



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES CAMPUS "IZTACALA"

BO 1240/96
E. 1

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE RNA TOTAL EN EL PERIODO DE ECLIPSE EN CELULAS HeLa INFECTADAS CON EL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS

400282  61060

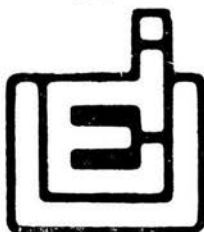
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

JUAN MANUEL MORENO ISLAS





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Dedico éste trabajo:

A Juana Vega Rosas

A Guadalupe Islas e Ignacio Moreno

A Leticia Montaña Rosales

A Juan Manuel y Ana María

A José Luis, Ma. Luisa, Toño y Toña

Por ser la luz y sal de mi vida...

Y a la memoria de Carlos Fernández Tomás

Gracias "Prof" por las enseñanzas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Fernández Tomás, por el apoyo, las enseñanzas y la paciencia durante el tiempo que se llevó a cabo éste trabajo.

Al Dr. Samuel Zinker, por permitirme trabajar en su laboratorio, para entrenarme en las técnicas de incorporación, extracción de RNA y corrido de geles.

A la Dra. del Angel, por el apoyo bibliográfico para la actualización en la introducción de éste trabajo.

A Juan Carlos González y Elizabeth Cárdenas por la asesoría en la captura, edición e impresión de ésta tesis.

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE RNA TOTAL
EN EL PERIODO DE ECLIPSE
EN CELULAS HeLa INFECTADAS CON EL VIRUS
DE LA POLIOMIELITIS**

INTRODUCCION:	A) Los virus	2
	B) Caracteres de poliovirus	3
	C) El genoma de poliovirus	5
	D) Interferencia de polio en la célula	8
ESTRATEGIA:	E) Objetivo general	14
	F) Objetivos particulares	14
	G) Mecanismos posibles	14
METODOLOGIA:	H) Materiales y métodos	15
RESULTADOS:	I) Tablas, gráficas y autorradiograma	29
CONCLUSIONES:	J) Mecanismos que se desencadenan	35
BIBLIOGRAFIA:	K) Referencias de libros y revistas	37

INTRODUCCION

A) LOS VIRUS

Virus es una palabra latina que significa veneno, su significado se remonta a cientos de años atrás, cuando se creía en la existencia de venenos transportados por el aire y con capacidad de producir terribles enfermedades.

Luis Pasteur demostró hacia fines del siglo XIX (Moore, et al. 1968) que muchas enfermedades del hombre, de las plantas y de los animales eran causadas por bacterias. Pero algunas de éstas enfermedades, como es el caso de la rabia, fueron profusamente investigadas sin encontrar en los microscopios de la época algún microorganismo responsable de la enfermedad.

A pesar de ello, Pasteur lograba producir la enfermedad a animales sanos al inyectarles saliva, sangre, o bien líquido cefalorraquídeo de animales enfermos, o bien, muertos recientemente por rabia.

Iwanowski, Biólogo ruso, demostró en 1892 (Moore et. al 1968) que el agente productor del mosaico del tabaco era capaz de atravesar filtros de porcelana que eran capaces de retener a las bacterias. Lo hizo filtrando jugo de una planta de tabaco infectada y frotando un poco de dicho filtrado en una planta sana. Al poco tiempo, la planta sana comenzó a mostrar los síntomas de la enfermedad.

W.M. Stanley, microbiólogo norteamericano, logró purificar por vez primera el virus del mosaico del tabaco en 1935, cuyas masas se observaban en el microscopio de luz como cristales en forma de astillas, demostrándose poco después que éstos virus eran nucleoproteínas. En ése mismo año se construyó un microscopio electrónico que permitió observar estructuras de forma cilíndrica (Moore et. al. 1968).

El tamaño de los virus puede ir de 17 a 450 nanómetros, pero una gran cantidad de ellos son menores a 200 nanómetros.

La mayor parte de los virus que atacan células animales alojan su genoma en una molécula de DNA, la cual se encuentra protegida por una cubierta de proteínas de forma variable. Las principales formas son: cilíndricos o helicoidales como el virus del mosaico del tabaco; esféricas, como el virus del síndrome de inmunodeficiencia adquirida; e icosaédricos ó cúbicos en los cuales se incluye al virus de la polio.

B) CARACTERES DE POLIOVIRUS

Poliovirus fué descubierto en 1909 por Landsteiner y Popper y es tal vez el más estudiado de los virus; a principios del siglo XX se produjeron devastadoras epidemias de poliomielitis aún en países con standards adecuados de higiene. (Paul, 1971).

Esta paradoja epidemiológica causó temores que aún a la fecha el SIDA no ha provocado. Como resultado se invirtieron grandes esfuerzos en aislar al virus y en elucidar su Biología.

Polio dejó de ser un problema serio de salud en los países con alto grado de desarrollo por las triunfantes aplicaciones de las vacunas en los 50s y 60s de Salk (Inactiva) y Sabin (Viva). De aquí, se redujo la investigación hasta que se descubrió que su estructura, organización genética y replicación son únicas. (Paul, 1971).

Poliovirus es un virus lítico, agente etiológico de una enfermedad bien caracterizada. Infecta específicamente a células de primates. Pertenece al grupo de picornavirus (Pico=Pequeño) se caracteriza por tener de 20 a 30 nanómetros de diámetro (Dales, et.al; 1965) y su cápside está formado por 60 unidades estructurales repetitivas de naturaleza protéica (Finch & Klug, 1959) y dispuestas de modo que el cápside tiene forma icosaédrica.

Al igual que todos los virus, no es posible el cultivo de poliovirus en medios inertes, ya que para reproducirse requiere la maquinaria de síntesis de una célula viva específica.

Poliovirus fué el primer virus animal que se obtuvo en forma cristalina pura, no es posible distinguir a polio de otros géneros de picornavirus sólo por su tamaño y estructura (Dulbecco, 1962).

Como prototipo de picornavirus, poliovirus se ha vuelto hasta la actualidad, un agente intensamente estudiado.

Poliovirus es una entidad sorprendentemente simple y que consiste en unas 60 copias de proteínas del cápside (VP1, VP2, VP3 y VP4) y una copia de un genoma de RNA de cadena sencilla. Schwerdt y Schaffer reportaron en 1955 que el genoma de poliovirus es RNA. Ellos mismos y en ése mismo año, cristalizaron el virus. Finalmente, en 1985 (Hogle & Fildman) se resolvió su estructura tridimensional.

A través de análisis de secuencias del RNA viral y de proteínas codificadas por el virus, el mapa del genoma de poliovirus fué establecido en 1981 (Kitamura et.al.).

Un hito en la investigación de polio fué el descubrimiento de que puede ser propagado en células de origen no neural (Enders, et.al. 1949) lo cual tuvo el consecuente desarrollo de los primeros ensayos en placa para polio y fué la base del aislamiento de mutantes y la cuantificación de virus salvajes y sus variantes.

Unos años después, se descubrió que el RNA genómico es infeccioso (Alexander, et.al. 1958); (Colter, et.al. 1957).

La genética de los picornavirus cambió dramáticamente con el advenimiento de la ingeniería genética y de los rápidos métodos de secuenciación; como resultado, los genomas de RNA se volvieron sustrato para modificaciones casi ilimitadas. Los primeros clones de DNA (cDNA) de un virus del grupo picorna (Para el virus de foot and mouth disease) se sintetizaron en Europa en un año (1981) en que el clonaje molecular de éstos agentes estaba restringido en los Estados Unidos de Norteamérica. En ése mismo año, Racaniello y Baltimore reportaron clones de cDNA específico de poliovirus; el ensamblaje de fragmentos de cDNA para formar el genoma viral completo generó clones de cDNA infeccioso que señalaron un nuevo capítulo en la genética de polio (Racaniello & Baltimore, 1981).

La transcripción total de cDNA con RNA polimerasa de fago T-7 en *Escherichia coli*, permitió obtener grandes cantidades de RNA de polio (Van der Werf, et.al. 1986).

Poliovirus ha sido recientemente sintetizado *de novo* en un extracto libre de células (Molla, Paul & Wimmer, 1991), lo cual no se había logrado antes con ningún otro virus. En base a éstos avances técnicos, el análisis genético de poliovirus ha sufrido un avance sin precedentes.

C) EL GENOMA DE POLIOVIRUS

El genoma del virus está compuesto de RNA de cadena sencilla con un peso molecular de aproximadamente 2.4 a 2.6×10^6 Daltons, éste RNA tiene un coeficiente de sedimentación de 35s. Los virus cuyo RNA tiene polaridad positiva (RNA+) como es el caso de polio, son únicos en el sentido de que su genoma funciona como RNA mensajero (RNAm) después de su entrada a la célula hospedera (Baltimore, D; 1971).

Aunque dicho RNA invasor se involucra en la síntesis de proteínas de la célula, el RNA del virión (vRNA) y el RNAm necesitan ser moléculas idénticas, teniendo como única diferencia la presencia o ausencia de VPg [Proteína unida por el extremo 5' por medio de una unión tipo O-(5'-uridil)-tirosina], dado que:

- 1) Ambos RNA tienen el mismo coeficiente de sedimentación de 35s (Summers & Levintow; 1965).
- 2) No hay diferencia entre ellos en la composición de los oligonucleótidos obtenidos después de la digestión con ribonucleasa T-1 analizado por electroforesis en doble dimensión.
- 3) Poseen idénticos nucleótidos 5'-terminales.

El RNAm viral es infeccioso. Así, la secuenciación del vRNA puede ser considerada no sólo como un estudio del genoma viral, sino también como el estudio del RNA mensajero viral.

La traducción del RNA mensajero bicistrónico sintético, reveló que la función de la región no traducida 5' es promotor del inicio de la traducción (Pelletier, et al, 1988); (Pelletier & Sonenberg, 1988); (Pelletier & Sonenberg, 1989).

Estudios paralelos llevados a cabo en el residuo 5' no traducido de EMCV (Virus de encefalomiocarditis), demostraron que ésta secuencia contiene elementos genéticos que funcionalmente se relacionan con el de polio (Jang, et al. 1988); (Jang, et al. 1989). Jang y sus colaboradores han llamado a éstos elementos Sitios de Entrada al Ribosoma (IRES, por su nombre en inglés). Los elementos IRES han sido identificados en todos los géneros de picorna y en otros RNA mensajeros virales y celulares. La traducción dependiente de las IRES es probablemente un mecanismo eucariote de síntesis de proteínas que ha sido usurpado por los picornavirus (Liu & Inglis, 1992).

Este RNA posee un segmento Poli-A en su extremo 3'; al retirarse la cadena de Poli-A, el RNAm pierde notablemente su capacidad infectiva (Spector & Baltimore, 1974).

En complejos donde interactúan células HeLa y poliovirus se han encontrado intermediarios replicativos, parte de cadena doble y parte de cadena sencilla, sugiriéndose que juegan un papel muy importante en la replicación, no obstante que se encontraron en muy pequeña cantidad (1% de 2 a 4 Horas y 5% de 4 a 5.5 horas, Baltimore & Girard, 1966).

Se sugiere también que el RNA complementario está formándose en el interior de la célula ó sufre degradación tan pronto como se va sintetizando, se han encontrado tres tipos de RNA viral:

- 1) De cadena sencilla
- 2) De cadena doble
- 3) El intermediario replicativo

El intermediario replicativo es el único RNAsa resistente en el período exponencial de síntesis. En estadios posteriores el RNA de cadena doble se acumula, tal vez como coproducto.

El RNAm eucarionte es por lo general monocistrónico y el RNAm de poliovirus codifica para un polipéptido que consiste de varias regiones que se separan unas de otras por un proceso proteolítico y produciendo proteínas con funciones diferentes (Proteínas del cápside, proteinasas, polimerasas, etc.)(Jacobson y Baltimore, 1968).

D) INTERFERENCIA DE POLIO EN LA CELULA ADSORCION

La infección se inicia con la adhesión del virus a receptores específicos tipo inmunoglobulina (Mendelsohn et. al., 1989) de la membrana celular seguido por penetración. En ocasiones el virus entra por endocitosis (Viropexis) y sufre la decobertura en el interior de la célula.

El virus debe establecer un contacto físico con la célula, algunos autores han elaborado modelos matemáticos del proceso de sujeción a pesar de que las variables son muy complejas y de que existen varios factores que afectan el proceso (Valentine & Allison, 1959), aunque ya ha sido formulado uno para el cálculo de la frecuencia de colisión de dos partículas en movimiento (Koch, 1960).

El reconocimiento del receptor parece ser independiente de la temperatura, pero la probabilidad de sujeción sí depende de ella por su efecto sobre el movimiento browniano (Sharp & Smith, 1960).

La penetración es dependiente de la temperatura, por lo que la sujeción en frío sincroniza la infección, aunque el frío introduce variables fisiológicas desconocidas.

Se ha comprobado que el virus sufre modificaciones en el cápside cuando entra en contacto con receptores de la membrana citoplásmica.

Se afirma que tener receptores es requisito que una célula debe cubrir para ser susceptible a polio (Jolkik y Darnell, 1961). Al tratar células con Diodecil sulfato de sodio (SDS), sus anticuerpos son menos eficientes (Mandel, 1962). De éste modo el RNA viral no se expone, así los viriones no son infectivos y no son susceptibles a ribonucleasas (Joklik & Darnell, 1961).

En células de animales que no son primates, no hay infección, tal vez por la ausencia de receptores y el RNA viral no penetra por la falta de interacción entre cápside y membrana. Las células HeLa adsorben el RNA de poliovirus y son sensibles a él, también hay evidencias de una decobertura intracelular, en la que de todos modos interviene la membrana citoplásmica en fagocitosis y el virus interactúa posteriormente con membranas vacuolares.

En ocasiones se encuentran virus en el citoplasma sin haber estado nunca asociados a membranas (Mandel, 1967).

Se han identificado células no susceptibles (Pollo y Hámster) que cuando se rompen sus membranas y comienza a haber fusión en las células, el virus entra y se multiplica en ellas (Enders, et.al.; 1967).

ECLIPSE

El eclipse es una fase del proceso infectivo siguiente a la sujeción y precedente a la replicación. Se llama así porque en las primeras etapas del estudio de la infección, los investigadores colocaban virus (proceso observable en microscopio electrónico), en un cultivo de células; provocando una serie de sucesos a nivel molecular (no observables en el microscopio electrónico) que finalizaban con la producción de nuevos virus y con la lisis celular (nuevamente observables en el microscopio electrónico). El virus no se eclipsa a menos de 37 grados centígrados.

INFECCION VIRAL Y SINTESIS DE MACROMOLECULAS DEL HOSPEDERO

Una vez que se ha llevado a cabo el reconocimiento y la adsorción del virus, polio lleva a cabo una rápida supresión de la síntesis de proteínas (Penman, et.al. 1963), más rápido y drástico que la actinomicina D (Que inhibe selectivamente la síntesis de RNA dependiente de DNA) por lo cual se piensa que el virus afecta la síntesis de RNAm y RNA ribosomal, que puede estar dado por proteínas codificadas por el RNA viral (Bablanian, et.al. 1965), (Penman & Summers, 1965).

La síntesis de una poliproteína tiene la desventaja de que tiene que haber proteinasas muy específicas para su procesamiento. Polio es un ribovirus típico que codifica poliproteínas que no dependen de la actividad proteolítica celular, de hecho codifica sus propias proteasas las cuales se usan para más de una función. Ejemplo: la proteinasa 2Apro es un activador de la traducción (Hambidge & Sarnow, 1992); deprime la síntesis de proteínas celulares (Sonenberg, 1987) y se relaciona con la duplicación del RNA (Molla et.al. 1993).

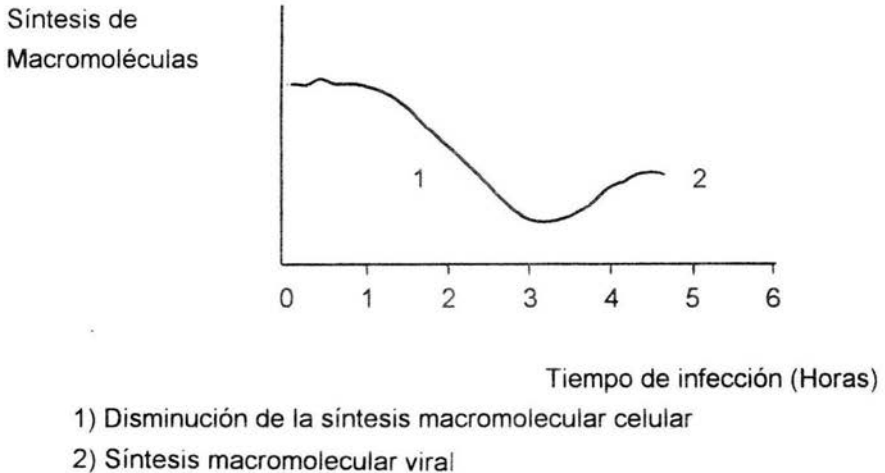
También existen evidencias experimentales que sugieren que la proteína 2Apro impide la síntesis de RNA mensajeros (Davies et.al., 1991), y que la 3Cpro inactiva factores de transcripción nuclear (Clark, et.al. 1991). Así las proteínas virales 2Apro y 3Cpro inhiben la transcripción y por tanto la traducción celulares, siendo éste el mecanismo principal por el cual poliovirus mata a la célula en infecciones líticas.

En células infectadas se ha demostrado que cuando la síntesis de proteínas celulares está inhibida, hay ribosomas sintetizando proteínas activamente, un 25% de éstos ribosomas y polisomas están asociados a proteínas antigénicamente identificables como proteínas virales (Scharf, et.al.;1963); asimismo se ha encontrado degradación progresiva de los polisomas en células infectadas (Summers, et.al.;1965).

Una parte importante del complejo virus-célula es la enzima RNA polimerasa dependiente de DNA. Una prueba de las funciones del intermediario replicativo es que hay RNA parcialmente terminado en él y que forma parte integral del virus posteriormente (Girard, et.al.; 1967).

FIGURA 1

CURVA DE SINTESIS DE MACROMOLECULAS
EN CELULAS HeLa INFECTADAS CON POLIOVIRUS



En ésta gráfica (Baltimore et.al. 1966) es posible observar que en los períodos tempranos de la infección sucede una estimulación en la síntesis macromolecular del complejo célula-virus durante los períodos tempranos (Durante la primera hora) del proceso infectivo, llevándose a cabo una notable inhibición de la síntesis de macromoléculas (a los 90 minutos de la infección) para posteriormente iniciarse la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos del virus (A los 180 minutos de la infección).

El RNA viral actúa como mensajero y se replica a través de un intermediario de doble cadena:

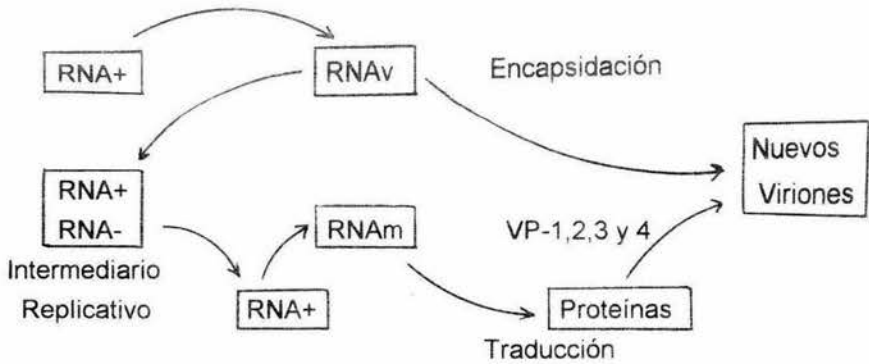


FIGURA 2.-En éste esquema es posible observar que el RNA del virus que penetra a la célula (RNAv) es utilizado como templado para la síntesis del intermediario replicativo (RNA+RNA-) a partir del cual se sintetizan grandes cantidades de RNA+ mismo que se utiliza como templado para síntesis de proteínas virales. Posteriormente, las proteínas y el RNA que se ha sintetizado *de novo*, pasan a formar parte de los nuevos viriones.

ENSAMBLE, MADURACION Y LIBERACION

Después de que se replica el RNA viral, es incluido en el cápside protéico preexistente de una manera relativamente rápida.

La poza de proteínas parece ser grande porque proteínas marcadas no pasan a formar parte del virión tan rápido como el RNA (20 minutos, comparado con 5 minutos), (Baltimore, et. al., 1966).

Se han hecho estudios al microscopio electrónico del desarrollo de poliovirus en células HeLa (Dales, et.al.; 1965), (Mattern & Daniel, 1965) encontrándose una zona a la cual se le ha llamado viroplasma que contiene RNA y proteínas virales. Esta zona está rodeada de polisomas los cuales contienen un número mayor de ribosomas que los polisomas de células no infectadas.

Estas áreas de viroplasma aparecen tres horas después del inicio de la infección. Las partículas de virus maduros se encontraron libres en la matriz citoplásmica o bien dentro de vacuolas sujetas a la membrana.

La maduración precede a la liberación de los virus, en células de primate la primera es lenta, mientras que la segunda ocurre usualmente rápido por destrucción de la membrana citoplásmica (Howes, 1959).

ESTRATEGIA

E) OBJETIVO GENERAL

Determinar cuáles tipos de RNA de las células HeLa son estimulados o inhibidos en un proceso infeccioso con poliovirus.

F) OBJETIVOS PARTICULARES

Con el fin de desarrollar las habilidades técnicas experimentales, ha sido necesario un entrenamiento previo en el manejo de técnicas de cultivo, cinética de incorporación, purificación de RNA total, corrido de geles y autorradiografía, que por razones de costos, se llevan a cabo previamente con cultivos de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y cuyo costo es menor que el de los cultivos de células He La.

G) MECANISMOS POSIBLES

En el experimento principal de este trabajo de tesis se infectarán células HeLa con poliovirus, haciendo al mismo tiempo una cinética de incorporación en pulsos de un precursor radioactivo del RNA (Uridina tritiada) y cuantificando los RNAs sintetizados durante el proceso infeccioso por autorradiografía de un gel de acrilamida en placa.

METODOLOGIA

H) MATERIALES Y METODOS

1) MATERIAL BIOLÓGICO

La cepa de levaduras utilizadas es Saccharomyces cerevisiae Ha.

Las células (HeLa) empleadas en el presente trabajo, serán células humanas que fueron obtenidas de un carcinoma cervico-uterino humano que se mantienen en cultivo desde su obtención a partir de una donadora llamada Helen Lane, de ahí su nombre. Estas células se pueden cultivar en monocapa cuando se dejan en un frasco de cultivo estático. En cambio, si se mantienen en constante agitación, crecen en suspensión; son permisivas para poliovirus, esto es, el virus puede infectarlas y replicarse en ellas.

Se utilizó para la infección poliovirus 1

2) SUBSTANCIAS

La acetona para análisis, el ácido acético, ácido fosfórico, ácido perclórico, ácido tricloroacético, alcohol etílico absoluto, alcohol metílico, carbonato de calcio, carbonato de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloroformo, hidróxido de sodio, naftaleno, y tolueno fueron obtenidos de J.T. Baker. La acrilamida, el lauril sulfato de sodio, y el sulfato de amonio, se obtuvieron de BDH. La acrilamida bis se obtuvo de Bio-rad. La cistina y la Fenilalanina se obtuvieron de Calbiochem. El cloruro de zinc se obtuvo de Hopkin & Williams. La agarosa se obtuvo de ICN. El cloruro de potasio y el fosfato de sodio monobásico se obtuvieron de Mallinckrodt. El ácido clorhídrico, el alcohol isoamílico, benceno, bicarbonato de sodio, bromofenol azul, cloruro de sodio, glicina, hidróxido de amonio, persulfato de amonio y xilol se obtuvieron de Merck. El 2,5-difenil oxiasol se obtuvo de N.E.N. Acetona para lavado y enfriamiento, alcohol industrial e hipoclorito de sodio se obtuvieron de Reasol. De Sigma se obtuvieron: ácido aspártico, alanina, arginina, azul de metileno, diodecil sulfato de sodio, glutamina y rojo neutro.

3) SUBSTANCIAS MARCADAS CON ISOTOPOS RADIOACTIVOS

Uridina tritiada, 1 milicurie	I.N.I.N.
Acido fosfórico, P32	I.N.I.N.

4) APARATOS

- Baño de agitación giratoria New Brunswick Scientific Mod. G-76.
- Cámara para corrido de geles con fuente de poder.
- Campana de flujo laminar New-Higgins.
- Campana de flujo laminar marca Veco.
- Centrífuga Sorvall refrigerada mod RC-5B.
- Contador de centelleo líquido marca Tri-lab.
- Espectrómetro de centelleo líquido Packard modelo 3385.
- Incubadora Hot-Pack.
- Microscopio invertido marca Olympus.
- Potenciómetro PHM-61 Copenhagen.
- Refrigerador criogénico Union Carbide Modelo LR-30.
- Refrigerador REVCO W:H: Curtin & Co. Mod. 7374.

5) METODOS

1.-EXTRACCION DE RNA DE Saccharomyces cerevisiae

- 1.-A 10 ml de medio S.C. Adenina(-), Uracilo(-) se adicionaron:
10 microlitros de solución de adenina (5 g/lt).
40 microlitros de uracilo (5 g/lt).
- 2.-Se agregó levadura Ha 1:200 esperando hasta que las levaduras crezcan hasta 40-80 Unidades Klett.
- 3.-Para preparar esferoplastos, se filtró el cultivo en una membrana millipore de poro con diámetro de 0.45 nanómetros, se lavó el filtrado con 30 ml de agua bidestilada estéril.
- 4.-Se adicionó 1 ml de sorbitol estéril 1.0 M a temperatura ambiente.
- 5.-Se agregaron 10 microlitros de glucosidasa
- 6.-Se colocaron los esferoplastos en un matraz erlenmeyer que contenía 9 ml de SCM a 23 grados centígrados: Se enjuagó con 2 ó 3 mililitros de E.M. (Medio Earle) a través de las paredes.
- 7.-Se incubó durante 120 minutos a 23 grados centígrados con giro muy lento.
- 8.-Se transfirió a un tubo córex y se centrifugó a 10,000 r.p.m.; se succionó el sobrenadante con una pipeta Pasteur, dejando la pastilla en el fondo del tubo.
- 9.-A la pastilla se le agregó 1 ml de L.E.T.S.(Cloruro de litio, E.D.T.A., Tris y S.D.S.) agitando con el vórtex hasta desprender el paquete.
- 10.-Se agregaron 2 ml más de L.E.T.S e inmediatamente 1 mililitro de solución Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico, sellando y agitando inmediatamente hasta formar emulsión.
- 11.-Se dejó reposar la emulsión durante 10 minutos sin dejar que las fases se separaran, para lo cual se agitó el tubo cada 3 minutos.
- 12.-Se centrifugó a 2,000 r.p.m. durante 15 minutos.
- 13.-A la fase acuosa que se forma (la fase de la parte superior) se le transfirió a un tubo que conteniendo 1 ml de solución de Fenol-cloroformo-isoamílico, se selló y se repitió la extracción desde el paso 10.

- 14.-Al primer tubo se le agregó 1 ml de L.E.T.S. para redissolver los ribosomas de la fracción protéica.
- 15.-Se pusieron luego 0.2 mililitros de cloruro de litio 5 Molar a la fase acuosa, permitiendo así que se forme una sal de litio con el RNA.
- 16.-Se agregaron posteriormente 4.4 ml de etanol 95% a -20 grados centígrados, produciéndose una solución homogénea al dejarla reposar.
- 17.-Se dejó reposar a -20 grados centígrados hasta que se precipitó el RNA purificado

2.-CINETICA DE INCORPORACION DE ADENINA TRITIADA A UN CULTIVO EXPONENCIAL DE Saccharomyces cerevisiae

- 1.-En una gradilla se colocaron dos series de 8 tubos de ensayo, poniéndolos posteriormente en hielo picado.
- 2.-Se agregó a cada tubo 0.5 ml de Acido Tricloroacético (TCA) al 20 %.
- 3.-Se utilizó un cultivo de levaduras 1:100 que se encontraba en crecimiento desde el día anterior (10 mililitros).
- 4.-Se adicionó al cultivo 0.1 microcurie por mililitro del isótopo, como se tenían 10 mililitros en cultivo, se adicionó 1 microcurie.
- 5.-En el momento de agregar el isótopo se consideró tiempo cero y se tomaron muestras de incorporación (alícuotas) del cultivo.
- 6.--Las muestras se tomaron lo más cerca posible del tiempo cero y a 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 minutos.
- 7.-La muestra que se tomó es de 0.5 ml y se agregó a los tubos que contenían TCA, había dos series de tubos para hacer duplicados de todos los tiempos.
- 8.-Tras dejar cada una de las muestras en hielo con el TCA, se filtró cada tubo por separado en un filtro de membrana, enjuagando con TCA al 5% . (1 ml aproximadamente), y enjuagando de nuevo con etanol al 30% (5 ml aproximadamente).
- 9.-Se colocaron los filtros en viales para conteo y se secaron durante una hora a 80 grados centígrados en el horno.
- 10.-Se agregaron, ya fríos los viales 5 ml de líquido de centelleo (omnifluor-tolueno).
- 11.-Se determinó el número de centelleos por minuto y se graficaron los datos.

3.- CUANTIFICACION DE RADIOACTIVIDAD
EN MUESTRAS DE RNA EXTRAIDO
DE Saccharomyces cerevisiae

- 1.-Se centrifugó la muestra durante 15 minutos a 15,000 r.p.m., se retiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur aspirando con la bomba de vacío hasta secar las paredes del tubo y cuidando no tocar la muestra con la pipeta.
- 2.-Se resuspendió la muestra en 0.2 ml de agua bidestilada estéril.
- 3.-Se tomaron 10 microlitros de la muestra y se agregó: 0.1 ml de Albúmina (1 mg/ml); 0.1 ml de TCA al 20% y 0.4 ml de TCA al 10%, se agitó manualmente y se dejó reposar 30 minutos en hielo.
- 4.-Se filtró, enjuagando con TCA al 5% (1 ml aprox.) y con etanol al 30% (2 ml aprox).
- 5.-Se secó el filtro en el horno a 80 grados centígrados durante una hora.
- 6.-Se agregaron 5 ml de líquido de centelleo y se contó durante un minuto.

4.-PREPARACION DE MUESTRAS DE RNA TOTAL DE
Saccharomyces cerevisiae PARA CARACTERIZARLAS EN GELES
DE ACRILAMIDA

- 1.-Con base en el número de d.p.ms en la muestra de 10 microlitros de la técnica de cuantificación, se tomó una muestra cuya cantidad fuera suficiente para emitir entre 5 y 10 mil cuentas por minuto.
- 2.-Se centrifugó ésta muestra a 15,000 r.p.m., se retiró el sobrenadante, se secaron las paredes del tubo con aire al vacío, cuidando de no tocar la muestra sedimentada.
- 3.-La muestra ya seca se resuspendió en 50-100 microlitros de Buffer PD 1/20 conteniendo sacarosa al 5%, SDS al 0.1% y BPB (Bromo-phenol-blue) al 0.01%.
- 4.-Esta muestra se colocó en el gel .

5.- PREPARACION Y CORRIDO DE GELES CILINDRICOS

	RNAHn	18s y 25s	RNA ^t	5s
Acrilamida solucion A	2.5 ml	5.5 ml	-	-
Acrilamida solucion B	-	-	6.6 ml	10.0 ml
Buffer PD (20x)	0.5 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Agua bidestilada	5.8 ml	11.1 ml	10.2 ml	6.8 ml
SDS al 10%	0.1 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Glicerol al 50%	1.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml
T.E.M.E.D.	10.0 µl	10.0 µl	10.0 µl	10.0 µl
Persulfato al 10%	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml

- 1.-Los componentes se agregaron en el orden en que se encuentran escritos.
- 2.-El persulfato de amonio al 10% no debe conservarse durante más de una semana debido a que se oxida, por lo cual se preparó al momento de hacer el gel.
- 3.-Cada columna indica una concentración diferente y ésta se eligió de acuerdo a los RNAs que querían caracterizarse.
- 4.-Ya agregados los componentes, se llenaron tubos de 13 centímetros de diámetro hasta un nivel de aproximadamente 8 centímetros para que los geles quedaran de 80 milímetros de largo por 6 de diámetro; se recubrió el gel con SDS 0.1%
- 5.-Cada depósito de la cámara de corrido se llenó con 500 ml de Buffer de corrido, que constó de:

Buffer PD (20x)	75 ml
SDS 10%	10 ml
Agua bidestilada	Se aforó a un litro.

- 6.-Se agregó la muestra tras correr el gel durante 15 minutos a 1 miliampere, a ésta parte se le llama precorrido. El corrido del gel, ya con la muestra, se hizo durante 120 minutos a 5 miliamperes.

- 7.-Al terminar el corrido, se sacó el gel del tubo con ayuda de una jeringa con aguja larga, se captó envolviéndolo en papel aluminio y se puso a congelar a -70 grados centígrados.
- 8.-Se cortó el gel en rebanadas de 1 milímetro, depositando una rebanada en cada vial, se agregaron 0.7 mililitros de protosol y se dejó un día para digestión.
- 9.-Tras haber pasado un día en digestión, se agregó líquido de centelleo (Tritón-omnifluor-tolueno) (4 ml).
- 10.-Se llevó durante 4 ó 5 horas al cuarto frío (4 grados centígrados).
- 11.-Se contó en frío durante un minuto y se graficaron los resultados.

6.-CINETICA DE INCORPORACION DE UN PRECURSOR RADIOACTIVO EN PULSOS A UN CULTIVO DE CELULAS

- 1.-Se centrifugó la suspensión celular a 2,000 r.p.m. durante 5 minutos, se retiró el medio de cultivo y se lavó la pastila celular con la mitad de volumen de MEM suero(-), éste lavado se llevó a cabo 2 veces.
- 2.-Volvió a centrifugarse la suspensión celular y se resuspendió a 4×10^6 células por mililitro.
- 3.-Se puso en agitación a 37 grados centígrados.
- 4.-Se tomaron alícuotas de 100 microlitros a los tiempos: más cercano a cero, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 minutos.
- 5.-Cada alícuota se colocó en tubos de ensayo que contenían 50 microcuries de Fósforo 32 permitiéndose la incorporación durante 3 minutos.
- 6.-La incorporación se interrumpió agregando 0.85 ml de PBS y 1 ml de TCA al 20%
- 7.-Tras haber interrumpido la incorporación, se puso la muestra en hielo durante 10 minutos.
- 8.-Se filtró en una membrana millipore de 0.22 nanómetros, se lavó con 1 ml de TCA al 5% y 3 ml de etanol al 30%.
- 9.-Se puso la membrana en un vial que contenía 5 ml de coctel D
- 10.-Se contó en frío y se graficaron los resultados.

7.-PILOTO DE INFECCIÓN DE CELULAS HeLa CON POLIOVIRUS

- 1.-Se centrifugó a 2,000 r.p.m. durante 5 minutos la suspensión de células, se retiró el medio y se resuspendió la pastilla celular en la mitad del volumen original con MEM suero(-). Volvieron a centrifugarse las células y se resuspendió a 10^7 células/ml (concentradas 100X).
- 2.-Se dejó agitando 10 minutos a temperatura ambiente. Se dividió el lote en 2.
- 3.-Se añadió a uno de los dos lotes el virus, calculando una multiplicidad de infección (MOI) de 100 P:F:U:/ célula.
- 4.-Se dejó agitando 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5.-Se diluyó con medio precalentado, a una concentración de 10^6 células/ml (10x) y se continuó el período de absorción durante 15 minutos más.
- 6.-Como se requería infección sincronizada, se centrifugó la suspensión a 2,000 r.p.m. durante 5 minutos, se le retiró el MEM suero (-) con los virus que no se pegaron a las membranas celulares y se resuspendió en medio MEM, suero 5% a una concentración de 4×10^6 cél/ml.
- 7.-Se colocó la suspensión a 37 grados centígrados con agitación, éste fué el tiempo cero de la infección.
- 8.-Para seguir el proceso de replicación viral, se suplementó con 5 microcuries por mililitro de Uridina tritiada.
- 9.-Se tomaron alícuotas por duplicado lo más cerca posible del tiempo cero tanto para las células infectadas como para las células del experimento testigo (mock). Posteriormente cada 30 minutos, 7 veces.
- 10.-Cada alícuota fue de 50 a 100 microlitros y tan pronto se retiró del resto del cultivo se puso en 1 ml de TCA y se dejó de 10 a 15 minutos en hielo.
- 11.-Se filtró con una membrana millipore, se lavó con 1 ml de TCA al 5% y con 2 ml de etanol al 30%.
- 12.-Se colocaron las membranas en viales marcados.
- 13.-Se agregaron 5 ml de coctel D, se contó 1 minuto y se graficó.

8.-CARACTERIZACION DEL RNA TOTAL
EN PERIODOS TEMPRANOS
DE INFECCION EN CELULAS HeLa INFECTADAS
CON EL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS

- 1.-Se centrifugó la suspensión celular a 2,000 r.p.m. por 5 minutos, se retiró el medio y se resuspendió en la mitad de volumen con medio MEM suero(-).
- 2.-Se repitió el proceso de lavado.
- 3.-Se resuspendió a 10^7 células por mililitro (100x), dividiendo el lote en dos.
- 4.-Se agitó durante 10 minutos para homogenizar el cultivo.
- 5.-Se agregó el virus a una multiplicidad de infección de 100 p.f.u./cél., al mock se le agregó una cantidad equivalente al volumen de virus de solución salina.
- 6.-Se dejó agitando a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 7.-Se diluyó con MEM suero(-) a 4×10^6 Cel/ml (10X)
- 8.-Se permitió la adsorción 15 minutos más a temperatura ambiente.,
- 9.-Se centrifugó 5 minutos a 2,000 r.p.m. y se retiró el medio con los virus no adheridos.
- 10.-Se resuspendió con 10 ml de MEM suero 5% a 4×10^6 cel/ml (10x), con el medio precalentado.
- 11.-Se puso a 37 grados centígrados en agitación, éste es el tiempo cero de la infección.
- 12.-Se suplementó con uridina triada (5 microcuries/mililitro) los lotes de células infectadas y mock.
- 13.-Se suplementó en pulsos a los tiempos 25, 120 y 180 minutos post-infección.
- 14.-Se tomaron alícuotas de incorporación cada 3 minutos durante el pulso, las alícuotas fueron de 50 microlitros.
- 15.-Al terminar los pulsos, se lavó una vez con medio Earle y uridina fría que se agregó mil veces más de la cantidad de uridina que se agregó radioactiva (en microgramos).

- 16.-Se centrifugó durante 5 minutos a 2,000 r.p.m.
- 17.-Se congelaron las pastillas celulares tras haberles retirado el medio radioactivo.
- 18.-Se continuaron los pulsos de los tiempos siguientes con el mismo método para iniciar, llevar a cabo y detener el pulso
- 19.-Cuando ya se tuvieron congelando todas las pastillas celulares, se resuspendió a 4×10^6 células/ml con buffer SDS (0.5% SDS) y se llevó a SDS 1% y EDTA 20 milimolar (contando con el hecho de que ya tenía).
- 20.-Se incubó 20 minutos con DNAsa de Worthington (20 miligramos por mililitro) y 160 microlitros de Cloruro de magnesio 0.2 M/ml a 37 grados centígrados.
- 21.-Se centrifugó durante 5 minutos a 2,000 r.p.m.
- 22.-Se resuspendió a 4×10^6 cel/ml en buffer SDS (SDS1% y EDTA 20 mM) con heparina 500 microgramos/ml e inmediatamente se agregó un volumen de Fenol-cloroformo-isoamílico (FCI).
- 23.-Se agitó 10 minutos a temperatura ambiente.
- 24.-Las fases orgánica y acuosa se centrifugaron a 2,500 r.p.m. a temperatura ambiente.
- 25.-Se determinó el número de centelleos por minuto.
- 26.-Se añadió un volumen del buffer en el que está resuspendida la muestra.
- 27.-Este proceso de extracción se repitió una vez más en las mismas condiciones.
- 28.-Se determinó el número de centelleos por minuto.
- 29.-A la fase acuosa de la segunda extracción FCI se le añadió un volumen de Coloroformo-isoamílico (CI) y se hizo la extracción dos veces.
- 30.-Se determinó el número de centelleos por minuto.
- 31.-La última fase acuosa obtenida en la fracción CI se ajustó a 0.4 Molar de acetato de sodio. El RNA se precipitó con 2.5 Volúmenes de etanol absoluto a -20 grados centígrados durante 16 a 18 horas.
- 32.-Se determinó el número de centelleos por minuto.
- 33.-Se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 30 minutos a 4 grados centígrados.
- 34.-Se resuspendió en 0.2 ml de agua bidestilada estéril.
- 35.-Se determinó el número de centelleos por minuto.
- 36.-Se midió absorbancia a 260-280 nm.

- 37.-Se determinó actividad específica (A-260/c.p.m.)
- 38.-Se colocaron las muestras en el gel de autorradiografía previamente preparado y precorrido.
- 39.-Para preparar un gel de autorradiografía se agregaron los siguientes ingredientes en el orden en que se encuentran escritos:

Solución A de Acrilamida	13.75 ml
Buffer PD (20X)	2.5 ml
Agua bidestilada	27.7 ml
SDS al 10 %	0.5 ml
Glicerol al 50%	5.0 ml
T.E.M.E.D.	25 μ l
Persulfato de amonio	0.25 ml

- 40.-Se mantuvo en agitación al ir agregando los componentes..
- 41.-Al agregar el último componente, se permitió la agitación durante un minuto más y se colocó en el interior de la cámara de corrido.
- 42.-Inmediatamente después de colocar el gel en el interior de la cámara, se introdujeron los peines de espaciado y se dejó polimerizar durante 30 minutos.
- 43.-Cuando el gel se hubo polimerizado, se retiraron los peines y se cubrió el gel con buffer de corrida, llenando también el depósito superior e inferior de la cámara de electroforesis.
- 44.-El gel se precorrió durante una hora a 100 voltios.
- 45.-Se colocaron en cada uno de los espacios del gel 2.5 Kc.p.m.s
- 46.-Ya colocada la muestra, se corrió el gel durante 4 horas.
- 47.-Se apagó la fuente de poder, se sacó el gel de la cámara, pegándolo a un papel filtro, se recubrió con plástico y se puso a secar durante 3 horas.
- 48.-Cuando el gel se hubo secado, se colocó en el cuarto frío sobre una placa fotográfica, la cual se encontraba en el interior de una bolsa negra, dejándolo 24 horas para imprimir la marca radioactiva en las placas fotográficas.
- 49.-En cuarto oscuro se abrió la placa fotográfica, se sumergió en revelador durante un minuto y medio, en interruptor de revelado durante medio minuto y en fijador durante 5 minutos. Se enjuagó durante 5 minutos con agua corriente y se dejó a secar durante 2 horas.

RESULTADOS Y ANALISIS

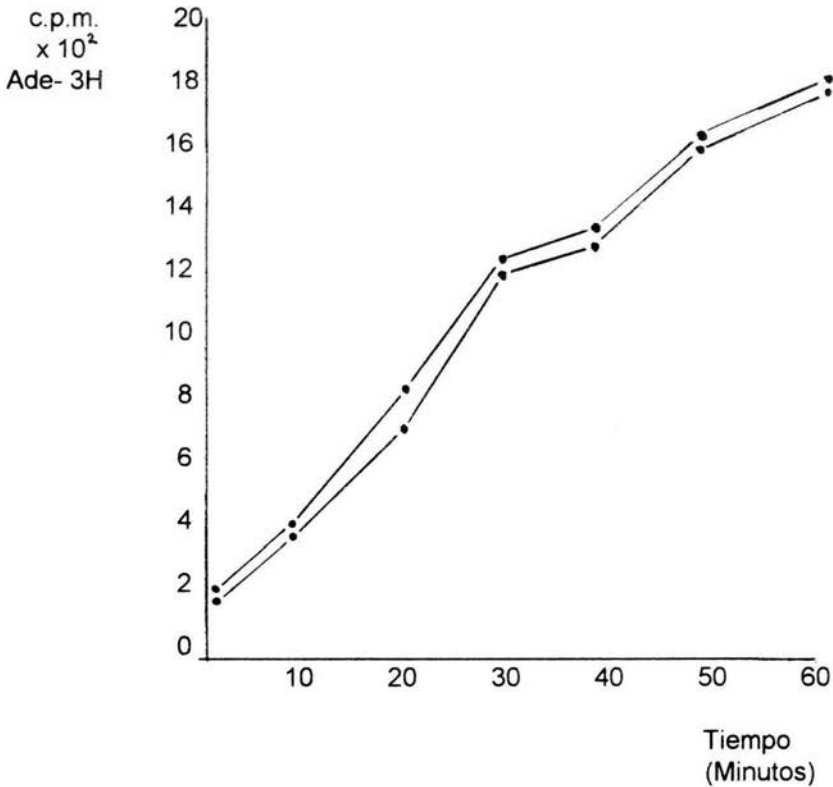
CINETICA DE INCORPORACION DE ADENINA TRITIADA A UN CULTIVO EXPONENCIAL DE Saccharomyces cerevisiae

Se siguió el método número 2, en el cual se permitió la incorporación de un precursor marcado y tomando muestras por duplicado para conteo de precursor incorporado a macromoléculas(Tabla No. 1 y Gráfica No.1):

TABLA No. 1

Muestra	Tiempo (Minutos)	Conteo (c.p.m.)
1	2	189
2	2'	194
3	10	394
4	10'	402
5	20	728
6	20'	857
7	30	1,268
8	30'	1,318
9	40	1,347
10	40'	1,563
11	50	1,671
12	50'	1,623
13	60	1,779
14	60'	1,800

Gráfica No. 1: Curva de incorporación de adenina tritiada contra tiempo para un cultivo de S. cerevisiae.



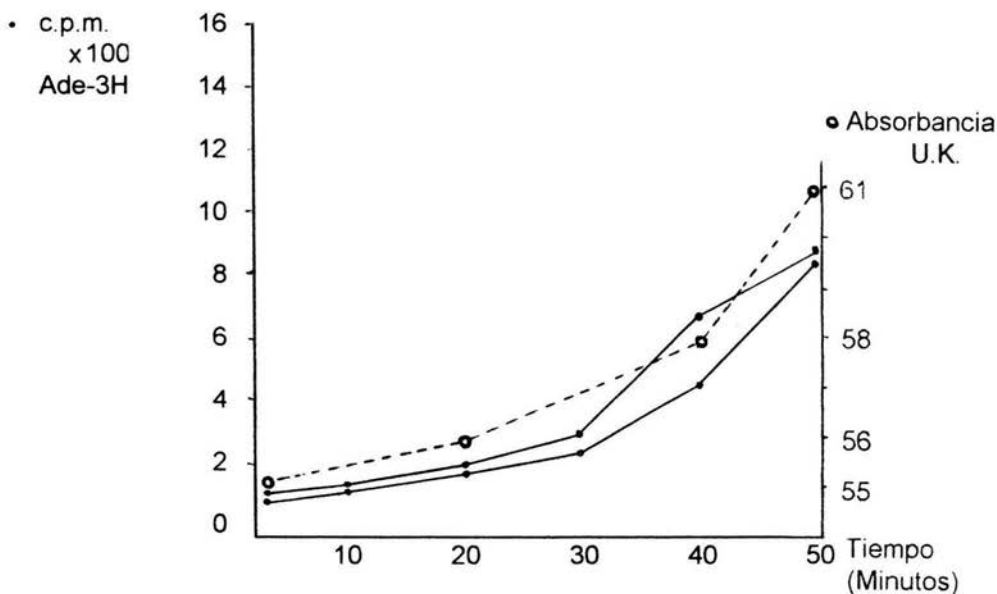
En ésta gráfica se observa que hay crecimiento en el cultivo, pues a cada período de tiempo se observa un incremento en la cantidad del isótopo incorporado a las macromoléculas. No se observa un crecimiento exponencial probablemente debido a que las condiciones en las que el cultivo se encuentra no son las ideales (agitación ó temperatura), lo cual provoca que la gráfica sea lineal.

Con el fin de comprobar el crecimiento y correlacionarlo con la incorporación del isótopo, se hizo un segundo experimento midiendo simultáneamente el crecimiento de las levaduras a través de la determinación de absorbancia del cultivo, medida en unidades Klett (U.K.), obteniéndose los resultados de la tabla 2 y de la gráfica 2.

TABLA No. 2

Muestra	Tiempo (min)	Conteo (c.p.m.)	Absorbancia (U.K.)
1	2	123	55
2	2'	133	
3	10	141	
4	10'	155	
5	20	204	56
6	20'	229	
7	30	293	
8	30'	325	
9	40	557	58
10	40'	775	
11	50	880	
12	50'	920	61

Gráfica No. 2.- Incorporación de adenina tritiada (puntos) y absorbancia (círculos) contra tiempo para un cultivo de S. cerevisiae.



En ésta gráfica es posible correlacionar el crecimiento en U.K. y la incorporación, observándose una curva con tendencia a exponencial, lo cual se hubiera confirmado mejor llevando a cabo la cinética 2 ó 3 puntos más (60, 70 y 80 minutos).

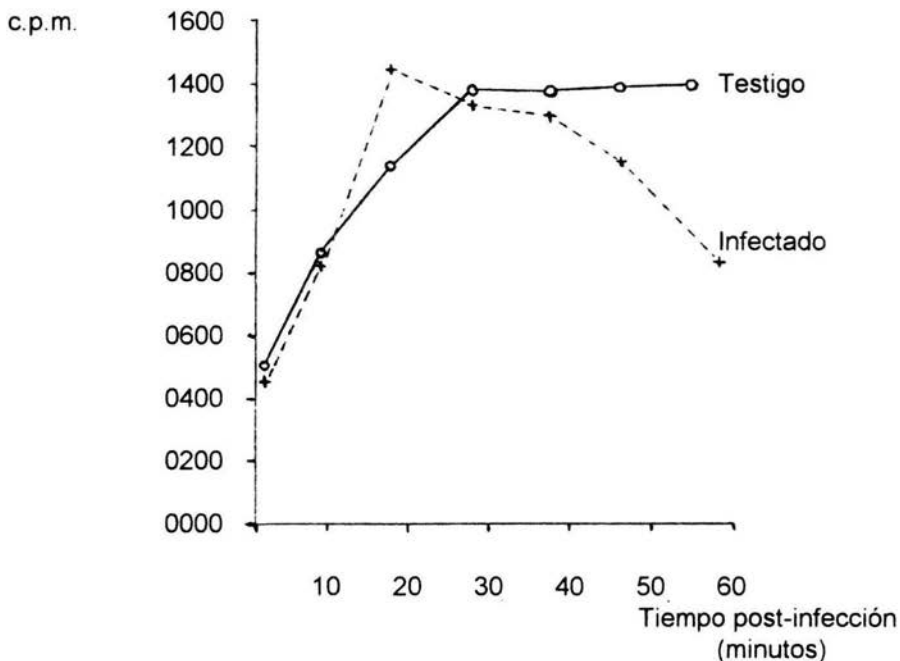
CINETICA DE INCORPORACION DE URIDINA TRITIADA
A UN CULTIVO DE CELULAS INFECTADAS Y NO INFECTADAS

Se llevó a cabo la metodología número 6, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 3 y Gráfica 3):

TABLA No. 3

Muestra	Tiempo	Testigo	Infectado
1 y 2	0	0523	0476
3 y 4	10	0850	0833
5 y 6	20	1158	1455
7 y 8	30	1390	1385
9 y 10	40	1348	1263
11 y 12	50	1360	1110
13 y 14	60	1384	0873

Gráfica No. 3 Incorporación de uridina tritiada a un cultivo de células dividido en dos lotes: infectadas y no infectadas.



En la gráfica es posible observar la estimulación mencionada en la introducción a los 20 minutos de la infección.

Con éste experimento se comprueba que las células incorporan una mayor cantidad de uridina en los períodos tempranos de la infección (20-30 minutos).

Los siguientes objetivos son: saber a costa de qué RNA es éste incremento o bien si se estimulan por igual todos los RNA; también debe determinarse si el incremento se debe a una síntesis temprana de RNA viral.

Estos objetivos se cumplieron con el siguiente experimento.

CARACTERIZACION DE RNA TOTAL EN PERIODOS TEMPRANOS
DE INFECCION EN CELULAS HeLa INFECTADAS
CON EL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS

Se llevó a cabo la metodología No. 8 obteniéndose la siguiente imagen de autorradiograma:

AUTORRADIOGRMA DE UN GEL DE ACRILAMIDA EN PLACA
PARA MOCK 20, 120 Y 180' E INFECTADAS 20,120 Y 180'

I -180 I -120 I -20 M-180 M-120 M-20



En éste autorradiograma puede observarse que no se trata de una síntesis temprana de RNA viral, debido a que no aparecen indicios de RNA 35s en la muestra de células infectadas a 20 minutos.

Dicho RNA aparecería entre la primera y segunda banda (de arriba hacia abajo), ya que la primera banda corresponde al precursor del RNA ribosomal (45s); la segunda corresponde al RNA de la subunidad mayor del ribosoma (RNA 28s) y la tercera banda corresponde al RNA 18s (De la subunidad menor del ribosoma).

No es posible afirmar que alguno de los RNA observados en el gel se encuentre estimulado o inhibido de modo notable en los tiempos elegidos del proceso infectivo.

CONCLUSIONES

Los resultados anteriores nos indican que no hay síntesis temprana de RNA viral, esto puede deberse a la ausencia en períodos tempranos de una cantidad elevada de proteínas virales implicadas en el proceso, fundamentalmente la RNA polimerasa viral.

El proceso infeccioso implica por tanto una paulatina inhibición de la transcripción celular en el núcleo y por tanto de la traducción en el citoplasma, la primera de las cuales se demuestra en la gráfica No. 3. iniciándose también de modo paulatino la síntesis de proteínas virales a partir de unas cuantas moléculas de RNA infectivo y la consecuente producción de moléculas de RNA con ayuda de las cada vez más abundantes proteínas virales, provocando una caída notable en la producción de RNA celular.

La estimulación de los RNA en el período temprano es por tanto una respuesta celular a la agresión que implica la presencia de moléculas extrañas a ella. Esta respuesta puede implicar la producción de moléculas clave en los mecanismos de defensa de la célula, obviamente a nivel de transcripción y traducción, ya que se trata de RNA ribosomal.

Las conclusiones anteriores nos llevan a una final: la presencia del virus implica que la célula activa en períodos tempranos (20 minutos) todos los mecanismos de síntesis y procesamiento de RNA ribosomal.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Alexander, H., Koch, G., Mountain, Sprunt, K., Van Damme, O. (1958). Infectivity of ribonucleic acid of poliovirus on HeLa cell monolayers. *Virology* **5**: 172.
- 2.-Bablanian, R. Eggers, H. J., & Tamm, I (1965) Studies on the mechanism of poliovirus-induced cell damage I. The relation between poliovirus induced metabolic and morphologic alterations in cultures cells. *Virology* **26**:100.
- 3.-Baltimore, D, (1971) Expression of animal viral genomes. *Bacteriol Rev.* **35**: 235-241.
- 4.-Baltimore, D. & Girard, M. (1966) an intermediate in the synthesis of poliovirus RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S:* **49**: 843.
- 5.-Clark, M.E., Hämerle, T., Wimmer, E., Dasgupta, A., (1991). Poliovirus proteinase 3c converts an active form of transcription factor IIc to an inactive form, a mechanism for inhibition host cell polymerase III transcription by poliovirus. *EMBO j*: **10**: 2941-47.
- 6.-Colter, J.S., Bird, H.H., Moyer, A.W., Brown, R.A., (1957). Infectivity of ribonucleic acid from virus infected tissues. *Virology*, **4**: 522-32.
- 7.-Dales, S., Eggers, H.J., Tamm, I. & Palade G.E. (1965). Electron microscopic study of the formation of poliovirus. *Virology* **26**:379.
- 8.-Davies, M.V., Pelletier, J., Meerovitch, K., Sonenberg, N., Kauffman, R.J. (1991). The effect of poliovirus proteinase 2Apro expression on cellular metabolism *J. Biol. Chem.* **266**:14714-20.
- 9.-Dulbecco, R. (1962). Basic mechanisms in the biology of animal viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **27**:159.
- 10.-Enders, J.F., Holloway, A., & Gregorian, E.A. (1967). Replication of poliovirus 1 in chick embryo and hamster cells exposed to sendai virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**:637.
- 11.-Enders, J.F., Weller, T., Robbins, F., 1949 Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science* **109**:85-87.
- 12.-Finch, J.T., & Klug, A. (1959) Structure of poliomyelitis virus, *Nature*, **183**: 1709.
- 13.-Girard, M., Baltimore, D. & Darnell, J.E. (1967) The poliovirus replication complex: site for synthesis of poliovirus RNA. *J. Mol. Biol.* **24**:59.
- 14.-Hambridge, S.J. Sarnow, P. (1992). Translational enhancement of the poliovirus 5' noncoding region mediated by virus encoded polypeptide 2A. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **89**:1072-76.
- 15.-Hogle, J.M., Filman, D.J., 1985. The three dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* **229**:1358-65.

- 16.-Howes, D.W. (1959) The growth cycle of poliovirus in cultured cells. III. The asynchronous response of HeLa cells multiply infected with type I poliovirus. *Virology* **9**: 110.
- 17.-Jacobson, M.F., Baltimore, D. (1968) Polypeptide cleavages in the formation of poliovirus proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A.* **61**:77-84.
- 18.-Jang, S.K., Davies, M.V., Kauffman, R.J., Wimmer, E.(1989). Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5'nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA in vitro. *J. Virol.* **63**:1651-60.
- 19.-Jang, S.K., Kräusslich, H.G., Nicklin, M.J.H., Duke, G.M., Palmberg, A. C., Wimmer, E. 1988. A segment of the 5' non translated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J. Virol.* **62**: 2636-43.
- 20.-Jolkik W.K., & Darnell, J.E. (1961). The adsorption and early fate of purified poliovirus in HeLa cells. *Virology* **13**, 439.
- 21.-Kitamura, N., Semler, B.L., Rothberg, P.G., Larsen, G.R., Adler, C.J. (1981) Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* **291**: 547-53.
- 22.-Koch, A.L., (1960) Encounter efficiency of coliphage-bacterium interaction. *Biochem. Biophys. Acta.* **39**: 311.
- 23.-Liu, D.X., Inglis, S.C.(1992) Internal entry of ribosomes on atricistronic mRNA encoded by infectuos bronchitis virus. *J. Virol* **66**: 6143-54.
- 24.-Mandel, B. (1962) Early stages of virus-cell interaction as studied by using antibody. *Cold Spring Harbor Symp Quant. Biol.* **27**: 123.
- 25.-Mandel, B. (1967) The interaction o neutralized poliovirus with HeLa cells.I. Adsorption. *Virology.* **31**: 238.
- 26.-Mattern, C.F.T. & Daniel, W.A. Replication of poliovirus in HeLa cells, electron microscope observations. *Virology* **26**: 646.
- 27.-Mendelsohn, C.L., Wimmer, E., Racaniello, V.R., (1989) Celular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence and expression of a new mwmbler of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, **56**: 855-65.
- 28.-Molla, A., Paul, A.V., Schmid, M., Lang, S.K., Wimmer, E., (1993). Studies on dicistronic polioviruses implicate viral proteinase 2Apro in RNA replication. *Virology.* **196**: 739-47.
- 29.-Molla, A., Paul, A.V., Wimmer, E.,(1991). Cell-free de novo synthesis of poliovirus. *Science* **254**: 1647-51.
- 30.-Moore, J., Degenhardt, E., Glass, B., Hallenbeck, L., Kennedy, M., Mayer, W., Goodman, T., Deyurp, I., Stewart, W., Bucklin, D., Swartz, G. (1968) *Biologia: Unidad, Diversidad y Continuidad de los Seres Vivos.* Editorial C.E.C.S.A. 222-227.
- 31.-Paul, J. R. 1971. A history of poliomyelitis. New Heaven, Yale University Press.
- 32.-Pelletier, J., Kaplan, G., Racaniello, V.R. Sonenberg, N., (1988). Cap independent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5'-noncoding region. *Mol.Cel.Biol.* **8**: 1103-12.

- 33.-Pelletier J., Sonenberg, N.,(1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**: 320-23.
- 34.-Pelletier, J., Sonenberg, N.,(1989) Internal binding of eukariotic ribosomes on poliovirus RNA: Translation in HeLa cell extracts. *J. Virol* **63**: 441-44.
- 35.-Penman, S., Scherer, K., Becker, Y., & Darnell, J.E. (1963). Poliribosomes in normal and poliovirus infected HeLa cells and their relationship to messenger RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **49**: 654.
- 36.-Penman, S, & Summers, D.,(1965) Effects on host-cell metabolism following synchronous infection with poliovirus. *Virology* **27**: 614.
- 37.-Racaniello, V.R., Baltimore, D. (1981). Cloned poliovirus complementary DNA is infectuous in mammalian cells. *Science* **214**: 916-19.
- 38.-Racaniello, V.R., Baltimore, D. (1981). Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 4887-91
- 39.-Schaffer, F., Scwerdt, C. (1955) Cristalyzation of puriefed MEF-1 Poliomyelitis virus particles. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **41**: 1020-23.
- 40.-Scharf, M.D., Shatkin, A.J., & Levintow, L. (1963) Association of newly formed viral protein with specific polyribosomes. *Proc. Nat Acad. Sci.U.S.* **50**: 686.
- 41.-Scwerdt, C., Schaffer, F., 1955 Some physical and chemical properties of purified virus preparations, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **61**: 740-53.
- 42.-Sharp, D.G.,& Smith, K.O. (1960) Rapid absorption of vaccinia virus on tissue culture cells by centrifugal force. *Proc. Soc. Exptl.Biol. Med.* **104**: 167.
- 43.-Spector, D., Baltimore, D., 1974. Requirement of 3'-terminal poly(adenilic acid) for the infectivity of poliovirus RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **71**: 2983-87..
- 44.-Sonenberg, N., 1987. Regulation of translation by poliovirus. *Adv. Virol. Res.* **33**: 10272-76.
- 45.-Summers, D.F. & Lewintow (1965) Constitution and function of polyribosomes of poliovirus infected HeLa cells. *Virology.* **27**: 44.
- 46.-Summers, D.F., Maizel, J.V.Jr., & Darnell, J.E.Jr. (1965) Evidence for virus-specific noncapsid proteins in poliovirus-infected HeLa cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**: 505.
- 47.-Valentine, R.C., 6 Allison, A.C. (1959) Virus particle adsorption. I. Theory of adsorption and experiments on the attachment of particles to non-biological surfaces. *Biochim. Biophys. Acta.* **34**:10.
- 48.-Van der Werf, S., Bradley, J., Wimmer, E., Studier, F.W., Dunn, J.J. 1986 Synthesis of infectuous poliovirus RNA by purified T-7 RNA polimerase. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 2330-34