar que se prepararon con albúmina de plasma bovino cristalizado (marca Armour, solución madre de 200 µg/ml).

4.- se realizó la determinación por una modificación de la técnica de Lowry et al[67] por el reactivo de fenol usando las siguientes soluciones: CO_3Na_2, 4% en NaOH 0,1 M; tartrato de sodio 4%; SO_4Cu 2% y reactivo de Folin Cicolteau en la dilución adecuada según una previa estandarización.

5.- se leyó a DO 750 en un fotocolorímetro Bausch y Lomb.

13. SISTEMA REGENERADOR DE ATP

Se mezcló sal de hexilamina del ácido P-enol pirúvico, 5 µmoles y P-enol piruvato quinasa, 50 µg, que equivale a 25 λ de una solución de 2 mg/ml de Boehringer Mannheim.

Con el fin de probar la eficiencia del sistema regenerador, se incubaron el sustrato y la enzima a 37°C durante distintos tiempos. Se efectuó luego la separación de los nucleótidos obtenidos durante la incubación por cromatografía ascendente durante 40 hs[84]. Se reveló con luz UV la zona del cromatograma donde se ubicaron cada uno de los nucleótidos.

14. ACTIVIDAD DE RNA POLIMERASA I y II

Las mezclas de reacción usadas y las condiciones de incubación fueron distintas según la enzima que se deseó determinar:

a.- RNA polimerasa I: necesita un sistema de baja fuerza iónica, conteniendo Tris-ClH 55 mM, pH = 7; beta-mercaptoetanol 55 mM; ATP 5,5 mM; CTP y GTP 1,2 mM; FNA 4,1 mM; Cl_2Mg 3,7 mM y DNA 100 µg/ml, el que se desnaturaliza por calentamiento a 95°- 98°C durante 10 min y se enfría antes de usar. Se incuba la mezcla y la muestra en estudio, durante 5 min a 37°C.

b.- RNA polimerasa II: necesita un sistema de alta fuerza iónica, que se obtiene reemplazando las sales de FNa y Cl_2Mg de (a) por sulfato de amonio 300 mM y cloruro de manganeso 3,7 mM. Se incuba durante 15 min a 37°C.

Las condiciones de precipitación del RNA como ácido insoluble y las lecturas de radiactividad que se describen en la Sección 11, fueron comunes a ambas determinaciones.

15. PURIFICACION DE VIRUS JUNIN, CEPA XJ.Cl_3

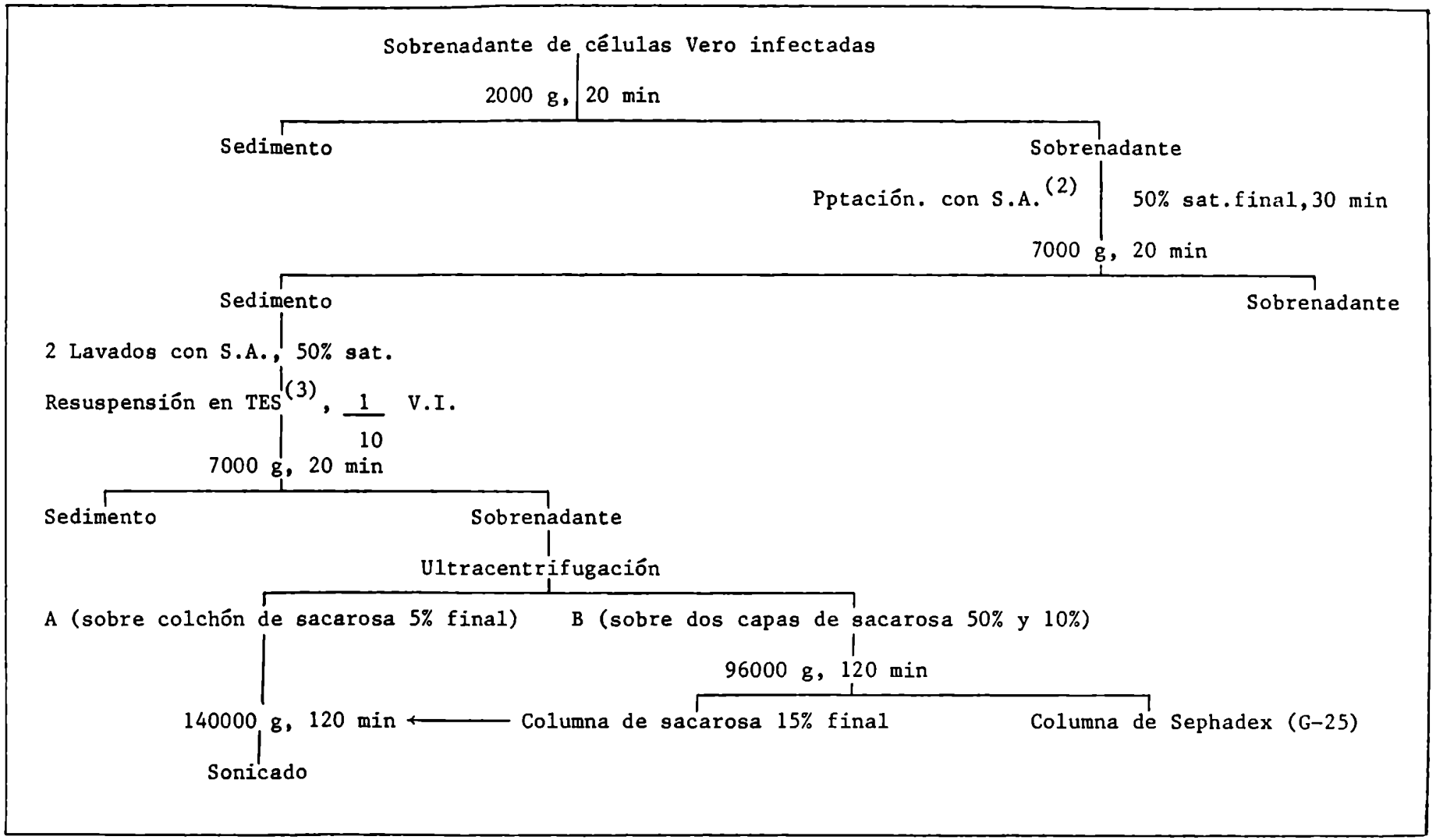
El virus se purificó a partir de los sobrenadantes de células Vero infectadas a una multiplicidad de 1, cosechadas a las 48, 60 y 72 hs p.i. Los sobrenadantes, de los que se eliminaron los restos celulares centrifugándose a 800 g durante 15 min, se guardaron a -70°C. La preparación de virus purificada contenía entre 5 y 8 mg/ml de proteínas y un título de virus del orden de 4×10^6 UFP/ml.

Como control también se purificaron sobrenadantes de células normales por el mismo procedimiento. Se utilizó el método de purificación de Help, G. y col.[49] con algunas modificaciones[107] que se detallan.

El esquema de purificación de la Tabla 1 comenzó con una concentración de virus por precipitación con sulfato de amonio saturado disuelto en TES, el cual una vez lavado y resuspendido en el buffer fue parcialmente purificado en algunos experimentos sobre un colchón de sacarosa 5% y posterior sonicación (Sección 17). En otros casos se sometió al virus a una ultracentrifugación en un gradiente discontínuo de sacarosa 10% y 50%. El virus se recogió de la interfase y en algunos experimentos se sometió a una cromatografía en columna (Sección 16). Este paso se adoptó con el fin de eliminar el sulfato de amonio y la sacarosa de la muestra. El paso final en algunos experimentos fue una segunda ultracentrifugación en una columna de sacarosa 15%.

FIGURA 3

ESQUEMA DE PURIFICACION DE VIRUS JUNIN(1)



(1) La temperatura de trabajo es de 0-4°C
(2) S.A.: Sulfato de amonio
(3) TES: Tris 10^{-2} M, EDTA 10^{-3} M y ClNa 10^{-1} M, pH = 7,4

16. CALIBRACION DE UNA COLUMNA DE SEPHADEX G-25

En las condiciones de calibración de la columna de Sephadex G-25 Grade Coarse (Pharm. Fine Chem. Inc.) se usó Tris-ClH 10^{-2} M, pH = 8; $SO_4(NH_4)_2$ a media saturación en Tris-ClH 10^{-2} M; ClNa 100 mM y EDTA 1 mM. El colorante usado fue Blue Dextran al 1%. El volúmen total empaquetado fue de 22,5 ml; con una velocidad de goteo de 0,8 ml/min, a 4°C, recogiéndose muestras de 0,5 ml durante la elución.

Se sembraron 0,2 ml de la solución de Blue Dextran y 0,4 ml de la solución de sulfato de amonio. Las lecturas de D.O. se hicieron a 300 mμ y la presencia del ión amonio se determinó por la reacción de Nessler[56].

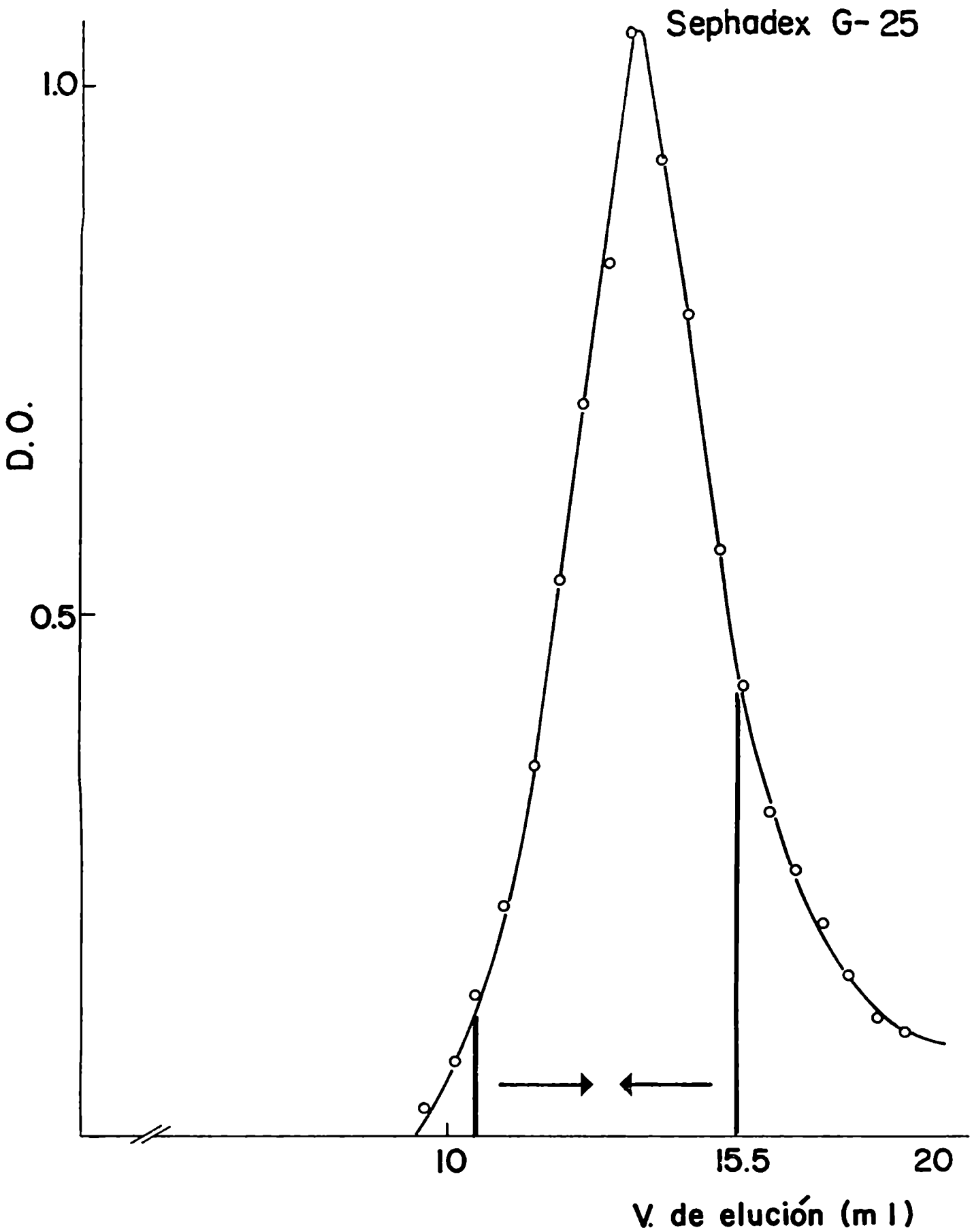
Se usó como eluyente un buffer de baja fuerza iónica pues se adaptó la elución a las condiciones en que se deseaba tener el virus, de allí que la columna no presentó un pico neto como se suele ver clásicamente. En el Gráfico 2 se representó una curva de D.O. vs Volúmen de Elución, donde se ve que la muestra se debió recoger entre 10,5 y 15,5 ml ya que después comenzó a dar positiva la reacción de Nessler, que indicaba la presencia de NH_4^+.

17. PROCESO DE SONICACION

Muchos virus necesitan ser sonicados o tratados con detergentes antes de poder determinar la actividad enzimática. El primer proceso nos interesó pues los pellets de virus son muy difíciles de resuspender. Por lo tanto el virus precipitado con sulfato de amonio y centrifugado a través de una columna de sacarosa 15% se resuspendió en buffer Tris-ClH pH = 7,4 y se sonicó a 55 watts

Gráfico 2

Calibración de una columna cromatográfica de Sephadex G-25



y 0°C antes de realizar las determinaciones enzimáticas. Los datos de infectividad en función del tiempo de sonicación, resumidos en la Tabla 8, muestran una considerable disminución después de 2 minutos. Por lo tanto nunca se sonicó más de 60 segundos, con períodos de 20 segundos y descanso equivalente. Este último paso se realizó a 0°C para evitar recalentamiento en la masa viral.

18. SATURACION DE RNAsas CONTAMINANTES

En la metodología de saturación de una posible RNAsa contaminante en la preparación viral se usó un RNA externo preparado con RNA purificado. Para conseguir éste se usó RNA de levadura comercial, Sigma, y luego se liofilizó. Se preparó una solución de dicho RNA con agua estéril en el momento de usar y de ella se tomó un volúmen equivalente a 100 µg de ácido nucleico para la mezcla enzimática, con la que se incubó durante 10 min a 0°C antes de agregar el virus.

19. TRATAMIENTO DEL VIRUS CON ALTA CONCENTRACION DE ClNa

Antes de la última centrifugación descrita en la Figura 3, se diluyó la preparación de virus XJ.Cl_3 con un volúmen de ClNa 5.3 M en buffer TES Tris 10^{-2} M, EDTA 10^{-3} M y ClNa 10^{-1} M, pH = 7,4, hasta una concentración final de 15% en ClNa. Se incubó esta mezcla durante 30 min a 37°C y el virus se sedimentó durante 90 min a 70.000 g, resuspendiéndolo luego en el mismo buffer.

Tabla 8. Acción del sonicado[(a)] sobre la infectividad del virus Junín, cepa XJ.Cl_3

MATERIAL	UFP TOTALES
Inicial	$2,3 \times 10^7$
Pellet sonicado 2'	$6,0 \times 10^5$
Pellet sonicado 4'	$1,0 \times 10^5$

(a): a 0°C y 55 watts en un Sonifier Cell Disruptor Model W185

20. DETERMINACION DE NTPasa

El virus se purificó hasta el paso de interfase, donde ya estaba demostrado que la pérdida de proteínas contaminantes era importante[49] y el virus se purificaba con un coeficiente de purificación de alrededor de 15 x. En esa "interfase" el título de virus fue de $3,7 \times 10^6$ UFP/ml y el contenido de proteínas de 3 a 5 mg/ml. Se realizaron ensayos paralelos con una interfase normal, obtenida purificando sobrenadantes de células normales, cuya concentración de proteínas fue de 1,5 mg/ml.

Para medir la actividad de nucleósido trifosfato fosfohidrolasas se usaron las siguientes soluciones, cuya concentración final fue:
Tris-ClH 55 mM pH 7,9; Cl_2Mn 4,4 mM; Cl_2Mg 2,5 mM; β-mercaptoetanol 6,4 mM; sulfato de amonio 30 mM; Nonidet P 400, 15%; ClNa 33 mM; GTP 62 µM, en un volúmen final de 0,8 ml.

El GTP-H^3 usado con una actividad específica de 5,66 C /mM, se diluyó con agua bidestilada estéril 1:30.

Se agregó a 0,2 ml de la mezcla de reacción 0,2 ml de la muestra a ensayar y 0,2 ml del nucleótido diluído.

Se trabajó en todos los casos incubando a 37°C y midiendo incorporación de GTP-H^3. La reacción que duró de 30 a 60 min según el experimento se concluyó por calentamiento del tubo en baño de María durante 3 min.

21. METODO DE SEPARACION DE NUCLEOTIDOS

Se realizó por cromatografía en papel Whatman 3 MM, usando como solvente etanol-acetato de amonio[84]. A distintos tiempos de la incubación se sa

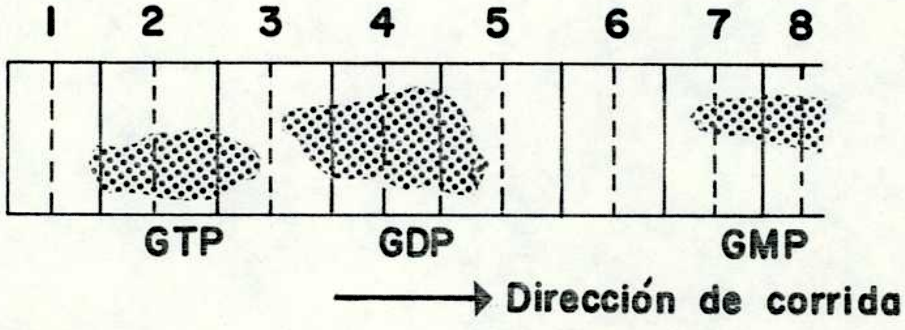
caron alícuotas de 30 µl, que se sembraron enseguida y se secaron con secador común y lámpara IR. El desarrollo del cromatograma se hizo una vez que la reacción estaba concluída y se compararon todas las siembras realizadas en la misma hoja. Además se sembraron estándares al lado de los distintos tiempos, con el fin de ubicar la zona de corrida de los trinucleótidos y dinucleótidos cada vez, la cual se marcaba revelando con luz ultravioleta.

Antes de realizar las incubaciones enzimáticas se hicieron controles de cromatografía, a fin de determinar con los estándares la correcta separación de los nucleótidos y el tiempo de corrida cromatográfica, que resultó ser de 40 horas.

El papel cromatográfico se cortó en tiras paralelas a la dirección de corrida y cada una de ellas se subdividió, con el fin de ser contadas en el contador de centelleo líquido usando PPO-POPOP en tolueno. Una muestra del desarrollo de una cromatografía se ve en la Figura 4.

Fig. 4

Desarrollo de un cromatograma de nucleótidos.



Procesamiento de datos: los datos obtenidos del cromatograma se procesaron de dos formas. En un principio cuando se quería solamente verificar alguna acción hidrolítica en la muestra con virus (primeros experimentos descritos en Resultados) se hizo la conversión de trinucleótidos a dinucleótidos calculando el porcentaje de cuentas de cada fracción con respecto al total de cpm de la correspondiente corrida:

$$\% \text{ NDP} = \frac{\text{CPM (NDP) x 100}}{\text{CPM (NDP) + CPM (NTP)}}$$

$$\% \text{ NTP} = \frac{\text{CPM (NTP) x 100}}{\text{CPM (NDP) + CPM (NTP)}}$$

El procesamiento de datos fue algo más laborioso cuando se debieron comparar las interfases normal e infectada, pues entonces fue necesario calcular las áreas bajo las curvas con el objeto de hacer una integración gráfica. Los resultados se expresaron como por ciento de variación del nucleótido correspondiente respecto del tiempo cero, dividido por los mg de proteína que había en la reacción.

$$\frac{\% \text{ nucleótido}_{t=0} - \% \text{ nucleótido}_{t=60}}{\text{mg proteína}}$$

Esta forma de expresar los resultados determina valores negativos si es mayor la proporción del nucleótido en el punto final de la reacción (t=60).

22. CORRELACION ENTRE LA CANTIDAD DE CELULAS CON LA CONCENTRACION DE DNA

Durante la siembra de las células en los viales se observó que no se obtenían monocapas con el mismo número de células, aún cuando los experimentos se realizaran en condiciones similares, por lo que resultó necesario realizar un recuento cada vez.

Para saber si la determinación de la concentración de DNA presente en cada cultivo, en vez del recuento de células, podría dar una idea más precisa de dicha variación se eligieron tres series de viales, cuyos cultivos se obtuvieron en idénticas condiciones, con el fin de correlacionar el número de células contadas a las 22 hs post-siembra y la concentración de DNA.

Los resultados que se resumen en la Tabla 9 muestran que mientras la variación en el número de células es de 40%, si se tiene en cuenta la concentración de DNA esta variación se reduce al 28%.

Sin embargo, la cantidad de DNA que se mide es muy pequeña y la medida de D.O. está sujeta a mayor error, ya que en general cae dentro de la primera parte de la curva estándar D.O. versus Concentración. El método de determinación es también más tedioso, porque requiere un mayor número de pasos y la reacción colorimétrica necesita un tiempo largo de incubación. En consecuencia, por razones de operatividad, como no se consiguió mayor sensibilidad con la metodología probada se optó por contar las células. Por norma, se promediaron los valores obtenidos en tres viales de cada serie de experimentos a los cuales se refirieron los valores de incorporación medidos.

Tabla 9. Correlación entre el N° de células y la medida de DNA

N° de experimento	N° de células	DNA µg/ml
1	$7,4 \times 10^5$	22
2	$6,1 \times 10^5$	18
3	$4,5 \times 10^5$	16

23. MEDIDA DE LA INCORPORACION DE URIDINA MARCADA EN MONOCAPA DE CELULAS CRECIDAS EN VIALES

El método usado correspondió al descrito por Ball, C. R. et al[8] adaptado al cultivo de células Vero crecidas en monocapa.

Se sembró en cada vial de vidrio del contador de centelleo líquido de 1 a 5 x 10^5 células, las que se contaron después de 24 hs, con una previa tripsinización según se ha descrito en (5). Todas las incorporaciones se realizaron por duplicado o triplicado según los casos.

Las células se marcaron con Uridina$^{5-6}H^3$ (New England 40,8 Ci/mmol) en una dilución tal que quedara 10 µCi ó 20 µCi por vial según el experimento, desde t=-30 hasta t=t_i (un período de 30 minutos antes del punto que se graficó). Una vez finalizado el período de marcación se agregaron 10 ml de solución isotónica fría en cada vial y 10 ml de ClO_4H 1,5% v/v para fijar las células. Se lavó luego dos veces con el mismo ácido y una vez con alcohol. El vial se dejó secar antes de agregar 1 ml de ClO_4H 5% v/v en cuya presencia se calentó durante 1 h a 80°C. Una vez frío se contó agregando 10 ml de una solución centelleadora que incluía: Tritón X-100, 500 mg; PPO 8, 25 g; dimetil POPOP, 150 mg y tolueno 1000 ml.

24. TRATAMIENTO CON DEAE-dextrán

El DEAE-dextrán es un éter policatiónico, producido del dextrán con un PM promedio de 500.000. Entre los varios efectos que tiene sobre los sistemas celulares figura la incorporación de macromoléculas como proteínas y polinu

cleótidos por los cultivos. Se usó la droga de Pharmacia Uppsala-Sweden con PM promedio de 2 x 10^6. Se determinó el tiempo óptimo de contacto de esta droga con el cultivo, que favoreciera la entrada de α-amanitina sin afectar la morfología celular. Así la droga se agregó en los últimos 30 min de una infección de 2 hs en una concentración final de 500 µg/ml.

El cultivo se lavó luego dos veces con la solución fisiológica tamponada y se cubrió con 0,9 ml de Eagle sin suero y 0,1 ml de α-amanitina (de 100 µg/ml) o bien 0,9 ml de Eagle sin suero y 0,1 ml de la solución fisiológica en los ensayos control.

Se marcó el tiempo adecuado agregando la solución de uridina tritiada y procesando según el punto 23.

RESULTADOS

1. Aspectos bioquímicos de la replicación viral

En primer lugar se trató de determinar la cinética de formación de RNA viral específico en la célula infectada en las primeras horas del ciclo de multiplicación.

1.1. Incorporación de uridina-H^3 en el RNA total

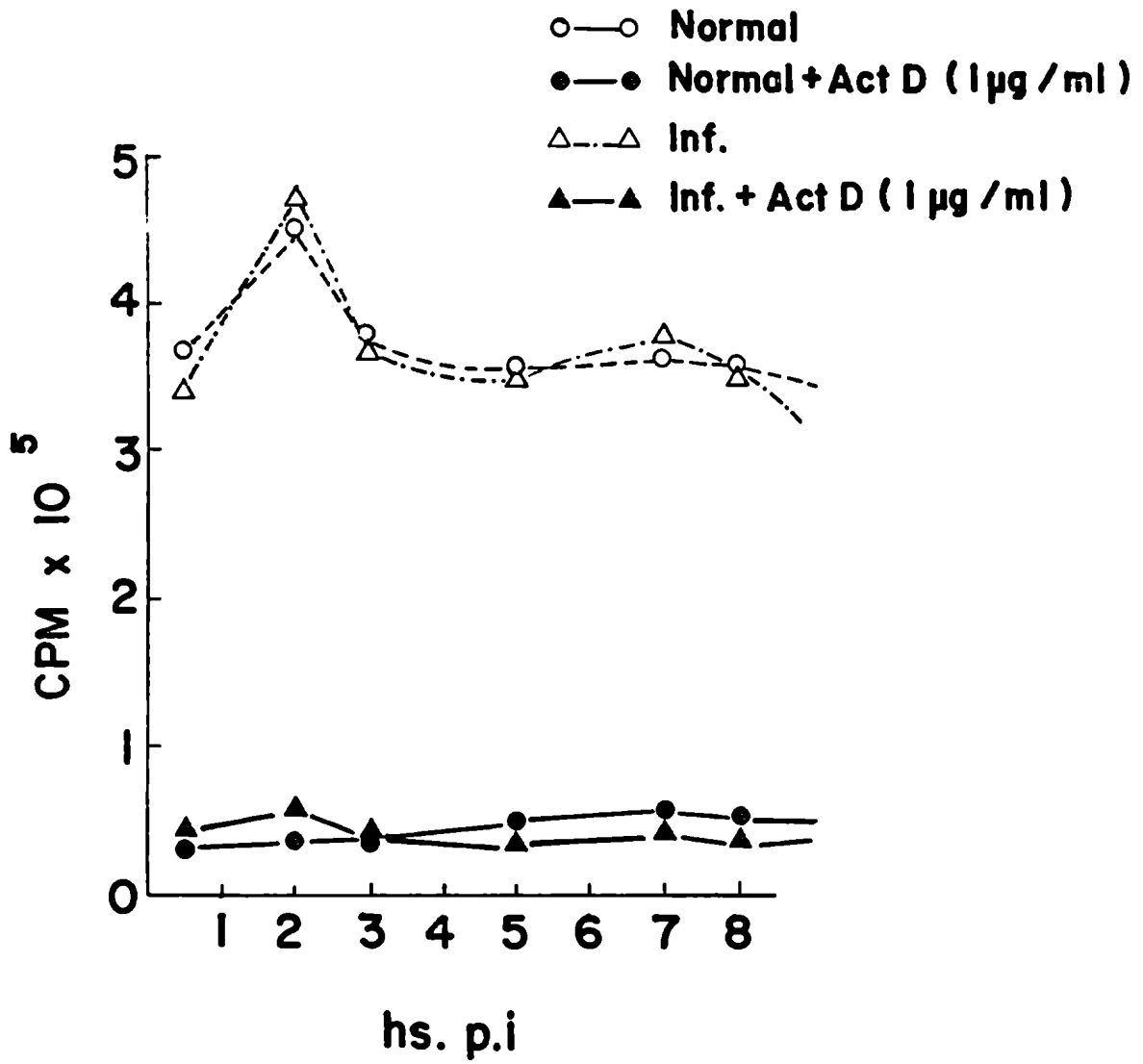
Con el objeto de medir la incorporación de precursor marcado en el RNA de células normales e infectadas se usó la técnica de marcación en viales según se ha descrito.

Como la infección de las células Vero M se realizó con virus proveniente de cerebro de ratón, sin purificar, como control normal se trabajó con células no infectadas, las que fueron incubadas con un homogeneizado de cerebro de ratón no infectado durante 1 h, repitiendo el procedimiento de adsorción, lavado, etc. a que se sometieron las células infectadas. En el experimento que se muestra en el Gráfico 3 se trabajó con 1,3 x 10^5 células por vial realizando pulsos de uridina-H^3 de 10 µCi durante 30 min y determinando la cinética de incorporación hasta las 8 hs post-infección.

Se puede observar que la infección no altera el perfil de incorporación de uridina-H^3 en el RNA celular aún cuando se trabajó con una multiplicidad de infección de 20. Este resultado era en cierto modo esperado puesto que el RNA específico viral debe representar un porcentaje muy bajo del RNA total

Gráfico 3

Incorporación de uridina-H^3 en células normales e infectadas con virus Junín XJ-CL_3 (a)



(a) m.i. = 20

que resulta enmascarado por el RNA del huésped. Característicamente se observa una incorporación inespecífica en las células infectadas y no infectadas que es máxima a las 2 hs p.i., la que se encontró reiterativamente en una serie de cuatro experimentos realizados en distintos momentos. Dicha incorporación se debe atribuír al cambio de medio después de la hora de infección ya que el mismo aumento se ha verificado si se agrega solamente Eagle con suero al 3% para simular la infección. Es atribuído por lo tanto a la metodología de trabajo, en la que después de infectar se retira el inóculo, se lavan las células y se agrega medio sin suero para marcar en forma eficiente el RNA.

Este aumento inespecífico va a dificultar todas las mediciones que se deseen realizar durante la fase temprana de la replicación.

Es sabido que la cinética de aparición de RNA viral se puede detectar entre los Picorna y Togavirus, por ejemplo, inhibiendo la síntesis de RNA celular por el antibiótico Actinomicina-D que inhibe la transcripción.

En el mismo Gráfico 3 se muestra la cinética de incorporación de células normales e infectadas pero en presencia de 1 µg/ml de Actinomicina-D, que se agregó junto con la marcación (Actinomicina-D + Uridina-H^3). No aparecen variaciones importantes entre los valores normales e infectados y la inhibición de la incorporación varía entre 86 y 90% respecto de los valores sin Actinomicina.

La cinética de las células infectadas también se vió afectada en la misma forma por lo que es evidente que hasta las 8 hs p.i. no puede detectarse síntesis de RNA viral utilizando esta metodología.

2. PARTICIPACION DEL NUCLEO CELULAR EN LA MULTIPLICACION DEL VIRUS JUNIN

La primera indicación que la integridad del núcleo celular era necesaria para la replicación del virus Junín se tuvo en 1971 cuando Coto, C. y Help, G[31] demostraron que la irradiación de células con UV impide la multiplicación del virus de NDV. En la actualidad la participación de distintas funciones nucleares en un ciclo de replicación se pueden estudiar con el uso de inhibidores metabólicos. Uno de los que elegimos fue la α-Amanitina.

2.1. Alfa-amanitina

Los distintos estudios existentes sobre la acción de la α-amanitina en la multiplicación del virus de Influenza y su interacción con las enzimas de la células nos llevó a elegir esta droga dentro de todas las Amanitinas conocidas.

2.1.1. Efecto de la α-amanitina sobre la multiplicación del virus Junín, cepa XJ.Cl_3 en células BHK-21

El polipéptido α-amanitina no atraviesa fácilmente la membrana celular, de manera que existen células cultivadas in-vitro que son aparentemente insensibles al tóxico. Por esta razón los primeros experimentos se realizaron trabajando con células BHK-21, donde ya estaba demostrado que existe transporte de la droga[122].

Se usaron concentraciones de drogas desde 2 hasta 10 µg/ml, ya que concentraciones mayores resultaron deletéreas para las células, las que cambian ostensiblemente su morfología a las 12 hs de contacto con el inhibidor.

Las células se infectaron con m.i. = 1 y el rendimiento de virus se midió en el sobrenadante de los cultivos a las 24 hs p.i.

Los resultados que se resumen en la Tabla 10, muestran que existe una inhibición significativa y que esta es dependiente de la concentración. Como el máximo de inhibición respecto del control se obtuvo para 10 µg/ml, concentración que, como ya se dijo no es posible aumentar, se siguió trabajando con ella en los experimentos posteriores.

2.1.2. Medida de la penetración de la droga en células Vero

Visto la inhibición de la multiplicación viral por la presencia de α-amanitina en células BHK se decidió determinar si el mismo efecto se producía en las células Vero M, ya que este es el sistema comúnmente usado en nuestros experimentos.

El proceso de penetración de la α-amanitina varía con el tipo de células pudiendo resultar lento, disminuyendo así la efectividad de la acción inhibitoria sobre el núcleo. Como control de la actividad de la droga en nuestros experimentos se midió la actividad de RNA polimerasa II, que es afectada por la α-amanitina en núcleos purificados de células Vero, a través de la capacidad de dichos núcleos para sintetizar RNA in-vitro. Los núcleos se obtuvieron a partir de células tratadas con la droga por distintos períodos de acuerdo a lo explicado en Materiales y Métodos y luego se incubaron en las condiciones adecuadas para medir actividad de RNA polimerasa II.

Tabla 10. Multiplicación del virus Junín[(a)], en células BHK-21 en en presencia de α-amanitina

Concentración de droga , µg/ ml	Título de virus UFP/ml	Inhibición %
0	650	0
2	500	23
5	420	65
10	60	92

(a) m.i.=1

Los resultados que se muestran en la Tabla 11 indicarían una acción inhibitoria total a partir de las 6 horas de contacto con la droga.

Debido a la combinación del tiempo prolongado de efecto máximo de la droga (6 hs) y el largo ciclo de replicación viral se decidió determinar el efecto de α-amanitina en células Vero infectadas pero por tiempos mayores.

Los cultivos de células Vero, se infectaron con virus Junín a m.i. = 1 con el objeto de medir el rendimiento en los sobrenadantes a las 24 hs y 48 hs p.i., antes que comenzara a observarse la acción citopatogénica. Según la Tabla 12, la inhibición es más importante a las 48 hs p.i.

2.1.3. Efecto de la α-amanitina sobre el virus VSV

La acción observada sobre el virus Junín podría deberse no a un efecto directo sobre la replicación viral sino a una acción sobre la célula huésped que ocurriría debido al tiempo prolongado de contacto de α-amanitina con las mismas, tiempo que es técnicamente necesario para poder medir un efecto sobre la multiplicación viral. Por este motivo se estudió el efecto de la droga sobre la replicación del virus VSV, cuya multiplicación se sabe que es independiente del núcleo. Para esto se trataron las células por períodos más prolongados con la droga y luego se infectaron.

Se observa en la Tabla 13 que la α-amanitina no inhibe la síntesis de VSV (intra o extra celular), dentro de las 24 hs p.i. Tampoco se ve afectado el rendimiento si se hace un pretratamiento de las células por un período de 12 horas antes de la infección lo que hace un total de 36 horas para el contacto de la droga con las células. En este caso existe un título menor de virus en el control pues se usó menor multiplicidad de infección.

Tabla 11. Actividad de RNA polimerasa II en la fracción nuclear de células Vero, tratadas con 10 µg/ml de α-amanitina

Horas de contacto	CPM incorporadas / µg DNA / 15 min.
0	332
3	32
6	0

Tabla 12 .Multiplicación del virus Junín en células Vero[a] en presencia de α -amanitina[b]

Tiempo p.i. hs	Control UFP/ ml	Tratado UFP/ ml	Inhibición %
24	$3,0 \times 10^3$	$2,1 \times 10^2$	93
48	$2,1 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$	98,6

(a) m.i.=1

(b) 10 μg/ml

Tabla 13. Rendimiento de VSV en células Vero[a] tratadas con 10 µg/ ml de α-amanitina

Virus	Tratamiento horas	Título de Virus Control UFP/ ml	Título de Virus Tratado UFP/ ml	Inhibición %
Libre[b]	0 a 24	$6,2 \times 10^7$	$6,1 \times 10^7$	1,7
Asociado[c]	0 a 24	$1,5 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	6,7
Libre	-12 a 24	$1,2 \times 10^7$	$6,2 \times 10^7$	0

(a) m.i.=0,4

(b) obtenido del sobrenadante

(c) intracelular

En consecuencia se puede concluír que la α-amanitina ejerce un efecto directo sobre la multiplicación del virus.

2.1.4. Estadío de la replicación del virus Junín afectado por la droga

Para intentar determinar si el requerimiento de la transcripción nuclear involucraba una función temprana o tardía en la replicación viral, se agregó α-amanitina en distintos momentos p.i., desde las 0 a 12 hs p.i.

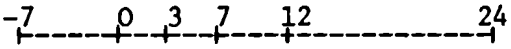
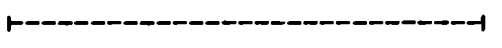
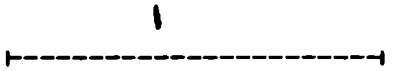
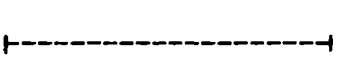
En la Tabla 14 se ve que la acción más significativa de la droga se obtiene en una etapa temprana del ciclo; más aún si cuando el virus entra a la célula ya se produjo la acción inhibitoria de la droga. En efecto, el rendimiento es sólo del 2% cuando existe un pretratamiento de las células durante 7 hs, previo a la infección. Así también, cuando aumenta el número de ciclos replicativos, en un rendimiento de 48 hs, por ejemplo, la inhibición es mucho más importante; 98% para el virus Junín (Tabla 12) y 99% para el virus Tacaribe (datos no presentados).

2.1.5. Acción de la α-amanitina sobre el virus Tacaribe

Para averiguar si la acción inhibitoria era una peculiaridad del virus Junín o podía cumplirse con otros arenavirus, se midió el rendimiento de virus Tacaribe en células BHK-21 y RK_{13}. Como se muestra en la Tabla 15 la acción inhibitoria es del mismo orden que la observada para el virus Junín, cepa $XJ.Cl_3$.

Todos estos datos señalan entonces una participación activa del núcleo celular durante la multiplicación del virus Junín en una etapa temprana de

Tabla 14. Rendimiento de virus Junín en células Vero[a] tratadas con α-amanitina por distintos períodos de tiempo

Horas de Tratamiento con α-amanitina (10 μg/ml)	Rendimiento de Virus[b] % UFP respecto del control
	
	2
	7
	20
	31
	68

(a) m.i. = 1

(b) 24 hs p.i.

Tabla 15. Efecto de la α-Amanitina sobre la multiplicación del virus Tacaribe

CELULAS	TITULOS[a]		INHIBICION
	CONTROL	TRATADO[d]	%
BHK-21[b]	$6,5 \times 10^2$	$3,0 \times 10^1$	95
RK-13[c]	$2,9 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	94

(a) UFP/ml en el sobrenadante respectivo a las 24 hs p.i.

(b) m.i. = 0,1

(c) m.i. = 1

(d) concentración de droga 10 µg/ml

la multiplicación. Gracias a que el efecto de α-amanitina es específico sobre la RNA polimerasa II resulta aparente que un mRNA celular juega algún papel importante en la replicación viral.

2.2. Inducción de RNA polimerasa II por infección viral

Los experimentos realizados con la α-amanitina demostraron que el núcleo tiene una activa participación en la multiplicación de los Arenavirus, por lo que se trató de determinar el efecto de la infección sobre la actividad enzimática nuclear.

Es conocido que las tres RNA polimerasas nucleares tienen no sólo distinta sensibilidad frente a la amanitina, sino también que pueden caracterizarse en distintas condiciones de incubación. Por ello se midió la actividad de RNA polimerasas I y II en las fracciones nucleares de células normales e infectadas con virus Junín, cepa XJ.Cl_3 en distintos tiempos p.i., en condiciones adecuadas según se indica en Materiales y Métodos.

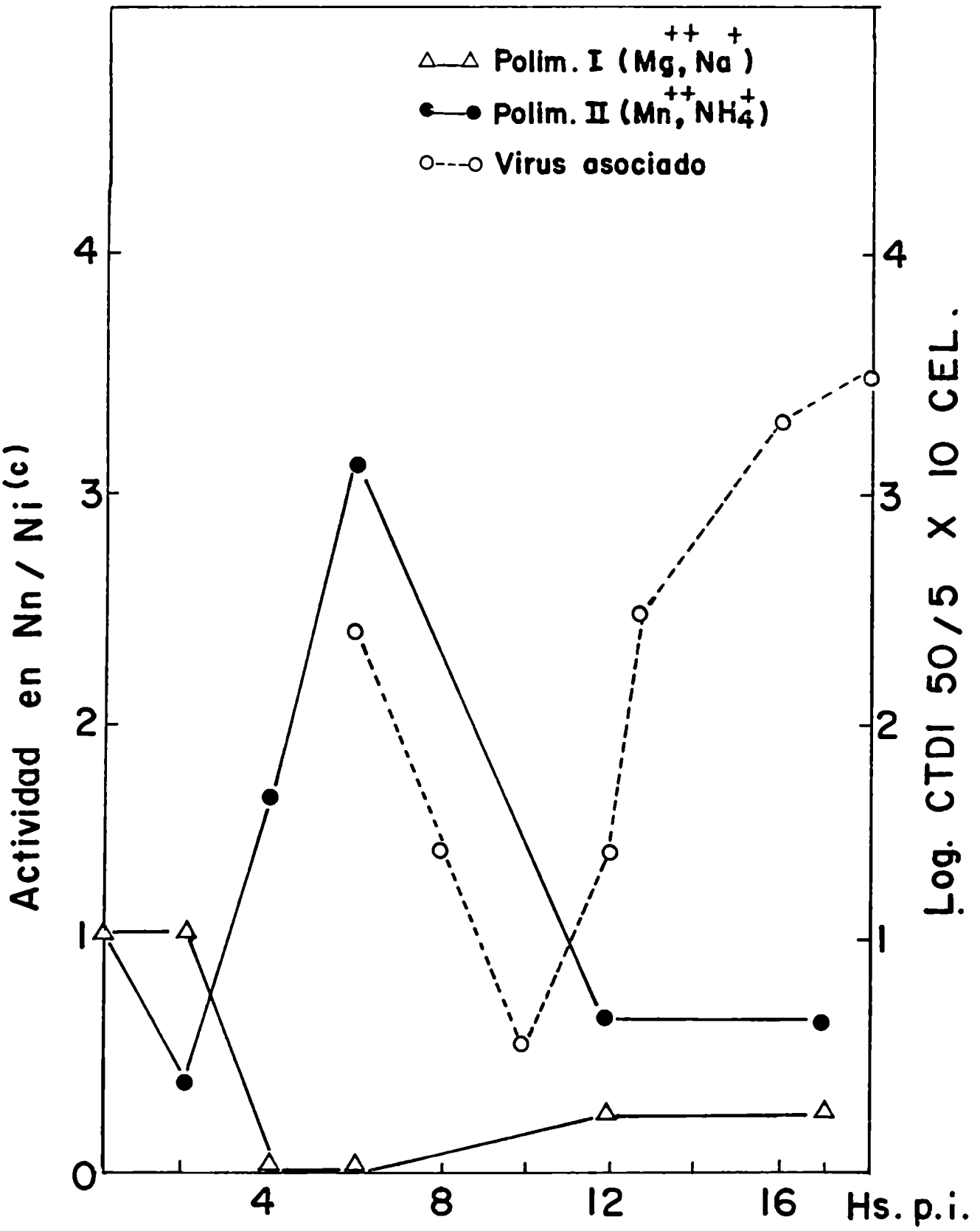
Se probó la actividad polimerásica en dos condiciones, con alta fuerza iónica (Mn^{++} y NH_4^+) y con baja fuerza iónica (Mg^{++} y Na^+) según Lobban, P. y Siminovitch, L.[66].

Los resultados que se muestran en el Gráfico 4 indican que la RNA polimerasa I se inhibe y no vuelve a sus valores normales en el tiempo estudiado. En contraste la RNA polimerasa II se"activa" con un máximo alrededor de las 6 hs p.i.

La actividad de polimerasa II desciende a valores normales al comenzar

Gráfico 4

Niveles [a] de ARN polimerasas I y II en núcleos de células Vero infectadas [b] con virus Junín, cepa XJ-CL_3



a) Incorporación (CPM / µg Prot.) en 15 min. b) m. i. = i

c) N_n , N_i : Núcleos Normales e Infectados

la producción de viriones libres. Como la actividad específica representada podría variar según se expresaran las cpm por µg de DNA ó µg de proteína se hicieron ambas determinaciones para los núcleos aislados en todos los tiempos p.i. Aún cuando para varios virus a RNA, inclusive Influenza, se verifica un "shutt off" en la síntesis de proteína celular durante la infección, en nuestro caso siempre se obtuvo un mayor contenido de DNA y proteína en los núcleos infectados respecto de núcleos normales. Por lo tanto el aumento que se observa en el Gráfico 4 no se debió a un descenso del denominador usado para expresar la actividad específica.

Estos resultados se correlacionan en forma indirecta, con la necesidad de transcripción nuclear temprana, para que ocurra la multiplicación viral.

2.2.1. Inhibición de la incorporación de Uridina-H^3 por efecto de la α-amanitina sobre la RNA polimerasa II

Otro modo de determinar la participación de la RNA polimerasa II en el ciclo de replicación viral, es midiendo el grado de inhibición de la incorporación de Uridina-H^3 en un sistema libre de células conteniendo 1,6 µg/ml de α-amanitina[117]. Como la droga se combina químicamente con la RNA polimerasa II, la medida in-vitro refleja la participación de la enzima en la síntesis de RNA.

En estas experiencias se ensayaron los núcleos del experimento anterior, en forma paralela a dichas determinaciones. La mezcla de reacción correspondió a la Sección 14 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 16, donde se ve que en condiciones de alta fuerza iónica,

Tabla 16. Inhibición de la RNA polimerasa II en presencia de α-Amanitina[a] in-vitro

Horas p.i.	Normal %	Infectado
2	92	100
4	45	97
6	no se hizo	100
12	82	0
18	100	90

(a) 1,6 µg/ml

que permite medir la actividad de RNA polimerasa II, se encontró siempre una inhibición importante, de mas de 80%, aunque el punto de 4 hs no mostró tanta inhibición. Los valores de 12 hs en el infectado pueden estar indicando que la síntesis de RNA detectable se debe a una enzima de origen viral. Cuando estas mediciones se realizaron en presencia de Actinomicina-D agregada al sistema de incubación, se obtuvo un 100% de inhibición, corroborando que la síntesis era atribuíble a una RNA polimerasa dependiente de DNA.

2.3. Síntesis de RNA en núcleos de células infectadas en la etapa temprana de multiplicación

El aumento de actividad enzimática correspondiente a RNA polimerasa II debería reflejarse en un aumento en la incorporación de uridina-H^3 en el núcleo de células infectadas respecto a células normales que se veía enmascarado cuando se analizó la cinética de síntesis de RNA en toda la célula (Sección 1.1. de Resultados).

Se infectaron células Vero (Vero-C) con virus Junín a una m.i. = 10. A las 2 y 6 hs p.i. e inmediatamente después de finalizado el pulso de 30 min (Sección 23 de Materiales y Métodos), se aislaron los núcleos de las células infectadas y no infectadas, las que sirvieron como controles (Sección 7 de Materiales y Métodos). Los resultados se presentan en la Tabla 17 en forma comparativa con los valores de incorporación de células enteras procesadas simultáneamente. Otra vez se comprueba que a las 2 hs p. i. hay una alta

Tabla 17. Valores de Incorporación de Uridina tritiada en Núcleos y Células Vero infectadas con virus Junín[a]

Tiempo p.i. hs	N.normal	N.infectado	Cél.normal	Cél.infectada
	CPM		CPM	
2	2.175[b]	1.169	30.742	27.760
6	1.957	2.758	7.610	8.915

(a) m.i.=10

(b) Promedio de 3 viales para las células y 6 viales para los núcleos

incorporación inespecífica que sin embargo no se refleja en los núcleos: el núcleo infectado incorpora un 4% respecto a la célula total y el normal un 7% respecto a su control.

Por otro lado, el incremento del 14% en las cuentas de las células infectadas respecto a las normales que se observa a las 6 hs p.i.,representa un 40% de aumento si lo que se comparan son los valores de los núcleos infectados respecto de los normales al mismo tiempo p.i. (2758 cpm frente a 1957 cpm)

El núcleo de las células normales incorpora a las 6 hs el 25,7% de la marca en relación a la célula total, mientras que para las células infectadas el valor obtenido es del 30,9%.

Se buscó encontrar alguna relación del aumento observado con la infección viral,por lo que se decidió determinar si la multiplicidad de infección tenía algún efecto sobre la relación de incorporación entre núcleos y célula. Esta vez se eligió como tiempo de trabajo 4 hs, momento en que se había encontrado que aumentaba la actividad de la RNA polimerasa II.

Los resultados se presentan en la Tabla 18. Es evidente que a baja multiplicidad de infección no se observan diferencias significativas de incorporación en núcleos ó células infectadas respecto a los controles,a pesar que éste se usó aproximadamente 100 veces más concentrado en proteína de cerebro normal. En cambio con una multiplicidad de 10, el valor de la incorporación de núcleos respecto a célula es del 40% y a su vez el núcleo infectado incorpora 1,6 veces más cuentas que el núcleo normal. Estos son resultados similares a los obtenidos en el experimento anterior pero trabajando a las 6 hs p.i.

Tabla 18. Influencia de la m.i. en la incorporación de Uridina tritiada en células Vero normales e infectadas con virus Junín, a las 4 hs p.i.

m.i.	Células CPM	Núcleos	Núcleos/ Células % CPM
1	95.739[(a)]	13.133	13
10	65.598	25.895	39
control	78.524	15.177	20

(a) Valor promedio de 3 viales.

En este experimento las células infectadas con m.i. = 10, incorporan 0,88 de las células infectadas con m.i. = 1, en cambio esa relación en los núcleos se invierte: los que están infectados con mayor m.i. incorporan dos veces más que los que están infectados con menor m.i. Otra vez se muestra que la estimulación de la síntesis que se mide en los núcleos no se ve reflejada en la medida del RNA total sintetizado en las células infectadas.

2.3.1. Efecto de la α-Amanitina sobre la síntesis de RNA

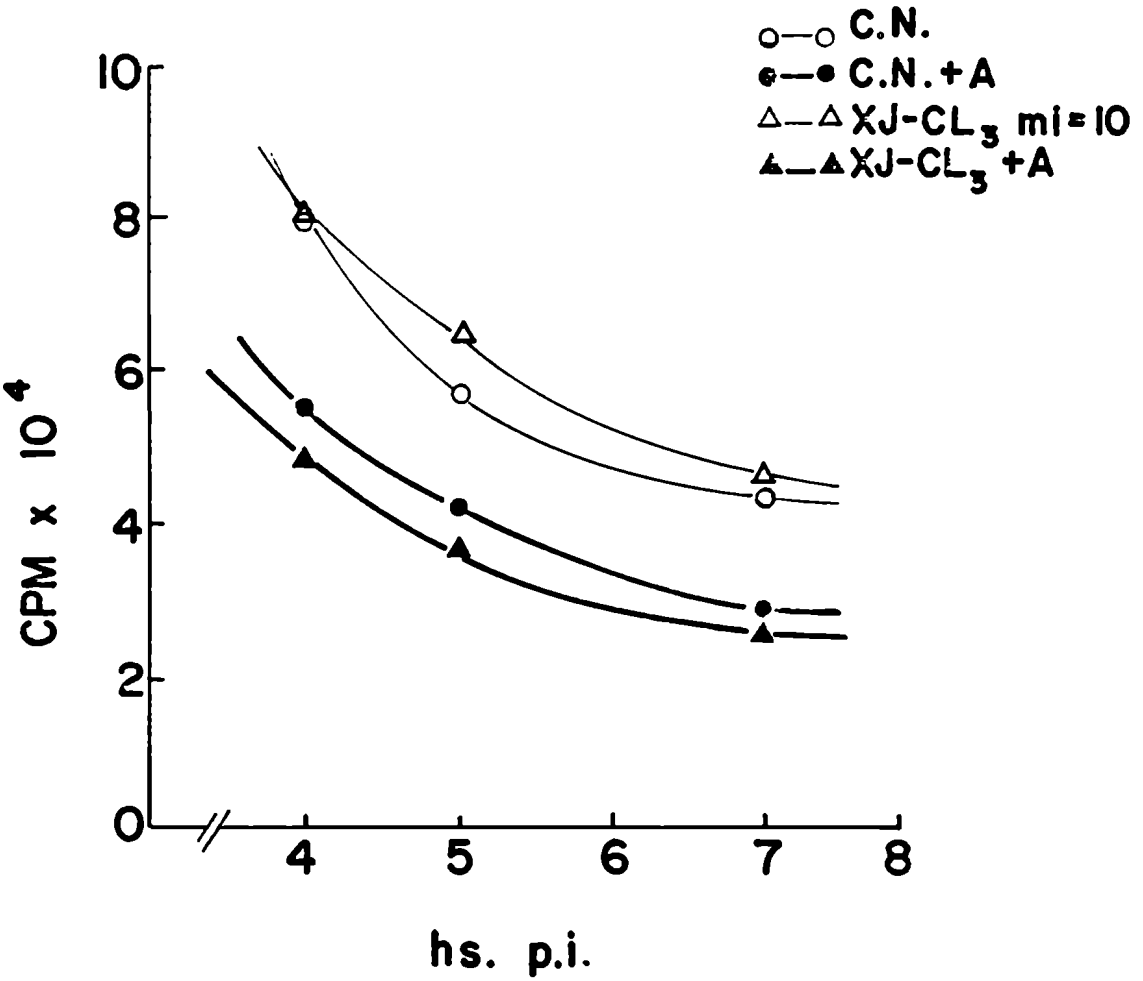
Los resultados obtenidos utilizando núcleos infectados aislados señalan una participación de la síntesis nuclear en todos los casos pero no en forma diferenciada y neta. Como estos experimentos son además muy trabajosos se decidió determinar la participación del núcleo en la síntesis viral mediante el uso de α-amanitina. El grado de inhibición en la síntesis del RNA es un reflejo de la participación del núcleo en distintos tiempos p.i.

En primer término se determinó la incorporación de uridina-H^3 en pulsos de 30 min en células Vero-C tratadas previamente con DEAE-dextrán para favorecer la entrada de α-amanitina (Gráfico 5). La marcación se agregó en los últimos 30 min de cada uno de los puntos marcados, los que están desde t = 0 en presencia de α-amanitina.

Cuando se compara la incorporación de uridina-H^3 entre células infectadas y controles entre las 4 y 7 hs p.i. se observa una coincidencia en el trazado de ambas curvas. Sin embargo, la incorporación en las células infectadas es 1,3 veces mayor que en controles. Aún cuando en presencia de α-amanitina la síntesis está disminuída tanto en células infectadas como en los controles,

Gráfico 5

Síntesis de RNA total en células Vero infectadas con $XJ\text{-}CL_3$ [a] y tratadas con ∝-Amanitina (10 µg/ml)



a) Las células se trataron con DEAE-dextrán 500 µg/ml durante los últimos 30' de la infección.

en las primeras se observa siempre que está un 10% más afectada.

2.3.2. Influencia de la duración del pulso

Como con esta técnica no se encontró un tiempo preferencial de inhibición se decidió variar el período de marcación en 1 h, 2 hs y 4 hs, a partir de las 4 hs p.i., con lo cual se mediría un RNA acumulado en los distintos intervalos en presencia y en ausencia de la droga.

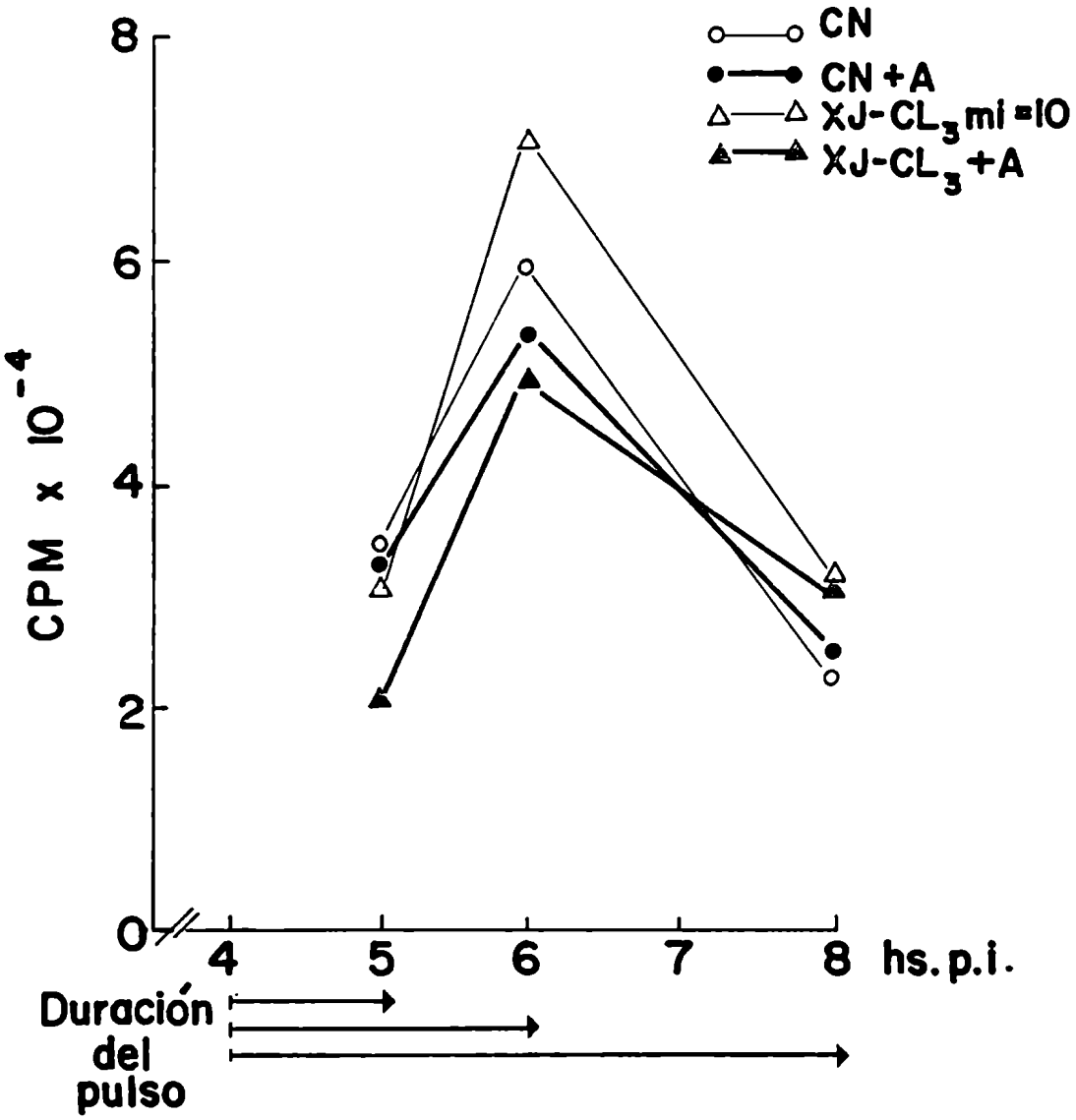
Se puede ver en el Gráfico 6 que a las 5 hs y 6hs p.i., con RNA sintetizado entre las 4 y 5 hs para el 1er pulso, y entre las 4 y 6 hs para el 2do pulso, se revela una importante inhibición de la incorporación en las células infectadas en presencia de α-amanitina que no se observa en las células control. Cuando el tiempo de marcación se alarga a 4 hs, los valores de todas las incorporaciones decaen como si la uridina caliente se acabara.

Con este intervalo de marcación de 2 hs se realizaron otros experimentos para lograr determinar el tiempo en que la inhibición por la droga era máxima y así resultó, según se ve en la Tabla 19, que entre las 4 y 6 hs p.i., la medida acumulativa de RNA revela la mayor influencia por α-amanitina frente a las células normales. Dicha diferencia, sin embargo, no pasó del 10% tal como se había observado en el Gráfico 4.

Es llamativo que la incorporación de uridina tritiada en presencia de la droga respecto de los valores en su ausencia, son más o menos coincidentes para las células control (que fueron tratadas con cerebro normal en los tres puntos considerados). En cambio el primer punto de las células infectadas presentó los mismos valores de incorporación (Promedios de 7.389 cpm y 7.116 cpm) en

Gráfico 6

Influencia de la duración del pulso en la síntesis de RNA en células Vero infectadas con XJ-CL_3[a], en presencia de α-Amanitina[b]



a) m.i. = 10

b) concentración = 10 µg / ml

Tabla 19. Incorporación de Uridina tritiada en células Vero infectadas con virus Junín[a], en presencia de Amanitina[b], a distintos tiempos p.i.

Tiempo p.i. horas	Control %	Virus
3 a 5	88[c]	100
4 a 6	86	77
5 a 7	82	88

(a) m.i.=10

(b) 10 µg/ ml

(c) Los porcentajes se calculan respecto de los valores de incorporación en ausencia de la droga, con pulsos de 2 hs.

presencia y en ausencia de la droga. Esto indicaría que acá se está midiendo una síntesis de RNA que no es afectada por la α-amanitina.

El grado de inhibición entre las 4 y 6 hs, detectado por este método, vuelve a ser de un 10% mayor en las células infectadas respecto de las control. Las primeras incorporan un 77% y las segundas un 86%.

3. Enzimas

La identificación de las múltiples enzimas presentes en el virión es una herramienta útil para aclarar la forma de replicación de un virus, por eso en este estudio sobre la estrategia del genoma del virus Junín, abordamos la caracterización de dos enzimas endógenas: RNA polimerasa dependiente de RNA y Nucleósido 5'-trifosfato fosfohidrolasa.

3.1. Actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA en virus Junín, cepa XJ.Cl$_3$

En consideración que la RNA polimerasa dependiente de RNA del virus de Influenza solo se detectó cuando en la mezcla de reacción estaba presente el ión manganeso[89,108] y que la actividad para los distintos virus difiere según cual sea el catión divalente presente en la mezcla, se probó la actividad de replicasa en preparados virales purificados, según el esquema A de purificación manteniendo constante el catión divalente y cambiando el monovalente. El proceso de sonicación usado en el último paso del proceso de purificación (Ver figura 3) debe ser controlado según se indicó en la Sección 17 de Materiales y Métodos para que no disminuya la infectividad. Los resultados que

se muestran en la Tabla 20 corresponden a una actividad medida durante 30 min en presencia de GTP-H^3. La actividad enzimática no resultó alterada por la presencia de los distintos cationes monovalentes en la mezcla de reacción. Por otra parte si bien la enzima es activa tanto en presencia de Mg como Mn incorpora más marcación cuando hay Mg en el medio. Además si se mantiene constante el catión monovalente Na y se compara la actividad de acuerdo con el catión divalente hay un 20% de aumento en favor de la combinación Mg-Na.

Como se ha demostrado la eficacia de la acción del ClNa en altas concentraciones para eliminar las proteínas extrañas a los virus purificados en gradientes, y en consideración que la actividad medida podría estar afectada por la presencia de hidrolasas (tanto nucleótido fosfohidrolasas como RNAsas) se probó este tratamiento según se ha descrito en Materiales y Métodos. Asímismo se trató de comprobar la asociación de la enzima con membranas quitando el detergente de la mezcla de reacción y la naturaleza del producto sintetizado, con el agregado de RNAsa. Los resultados se presentan en la Tabla 21 donde se utilizó virus purificado según el esquema B. Se observó que la carencia de uno de los trinucleótidos anula la síntesis y que la presencia del detergente NP-40 no es esencial para demostrar la existencia de la enzima, la que sin embargo no se encuentra si el detergente es Tritón N-101.

En esa misma tabla se observa que la enzima debe determinarse con material fresco, pues tanto el virus mantenido 12 hs a 4°C, como una semana a -70°C prácticamente no revela actividad.

Con respecto al tratamiento con ClNa si bien parecería ser efectivo para eliminar RNAsa no se ha verificado un espectacular aumento como se esperaba. sino sólamente un aumento de un 3,6 más respecto del virus sin tratar.

Tabla 20. Requerimiento de cationes divalentes para la actividad de RNA polimerasa[a]

Mezcla de Reacción	CPM/ µg de Proteína
Con Cl_2Mg, sin Cl_2Mn	2.136
Con Cl_2Mn, sin Cl_2Mg	1.306
Con Cl_2Mn y ClNa[b]	1.700
Con Cl_2Mg y ClNa[b]	2.040
Con Cl_2Mn y $ClNH_4$[c]	1.400

(a) Medida como incorporación de GTP-H^3, durante 30 min. Proteína viral: 500 µg. Título de Virus: 2,5 x 10^6 UFP/ml

(b) ClNa 25 mM.

(c) $ClNH_4$ 25 mM.

Tabla 21. Requerimientos generales de la actividad de RNA polimerasa en el virus Junín, cepa $XJ\text{-}Cl_3$[a]

Mezcla de Reacción	CPM / µg de Proteína
Completa(con Mg y Mn)	2.470
Sin virus	0
Sin GTP	140
Sin CTP	0
Sin NP-40	1.480
+ Tritón N-101 (0,8 mg/ml)	0
+ RNAsa	370
Virus a 4°C	854
Virus a -70°C	0
Virus T[b] + Mezcla[c]	8.892

(a) Medida como incorporación de UTP-H^3, durante 30 min. a 32°C.A cada valor se le sustrae su correspondiente blanco(t=0min.)

(b) Virus tratado con ClNa

(c) En esta mezcla se incluye NH_4^+ 4,6 mM y Na^+ 33 mM.

3.2. Actividad de Nucleósido Trifosfato Fosfohidrolasas

La existencia de 5'-trifosfato hidrolasas, cuyo sustrato puede ser ATP, con una afinidad variable hacia los otros nucleótidos, ha sido ampliamente descrita para virus a RNA ó DNA[13,43,54,80,116]. Estas enzimas actúan sobre un nucleósido-5'-trifosfato en la siguiente reacción:

$$NTP + H_2O \longrightarrow NDP + P_i$$

Como en nuestras determinaciones de replicasa en los preparados de virus Junín, cepa XJ.Cl_3, encontramos una marcada disminución en las cuentas de los trinucleótidos después de realizada la incubación a 37°C, sospechamos la presencia de una nucleótido fosfohidrolasa.

Para demostrar esta actividad enzimática se usó el mismo material probado en la determinación de RNA polimerasa dependiente de RNA: virus purificado por precipitación con sulfato de amonio y posteriormente centrifugado en un gradiente discontínuo de sacarosa (corresponde a la metodología B del esquema de purificación de la Fig 3).

Se ensayó en primer término, con un material viral congelado durante 15 días a -70°C, la influencia de distintas mezclas de reacción, según se ha descrito en Materiales y Métodos. Por otra parte se probó la importancia del detergente NP-40 en la mezcla, a una concentración final de 0,15%. De tal forma se probaron las siguientes variantes:

a) Virus Junín tratado con detergente, en presencia de Mn ó Mg,

b) Virus Junín sin tratar, en presencia de Mn ó Mg.

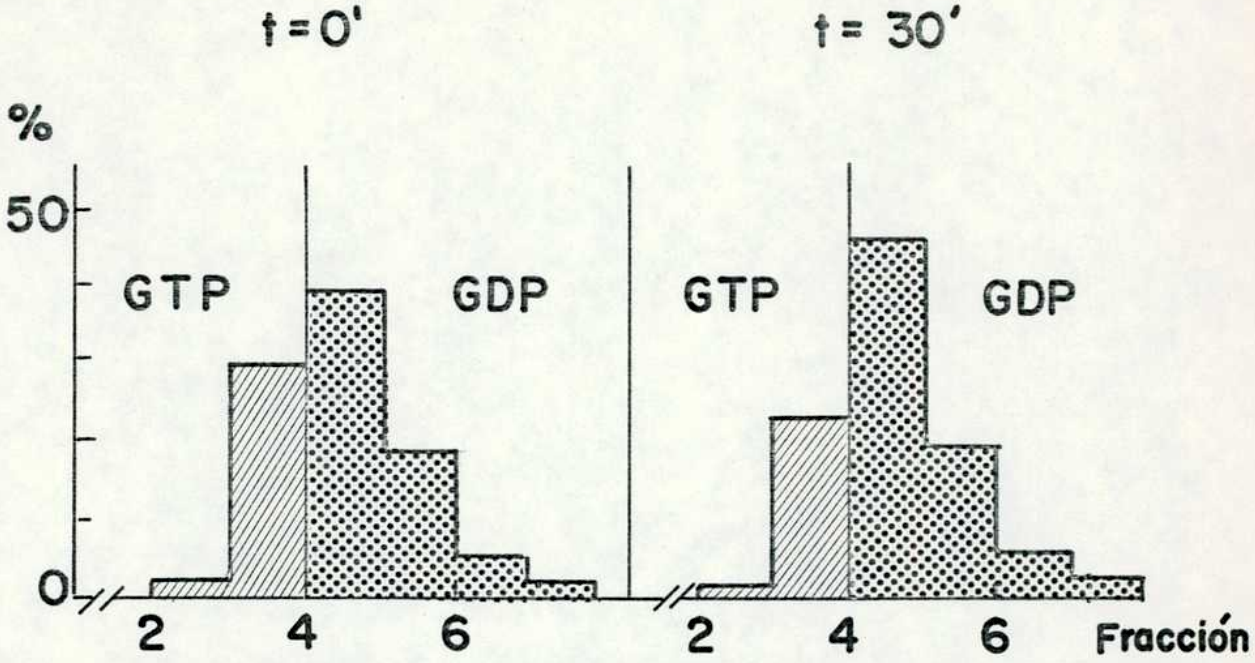
La incubación y posterior separación cromatográfica de los productos de la reacción se realizó según se ha descrito. En el Gráfico 7 se resume la actividad de hidrolasa, de acuerdo con las diferencias en las cuentas obtenidas para las zonas de trinucleótido y dinucleótido en el tiempo 0 de incubación y una vez concluída la misma (t = 30'). Se reveló la actividad enzimática cuando la mezcla contenía Mg y virus sin tratar con detergente (Gráfico 7-A) y actividad dudosa en presencia de Mn y virus tratado con detergente (Gráfico 7-B) ya que en este último caso las variaciones entre el porcentaje de trinucleótido que disminuye cuando se compara t = 30' y t = 0', respecto del porcentaje de dinucleótido que debiera aumentar si hubiera actividad hidrolítica no resultó muy marcado. El resto de las combinaciones dio resultados negativos.

Suponiendo que no fuera necesaria la presencia de detergente para revelar actividad de nucleótido fosfohidrolasa, se probó la actividad de un material viral congelado durante 50 días, aumentando el tiempo de incubación a 60 minutos y utilizando como cationes Mn ó Mg.

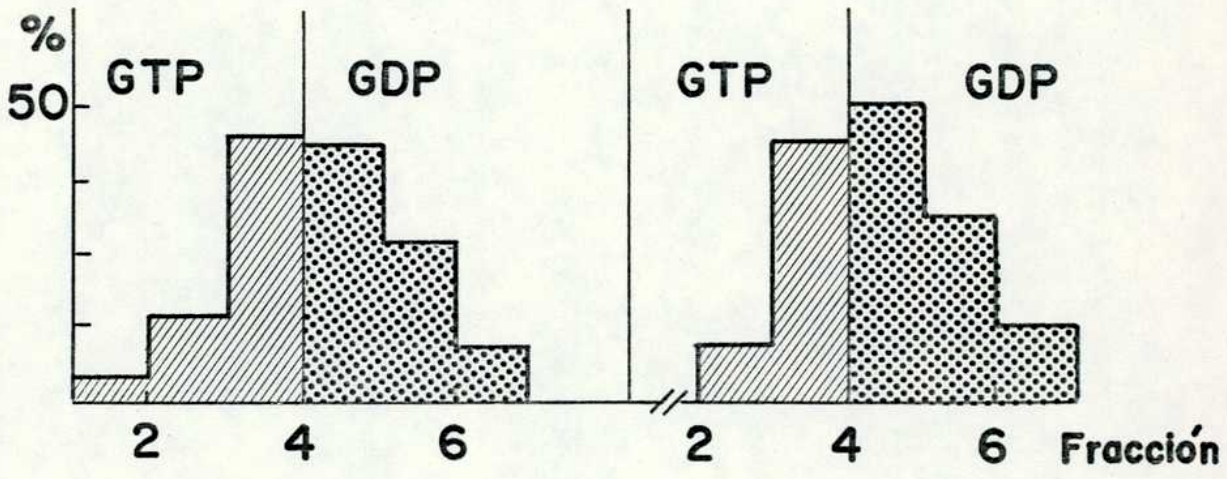
Los porcentajes calculados se representaron en el Gráfico 7-C, revelándose actividad enzimática con una disminución de GTP y un concomitante aumento de GDP en t = 60' sólo en la mezcla que tenía Mg. El ensayo hecho con Mn no se graficó pues no se pudo deducir del mismo la existencia de actividad GTPásica.

Con el fin de realizar los correspondientes controles se comparó la actividad hidrolásica de preparados virales obtenidos de sobrenadantes de células infectadas con preparados "control" obtenidos de sobrenadantes de células sin infectar que recibieron igual tratamiento. El contenido en proteínas del

Actividad de GTP-asa en virus Junín XJ_Cl_3

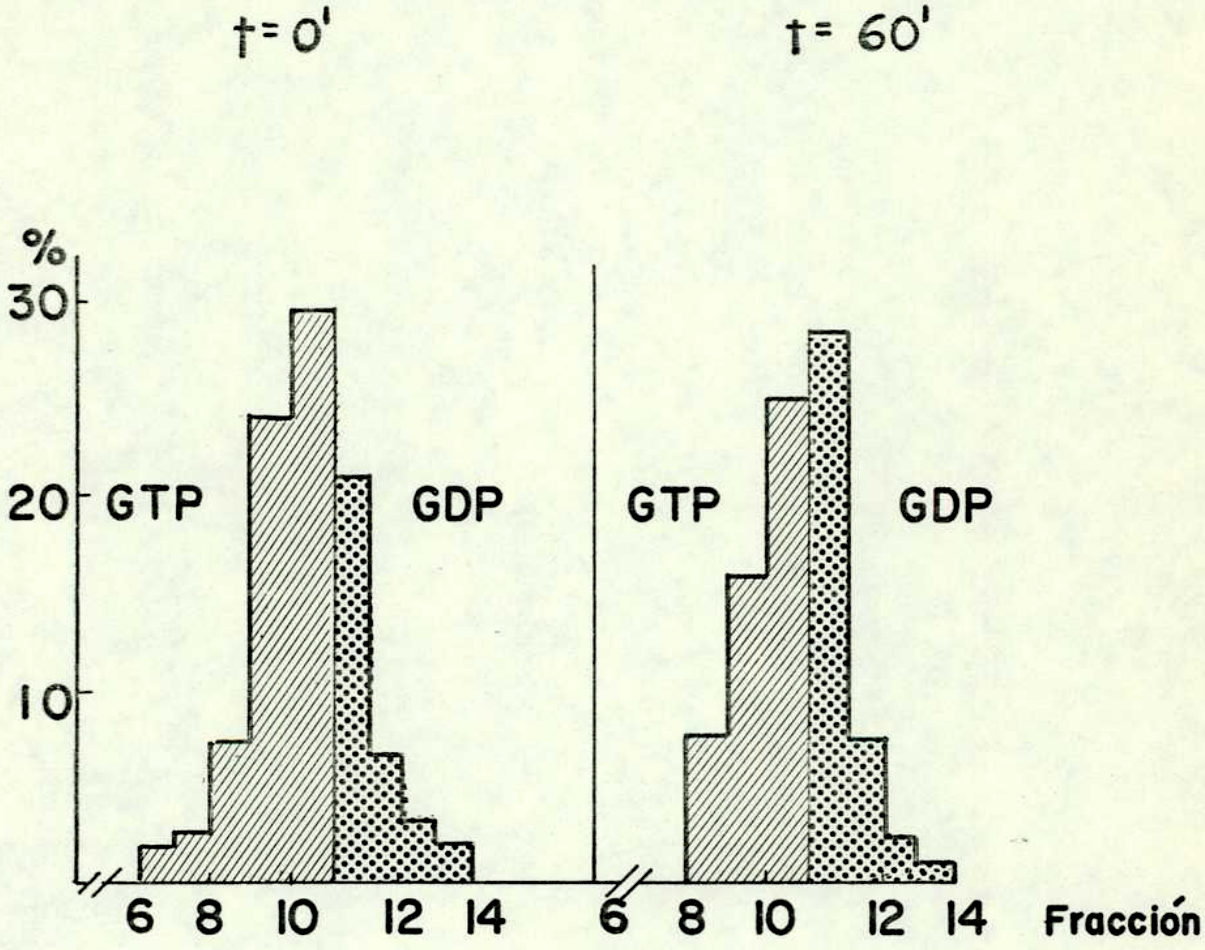


A : con Mg^{++} ; Sin NP-40 - Incubación de 30'



B : con Mn^{++} y NP-40 - Incubación de 30'

Gráfico 7



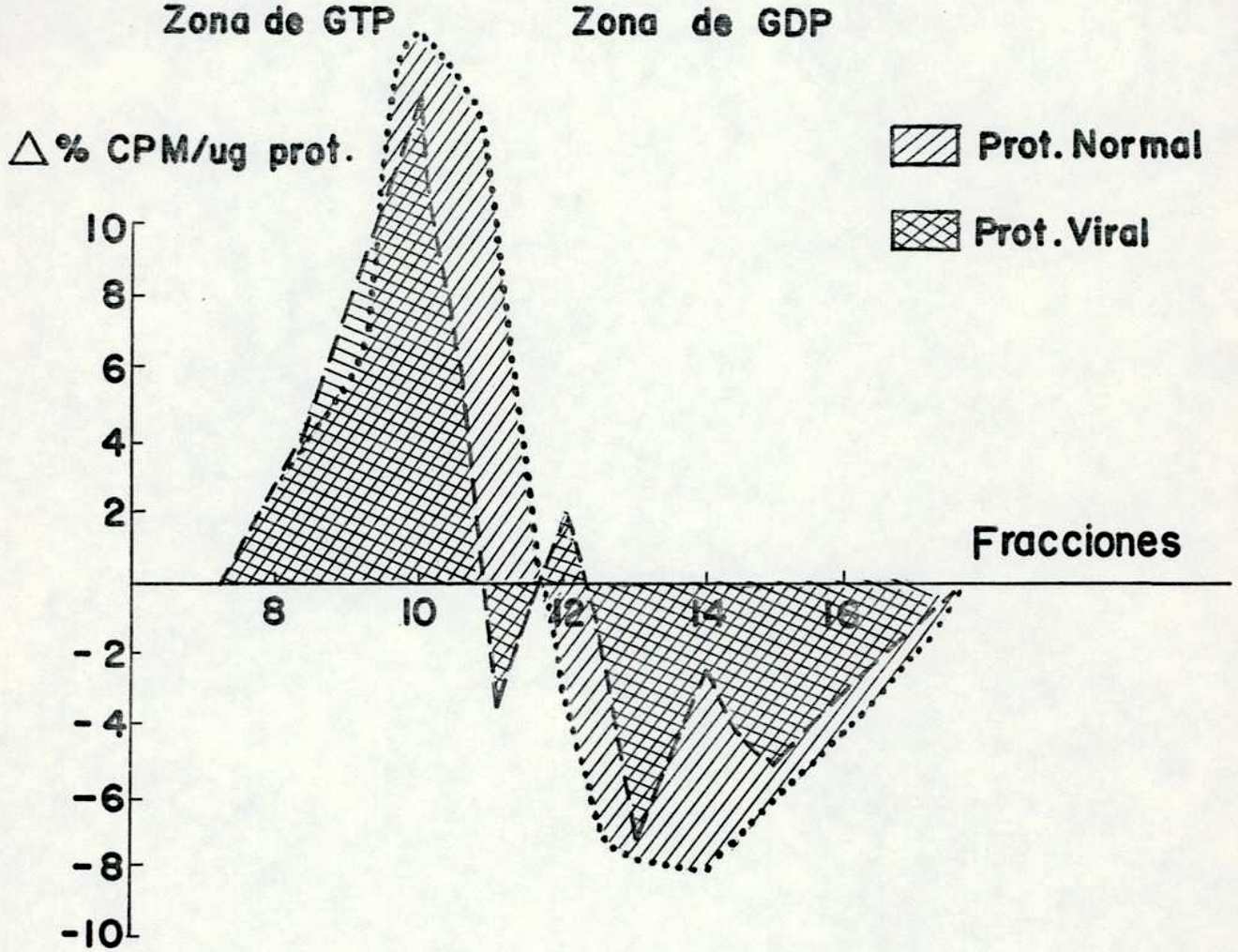
C: Con Mg ; sin NP-40- Incubación de 60'

material viral fue de 5 mg/ml y en el material control 1,5 mg/ml. En este caso el pellet obtenido de la primera parte del proceso de purificación estuvo durante 60 días a -70°C. El procesamiento de los valores obtenidos una vez desarrollado el cromatograma fue algo laborioso, según se indicó en 2.1. La presencia del dinucleótido originado por la actividad hidrolítica a los 60 min de incubación, se reveló en un área que aparece por debajo de las abcisas (Gráfico 8). La integración gráfica de las áreas que se encuentran por debajo de las curvas demostró que la actividad enzimática para las fracciones normal e infectada, en presencia de Mg y NH_4 simultáneamente son del mismo orden. La mezcla de Mn-NH_4 dió resultados que no se pudieron interpretar.

La existencia de actividad de 5'-nucleotidasa en esta interfase corresponde,por lo tanto, a una actividad contaminante celular, ya que también se detectó en el material que no tenía virus, y puede provenir de células rotas que quedan en el sobrenadante del que se parte en el proceso de purificación.

Gráfico 8

Actividad * Comparada de GTP-asa en Virus Junín XJ-Cl_3 y Material Normal.



* La determinación se hizo con 0.5 mg de proteína "normal" y 0.7mg de proteína viral.

DISCUSION

A pesar que existían estudios realizados por Coto, C. y col.[28] y Pfau Ch. y col.[91] que demostraban la dificultad de detectar síntesis de RNA viral en células infectadas con un Arenavirus, se consideró la posibilidad que aumentando la multiplicidad de infección se consiguiera revelar la cinética de síntesis de RNA viral. Para esto se desarrolló el método de cultivo de células en viales de centelleo que permite trabajar sin pérdida de material y a una multiplicidad entre 10 y 20 veces mayor que la comúnmente usada. No se encontraron diferencias significativas entre las curvas de incorporación de células normales e infectadas (Gráfico 3). Sólo se observó un aumento de incorporación importante a las 2 hs p.i. que hemos considerado inespecífico, tanto en células normales como en infectadas y que puede ser atribuible al proceso que sufren las células en el momento de agregar la marcación, hecho también observado en otros sistemas celulares (R. A. de Torres, comunicación personal). Cuando se realiza la incorporación en presencia de Actinomicina-D, que permite la detección de RNA viral en los Picornaviridae, tampoco se observan diferencias significativas, ya que la inhibición de la incorporación en las células controles es del 86% y en las infectadas del 90% respecto de los valores en ausencia de la droga.

En consecuencia no ha sido posible determinar por esta metodología la síntesis de RNA viral, ya que queda enmascarada dentro del "background" de RNA celular, agravado por el hecho de un temprano aumento inespecífico.

Necesidad de la funcionalidad del núcleo celular para la replicación viral

La mayoría de los RNA virus multiplican con total independencia del núcleo celular. Sin embargo como ya se explicó en Introducción existían evidencias de una participación activa del núcleo celular en la multiplicación de los Arenavirus. Los resultados obtenidos por nosotros con la α-amanitina aclaran,sin duda, esta participación. La acción inhibitoria de la α-amanitina sobre la multiplicación del virus Junín, es concentración dependiente en células BHK-21, aunque la relación no es estrictamente lineal, ni fue posible usar una concentración de droga mayor de 10 µg/ml sin que resultara afectado significativamente el metabolismo celular. Se han usado sin embargo concentraciones mayores con el virus de Influenza[71,110] y Pichindé[64]. De acuerdo con los resultados de la Tabla 10, elegimos la concentración de 10 µg/ml responsable de la máxima inhibición, para trabajar en células Vero. Como no teníamos datos del proceso de entrada de la droga en estas células y en consideración que la RNA polimerasa II es la enzima blanco de la misma, se midió su actividad en núcleos aislados de células Vero, para distintos tiempos de tratamiento con 10 µg/ml de α-amanitina (Tabla 11), obteniéndose un 90% de inhibición a las 3 hs de contacto y un 100% de inhibición a las 6 hs p.i. Este porcentaje se consideró satisfactorio ya que otros investigadores habían comunicado un 63% de inhibición de la actividad de la polimerasa con 5 µg/ml de droga y 1 h de contacto en células CHO[110]. En base a estos resul-

tados se consideró que la droga ejerce su máximo efecto inhibitorio después de estar en contacto con las células por más de 6 hs, lo que se refleja en el mayor grado de inhibición de la multiplicación del virus Junín con un pretratamiento de 7 horas (Tabla 14).

Otra interpretación del mayor efecto inhibitorio observado podría basarse en un daño celular. Sin embargo el metabolismo de la célula huésped no es afectado, ya que el virus VSV pudo multiplicar con igual eficiencia en ausencia que en presencia de la droga, aún con un tratamiento de 12 hs antes de la infección (Tabla 13). En consecuencia podemos postular que la α-amanitina ejerce un efecto directo sobre la multiplicación de los Arenavirus Junín y Tacaribe (Tabla 15) y que la síntesis de RNA mensajeros celulares es un requerimiento para la replicación normal de estos virus. Agregando la droga a distintos tiempos p.i. se trató de determinar si dicho requerimiento ocurre durante todo el ciclo o sólo en la primera etapa. Los datos de la Tabla 14 indican que el rendimiento del virus Junín resulta menos afectado si se dejan transcurrir entre 7 y 12 hs después de la infección sin tratamiento con la droga. Sin embargo debido a la lenta velocidad de penetración, es difícil asegurar con precisión el momento en que la α-amanitina ejerce su efecto. A pesar de esto nunca se alcanzó el 100% de rendimiento viral en cultivos en los que se agregó la droga en una etapa tardía p.i., lo que podría interpretarse como la necesidad de transcripción del DNA celular durante todo el ciclo de replicación. Esto marcaría una importante diferencia con el virus de Influenza, ya que en éste la adición de la droga a las1,5 hs p.i. no afecta la transcripción del RNA viral. La exacta determinación de este período se

realizó recientemente por medio de un sofisticado y trabajoso método bioquímico, pero ya había sido sugerido por Mahy et al[71], de acuerdo con el tiempo en que el agregado de la droga no afecta al rendimiento de virus extracelular.

En base a que el efecto inhibitorio que ejerce la α-amanitina se manifiesta sobre los virus Junín y Tacaribe en varios sistemas (Tabla 15) quedaría probado, junto con los datos ya discutidos que el efecto es específico sobre la replicación viral. Podemos agregar que con esta serie de experimentos se ha establecido una similitud de comportamiento entre los virus Junín y Tacaribe, a nivel molecular, tal como ocurre con Influenza A y B, que no ha sido descrita anteriormente.

Leung[64] ha demostrado que en células infectadas con virus Pichindé existen tres polipéptidos virales los que en presencia de α-amanitina se reducen significativamente. Trabajos posteriores del mismo investigador[63] obtenidos con el virus Pichindé, confirmaron que no es la replicasa viral el blanco de la acción de la droga. Todos estos resultados indican que la transcripción de algunos genes celulares son un prerequisito para la transcripción y replicación de los Arenavirus.

Inducción de RNA polimerasa II por infección viral

Existen virus a RNA que no afectan las enzimas celulares, aún cuando las puedan utilizar en su multiplicación y en contraste existe otro grupo que las inhibe pronunciadamente.

En el caso de los Arenavirus aún cuando no conocemos ningún estudio sobre una variación en la actividad enzimática celular, estudiamos la actividad de las RNA polimerasas, una vez que demostramos la acción de la α-amanitina sobre la multiplicación de este grupo. Nuestras determinaciones se concentraron en las RNA polimerasas I y II, que se diferencian por su sensibilidad frente a la α-Amanitina, así como por las condiciones de la mezcla de incubación.

Los resultados del Gráfico 4, muestran que la actividad de síntesis de RNA medida en condiciones de baja fuerza iónica (Mg^{++} y Na^{+}) de la cual es responsable la RNA polimerasa I, disminuye respecto del valor que se obtiene en los núcleos aislados de células normales. La inhibición se mantiene a lo largo del período de 12 hs p.i. En contraste la actividad medida en condiciones de alta fuerza iónica (Mn^{++} y NH_4^{+}) revela un importante aumento alrededor de las 6 hs p.i. Esta activación desaparece cuando comienza la producción de viriones libres.

Es interesante destacar que también en las células infectadas con el virus de Influenza se ha encontrado una disminución de la actividad correspondiente a la RNA polimerasa I, de ubicación nucleolar, por debajo de los valores normales[71]. Como para este virus se ha descrito un antígeno nucleolar [36] que participa de la replicación, sería interesante saber si el mismo fenómeno existe en el caso del virus Junín.

La actividad transcripcional aumentada en las células infectadas con virus Junín puede deberse tanto a un aumento en la habilidad catalítica de la RNA polimerasa, la que por ejemplo puede estar modificada por el virus, como

a una alteración en la disponibilidad del templado. En el caso de las células tumorales se ha descrito una proteína (Factor S II) que estimula la actividad de la RNA polimerasa II sobre el DNA nativo como templado. Como esta enzima de ubicación nucleoplásmica transcribe los RNA mensajeros celulares, nuestros resultados sugieren que serían necesarios en la replicación del virus Junín especies de dichos RNA en tiempos tempranos p.i. La participación de la RNA polimerasa II es sugerida también por los datos de la Tabla 16.

Síntesis de RNA nuclear

En la búsqueda de otro parámetro bioquímico que se correlacionara con el aumento de actividad correspondiente a RNA polimerasa II, analizamos la síntesis de RNA nuclear en una etapa temprana p.i. El aislamiento de los núcleos inmediatamente concluída la marcación permitió observar que en ellos no se detecta el significativo aumento en la incorporación celular (Gráfico 3) que había sido atribuído al procesamiento entonces utilizado. En este caso (Tabla 17) ambos núcleos, normal e infectado, incorporan porcentajes equivalentes respecto del total incorporado por la célula (7% y 4% respectivamente) a las 2 hs p.i. También son equivalentes los porcentajes a las 6 hs p.i. (25% y 30%) pero en este tiempo la diferencia que no se detecta en el RNA total celular, aparece claramente en el RNA sintetizado en los núcleos: los núcleos infectados incorporaron un 40% más que los núcleos normales.

Tratando de correlacionar este aumento con el proceso de infección viral y considerando que la actividad de RNA polimerasa II comenzaba a aumentar entre las 4 y 6 hs p.i., se eligió el tiempo de 4 hs para medir la influencia de la multiplicidad de infección en la incorporación de uridina tritiada (Tabla 18). Es de destacar que la diferencia de incorporación observada en la síntesis de RNA total, para m.i. = 1 no se detecta en el RNA sintetizado por la fracción nuclear. Los de menor multiplicidad de infección incorporan un menor porcentaje de uridina tritiada en la fracción nuclear respecto de su total en la célula. Es decir que la medida de este último parámetro no solo no refleja lo que ocurre en la fracción nuclear sino que es francamente opuesto. Para una mayor multiplicidad de infección, se detecta una mayor síntesis de RNA en los núcleos.

Si es el núcleo el lugar donde hay que estudiar la síntesis de macromoléculas inducidas por el virus, es importante investigar si la α-Amanitina influye en forma diferencial sobre la síntesis de RNA en las células infectadas a lo largo del proceso de infección. Esta serie de experimentos se diferencian de aquellos en los que se midió el rendimiento de virus en presencia de amanitina, en que se sometieron las células a un tratamiento previo con DEAE-dextrán para permitir la rápida entrada de la droga. El tiempo elegido estuvo entre las 4 y 7 hs p.i.

Se observa que el tratamiento con la droga produce una mayor inhibición en las células infectadas que en las control, de modo tal que las curvas de incorporación correspondientes se invierten en presencia de la droga (Gráfico 5). Los porcentajes de inhibición calculados en las células normales coin

ciden con los encontrados por otros investigadores en las células Vero, pero el análisis del Gráfico 5 parece indicar que el porcentaje de inhibición en las células infectadas varía en función del tiempo p.i.

Con el objeto de detectar mejor este grado diferencial de inhibición se decidió medir un RNA acumulativo en tiempos posteriores a las 4 hs p.i. No se midió antes de dicho tiempo ya que la síntesis inespecífica observada en el Gráfico 3 (y reflejada también en el Gráfico 5) podía confundir los resultados. Un pulso de 2 hs (Gráfico 6) permite detectar también un grado de inhibición cercano al 30% en presencia de α-Amanitina respecto del control sin la droga. Los pulsos de mayor tiempo no dan resultados interpretables probablemente porque el efecto de la degradación es más importante que la síntesis.

Trabajando con un intervalo de marcación de 2 hs se decidió determinar los porcentajes de incorporación de uridina tritiada entre las 3 y las 7 hs p.i. En la Tabla 19 se resumieron dichos porcentajes, calculados en presencia de la droga, respecto de los valores de incorporación que se obtienen en su ausencia. En todos los puntos del ensayo control se encuentra un grado de incorporación equivalente. En cambio en los cultivos infectados con virus Junín parece existir entre las 3 y 5 hs p.i. una síntesis de RNA no dependiente de α-amanitina que podría ser especificamente viral. El máximo de inhibición por acción de la droga estaría entre las 4 y 6 hs p.i.

Estos datos coinciden con la síntesis aumentada de RNA polimerasa II a las 6 hs p.i. (Gráfico 4). Dicha enzima se relacionaría directamente con la síntesis de RNA dependiente de α-Amanitina, detectada en los distintos pulsos, aún cuando otros investigadores proponen que la contribución de la RNA

polimerasa en CEF, para medir síntesis de RNA a través de la incorporación de Uridina-H^3 no es muy importante[71]. En este aspecto los experimentos realizados con pulsos de 2 hs parecen ser más precisos que los enzimáticos, pues ya entre las 5 y las 7 hs p.i. (Tabla 19) los valores de incorporación en presencia de α-Amanitina equivalen a los de un material normal, hecho no visible en el gráfico de las actividades enzimáticas. Es probable que a las 8 hs p.i. exista aún enzima activa con un templado externo, como aparece en el Gráfico 4, que sin embargo no actúe en el proceso de replicación, influenciada por ejemplo por algún mecanismo de regulación. De todas maneras la metodología de los pulsos proporciona datos indicativos y es probable que se necesiten utilizar DNA complementario al mRNA para detectar específicamente la síntesis de los RNA atribuíbles al virus[72].

Enzimas asociadas al virión

RNA polimerasa dependiente de RNA

Los Arenavirus se clasifican entre los virus que tienen un RNA de polaridad negativa y por lo tanto deben tener una transcriptasa asociada al virión.

La detección de esta enzima ha sido extremadamente dificultosa para los distintos integrantes del grupo ya que sólo se ha encontrado en el virus Pichindé[22]. Los datos que se presentan en la Tabla 20 sugieren fuertemente que también está presente en los viriones de Junín. Para arribar a esta conclusión fue necesario tener en cuenta distintas consideraciones.

Una de ellas es la cantidad de proteína viral fresca de que se dispone, y otra es la cantidad de nucleótido marcado presente en la mezcla de reacción. Con respecto al primer punto consideramos que sólo un 1% del total de proteínas correspondería a la replicasa buscada, por lo que se trató de perfeccionar el método de purificación que proporcionara la mayor cantidad de proteína viral en el menor volúmen posible.

Cuando se sometió el virus purificado según se indicó en Materiales y Métodos al proceso de cromatografía en columna de Sephadex G-25, no se perdió la infectividad, pero la dilución a la que se sometió la muestra llegó a ser de 1:5, según el volúmen de virus sembrado. Por lo tanto este proceso cromatográfico se reservó para ser utilizado en los casos en que el volúmen inicial de virus que se disponía era mayor de cinco litros.

Con respecto a la cantidad de nucleótido caliente que se incorporó al RNA sintetizado, el análisis de los datos proporcionados por los distintos investigadores, nos llevó a disminuír la dilución del trinucleótido con la cual se comenzaron a hacer las determinaciones. Así, mientras para el virus de Influenza basta con 10,5 μ para los virus VSV y NDV se usa 1 mμ. En nuestro caso una dilución del orden de 1:5 de la solución de GTP original determinó que se pudiera agregar a la mezcla de incubación sólo 890 pmoles.

Otro aspecto importante es la existencia de RNAsa contaminante, la cual es comúnmente inhibida en las técnicas de aislamiento de polisomas, por ejemplo con policationes como sulfato de polivinilo o sulfato de dextrán. Como se ha visto que las RNA polimerasas virales también son afectadas por la pre

sencia de dichas sustancias[50,57] resulta peligroso el uso de estos inhibidores. Como alternativa recurrimos al agregado de RNA externo, que aunque no actúa como patrón para la replicasa puede ser usado como sustrato preferencial de la RNAsa (Sección 18 de Materiales y Métodos). Con tal fin en algunos experimentos se agregó RNA de levadura purificado sin lograrse resultados satisfactorios.

La temperatura óptima que se usa en la determinación de RNA polimerasa dependiente de RNA es variable, depende del virus con que se trabaje y de los cationes incluídos en la mezcla de reacción. Así Skehel, J.[52], encontró una temperatura óptima de 40°C para la enzima del virus de Influenza, usando Mn como catión. Como también debe tenerse en cuenta la acción de la RNAsa, que aumenta su actividad por encima de 30°C[117], y que en el caso de los Mixovirus alcanza a hidrolizar un 15% del RNA total a menos de 30°C, adoptamos una temperatura intermedia de 32°C y un tiempo de incubación de 30 minutos. También la actividad polimerásica del virus Pichindé es mayor a 32°C[22].

Con todas estas consideraciones tenidas en cuenta (proteína viral, cantidad de trinucleótido marcado, existencia de RNAsa contaminante), abordamos la caracterización de los cationes divalentes necesarios para determinar la actividad de la enzima. El ión Mg^{++} proporciona una mayor actividad tanto para la mezcla de reacción común como para su combinación con Na^{+}, frente al otro catión divalente probado (Mn^{++}) (Tabla 20). Pero las diferencias de los valores de incorporación son del orden de 30% en contraste con la ac

tividad de la polimerasa de VSV que requiere iones Mg no sustituíbles por Mn. De los dos cationes monovalentes probados, Na^+ y NH_4^+, el más efectivo parecería ser el primero.

Al realizar estas determinaciones se consideró el posible arrastre de iones amonio, que pudieran quedar en el preparado de virus e interferir con la actividad enzimática. Para establecer la presencia de este ión se aplicó la reacción de Berthelot[39] por considerarse una de las más sensibles. El resultado,probado con virus tratado con ClNa y conservado durante un mes a -20°C, fue negativo, descartándose así una contribución de ión amonio a la mezcla de la reacción.

En la Tabla 21 se observa que la mezcla completa incluyó los dos cationes divalentes,hecho que en virus de Influenza, cepa WSN, aumenta la actividad. Si se saca el ión Mn, como se observó en la Tabla 20, no varía mucho la actividad medida, en cambio sí se reduce totalmente si se sacan GTP o CTP de la mezcla de reacción. En el caso de la RNA polimerasa del virus Pichindé la incorporación decrece tanto si se saca el ión Mn como el Mg[22].

Con respecto al detergente NP-40 se verificó un 60% de acción enzimática si se elimina de la mezcla, procentaje que puede representar la actividad presente en los viriones rotos durante el proceso de purificación. Este detergente puede ser reemplazado por bromuro de trimetil-cetil amonio (datos que no se muestran), pero nó por lisolecitina o Tritón NP-40 ya que en estos dos últimos casos los resultados son negativos.

La poca incorporación detectada cuando se agrega RNAsa a la mezcla de reacción, señala que la actividad enzimática puede corresponder a una RNA polimerasa.

Este último ensayo no es propio de esta enzima solamente ya que los datos aportados por Leung, W.[63] señalan que existen 3 actividades de polimerasas en Pichindé, todas las cuales son sensibles a RNAsa y resistentes a DNAsa y Actinomicina D.

Así existe una poli U polimerasa (dependiente de Mg^{++}), una poli A polimerasa dependiente de Mn^{++} y una actividad de transcriptasa que actúa como Mg^{++} y Mn^{++}. Las dos primeras se corresponden con una actividad polimerásica de las células normales, que están asociadas a los ribosomas de los Arenavirus.

La actividad de RNA transcriptasa según este autor debe determinarse sobre la ribonucleoproteína obtenida de gradientes de sacarosa, para elevar a un mínimo la actividad de ribonucleasa la que existe en el virus tratado con detergente. También aconseja usar siempre virus fresco, ya que las otras dos actividades de polimerasa son relativamente más estables.

Sin embargo la actividad específica de transcriptasa del virus Pichindé sigue siendo baja cuando se compara con la de VSV. Los valores[63] corresponden a 15 pico moles/mg de proteína a partir de la preparación de ribonucleoproteína y el máximo valor obtenido por nosotros fue de 13 pico moles por mg de proteína en el virus total.

Estos valores a pesar de ser bajos están en el rango de actividad asociada al virus de sarampión, paperas o rabia. Comparando con la transcriptasa del virus de Influenza cuyo producto complementa en un 95% con el RNA viral, solamente el 23% del genoma de Pichindé es transcripto por la enzima,

por lo tanto se supone que existe algún factor en las células infectadas, que está ausente en el virión. Esta última posibilidad también fue considerada por nosotros, de allí que en una serie de experimentos se agregó al sistema de reacción un extracto de citoplasma de células infectadas (datos no presentados), pero los resultados no resultaron satisfactorios.

También se ha propuesto que la actividad de RNA polimerasa puede verse dificultada si existen fosfodiesterasas[63].

La actividad de NTPasa puede ser una de las funciones de una enzima que también actúa como fosfodiesterasa, hidrolizando el grupo $R-O-PO_3^{=}$.

En nuestros preparados de virus Junín probamos que la actividad de NTPasa existe y por lo tanto podría contribuír también a dificultar la determinación de transcriptasa.

El virus Junín entonces aparte de la NTPasa puede tener una RNAsa, una poli-U y poli-A polimerasa, tal como ocurre con Pichindé.

Los resultados aquí presentados coinciden en una acción de transcriptasa pues:

a.- la síntesis ocurre si los 4 trinucleótidos están presentes, la omisión de uno de ellos disminuye drásticamente la incorporación.

b.- la síntesis se anula cuando no se usa virus fresco. Si la actividad medida inicialmente hubiera sido la de poli-U polimerasa no hubiéramos observado la influencia de congelamiento a -70°C[63].

Para completar el estudio sería necesario probar que la polaridad del RNA sintetizado in-vitro es complementaria a la del virión.

Nucleósido 5'-trifosfatasa

Las enzimas responsables de la hidrólisis de los sustratos de la RNA polimerasa a sus derivados difosfatados, han sido localizadas y ampliamente estudiadas para algunos virus.

Para el Reovirus[54] se ha postulado que la actividad de NTPasa está asociada a la misma proteína que tiene acción de polimerasa. Así como en los Deoxivirus[43] se supone que una ATPasa participa de la regulación de los procesos de replicación del DNA y la transcripción, también para los virus a RNA de doble cadena se relaciona la actividad ATPásica con el procesamiento del RNA mensajero, probablemente a través de la regulación de la actividad de la RNA polimerasa.

En nuestro caso los primeros ensayos hechos para determinar la actividad de replicasa daban cuentas muy variables en el punto equivalente al tiempo cero de incubación (t = 0), para varias series de experimentos con distintos componentes en la mezcla de reacción, por lo que sospechamos la acción de una NTPasa que destruyera el trinucleótido que se usaba para marcar y que de alguna forma compitiera con la actividad que se quería determinar. Los resultados muestran que dicha actividad existe en presencia de Mg^{++} y NH_4^+ (Gráfico 7). En el caso de la ATPasa de para Influenza, también el ión Mg es más efectivo que el Mn^{++} y tampoco es necesaria la presencia del detergente.

La presencia de una hidrolasa que destruya el sustrato de la polimerasa provee un mecanismo de regulación de la actividad de esta última[54], por eso es común la necesidad de un sistema regenerador de trifosfato si se quiere una síntesis contínua de RNA.

Según se deduce del gráfico 8 la actividad de GTPasa en el virus Junín también se encuentra en la fracción normal, por lo tanto la enzima es producto de la contaminación celular y no se encuentra en el virión. El hecho que no se necesite la ruptura de las partículas virales con detergente para detectar la actividad hidrolítica indicaría que las enzimas se localizan en la superficie del virus Junín y esto también sugiere su origen celular. Asímismo en el caso de Influenza A la contaminación celular que no alcanza al 1% de proteína, en partículas altamente purificadas, es responsable de actividad de fosfohidrolasa y RNAsa[83].

Por una parte concluímos que se necesita una purificación más rigurosa del virus para determinar la RNA polimerasa, pero tampoco se puede excluír la posibilidad que el virus incorpore dicha enzima de la célula huésped antes o durante el proceso de brotación. En este caso sólo un exhaustivo análisis de la actividad e inhibición en presencia de distintos iones y el grado de afinidad respecto de los nucleótidos podría determinar unívocamente si la enzima es un contaminante celular o está codificado por el genoma viral. Consideramos que dichos estudios no eran el objeto de este trabajo.

Distintos aspectos del compromiso celular en el proceso de replicación viral

Para el caso del virus Junín, así como para el resto de los Arenavirus no existen suficientes estudios sobre los pasos secuenciales de la replicación, ni los lugares donde ocurre la transcripción. Sin embargo hemos elabo

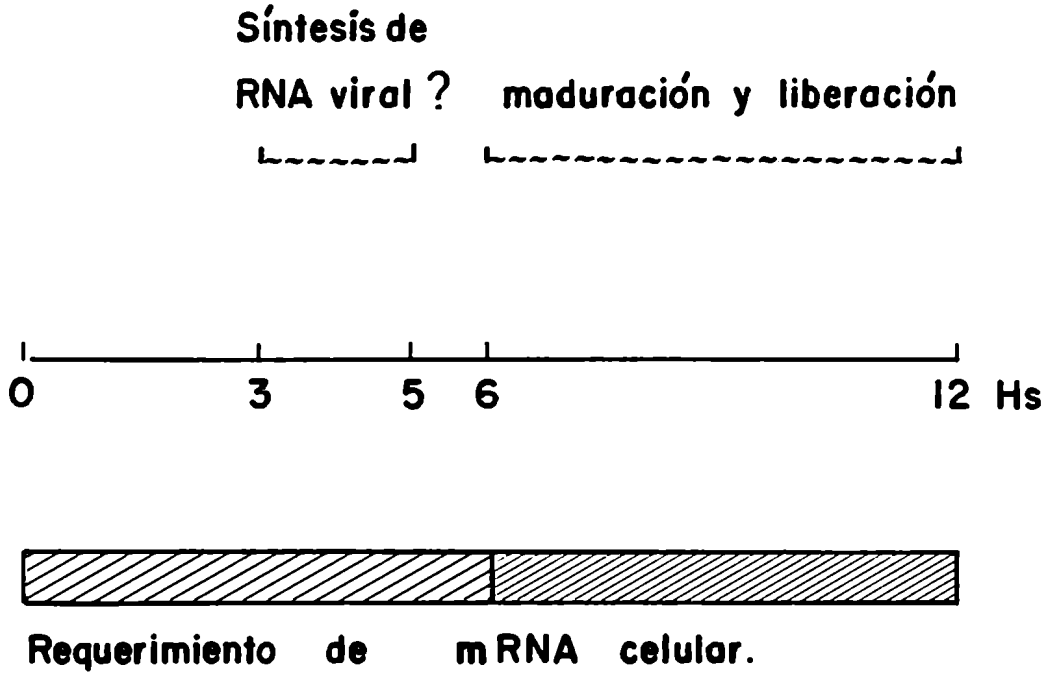
rado un diagrama para resumir los datos aportados por este trabajo de Tesis, asi como los de este laboratorio, intentando explicar la relación del virus Junín con las células Vero.(Figura 5)

La dependencia con la función nuclear, determinada por la α-amanitina se establece en forma fundamental entre las 0 y 6 hs p.i. Como no podemos descartar la influencia de la síntesis de mRNA celular en el resto de las etapas de la multiplicación viral, suponemos que después de las 6 hs p.i. el requerimiento es menor. Esta última conclusión deducida a partir de la producción de partículas virales en presencia de α-amanitina agregada en tiempos tardíos p.i., coincide con la probable existencia de una proteína celular requerida en el proceso de maduración (Sección 2.4.2. de Introducción). Cuando se quiso ajustar el tiempo de dependencia a través de experimentos más precisos, usando DEAE-dextrán y pulsos de dos horas para medir la síntesis de RNA, resultó por una parte confirmado el período de máxima inhibición entre las 4 y 6 hs p.i. Pero también se detectó una síntesis de RNA no influenciada por α-amanitina entre las 3 y 5 hs p.i. Este RNA acumulativo podría representar una síntesis de RNA viral que no se revela en pulsos cortos y queda enmascarado por el celular. En la misma figura 5 hemos incluído el proceso de salida de la partícula viral como un paso que lleva un total de 6 horas, según los datos provistos por León, M.[60].

También hemos intentado correlacionar la síntesis de mRNA viral, con los procesos que normalmente ocurren en la célula, a través del estudio de la acción de la cordicepina sobre la multiplicación del virus Junín.

Figura 5

Eventos actualmente conocidos en la multiplicación del virus Junín



La adición de un segmento de poli-A al RNA heterogéneo nuclear, es un evento que ocurre normalmente en el núcleo de la célula de mamíferos una vez completada la transcripción y la cordicepina lo bloquea de manera tal que las moléculas de mRNA no llegan al citoplasma.

El estudio con esta droga se inició buscando una concentración que no afectara la morfología celular en un período de 24 hs, que es cuando se miden de rutina los rendimientos de los sobrenadantes. Una concentración de 50 µg/ml de cordicepina, determinó un 66% de inhibición en la síntesis de RNA total celular, después de 6 hs de tratamiento con la droga. Esta inhibición se consideró satisfactoria, según resultados publicados por Darnell[34]. Cuando se midió el grado de inhibición sobre las distintas líneas de células Vero que estaban en este laboratorio, se encontró que la misma dependía de la historia previa y del estado metabólico de las células, tal como se había observado en otros sistemas celulares[98]. En nuestro caso la multiplicación viral a las 24 hs p.i., medida en las células Vero M no resultó afectada, tanto para el virus Junín como para el Tacaribe, aún cuando se hizo un pretratamiento de 4 hs con cordicepina.

Si suponemos que el RNA mensajero viral debe llevar como todos los mensajeros, una secuencia de poli-A, los resultados inducen a pensar que no hay síntesis " de novo" del polinucleótido, después de una infección con estos virus, que pueda ser interferida por la cordicepina.

Otro aspecto considerado, en la relación del virus Junín con la célula huésped fue la aparición de enzimas en las células después de la infección

viral. Es de especial interés estudiar las RNA polimerasas dependiente de RNA, ya que su templado permite suponer que la enzima no estaba presente antes de la infección y por lo tanto no pertenece al espectro de las enzimas celulares. Nosotros buscamos la actividad en las células Vero infectadas con virus Junín, efectuando los correspondientes controles con células normales en las que se simuló la infección. Los resultados sugieren la presencia de una actividad sintetizante de RNA en presencia de Actinomicina D, que es temprana en el núcleo (4 hs) y luego pasa al citoplasma (9 hs). Dicha actividad no se detectó sin embargo en la fracción microsomal que suele ser rica en RNA polimerasas de otros virus a RNA. La actividad nuclear temprana puede deberse a la acción de la enzima que el virus trae consigo y coincidiría con la síntesis de RNA señalada en la Figura 5. Si todos los procesos posteriores a la transcripción primaria ocurren en el citoplasma, la actividad detectada en éste más tarde, es la que corresponde al virus que está siendo ensamblado.

CONCLUSION

De los datos aquí presentados podemos resaltar la demostración de la participación del núcleo celular en la replicación viral a través del efecto inhibitorio que ejerce la α-Amanitina sobre la multiplicación del virus Junín, de la acción de la droga en la síntesis de RNA y de la inducción de la RNA polimerasa II.

También se sugiere la presencia de actividad de transcriptasa en el virión que corrobora el hecho que los Arenavirus tienen RNA de polaridad negativa.

BIBLIOGRAFIA

1.- Adesnik, M.; Salditt, M.;Thomas, W. and Darnell, J.E.
"Evidence that all messenger RNA molecules (except Histone Messenger RNA) contain Poly (A) Sequences and that Poly (A) has a Nuclear function".
J.Mol.Biol. 71: 21-30, 1972.

2.- Añon, M.C.; Grau, O.; Martínez Segovia, Z. and Franze Fernández, M.T.
"RNA composition of Junin virus".
J. Virol. 18: 833-838, 1976.

3.- Armstrong, S.J. and Barry, R.D.
"The detection of virus induced RNA synthesis in the nuclei of cells infected with Influenza virus".
Negative Strand Viruses, 1 Cap. 33: 491-499, Ac. Press, London, 1975.

4.- Arora, D.J.S.; Pavilanis, V.; Soula, A.; Robert, P. and Croteau, G.
"Influenza virus associated RNAse".
Can. J. Microbiol. 22: 57-63, 1976.

5.- Bablanian, R.; Eggers, H.J. and Tamm, I.
"Studies on the mechanism of poliovirus induced cell damage. I. The relation between metabolic of morphological alterations of cultured cells".
Virology. 26: 100-113, 1965.

6.- Bachrach, H.

"Comparative strategies of animal virus replication".

Adv. Virus Res. 22: 163-186, 1978.

7.- Baltimore, D.

"Expression of Animal Virus Genomes".

Bacteriol. Rev. 35: 235-241, 1971.

8.- Ball, C.R.; Van den Berg, H.W. and Poynter, R.W.

"The Measurement of radiactive Precursor incorporation into Small Monolayer cultures".

Methods in Cell Biology. Vol. XIII Chapter 18. p 349-360. Ed. by D. M. Prescott. Ac. Press. N. Y. 1973.

9.- Banerjee, A.

"In Vitro Synthesis of RNA that contains Polyadenylate by Virion Associated RNA Polymerase of V.S.V.".

Proc. Natl. Acad. Sci. 70: 3566-3570, 1973.

10.- Bishop, D.H.L. and Flamand, A.

"Transcription processes of animal RNA viruses".

Control Processes in virus multiplication. Ed. Burke, D.C. & Russel, W.C. Cambridge University Press, Cambridge, 1975.

11.- Bishop, D.H.L.
"Molecular and genetic Properties of Arenaviruses".
Medicina (Bs.As.) 40:275-288, 1980.

12.- Bitter, G. and Roeder, G.
"Transcription of viral genes by RNA Polymerase II in nuclei isolated from Adenovirus 2 Transformed cells".
Biochemistry, 17:2198-2205, 1978.

13.- Borsa, J.; Grover, J. and Chapman, J.D.
"Presence of Nucleoside Triphospate phosphohidrolase activity in purified virions of Reovirus".
J. Virol. 6 N°3, 295-302, 1970.

14.- Buchmeier, M.J.; Welch, R.M.; Oldstone, M.B.
"Protein structure of LCMV".
Abst. ASM, N. Orleans, p.344, 1977.

15.- Buchmeier, M.J.; Elder, J. and Oldstone, M.B.
"Protein structure of LCMV: identification of the virus structurals cells associated Polypeptides".
Virology. 89: 133-145, 1978.

16.- Buchmeier, M.J.; Gee, S.R. and Rawls, W.E.
"Antigens of Pichinde virus".
J. Virol. 22: 175-186, 1977.

17.- Buchmeier, M.J. and Oldstone, M.B.A.
"Protein structure of Lymphocytic Choriomeningitis virus: Evidence for a cell-associated Precursor of the virion glycopeptides".
Virology, 99: 111-120, 1979.

18.- Buck, L. and Pfau, C.J.
"Inhibition of lymphocytic choriomeningitis virus replication by Actinomicin Dand 6-azauridine".
Virology 37: 698-701, 1969.

19.- Burton, K.
"A study for the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleicacid".
Biochem. J. 62:315-323, 1956.

20.- Campadelli-Fiume, G.
"Amanitins in Virus Research".
Archives of Virology. 58:1-13, 1978.

21.- Carter, M.F.; Biswal, N. and Rawls, W.E.
Characterization of nucleic acid of Pichinde virus".
J.Virol. 11: 61-68, 1973.

22.- Carter, M.F.; Biswal, N. and Rawls, W.E.
"Polymerase Activity of Pichinde virus".
J.Virol. 13: 577-583, 1974.

23.- Colonno, R. and Stone, H.
"Methylation of messenger RNA of NDV in-vitro by a Virion associated enzyme".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 42: 2611-2615, 1975.

24.- Compans, R.W. and Caliguri, L.A.
"Replication of Influenza Virus: Studies on Shyntesis of Membrane componentes and on a purified viral RNA Polymerase".
Neg. Strand Viruses. 2: 573-594, 1975, Ac. Press.

25.- Coto, C.; León, M. y Help.
"Rol del genoma del huésped en la multiplicación del virus Junín (FHA)".
Acta Bioq. Clínica Latinoamericana, Vol IX N°4, 247-257, 1975.

26.- Coto, C.; Weissenbacher, M. y Calello, M.A.
"Protección del cobayo contra la FHA por inoculación de virus del complejo Tacaribe".
Medicina (Bs.As.) 3: 9-16, 1976.

27.- Coto, C.; Zaharzevskij, L. y Parodi, A.
"Localización subcelular del virus Junín en cerebro de ratón lactante. Estudio de infectividad".
Rev. Soc. Argent. Biol. 41: 128-134, 1965.

28.- Coto, C.; Vombergar, M.D. de y Tkavzevski, L.Z.de
"Interacción del virus Junín con células de riñón de mono".
Medicina (Bs.As.) 3, supl. 1: 38-44, 1970.

29.- Coto, C.E.; León, M.E.; Peralta, L.M.: Help, G. and Laguens, R.P.
"Induction of infectious viral and viral surface antigen in Vero cells persistently infected with Junin virus".
Humoral Immunity in Neurological Diseases. Ed. Karcher, Lowenthal and Strosberg A. Plenum Publishing Corporation. 405-415, 1979.

30.- Coto, C.E. and Vombergar, M.D. de
"The effect of 5-Iododeoxyuridine and Actinomicin D on the multiplication of Junin virus".
Arch. ges. Virusforsch. 27: 307-316, 1969.

31.- Coto, C.E. and Help, G.I.
"Inhibition of Junin (AHF) multiplication in U.V. irradiated cells".
Medicina (Bs.As.) 31: 417-421, 1971.

32.- Chow, N. and Simpson, R.W.
"RNA-dependent RNA polymerase activity associated with virions subviral particles of Mixoviruses".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68: 752-756, 1971.

33.- Damonte, E.B. y Coto, C.E.
"Análisis de los factores que condicionan la formación de placas en células Vero infectadas con los virus Junín y Tacaribe".
Rev. Asoc. Arg. Microbiol. 6: 15-22, 1976.

34.- Darnell, J.E.; Phillipson, L.; Wall, R. and Adesnik, K.M.
"Polyadenylic Acid Sequences: Role in Conversion of Nuclear RNA into Messenger RNA".
Science, 174: 507-510, 1971.

35.- Davidson, J.N.
"The biochemistry of the Nucleic Acid Chapter XI. The replication and Biosynthesis of DNA".
Methuen & Co. Ltd. London 189-235. 1968.

36.- Dimmock, N.
"New virus- Specific Antigens in cells infected with Influenza virus".
Virology, 39: 224-234, 1969.

37.- Farber, F.E. and Rawls, W.E.
"Isolation of ribosome like structures from Pichinde virus".
J. Gen. Virol. 26: 23-31, 1975.

38.- Fenner, F.
"Classification and Nomenclature of viruses".
Intervirology 7, N° 1-2, 1976.

39.- Fister, H.

"Manual of Standardized Procedures for Spectrophotometric chemistry".

St. Sc. Supply Corp. N.Y. 1950.

40.- Fiume, L. and Wieland, T.

"Amanitin, chemistry and action".

FEBS Letters. 8: 1-5, 1970.

41.- Galet, H. and Prevec, L.

"Poly A synthesis by extracts from L cells infected with VSV".

Nature NB, 243: 200-203, 1973.

42.- Gangemi, D.; Rosato, R.; Connell, E. ; Johnson, E. and Eddy, G.

"Structural Polypeptides of Machupo Virus".

J. Gen. Virol. 41: 183-188, 1978.

43.- Gold, P. and Dales, S.

"Localization of nucleotide phosphohydrolase activity within vaccinia".

Proc. Natl. Acad. Sci. 60, 3, 845, 1968.

44.- Goldberg, I. and Friedman, P.

"Antibiotics and Nucleic Acids".

Ann. Review of Biochem. 40: 775-810, 1971.

45.- Gregoriades, A.

"Actinomicin D and Influenza Virus multiplication in the chick Embryo

Fibroblast".
Virology. 42: 905-916, 1970.

46.- Guerrero, L.B. de; Weissenbacher, M.C. y Parodi, A.S.
"Inmunización contra la FHA con una cepa atenuada del virus Junín. I. Estudio de una cepa modificada del virus Junín. Inmunización de cobayos".
Medicina (Bs. As.) 29: 1-5, 1969.

47.- Hastie, N.D. and Mahy, B.W.
"RNA dependent-RNA polymerase in nuclei of cells infected with Influenza virus".
J. Virol. 12: 951-961, 1973.

48.- Help, G.I.
"Biogénesis de partículas interferentes y su posible rol en las infecciones por virus Junín".
Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. U.B.A. 1980.

49.- Help, G.; Coto, C.E. y Tkaczevski, L.Z. de
"Evaluación de un método de purificación del virus Junín (FHA)".
Medicina (Bs. As.) 30, Supl. 1: 15-21, 1970.

50.- Ho, P.P. and Walters, C.P.
"Influenza Virus. Induced Ribonucleic Acid Nucleotidyl transferase and the effect of Actinomycin D on its formation".
Biochemistry. 5: 231, 1966.

51.- Horisberger, M.A. and Brambilla, R.
"The virion associated and cell-associated in vitro activities of the Influenza RNA polymerase".
Negative Strand Viruses and the Host cell. Ed. Mahy, B.W.J. y Barry, R.D. p 341-347, 1978. Ac. Press. Londres.

52.- Hruby, D.E.; Lynn, D.L. and Kates, J.
"Vaccinia virus replication requieres active participation of the host cell transcriptional apparatus".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 1887-1890, 1979.

53.- Imblum, R. and Wagner, R.
"Protein kinase and Phosphoproteins of VSV".
J. Virol. 13:113-124, 1974.

54.- Kapuler, A.; Mendelsohn, N.; Klett, H. and Acs, G.
"Four-base specific Nucleoside 5'-Triphosphatases in the subviral core of Reovirus".
Nature 225, 1209-1213, 1970.

55.- Kelly, D.C.; Avery, R.J. and Dimmock, N.
"Failure of an Influenza virus to initiate infection in enucleate BHK cells"
J. Virol. 13: 1155-1161, 1974.

56.- Kolthoff, I.M. and Sandell, E.B.

"Tratado de Química Analítica Cuantitativa".
Ed. Nigar, Bs. As., 1960.

57.- Krug, R.M.; Plotch, S.J. and Tomasz, J.
"Influenza viral RNA transcription in-vivo and in-vitro".
Negative Strand Viruses and the Host cell. Ed. Mahy, B.W.J. y Barry, R.D.
p 301-311, 1978. Ac. Press, Londres.

58.- Lamb, R.A.; Chopin, P.W.
"Synthesis of Influenza virus polypeptides in cells resistant to α-amanitin: evidence for the involvement of celular RNA polymerase II in viral replication".
J. Virol. 23: 816-819, 1977.

59.- La Placa, M., Campadelli-Fiume, G.; Costanzo, f. and Foa, L.
"Influence of virus Infection on cellular DNA-dependent RNA polymerase Activities".
Neg. Strand Viruses. 1.: 513-521, 1975. Ac. Press.

60.- León, M.
"Drogas inhibidoras de la multiplicación del virus Junín".
Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA. Año 1978.

61.- Leung, W.; Ghosh, H.J. and Rawls, W.
"Strandedness of Pichinde virus RNA".
J. Virol. 22(1): 235-237, 1977.

62.- Leung, W. and Rawls, W.
"Virion-Associated Ribosomes are not required for the replication of Pichinde Virus".
Virology. 81: 174-176, 1977.

63.- Leung, W.C.
"The replication of Pichinde Virus-an Arenavirus".
Negative Strand Viruses and the Host cell. Ed.Mahy B.W.J. y Barry R.D. Ac.Press. Londres, p. 415-426, 1978.

64.- Leung, W.C.
Abstracts for the IV International Congress for Virology. p 446.
Centre for Agric. Publish & Documentation, The Netherlands, 1978.

65.- Lindell, T; Weinberg, F.; Morris, P.W.; Roeder, R.G. and Rutter, W.J.
"Specific Inhibition of RNA polymerase by α-amanitin".
Science. 170: 447-449, 1970.

66.- Lobban, P.E. and Siminovitch, L.
"The RNA Polymerase II of an α-Amanitin-Resistant chinese Hamster Ovary Cell Line".
Cell. 8: 65-70, 1976.

67.- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J.
"Protein Measurement with the Folin-phenol reagent".
J.Biol.Chem. 193: 265-275, 1951.

68.- Mahy, B.W.J.; Barret, T.; Briedis, D.J.; Brownson, J.M. and Wolstenholme, A.J.
"Influence of the host cell on Influenza virus replication".
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 288, 349-357, 1980.

69.- Mahy, B.W.J.; Hastie, N.D.; Raper, R.H.; Brownson, J.M. and Carroll, A.R.
"RNA Polymerase activities of nuclei from Influenza Virus infected cells".
Negative Strand Viruses 1. Cap.30: 445-467, 1975. Ac. Press.London.

70.- Mahy, B.W.J. and Bromley, P.A.
"In vitro product of a ribonucleic acid polymerase induced by Influenza virus".
J. Virol. 6: 259-269, 1970.

71.- Mahy, B.W.J.; Hastie, N. and Armstrong , S.
"Inhibition of Influenza virus replication by α-amanitin: mode of action".
Proc. Nat. Acad. Sci. 69:1421-1424, 1972.

72.- Mark, G.; Taylor, J.M.; Broni, B. and Krug, R.
"Nuclear Accumulation of Influenza Viral RNA transcripts and the effects of cicloheximide, Actynomicin-D and α-amanitin".
J. Virol. 29:744-752, 1979.

73.- Martínez Segovia, Z.; De Mitri, M.I.; Grau, O.; Añóm, M.C. y Franse-Fernández, M.
"Estudios bioquímicos del virus Junín".
Medicina (Bs.As.) 37: Supl.3 18-25, 1977.

74.- Martínez Segovia, Z. and Grazioli, S.
"The nucleic acid of Junin virus".
Acta Virológica. 13: 264, 1969.

75.- Martínez Segovia, Z. ; De Mitri, M.I.
"Junin virus structural proteins".
J.Virol. 21:579-583, 1977.

76.- Mc Auslan, B.R.
"Enzimes specified by animal DNA viruses".
En: "Strategy of the viral genome" G.E.W. Wolstenholme and M.O'Connor eds. CIBA. Symposium. p 25-44, 1971. Churchill-Livington, London.

77.- Mersich, S.; León, M.E. and Coto, C.E.
"Cell Nucleus Participation in the multiplication of the Arenavirus Tacaribe".
FEMS Microbiology Letters 6:205-207, 1979.

78.- Mifune, K.; Carter, M. and Rawls, W.
"Characterization studies of Pichinde virus member of the Arenavirus group".
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136: 637-644, 1971.

79.- Moyer, S. and Summers, D.
"Phosphorilation of VSV in vivo and in vitro".
J. Virol. 13: 455-465, 1974.

80.- Munyon, W.; Paoletti, J.; Ospino, J.; Grace, J.T.
"Nucleotide phosphohydrolase in purified vaccinia virus".
J. Virol. 2: 167-172, 1968.

81.- Murphy, F.A. and Whitfield, S.G.
"Morphology and morphogenesis of arenaviruses".
Bull of W.H.O. 52: 409-419, 1975.

82.- Neurath, A.R.
"Study on the adenosine diphosphatase(adenosine triphosphatase) associated with Sendai virus".
Acta Virol. 9: 313-322, 1965.

83.- Oxford, J.S.
"Polypeptide Composition of Influenza B Viruses and Enzymes associated with the purified Virus Particles".
J. Virol. 12: N° 4, 827-835, 1973.

84.- Paladini, A and Leloir, F.
"Studies on Uridine Diphospate glucose".
Biochem. J. 51: 426-430, 1952.

85.- Palmer, E.; Obijeski, J.; Webb, P. and Johnson, K.
"The circular segmented nucleocapsid of an Arenavirus Tacaribe virus".
J. Gen. Virol. 36: 541-545, 1977.

86.- Pedersen, I.R.

"Different classes of ribonucleic acid isolated from lymphocytic choriomeningitis virus".

J. Virol. 11: 461-423, 1973.

87.- Pedersen, I.R.

"LCM virus: its purification and its chemical and physical properties".

LCM virus and other arenaviruses, Ed. by Lehmann-Grube, p 13-23, Berlín, Springer, 1973.

88.- Pedersen, I.R. and Konigshofer, E.P.

"Characterization of ribonucleoproteins and ribosomes isolated from Lymphocytic choriomeningitis virus".

J. Virol. 20: 14-21, 1976.

89.- Penhoet, E.; Miller, H.; Doyle, M. and Blatti, S.

"RNA-dependent RNA polymerase activity in Influenza virions".

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68: 1369-1371, 1971.

90.- Perez Villareal, L. and Holland, J.

"Poly (A). Synthesis in vitro by purified virions of VSV".

Nature NB. 246: 17-19, 1973.

91.- Pfau, C.

"Biochemical and Biophysical properties of the Arenavirus".

Prog. Med. Virol. 18: 64-80, Karger-Basel, 1974.

92.- Plotch, S.J. and Krug, R.
"Influenza Virion Transcriptase: Synthesis in-vitro of large polyadenylic acid containing complementary RNA".
J. Virol. 21:24-34, 1977.

93.- Raghow, R. and Kingsbury, D.
"Endogenous viral enzymes involved in messenger RNA production".
Ann. Rev. Microbiol. 30: 21-39. Ann.Rev. Inc. USA. 1976.

94.- Ramos, B.; Courtney, R.J. and Rawls, W.E.
"Structural proteins of Pichinde virus".
J. Virol. 10: 661-667, 1972.

95.- Rawls, W. and Buchmeier, M.
"Arenaviruses: purification and physicochemical nature".
Bull. of W.H.O. 52: N° 4,5,6, 393-401, 1975.

96.- Rawls, W.E.; Banerjee, S.N.; Mc Millan, C.A. and Buchmeier, M.J.
"Inhibition of Pichinde virus replication by Actinomicin D".
J. Gen. Virol. 33: 421-434, 1976.

97.- Reed, L.J. and Muench, H.A.
" A simple method of estimating fifty per cent end points".
Ann. J. Hyg. 27:493-497, 1938.

98.- Rochovansky, O. and Pons, M.W.
"The effect of cordycepin on Influenza virus replication".
Neg. Strand Viruses. 1: Cap. 32, 475-484, 1975. Ac. Press. London.

99.- Roeder, R.G.
"Nuclear RNA Polymerases".
in RNA polymerase. Losick,R.and Chamberlin, M. Eds.Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory, 285-330, 1976.

100.- Rosenbergova, M. and Pristasova
"Nuclease Activity of large RNA viruses".
Acta. Virol. 16: 1-8, 1972.

101.- Rott, R. and Scholtissek, C.
"Specific Inhibition of Influenza virus replication by α-amanitin".
Nature (London) 228: 56, 1970.

102.- Roy, P. and Bishop, D.H.L.
"Nucleoside triphospate phosphotransferase a new enzyme activity of oncogenic and non oncogenic budding viruses".
Bio.Bio.Acta, 235:191-206, 1971.

103.- Saharzevskij, L. de Tkaczevski; Coto, C. y Parodi, A.
"Localización subcelular del virus Junín en el cerebro del ratón lactante (Estudio de microscopía electrónica)".
Rev. Latinoam. Microbiol. 8:110-133, 1967.

104.- Saleh, F.; Gard, G. and Compans, R.
"Synthesis of Tacaribe Viral Proteins".
Virology. 93: 369-376, 1979.

105.- Scholtissek, C. and Rott, R.
"Ribonucleic Acid Nucleotidyl transferase induced in chick fibroblast after infection with an Influenza virus".
J. Gen. Virol. 4: 125-137, 1969.

106.- Shatkin, A.J.; Banerjee, A.K.; Both, G.W.
"Traslation of animal virus mRNA in vitro".
Mon. in Virology, Plenum Press. Cap. 1. 10: 1-71, 1977.

107.- Shenk, T.E. and Stollar, V.
"Defective interfering particles of Sinbdis Virus. I. Isolation and some chemical and biological properties".
Virology. 5: 162-173, 1973.

108.- Skehel, J.J.
"RNA-dependent RNA polymerase activity of the Influenza virus".
Virology 45: 793-796, 1971.

109.- Skehel, J.J.
"Ribonucleic Acid Synthesis in chick Embryo cells infected with Fowl-Plague virus".
J. Virol. 3: 429-438, 1969.

110.- Spooner, L. and Barry, R.
"Participation of DNA-dependent RNA polymerase II in replication of Influenza Virus".
Nature. 268: 650-652, 1977.

111.- Stallcup, M.; Ring, J. and Yamamoto, K.
"Synthesis of Mouse Mammary Tumour Virus Ribonucleic Acid in Isolated Nuclei from Cultured Mammary Tumour Cells".
Biochemistry. 17: 1515-1521, 1978.

112.- Tata, J.; Hamilton, M.J. and Shields, D.
"Effects of α-Amanitin in vivo on RNA Polymerase and Nuclear RNA Synthesis".
Nature N. Biol. 238: 161-163, 1972.

113.- Trowbridge, R.S.
"Lymphocytic Choriomeningitis Virus. Intercellular spread of the virus and the role of the host and of the virus in virion synthesis".
Ph. D. Tesis, Massachusetts, 1970.

114.- Vezza, A.C.; Clewley, J.P.; Gard, G.P.; Abraham, N.Z.; Compans, R.W. and Bishop, D.H.
"Virion RNA species of the Arenavirus Pichinde, Tacaribe and Tamiami".
J.Virol. 26: 485-497, 1978.

115.- Vezza, A.C.; Gard, G.; Compans, R. and Bishop, D.
"Structural components of the Arenavirus Pichinde".
J. Virol. 23: 776-786, 1977.

116.- Vilaginés, R.; Mc Auslan, B.R.
"Proteins of Polyhedral Cytoplasmic Deoxyvirus. II. Nucleotide Phosphohydrolase activity associated with Frog Virus 3".
J. Virol. 7(5): 619-624, 1971.

117.- Voets, R.; Lagrou, A.; Hilderson, H.; Van Dessel, G. and Dierick, W.
"RNA Synthesis in Isolated bovine thyroid nuclei and nucleoli".
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360: 1271-1283, 1979.

118.- Weinmann, R. and Roeder, R.
"Role of DNA-dependent RNA polymerase III in the transcription of the RNA and 5SRNA genes".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71: 1970-1974, 1974.

119.- Weiss, S. and Bratt, M.
"Polyadenylate Sequences on Newcastle Disease Virus mRNA Synthesized in vivo and in vitro".
J. Virol. 13: 1220-1230, 1974.

120.- Welsh, R.M.; Burner, P.A.; Holland, J.J.; Oldstone, M.B.A.; Thompsom, N.A. and Villareal, L.P.

"Comparison of biochemical and biological properties of standard and defective LCM".
Bull. W.H.O. 52: 403-408, 1975.

121.- Winston, S.H. and Rustigian, R.
"Enhancement and Suppression by Actinomycin D of a Vero Cell Nontransmissible Measles Infection".
Infection & Immunity. 24: 967-970, 1979.

122.- Zanetti, M.; Foa, L.; Constanzo, F. and La Placa, M.
"Specific inhibition of Rous Sarcoma virus by α-amanitin".
Arch. Ges. Virusforsch. 34: 255-260, 1971.