

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA

**“MECANISMOS DE PATOGENIA VIRAL. PROTEINAS  
VIRALES ASOCIADAS A POLIRRIBOSOMAS EN CELULAS  
HeLa INFECTADAS CON VIRUS DE LA POLIOMIELITIS”**

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
BIOLOGA

PRESENTA

Ma. Lilia Cantero Aguilar

ASESOR: DR. JOSE TAPIA RAMIREZ  
CINVESTAV IPN

JULIO 1998

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

17  
dej.  
266835  
1



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 23 del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV IPN

*En memoria del Dr. Carlos Fernández Tomás+ que más que un director fue un amigo  
Con profunda pena y para siempre.*

Agradezco:

A mi querido amigo y tutor el Dr. José Tapia Ramírez ya que es su tesis y no mía

A mi amiga la Bióloga Marianela Peña Romero por su tenacidad y esfuerzo permanente hasta el final de éste trabajo.

A mis compañeros del laboratorio 23 y por las “noches de gradientes”

A todos mis amigos Rosy, Gaby, Maritza, Ma. Elena, Leticia, Rafa, José Luis, Cesar, Humberto, Lucas y los que falten.

A mis padres con respeto y Amor. Sr. Pedro Cantero Santillán y Magdalena Aguilar de Cantero

A mis hermanos Magdalena, Pedro, José Luis, Fernando, Agustín, Cristina, Ricardo, Pilar, Eduardo, Ma. de los Angeles y Jorge.

A Jean Louis, Aude, et Sébastien avec tout mon amour.

## RESUMEN

La replicación de los picornavirus (ejemplo; el virus de la Poliomiélitis o Poliovirus) ocasiona profundos efectos sobre células permisivas, entre estos, la inhibición de la síntesis de proteína celular. Para explicar esta inhibición se ha reportado: la pérdida en la actividad del factor (24 Kd) necesario para el reconocimiento del "CAP"; m G(5') ppp (5') N p (extremo 5' del ARN mensajero celular), asociada con la degradación del un péptido de 220 kd (p220) requerido para formar el complejo con el factor de 24 Kd. Por otra parte se ha observado durante la infección, la asociación de proteína de origen viral, sintetizada "de novo", en los ribosomas. En cuanto a la inhibición de síntesis de proteínas celulares, se sabe que ocurre durante la adsorción y penetración viral, y no requiere, aparentemente, de la expresión de genes virales; además de que mutantes termosensibles, defectivas en su proteína estructural, no inhiben la síntesis de proteínas celulares.

La posible asociación de proteínas estructurales virales a ribosomas de células infectadas, junto con las otras evidencias, podrían sugerir, que la proteína estructural del virus se une a los polirribosomas (polisomas), lo cual permitiría la traducción específica o preferencial del ARNm viral. Para abordar esta hipótesis, se utilizó la siguiente estrategia de trabajo.

El virus de la poliomiélitis fue marcado durante un ciclo replicativo con Metionina-S<sup>35</sup> en su proteína estructural, posteriormente fue altamente purificado, y utilizado para infectar cultivos de células HeLa en suspensión con el fin de seguir el destino de entrada de las proteínas estructurales. Los resultados mostraron que una pequeña cantidad de estas proteínas derivadas del virión (PDV) se unieron a las células durante su infección a 37 °C y que llegaron a asociarse a estructuras subvirales que contenían ARN (no ocurriendo lo mismo a 15 °C ). A las tres horas después de la infección, aproximadamente el 53% de la proteína derivada del virión se detectó asociada a estructuras moleculares de bajo coeficiente de sedimentación (menor de 155 S), y con una densidad

de flotación de 1.59, 1.54, y 1.4 g/cc. La radioactividad restante de la PDV se encontró asociada principalmente a una estructura ribonucleoproteica subviral pesada (RNPv-P) compatible al de un complejo ARN-ribosoma debido a la presencia de ARN de cadena sencilla (ARNss) y que fue analizado por su coeficiente de sedimentación, por su densidad en cloruro de cesio (1.54 gr/cc), y por su sensibilidad a RNAsas. Las PDV hacen su aparición en el complejo RNPv-P a tiempos tempranos de infección (60'), y continua acumulándose a lo largo de ella, a expensas del material de bajo coeficiente de sedimentación. Esta acumulación de proteína en la fracción pesada (FP), es paralela a la síntesis específica de proteína viral, y es bloqueada en presencia de cicloheximida.

Los resultados sugieren que durante la infección con poliovirus una pequeña cantidad de PDV penetra a la célula, asociadas al ARN infectante, y que en estas PDV participan al menos tres proteínas estructurales. Esto permitiría un atractivo modelo, en donde las proteínas estructurales penetran a la célula acompañando al genoma viral, participando en los pasos iniciales de la replicación de poliovirus.

## INTRODUCCION

La Poliomiелitis (parálisis infantil, enfermedad de Heine-Medin) fue diferenciada como entidad clínica por Heine en 1840, y descubierta en forma epidémica por Landsteiner y Popper en 1908 al transmitir esta enfermedad a monos. En 1964 el grupo internacional para el estudio de los Enterovirus, como parte de una meta para clasificar la mayoría de los grupos de virus, sobre la base bioquímica común y propiedades biofísicas, definen a Poliovirus dentro de la familia de los Picornavirus (Pico:pequeño; ARN:ácido ribonucleico) los que incluyen virus pequeños de menos de 30 nm de diametro, no cubiertos que contienen ARN. Poliovirus pertenece al grupo de los Picornavirus, familia Picornaviridae, genero Enterovirus. Esta familia constituye el grupo más importante de patógenos humanos (American Public Health Association, 1975).

La Poliomiелitis es una enfermedad infecciosa, aguda "relativamente frecuente" de origen viral, que en forma natural solo se presenta en el hombre y produce gran variedad de manifestaciones clínicas, desde una enfermedad asintomática hasta la enfermedad sin parálisis y la forma paralítica. En su forma más grave el virus invade algunas partes del sistema nervioso central atacando selectivamente a las células motoras, lo que produce parálisis flácida, mas comúnmente de las extremidades inferiores, pero en la mayoría de los casos no lo afecta; la infección puede estar presente sin que se advierta signo alguno de la enfermedad; puede manifestarse dando lugar a síndromes inespecíficos, o puede invadir el sistema nervioso central y producir o no trastornos funcionales (Arevalo, G. S. 1983).

Cuando Bodian y Sabin aportaron datos básicos sobre la patogenia de la Poliomiелitis, referentes a que los virus penetran por via oral al organismo del hombre, se propagan en el tubo digestivo, para eliminarse después en las materias fecales, se pudo considerar a la Poliomiелitis como una enfermedad digestiva más que neurológica. Los portadores asintomáticos, sobre todo los que

presentan infecciones inespecíficas, desempeñan el papel más importante en la transmisión de los virus. El virus se encuentra en las heces y en la región orofaríngea de pacientes con Poliomiélitis, no importando cual sea el tipo clínico de la enfermedad. No hay evidencia de otros mecanismos; sin embargo, esporádicamente se ha invocado a la leche contaminada como vehículo de transmisión de la enfermedad.

La mortalidad total de la Poliomiélitis es aproximadamente del 5%. Los pacientes que sufren el tipo "abortivo" y no paralítico de la enfermedad, se recuperan por completo. Aproximadamente del 2 al 5% de los niños y del 15 al 30 % de los adultos (aumentando con la edad), mueren a causa de la infección paralisante. Ya que del 90-95 % de los casos de Poliomiélitis corresponden a infección inaparente o "enfermedad menor" no diagnosticada, la prevención de la enfermedad por aislamiento de los pacientes es sumamente difícil. La vacuna no parece disminuir la frecuencia de Poliomiélitis no paralítica y todavía no se sabe cuanto tiempo dura la protección. En cada millón de vacunaciones, aproximadamente solo uno a tres casos de Poliomiélitis paralítica pueden atribuirse a la vacuna (American Public Health Association 1975).

Los estudios experimentales sugieren que la inmunización con vacunas de virus atenuados desarrollados por Sabin, administradas por vía oral, producen anticuerpos neutralizantes y protección contra la infección, aunque cabe la posibilidad de que alguno recupere la neurovirulencia. Las cepas del virus de la Poliomiélitis utilizadas, son capaces de desarrollarse en el tubo gastrointestinal, pero no invaden el sistema nervioso; sin embargo, todavía no hay pruebas suficientes de ello. Aunque los efectos de este tipo de vacuna son prometedores, deben guardarse algunas reservas al juzgar sobre su eficacia.

## **Los Virus (Definición y Clasificación).**

La Virología se ha convertido en una parte integral de la Biología Molecular porque ambas se ocupan del estudio de las entidades subcelulares, los virus, cuya estructura y organización entran en el dominio macromolecular. El tema importante de la Virología, los virus, pueden ser definidos como "entidades cuyos genomas son elementos de ácido nucleico (ADN o ARN) que se replican dentro de la célula viva usando la maquinaria sintética celular y originando la síntesis de elementos especializados (viriones) que pueden transferir el genoma viral a otras células (Luria y cols. 1978). Es usual subdividir a los virus, de acuerdo a la naturaleza de sus hospederos, así, existen los virus de plantas, virus animales y virus de bacterias o bacteriofagos. Sin embargo tan generales subdivisiones crean ambigüedades, como con los virus de plantas, que pueden multiplicarse en sus vectores los insectos. Cada virus tiene un rango de hospederos (en donde más o menos se relacionan los organismos). Desde que los virus fueron descubiertos como patógenos, es lógico clasificarlos entonces en términos de su "hospedero mayor". Es decir el huésped, cuya respuesta a los virus atrae primero la atención del hombre. Si bien es cierto que la multiplicación de los diversos virus (de plantas, animales y bacterias), involucra los mismos eventos: multiplicación, transcripción, traducción y replicación, los mecanismos de expresión difieren en varios aspectos como son, la naturaleza del ácido nucleico, el mecanismo de replicación, la polaridad, el tamaño del material genético, el tipo de huésped, su respuesta, etc. (Bacharch, H.L. 1978).

Lo anteriormente expuesto ha provocado el que se generen diversos grupos de clasificación. Dada la estrategia de replicación viral, Baltimore (1971), clasificó a los virus animales en VI clases, basándose en el mecanismo de transcripción del genoma y denominó ácido nucleico "+" (ARN) al que poseía la misma polaridad del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y ácido ribonucleico "--" (ARN) si la polaridad era opuesta.

Posteriormente Bacharch (1978), incluyó en dicha clasificación a la unidad de iniciación de la replicación (UIR), que puede ser considerada como la forma infectiva. La clasificación de Backrack, extiende la propuesta inicial de Baltimore, en cuanto a incluir proteínas (ARN Polimerasas principalmente) como parte importante de la estrategia viral. El virus de la poliomielitis o poliovirus viene a formar parte de la clase IV dentro de esta clasificación (Esquema 1).

Estas propuestas, junto con la existencia de un gran número de laboratorios trabajando de manera independiente con diferentes picornavirus, ha conducido a una variedad de nomenclaturas, las cuales impiden la comunicación entre los trabajos de investigación y necesariamente complican la enseñanza de la picornavirología. Sin embargo, en el tercer encuentro del grupo Europeo sobre el estudio de la Biología Molecular de los Picornavirus, celebrado en Urbino Italia, acuerdo en la necesidad de una nomenclatura sistemática, basándose en un mapa idealizado de la poliproteína de picornavirus (Fig. 2), adoptándose el nombre de la nomenclatura L434. (tabla I).

### **Los virus en la Biología Molecular.**

Desde finales de los años 50' y principios de los 60' el interés de la genética se ha centrado en el estudio de las funciones celulares, con investigaciones tendientes a conocer los posibles mecanismos de regulación de la expresión genética. Para ello se han empleado a los virus como excelentes sistemas modelo. La importancia del estudio de los virus en el desarrollo del conocimiento científico fue originalmente desarrollado por los biólogos moleculares, tanto para la comprensión de las modalidades moleculares de replicación como para el desarrollo de estrategias clínicas para la detección y prevención o tratamiento de enfermedades de origen viral, ya sea en humanos, plantas o animales de interés económico para el hombre. Desde el punto de vista de la Genética y de la Biología molecular, existen muchos y muy variados ejemplos de las aportaciones

de la Virología al conocimiento científico, como son, la expresión genética secuencial, la transcripción del ADN a partir de una molécula de templado de ARN, el procesamiento de proteínas eucarióticas, su interacción con membranas, la estructura de la unidad reguladora en la transcripción, etc.

Con los ejemplos antes mencionados, es claro que el estudio de la Biología Molecular de los virus aporta conceptos fundamentales en la biología molecular de la célula que ha sido infectada.

### **Generalidades.**

#### **a) Estructura viral.**

Fisicoquímicamente, los virus del grupo Picorna son partículas esféricas de ribonucleoproteína exhibiendo simetría icosaédrica. El diámetro seco de esas partículas es de 27-29 nm y están compuestas de 70 % de proteína y 30 % de ARN (Mathews, F.E. 1982). El peso molecular de la partícula es de alrededor de  $8.5 \times 10^6$  daltones. Estos viriones carecen de lípidos y parece ser una concordancia general que las proteínas estructurales virales no sean glicosiladas. Poliovirus presenta un coeficiente de sedimentación de 155 S. La cápside viral la constituyen 4 distintos polipéptidos virus específicos VP1, VP2, VP3 y VP4; así como una o dos copias de VP0 el precursor no cortado de VP2 y VP4. VP0 es un componente necesario de la partícula del virus infeccioso, el papel que desempeña esta molécula en la estabilidad de la cápside, pudiérase ser infectividad, o morfogénesis, sin embargo, esto permanece en el misterio (Fernández Tomás C. y Baltimore D. 1973).

Las proteínas VP1, VP2 y VP3, tienen un peso molecular entre 23 y 37 kd, VP4 se ha reportado que tiene un peso molecular de entre 9 y 15 kd. Diversos estudios indican la presencia de 60 copias de cada uno de los cuatro polipéptidos por partícula viral, sin embargo, han sido reportadas

discrepancias, en el análisis llevado a cabo en poliovirus Tipo I que ha mostrado proporciones molares aberrantes (Lucas-Lenard J. 1978).

Algunos análisis de las proteínas estructurales, análisis composicionales de mutantes estructurales, y serotipos diferentes (Blondel y cols. 1982; Minor y cols. 1983 y 1985), han mostrado claramente la considerable variación en los polipeptidos mayores de la cápside que son compatibles con infectividad. De hecho, tales alteraciones pueden conducir a incrementar la estabilidad de la cápside, por otro lado, en cuanto a su carácter antigénico, las únicas estructuras poliovirus-específicas capaces de crear una respuesta inmune de anticuerpo neutralizantes cuando son inoculadas al animal hospedero son, los viriones intactos 155S y, en menor grado las procápsides 80 S. Ni los precursores morfogenéticos restantes, ni cualquier de las cuatro proteínas estructurales aisladas por tratamiento del virión con SDS, han sido capaces como tales de producir una respuesta (Minor y cols. 1985); en contraste con las investigaciones realizadas con otros dos miembros de la familia Picornaviridae (el virus de la fiebre aftosa, Aftovirus y Coxaquievirus B3) en los cuales ciertas proteínas estructurales aisladas son reconocidas como suficientes para evocar una respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes. Puede observarse, sin embargo que las epitopes en poliovirus son altamente dependientes de la estabilidad conformacional dada a esta por la estructura intacta del virión (dado que estos epitopes aparecen en diferentes estadios de la morfogénesis viral). Esto refleja un grado significativo de variación de poliovirus. Estudios de entrecruzamiento y marcaje de superficie de viriones intactos han puesto en evidencia que VP1 es la proteína predominantemente expuesta. VP2 y VP3 están también localizadas externamente, pero en una extensión significativamente menor que VP1. VP4 parece estar completamente externa (Minor y cols. 1985). También se ha establecido que, poliovirus contiene más de un epitope neutralizante. Que estos epitopes se establecen sobre estructuras precursoras morfogenéticas virales que los epitopes están

sujetos a un alto grado de variación, y que los epitopes neutralizantes revelados por los anticuerpos monoclonales están localizadas sobre la proteína estructural viral VP1 (Emini y cols. 1982 y 1983; Erans y cols. 1983).

El genoma de poliovirus es una molécula de ARN de cadena sencilla y de polaridad positiva, esto es, de igual longitud y secuencia de bases que su ARNm. Consta de 7433 nucleótidos de los cuales, 6642 codifican para aproximadamente 10 proteínas (Racaniello y Baltimore 1981).

A el genoma de poliovirus se le ha dividido en 3 regiones principales, denominadas: P1, P2 y P3. En la región P1 está localizada la zona 5' terminal del genoma viral, y en esta se encuentran codificadas las 4 proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4.

La región P2 codifica, entre otras a 2 proteínas, P2a, y P2c, con una posible actividad de proteasas (Lucas-Lenard J. 1978). Y la región P3 que codifica para 3 proteínas la proteína VPg, la proteasa P3c y la replicasa P3d. La proteína VPg se encuentra unida covalentemente al extremo 5' terminal del genoma viral (Nomoto y cols. 1976; Fernández-Muñoz R. y Darnell J. 1976; Flanagan y cols. 1977). La proteasa P3c presenta una actividad autocatalítica y participa en el procesamiento de la región P1, para dar origen a las proteínas VP1 y VP3, y la replicasa P3d está involucrada en la replicación viral (Lundquist R. Y Maizel J. 1978; Pallansch y cols. 1984). Todas estas proteínas son el resultado del procesamiento proteolítico de los polipéptidos precursores: P1 (donde están contenidas las 4 proteínas estructurales) P2abc y P3abcd (Fig. 2).

### **Replicación del virus.**

Cuando un virus invade una célula se establece un nuevo sistema genético que permite la replicación del material genético viral y la expresión de la información codificada por el genoma del virus. El sistema genético puede también establecer una integración estable del material

genético dentro de la célula. En donde el sistema genético del virus reemplaza al del hospedero utilizando su maquinaria sintética (Holland J. y McLaren L. 1959; Luria y cols. 1978). Este proceso de replicación puede ser dividido en los siguientes eventos: la adsorción, la penetración, el desnudamiento y la liberación del genoma viral en el citoplasma. Algunos de estos eventos se interrelacionan y ocurren concomitantemente (Fenwick M. Y Cooper P. 1962; Carrasco, L. y Smith A. 1980; Nair C. 1984).

Los primeros pasos de infección por todos los tipos de virus se han referido tradicionalmente a la adsorción, penetración y desnudamiento. La adsorción del virus a la célula es el primer paso de la serie de eventos resultantes en la producción de la progenie viral. El tiempo de adsorción es usualmente de 60 min y los cambios inducidos a la célula por el virus son marcados de aquí en adelante (Ehrenfeld, E. 1982; Luria y cols. 1978). La presencia de receptores de superficie celular, parecen ser el factor primario en determinar la susceptibilidad de una célula o tejido a la infección con cualquier virus (Holland, J. y McLaren L. 1961; Luria y cols. 1978). Algunas células carentes de receptores son infectadas rápidamente por ARN libre. El trabajo realizado con células híbridas de humanos y de ratón mostraron que el cromosoma 19 humano, el cual ostensiblemente codifica para una proteína de membrana plasmática humana, es esencial por la susceptibilidad de los heterocariotes a la infección con poliovirus (Nobis y cols. 1985). La naturaleza de los receptores no ha sido aun resuelta, y el intentar solubilizar y purificar a estos ha respondido solo a casos limitados. La actividad del receptor de poliovirus parece existir como un complejo de glicoproteínas y poliproteínas (Nobis y cols. 1985). Algunos experimentos que involucran la interacción de varios tipos de rinovirus humanos a células HeLa han mostrado que estas tienen alrededor de 10 receptores por célula (Lonberg-Holm. y Korant B. 1972; Lonberg-Holm K. 1975). Para el caso de los picornavirus no han sido bien caracterizados y varían según el hospedero y esta diferencia puede ser la causa de la variabilidad de receptores sobre la superficie celular, los cuales son necesarios para que se una el virus

La adsorción denota el contacto inicial virus-célula por la interacción del virus con estos receptores específicos de membrana (Lonberg-Holm K. Y Philipson L. 1974). La adsorción es independiente de la temperatura, y es afectada por la concentración iónica del medio extracelular. Estudios iniciales muestran que la unión temprana de las partículas virales a células susceptibles es reversible si esta se lleva a cabo en frío (Crowell R. y Phillipson L. 1971). A temperaturas cercanas a 37 °C, sobreviene un eclipse rápido de infectividad viral. El paso irreversible parece involucrar cambios conformacionales en la cápside del virus (Dales S. 1973). Durante este evento, aparentemente las 4 proteínas estructurales de poliovirus participan, aunque, VP4 parece ser primordial en este proceso, dado que la pérdida de esta proteína está asociada a baja infectividad, a la vez que se observa una sensibilidad incrementada a enzimas proteolíticas (De Sena J. y Mandel B. 1977; Madshus y cols. 1984). Una vez que el virus se ha unido al receptor específico, lleva a cabo la penetración y el desnudamiento, eventos que parecen ser simultáneos (Rekosh D. 1977). El desnudamiento involucra un rearrreglo de las proteínas de la cápside (VP2 y VP4), continuada por la disociación de otra de las proteínas estructurales VP1, y seguidamente la entrada del genoma viral, este evento es dependiente de la temperatura y realizada por viropexis. Los mecanismos que gobiernan la unión y desnudamiento del virión permanecen en controversia. Algunos reportes sugieren que los virus pierden su cubierta proteica fuera de la célula y que los genomas liberados penetran la membrana celular, sin embargo otros reportes proponen que los viriones modificados son fagocitados y descubiertos dentro del citoplasma. El siguiente proceso de la replicación viral es conocido como periodo de Eclipse, es aquí en donde el ARN de cadena positiva que actúa como mensajero inicia su traducción para la síntesis de una enzima (ARN polimerasa) codificada por el genoma del virus. Esta enzima que se ha sintetizado es capaz de transcribir el ARN infectante (+) a una cadena de polaridad negativa que a su vez sirve de templatado para sintetizar múltiples cadenas de ARN de polaridad positiva (ARN genómico). Una vez que se ha expresado el genoma viral, y que es detectado en un periodo temprano de infección, tiene lugar

la formación del precursor proteico de la partícula madura (la procapside), que al asociarse a una molécula de ARN cadena positiva, lleva a un estadio posterior conocido como provirión (Fernández-Tomás C. y Baltimore D.1973). Este complejo ribonucleoproteico, a través del procesamiento de uno de sus componentes proteicos, forma los viriones maduros.

### **Síntesis y procesamiento de proteínas virales.**

Se sabe que todos los ARNm de eucariotes parecen ser funcionalmente monocistronicos, una prueba de ello es que dirigen la síntesis de una cadena individual polipeptídica continua a partir del sitio de iniciación 5'-proximal. Por lo tanto, podría suponerse que los ARNm del virus de mamíferos pudieran funcionar de la misma manera. Las primeras evidencias de que el ARN de los picornavirus presenta un solo sitio de iniciación fueron aportados por Jacobson y Baltimore (1968). Ellos reportan que cuando utilizan análogos de aminoácidos detectan la acumulación de una proteína gigante a la que le denominaron NCVP-00.

La secuencia del ARN del genoma de poliovirus fue recientemente determinada (Racaniello V. y Baltimore D. 1981), el ARN tiene una longitud de 7433 nucleótidos. La traducción de este, comienza con un triplete de AUG en el codón 741 a partir del 5' terminal y, continua por 6621 nucleótidos hasta un codón UAG que se encuentra localizado a 72 nucleótidos de la porción de poli(A) del 3' terminal. La poliproteína precursora que se sintetiza, presenta 2207 aminoácidos, se ha organizado dentro de tres regiones. La región amino-terminal (P1), que contiene las secuencias de las cuatro proteínas de la cápside, la región central (P2), que contiene secuencias para varios polipéptidos de los cuales no se conoce bien la función, aunque se sabe que codifica entre otras, dos proteínas con actividad de proteasas (Putnak J. y Phillips B. 1981), y finalmente la región Carboxilo-terminal (P3), donde están contenidas las secuencias de: la replicasa viral; las proteasas responsables de la mayoría sino todo el procesamiento de la poliproteína viral; las de la proteína

VPg ( que se encuentra localizada en el extremo 5' del genoma viral), y la región donde se localiza el inicio de la transcripción). Durante el procesamiento de la poliproteína NCVP-00 (200,000 daltones) se sabe que ocurren al menos 10 rompimientos, y que ocho de ellos ocurren entre los aminoácidos glutamina-glicina (Pallansch y cols. 1984).

Los primeros dos cortes que se producen en NCVP-00 dividen a esta en los tres dominios antes descritos (P1, P2 y P3), estas rupturas ocurren rápidamente cuando aun no se ha terminado de sintetizar completamente esta poliproteína. La proteasa P2a es responsable de los cortes entre P1 y P2 y para la región P3, esta parece ser de origen celular, y que se encuentra asociada a la maquinaria sintética de la célula. El resto del procesamiento, da como resultado las proteínas funcionales finales, y llevándose a cabo de modo secuencial y finamente regulado. Cabe hacer mención que hasta la fecha se desconoce el número y origen de las proteasas encargadas del fenómeno del procesamiento (Fig. 1).

Después que los constituyentes virales son sintetizados a partir de las dos horas después de infección, comienzan a ser ensamblados para dar origen a la progenie viral (5 a 6 horas post-infección). Al finalizar este período hay una pérdida irreversible de la capacidad celular para sintetizar cualquier macromolécula celular o viral produciéndose la muerte celular y la liberación de los viriones (Holland J. 1962; Franklin R. y Baltimore D. 1962; Penman S. y Summers D. 1965; Carrasco L. 1977).

## LISTA DE ABREVIATURAS.

Ac.	Anticuerpo
ATCC	Amercan Type Culture Collection
Brij-58	Polioxietilen 20 Cetil Eter
CO <sub>2</sub>	Bioxido de carbono
cpm	Cuentas por minuto
CR	Complejo de replicación
ADN	Acido desoxrribonucleico
D.O.	Densidad Optica
DO-C	Deoxicolato de Sodio
DTT	Ditiotreitol
E.A.	Esterilización por autoclave
EDTA	Acido Etilendiaminotetraacético
E.F.	Esterilización por filtración (filtro de 0.22 $\mu$ m)
EIF	Factor de Iniciación
FE	Factor de Elongación
Hepes	Acido N-2-Etanosulfonico Hidroxietilpiperazina
m.d.i.	Multiplicidad de Infección
(p/p)	(peso/peso)
PAGE	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

(PE) 100X	Solución de Penicilina-Estreptomicina (100 veces)
poli(A)	Poliadenilato
Pv	Proteína viral
ARN	Acido Ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
ARNdc	ARN de doble cadena
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
ARNv	ARN viral
RNP	Ribonucleoproteína
RNPv	ARN viral acompañado a proteínas citoplasmáticas
rpm	revoluciones por Minuto
S	Unidades Svedberg de Sedimentacion
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
TCA	Acido Tricloroacético
TEMED	N',N',N',N'-Tetrametilendiamino
Tris	Hidroximetil-amino-metano
Tris-HCL	Tris-hidroximetil-aminometano-ácido clorhídrico
u.f.p.	unidades formadoras de placa
U.V.	Ultravioleta
Vpg	Proteína del virus de la poliomielitis unida al extremo 5' terminal del RNA viral
	v/v (volumen/volumen)

## **MATERIAL Y METODOS.**

### **Material Biológico.**

**Células:** Los sistemas utilizados para abordar nuestro objetivo, fueron las líneas celulares HeLa R y HeLa S (Henrietta Laks) provenientes de un carcinoma cervical humano (ATCC-CCL), obtenidas de la American Type Culture Collection (Catalogue of strains II. Third edition).

La línea celular HeLa R se trabajó exclusivamente en monocapa, y las células HeLa S en cultivos en suspensión. Para los experimentos realizados en cultivos en monocapa, las células se trabajaron en semiconfluencia, y los de suspensión se mantuvieron a una densidad constante de  $6-8 \times 10^5$  células /ml.

El *Staphylococcus aureus* cepa Cowan 1 (Pansorbina) fue empleado como acarreador, en preparaciones de inmunoprecipitación.

**Virus.** El virus utilizado, fue el virus de la poliomielitis (Mahoney tipo I), propagado por dilución seriada, y obtenido del laboratorio del Dr. David Baltimore.

**Suero.** Para los medios de cultivo e inmunoprecipitaciones (entre otros) se utilizó suero fetal de ternera estéril, mantenido a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (HyClone-Laboratories, USA).

**Suero Dializado.** Durante la infección a las células HeLa con poliovirus, fue necesario complementar el medio de cultivo (después de la adsorción), con suero dializado, debido a las características de la infección y tipo de radiactividad empleada, este se dializó contra 100 volúmenes de MEM de infección (ver preparación), libre de metionina, glutamina y antibióticos. El proceso de diálisis tuvo una duración aproximada de 14 a 16 Horas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La membrana de diálisis utilizada fue del tipo "Spectrapore 3" (Spectrum Medical Industries), con un volumen de

exclusión de alrededor de 3500 de peso molecular.

#### Medios de Cultivo.

Para el cultivo y proliferación de las células HeLa, se utilizó el medio mínimo esencial (MEM), modificado por Joklik (Gibco Laboratories), este medio se preparó generalmente dos veces concentrado (MEM 2X, suero -, [IPE]-, a.a. no esenciales). Un litro de medio de cultivo, contiene dos sobres de medio liofilizado de 1 lt. cada uno, y 4 g. de bicarbonato de sodio, llevados a un volumen final de 900 ml. con agua bidestilada estéril y un pH ajustado a 7.3-7.4 mediante la adición de hidróxido de sodio 1 M. Este se esterilizó inmediatamente por filtración, a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.22  $\mu$ m (Millipore, USA).

MEM, Medio Mínimo Esencial (Modificado por Joklik), para cultivo en suspensión (.Dr. W.K. Joklik. Comunicación Personal para Gibco Laboratories). Liofilizado.

Componentes:	mg/lt.	Componentes:	mg/lt
NaCl	6500.00	L-Tirosina (Disodica)	47.00
KCl	400.00	L-Valina	
46.00			
MgCl 6H <sub>2</sub> O	200.00	Colina-Cl	1.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -HO	1327.00	Acido Fólico	1.00
Dextrosa	2000.00	i-Inositol	2.00

L-Arginina-HCl	105.00	Nicotinamida	1.00
L-Cistina-2HCl	34.40	D.-Ca pantotenato	1.00
L-glutamina	2914.00	Piridoxal HCl	1.00
L-Histidina	31.00	Riboflavina	0.10
L-Isoleucina	52.00	Tiamina	
	1.00		
L-Lisina	58.00	Rojo de Fenol	10.00
L-Metionina	15.00	NaHCO	2000.00
L-Fenilalanina	32.00	Penicilina G Potasica	75 U/ml
L-Treonina	48.00		
L-Triptofano		Sulfato de estreptomicina	50
	ug/ml		

MEM IX, suero+, [PE]+, a.a. no esenciales+. Para la preparación de 1 l.t. de este medio, se utilizó lo siguiente: 450 ml de MEM 2X (estéril), 20 ml. de una solución de Penicilina-Estreptoinicina cien veces concentrarla (PE—100X), 100 ml. de suero fetal de bovino (HyClone Laboratories, USA), 10 ml. de una mezcla de a. a. no esenciales cien veces concentrada (a. a. no esenciales 100X) y 420 ml. de agua bidestilada estéril.

MEM de Infección, suero-, [PE]-, glut.-, met.-. Los componentes de este medio de cultivo son los mismos que del MEM IX, excepto por la ausencia del suero, [PE], glutamina y metionina. El MEM de infección se preparó en su totalidad en el laboratorio.

Este medio de cultivo se utilizó para infecciones tanto en monocapa como en suspensión y, dependiendo de la metodología empleada, se esterilizó por filtración o, se utilizó no estéril.

MEM-Agar 1.5% (Especial para la titulación de poliovirus). En la preparación de este medio se adicionó lo siguiente: 23 ml de MEM 2X estéril, 2.5 ml. de suero fetal al 100%, 1 ml. de (PE)-100X,

200 ul de DEAE-Dextran, 750 ul de glutamina 1 mM, 115 ul de CaCl (20 mg/ml), 500 ul de a.a. no esenciales 100X y, 23 ml de agar noble especial. Todo esto se preparó en condiciones de esterilidad,

manteniéndose posteriormente a una temperatura de 45 °C, hasta el momento de ser adicionado a las

células infectadas en monocapa.

Radioisotopos.

-(<sup>3</sup>H-5,6) Uridina. Actividad específica 45 Curies/mMol

-L(<sup>35</sup>S)Metionina. Actividad específica 850-1440 Curies/mMol

El material radioactivo se obtuvo de Amersham Radiometer Center (Amersham, Inglaterra) y de New England

Nuclear (Boston, Mass. USA).

Bolsa de dialisis " Spectrapore 3" (Spectrum Medical Industries) con un volumen de exclusión aproximado de 3,500 de PM.

Papel Whatman 3MM (Whatman, Inglaterra).

Película Kodak-X-Omat S-5 (México).

Cajas petri para cultivo de tejidos estériles, desechables, de 100 mm de diámetro (Falcon, Laboratories. USA).

Tubos cónicos estériles, desechables de 50 ml (Falcon, Laboratories. USA).

Matraces de vidrio con tapa de rosca de diversas capacidades.

Tubos de nitrocelulosa, Beckman (USA)

Radiactivos y otros Materiales empleados.

Acetato de Potasio	Merck (México)
Acétato de sodio	Merck (México)
Azida de Sodio (NaN)	Sigma Chemicals Co. (USA)
Acido acético glacial	Merck (México)
Acido Clorhidrico (HCl)	J.T. Baker (México)
Acido etilen-diamino-tetracético (EDTA)	Sigma Chemicals Co. (USA)
Acido sulfurico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	J.T. Baker (México)
Acido Tricloroacético (TCA)	J.T. Baker (México)
Acrilamida	BDH Chemicals (USA)
Agar noble especial	Difco (USA)
Albumina de suero bovino	Sigma Chemicals Co. (USA)
Alcohol Etilico Absoluto	J.T. Baker (México)
Amino ácidos esenciales y no esenciales	Sigma Chemicals Co. (USA)
Azul de Bromofenol	Merck (México)
Azul de Comassie	Sigma Chemicals Co. (USA)
Bis-Acrlamida	BDH Chemicals (Inglaterra)
Brij-58	Sigma Chemicals Co. (USA)
Carbonato de Sodio (Na HCO)	J.T. Backer (México)
Cloruro de Cesio (CsCl)	BRL (Bethesda, Research

Cicloheximida

Sigma Chemicals Co. (USA)

Cloruro de Magnesio ( $MgCl_2 - 6 H_2O$ )

Merck (México).

### **Composición y Preparación de los Reactivos.**

Para la preparación de los reactivos y soluciones, se empleo agua bidestilada, y las condiciones de esterilización cuando se indica fueron: por autoclave [EA] 15 lb/cm de presión, 125 °C durante 20 minutos; o por filtración (EF) a través de membranas millipore tipo GS (0.22µm).

Solución Amortiguadora de fosfatos (PBS). (NaCl 137 mM; KCl 3mM; NaHPO 2mM y Kh PO 2mM).

Los reactivos fueron disueltos en agua bidestilada, ajustandose el pH a 7.4. antes de aforarse (EA).

Solución de Penicilina-Estreptomicina cien veces concentrada (PE) 100X. 7.5 x 10 unidades de penicilina G sodica y 5 gramos de sulfato de estreptomicina se disolvieron en agua bidestilada estéril, fueron llevados a un pH 7.3 y aforados a un litro (EF). Se almacenó a - 20 °C.

Solución de Metionina 100X (cien veces concentrada). 1.5 gramos de L- metionina fueron disueltos en agua bidestilada estéril, ajustando a un pH de 7.3-7.4, la solución se aforó a 1000 ml (EF).

Solución de Glutamina (100 X). 29.4 g. de L-glutamina se disolvieron en agua bidestilada estéril,

ajustándose posteriormente el pH a 7.3, aforando a 1000 ml. (EF).

Solución de Rojo de Fenol al 0.5 % (indicador de pH). 0.5 gr. de rojo de fenol se disolvieron en aproximadamente 75 ml de agua bidestilada estéril con la ayuda de calor y 1.5 ml de NaOH 1N; esta solución se llevo a un volumen final de 100 ml y se filtro sobre papel whatman 1 MM. Se guardo a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Solución de Tripsina al 0.1 % (volumen final de 1000 ml). Se utilizaron 100 ml de una solución de PBS 10X, 1 gr. de dextrosa, 1 gr. de tripsina, 3 ml de rojo de fenol al 0.5 % y 10 ml de una solución de (PE) 100X, y se disolvieron en agua bidestilada estéril, y se ajustó a un pH de 7.3 (EF). Se guardo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Mezcla de aminoacidos no esenciales 100X (a.a. no esenciales 100X). 0.089 g. de L-alanina; 1.5 g. de L-asparagina; 1.33 g. L-ac. Aspartico; 1.47 g. L-ac. Glutamico; 1.15 g. de L-prolina; 1.05 g. de L-serina; 0.75 g. de glicina, se disolvieron en agua bidestilada estéril, ajustándose posteriormente a pH de 7.3-7.4 y, aforándose a 1000 ml (EF). La mezcla se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso.

Solución amortiguadora de Tris-HCl 0.5 M, pH 7.3.- 39.5 g. de Tris-HCl fueron disueltos en agua bidestilada, y su pH se ajustó a 7.3 y aforados a 500 ml con agua bidestilada (EA). Se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Solución de Cloruro de sodio 4.0 M. Un total de 23.376 g. de NaCl se disolvieron en agua bidestilada hasta un volumen final de 100 ml. Se almaceno a  $4^{\circ}\text{C}$  (EA).

Solución de cloruro de magnesio 1.0 M. 20.331 g. de  $MgCl_2$  se disolvieron y llevaron a un volumen final de 100 ml. Con agua bidestilada (EA). Se guardo a 4 °C.

Solución de Cloruro de Potasio 1.0 M. Fueron disueltos 7.456 g. de KCl en agua bidestilada, y a un volumen final de 100 ml (EA). Almacenada a 4 °C.

Solución amortiguadora de RSB 10X (Tris-HCl pH 7.3, 0.1 M; NaCl 0.1 M). 200 ml del "Stock" de Tris-HCl pH 7.3 0.5M y 25 ml de una solución de NaCl 4 M fueron aforados a 1000 ml con agua bidestilada y un pH final de 7.3 (EA). Almacenar a 4 °C.

Solución Amortiguadora RSB  $Mg^{++}$  (Cold Reticulocyte Standard Buffer) (NaCl 10 mM; Tris pH 7.3 10 mM,  $MgCl_2$  1.5 mM). Esta solución contiene 100 ml de buffer RSB 10X; 1.5 ml del stock de 1.0 M de  $MgCl_2$ , un pH ajustado a 7.3 y un volumen final de 1000 ml (EA), almacenado a 4 °C.

Solución de Deoxicolato de sodio al 20 % (DOC 20 %). 20 g. de DOC fueron disueltos a un volumen final de 100ml.- Con agua bidestilada y en condiciones libres de ARNasas. Se almacenó a 20 °C.

Solucion Amortiguadora para Polisomas (buffer "polis"). (NaCl 0.14 M; KCl 0.01 M; Tris-HCl pH 7.4 0.01 M;  $MgCl_2$  0.005 M). Se utilizaron 3.5 ml. de una solución de NaCl 4 M, 1 ml de una solución de KCl 1 M; 2 ml de una solución de Tris-HCl pH 7.3, 0.5 ml. de solución de  $MgCl_2$  1 M, se llevaron a un volumen final de 100 ml. previo ajuste del pH a 7.4 [EA]. Se almacenó a 4 °C.

Solución de Sacarosa al 10 %~DOC-Brij-58 (solución libre de ARNasas). 10 g. de sacarosa, 5 ml.

de DOC al 20 %, y 5 ml. de Brij-58 al 20 % se disolvieron y llevaron a 100 g. con RSB Mg<sup>++</sup>I estéril (se almacenó a -20 °C).

Solución de Sacarosa al 15 % (p/p) en RSB Mg<sup>++</sup>I (Solución libre de ARNasas). 15 g. de sacarosa, fueron disueltos en 85 g de solución amortiguadora RSB Mg<sup>++</sup> (estéril). Se mantuvo a -20 °C.

Solución de Sacarosa al 30 % (p/p) en RSB Mg<sup>++</sup>I (solución libre de ARNasas). 30 g. de sacarosa se disolvieron en 70 g. de solución estéril de RSB Mg<sup>++</sup>I. La solución se almacenó a -20 °C.

Solución de Sacarosa al 60 % (p/p) en RSB Mg<sup>++</sup>I (solucion libre de ARNasas). 60 g. de sacarosa se disolvieron en un volumen final que corresponda a 100 g. de buffer RSB Mg<sup>++</sup>I (estéril), guardndose a -20 °C.

Solución amortiguadora de Tris-HCl pH 7.3 0.5 M fueron disueltos en 1000 ml de agua bidetilada con el previo ajuste de su pH a 7.3 (EA), se almacenó a 4 °C.

Solución de TCA al 10 % (v/v). 10 ml de una solución de TCA al 100 % se aforaron a 100 ml con agua bidestilada estéril. Se almacenó a 4 °C.

Solución de TCA al 5 % (v/v). 5 ml de una solución de TCA al 100 % se llevaron a un volumen de 100 ml con agua bidestilada estéril. Se mantuvo a 4 °C.

Solución de etanol al 30 % (v/v). 30 ml de etanol absoluto fueron aforados a 100 ml con agua bidestilada estéril, almacenandose a 4 °C.

Mezcla de centelleo líquido (tolueno-tritón I). 100 ml de tolueno, 600 ml de tritón X-100, 168 ml de agua bidestilada y 3.5 g. de PPO), se mezclaron y guardaron a temperatura ambiente (TA).

Mezcla de centelleo líquido (tritón-omni fluor-tolueno). 4 g de omni fluor y 300 ml de tritón X-100, se llevaron a un volumen final de 1000 ml con tolueno. Se almacenó la mezcla a T.A.

Solución para tratamiento de tubo de diálisis (libre de ARNasas). El tubo de dialisis se hirvió por 15 minutos con una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (carbonato de sodio) y 10 mM de EDTA (100 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 20 ml de una solución de 0.5 M de EDTA en 1000 ml de agua bidestilada). Seguidamente, el tubo se lavo repetidas veces con agua bidestilada estéril, se repitió la operación, y se introdujo en una solución de 1 mM de EDTA, para ser esterilizado [EA], al enfriarse el mismo, se le adicionaron de 2 a 3 gotas de cloroformo. Se almacenó a 4 °C.

Solución de EDTA al 0.5 M. Se pesaron 18.612 g. del reactivo y se disolvieron en un volumen final de 100 ml con agua bidestilada estéril. El pH se ajusta con NaOH a 8.0. Se almacenó a T.A.

Solución de SDS al 20 %. 20 g. de SDS fueron disueltos y llevados a un volumen final de 100 ml. con agua bidestilada estéril. Se mantuvo a T.A.

Solución de Acrilamida al 30 % (Electroforesis). 30 g. de .acrilamida se disolvieron en un volumen final de 100 ml. de agua bidestilada. Se mantuvo la solución a una temperatura de 4 °C.

Solución de Bisacrilamida al 2 % (Electroforesis). 2 g. de bisacrilamida se disolvieron en agua bidestilada y la solución fue aforada a 100 ml. Se guardo a 4 °C.

Solución Amortiguadora de Tris-Base 1 M, pH 8.8 (Electroforesis). 12.1 g. de Tris-base se

disolvieron en agua bidestilada, se ajusto su pH a 8.8 con una solución de HCl 5 N, llevando la solución a un volumen final de 100 ml. Se almacenó a 4 °C.

Solución de Persulfato de Amonio al 10 % (Electroforesis). 100 mg. de persulfato de amonio fueron llevados a 1000 ml. con agua bidestilada, esta solución se preparo el mismo día de su uso.

Solución Amortiguadora de Tris-Base pH 6.8, 1 M. (Electroforesis). 12.1 g. de Tris-base se prepararon en agua bidestilada, se ajusto su pH a 6.8, aforándose a 100 ml. Se almaceno la solución a 4 °C.

Solución Amortiguadora de Corrida 10 X (Electroforesis). 30.2 g. de Tris-base, 144.1 g. de glicina se aforaron a 950 ml. con agua bidestilada, ajustando previamente su pH a 8.3, se almaceno la solución a 4 °C.

Solución Amortiguadora de Corrida IX (Electroforesis). 190 ml. de la solución amortiguadora de corrida 10X, mas 10 ml. de SDS al 20 % se aforaron a 2000 ml con agua bidestilada, manteniendo la temperatura del buffer a aproximadamente 10 °C, que es la temperatura a la que se corre el gel de Poliacrilamida-SDS.

Solución de Azul de Coomassie al 0.2 % en 50 % de Metanol 7 % de Acido Acético (Tinción para Geles de Poliacrilamida-SDS). 0.2 g. de azul de coomassie se disolvieron en 50 ml. de metanol-7 % de ácido acético, y se llevaron a un volumen final de 100 ml. con agua bidestilada. La solución se mantuvo a T.A.

**Solución Amortiguadora de Muestra 2X (Electroforesis).** 1 ml. de Tris-base pH 6.8, 1 M, mas 1 ml. de SDS al 20 %, 100 ul de  $\beta$ -Mercaptoetanol, 6 ml. de glicerol y 20 ul. de azul de bromofenol, se aforaron a 10 ml. de agua bidestilada estéril. Se mantuvo a 4 °C.

**Mezcla de DMSO-PPO (Fluorografía).** 22,5 g. de PPO se disolvieron y aforaron en DMSO. Se preparo el día de su uso.

**Solución Desteñidora de Acido Acético 7 % (v/v)-Metanol 5 % (v/v) (Para Geles de Poliacrilani(la)).** 70 ml. de ácido acético, y 50 ml de metanol, se aforaron a 1000 ml. con agua bidestilada.

**Solución de DEAE-DEXTRAN (12mg/ml).** 12 g. de DEAE-DEXTRAN fueron disueltos en 1000 ml. de agua bidestilada, la solución se esterilizó [EA] y se guardo en alicuotas a -20 °C hasta su uso.

**Solución de Agar Noble Especial (1.5 %).** 15 g. de agar noble especial se disolvieron en agua bidestilada mediante calentamiento, se fraccionó y esterilizó [EA] y almacenó a 4.°C.

**Solución de Glutamina 1 mM (Plaqueo).** 14.6 mg. de Glutamina fueron disueltos y aforados en agua bidestilada a 100 ml. la solución se esterilizo [EF] y se guardo a - 20 °C hasta su uso.

**Solución de Cloruro de Calcio (Plaqueo).** 2 g. de CaCl se disolvieron en agua bidestilada hasta 100 ml. se esterilizó (EF) y guardo a -20 °C hasta su uso.

**Solución de Cicloheximida (15 mg/ml).** 15 mg de cicloheximida se disolvieron en agua bidestilada

estéril hasta 5 ml ajustando previamente el pH a 7.3. Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta usarse.

### **Cultivo de Células HeLa.**

Las líneas celulares HeLa R, y HeLa S, se cultivaron tanto en monocapa (HeLa R, HeLa S), como en suspensión (HeLa S), en MEM modificado por Joklik, suplementado con a.a. no esenciales, (PE 100 X y 10 % de suero fetal de Bovino, a un pH de 7.3-7.4, en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 10 % y a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ .

Particularmente las células HeLa R, tienen la característica de formar una monocapa confluyente lo cual nos permitió realizar infecciones directamente en monocapa. Principalmente esta línea celular se utilizó, para la titulación del virus de la Poliomielitis, por el Método de Unidades Formadoras de Placa (U.F.P.), y además como reserva permanente de estas células en el laboratorio. Las células HeLa R se cultivaron en cajas petri de 100 mm y en botellas falcón de 75cm.

Cultivo y proliferación celular en suspensión (células HeLa S). Este sistema es conveniente para el crecimiento de grandes cantidades de células. Provee un origen constante de estas células en fase logarítmica con ciertas ventajas al cultivo en monocapa y en especial las líneas celulares derivadas de tumores como es el caso de las HeLa S, que puede ser adaptada a crecimiento en suspensión o viceversa.

### **Alteración de Funciones Celulares**

#### **Inhibición de la traducción**

Durante la infección con el virus del grupo picorna se detecta a nivel celular, inhibición secuencial de la biosíntesis de macromoléculas, proteínas, RNA y DNA. El efecto sobre la traducción celular

se ha descrito, fundamentalmente, en dos tipos de sistemas: en células L infectadas con mengovirus y en células HeLa infectadas con poliovirus. La estrategia seguida por el virus de la poliomielitis para inhibir la traducción de la célula que infecta radica en dos hechos fundamentales: Primero, la inhibición es a nivel de la formación del complejo iniciador (Leibowitz y Penman 1971; Kaufman y cols. 1976; Ehrenfeld y Manis, 1982) y segundo que se requiere de la expresión del genoma viral. Bernstein y cols. 1985 han encontrado que mutaciones en el polipéptido 2<sup>a</sup> de poliovirus son incapaces de inhibir la traducción celular. Se ha reportado la desagregación de polirribosomas celulares (Penman y cols. 1963; Colby 1974) y la asociación posterior del RNAm viral en los denominados polirribosomas virales (Penman y cols. 1963). Durante el transcurso de la inhibición, la velocidad de elongación de la cadena polipéptidica es constante y el RNA mensajero celular permanece estable (Leibowitz y Penman 1971).

Hasta la fecha el fenómeno de inhibición ha sido estudiado ampliamente sin embargo aún no se conoce con precisión el mecanismo. Actualmente se han descrito tres mecanismos por los cuales la inhibición se lleva a cabo: 1) existe una correlación directa, entre degradación de una proteína celular de 220 kd. (un componente del factor de iniciación de la síntesis de proteínas, eIF-4F) e inhibición traduccional. EiF-4F es también conocido como el complejo unidor del cap (CBP II), dicho complejo facilita la unión de RNAs mensajeros con cap a la subunidad ribosomal 40 S (Shatkin, 1985). La destrucción de P220 provoca que la capacidad traduccional de RNAs mensajeros celulares se vea inhibida, favoreciéndose la traducción selectiva de RNAs mensajeros sin "cap", como el de poliovirus. Aparentemente la degradación de 220 se lleva a cabo por una proteínasa viral (2A). Es por ello que mutantes en el gen 2A de poliovirus son deficientes en inhibir la traducción celular (Bernstein y cols. 1985), aunque recientemente se ha demostrado que la proteasa viral induce a su vez una proteasa celular, que sería la responsable de la degradación de P220. Como se mencionó anteriormente la traducción de poliovirus se lleva a cabo en ausencia de

“cap” gracias a regiones localizadas en la región no traducible del genoma viral (RNT) que confieren traducción con independencia al “cap” (Pelletier y cols. 1988). 2) Otro mecanismo implicado en la inhibición traduccional es el que involucra cambios en la permeabilidad de la membrana celular, trayendo consigo un incremento en la concentración de Na<sup>+</sup> intracelular, lo cual favorece la traducción del RNAm viral e inhibe la expresión de los RNAs celulares (Sanchez, T. A. 1983; Alonso y Carrasco 1981).

3) Recientemente se ha propuesto que el incremento en la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  del factor eIF2, puede provocar que la traducción celular se vea abatida, mientras que la traducción de los mensajeros virales se favorecería, aunque no existen evidencias lo suficientemente fuertes que apoyen éste mecanismo. Sin embargo en otros sistemas, como el de adenovirus, se ha demostrado que la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  del factor eIF-2 inhibe la traducción celular (Katze y cols. 1986, 1988).

### **Inhibición de la Transcripción**

Como se mencionó anteriormente, durante la infección con picornavirus se detecta también una marcada inhibición en la síntesis de RNA de la células huésped. Este fenómeno fue descrito en primera instancia por Salzman y cols. (1959), Martin y cols (1962) y Franklin y Baltimore (1962). Mas tarde los estudios se ampliaron utilizando distintas líneas celulares y varios miembros del grupo picornavirus (Bienz y cols. 1978; Zimmerman y cols. 1963 y McCormick y Penman 1967).

Ensayos de transcripción “in vitro” con núcleos íntegros han mostrado que la transcripción inicialmente afectada es la dependiente de la RNA polimerasa II (Miller y Penhoet 1972), mientras que la catalizada por las RNA polimerasas I y III son afectadas en menor proporción y a tiempos tardíos de la infección (Apriletti y Penhoet 1974; Schwartz y cols. 1974). La estabilidad del RNA mensajero no se modifica (Colby y cols 1974; Francklin y cols. 1962; Leibowitz y Penman 1971), las RNA polimerasas II y III solubilizadas de células infectadas conservan la actividad

transcripcional al ser ensayadas con un templado exógeno (Schwartz y cols. 1974; Apreletti y cols. 1974). La sensibilidad al inhibidor  $\alpha$ -amanitina no está modificada (Apreletti y cols. 1978). Al analizar la integridad del DNA celular, obtenido de células infectadas, se encuentra que no se encuentra degradado, cabe mencionar que en estos estudios no se analiza la estructura conformacional de la cromatina, sino del DNA desnudo (Holland y Peterson 1964). También se ha reportado que el número de RNA polimerasa II unidas al templado disminuye (Flores-Otero y cols. 1982) y que la subunidad mayor (II o) de la RNA polimerasa II O, es modificada durante la infección (Rangel y cols. 1987). Esta modificación puede ser prevenida si se bloquea el procesamiento de la poliproteína viral con zinc o cicloheximida (Rangel y cols. 1988), lo cual sugiere que se requiere de la expresión viral y del procesamiento de péptidos para que la modificación de la RNA polimerasa se lleve a cabo. Otras evidencias también sugieren que para detectar el efecto supresor, se requiere de la síntesis y acumulación de productos virales (Penman y cols. 1965; Baltimore y cols. 1963; Fernández-Tomás 1982; Bienz y cols. 1982; Bossart y cols. 1984). Se ha postulado que alguna proteína viral o lipoproteína, actúa como inhibidor transcripcional celular (Baladin y cols. 1964; Fernández-Tomás 1982; Ho y Washington 1971; Bienz y cols. 1982).

Por otra parte Crawford y cols. (1981) reportaron que extractos celulares provenientes de células infectadas carecen de al menos, un factor requerido para la iniciación específica de la transcripción. Mas recientemente Kliewer y Dasgupta (1988) reportan que cuando se analiza la actividad transcripcional de diferentes factores transcripcionales, se encuentra deficiencia del factor TFIID. Los autores sugieren que éste factor se encuentra inactivado durante la infección con poliovirus, y que es el causante de la inhibición transcripcional. Recientemente, por estudios de transcripción "in vitro", retardamiento en gel de complejos DNA-proteína y ensayos de entrecruzamiento con luz U.V. (cross-linking), se ha mostrado que durante la infección con poliovirus se induce una proteína de 50 kd que, aparentemente, compete con un factor transcripcional (USF), por la región UPE del

promotor tardío de adenovirus 2 (Lazard y cols. 1989). El factor USF tiene un peso molecular aproximado de 46 kd y se une a la región UPE del promotor tardío de adenovirus. Al analizar los complejos formados por la región UPE y extractos nucleares de células infectadas y control, se encuentra que los primeros tienen una migración mayor con respecto a los extractos control, sugiriendo que la diferencia en la movilidad electroforética entre los complejos (UPE-proteína de 46 kd) y el complejo B (complejo "inducido por el virus"), es debido a un incremento en la carga o en el peso molecular de las proteínas (fosforilación, glicosilación etc.) (Lazard y cols. 1989).

La presencia de un inhibidor, la ausencia de factores y/o modificación de la RNA polimerasa parecen ser parte de un mecanismo concertado, en donde es difícil determinar, qué es causa y qué es efecto. Lo que es evidente, es que algún producto viral o inducido durante la infección, es el causante del efecto supresor, por ello es importante el estudio de aquellas funciones virales implicadas en la inhibición de la síntesis de RNA.

### **Proteínas estructurales del virus y Ribosomas.**

El papel que desempeñan las proteínas estructurales del virus de la poliomielitis y que forman parte de la cápside del mismo, parece ser versátil, ya que por un lado se ha visto que contienen los antígenos que participan en la unión de los viriones al receptor específico en la célula huésped (analizado en generalidades de los poliovirus), además tienen un papel fundamental durante la adsorción y penetración del virus. Y, resultados obtenidos en el laboratorio, proponen la participación de estos polipéptidos virales en proceso replicativos del virus.

### **Los Ribosomas**

Los ribosomas son los organelos celulares a los que se les une el ARNm, ARNt y cofactores de la

célula encargados de traducir la información genética codificada en el ARN a proteínas.

Bioquímicamente los ribosomas, son partículas de ribonucleoproteína formadas por la unión no covalente de 75 a 80 macromoléculas.

Se ha reportado que cuando se rompen células de mamífero, y el citoplasma se analiza por sedimentación zonal y absorción, de luz ultravioleta, se han observado y caracterizado una serie de partículas de ribonucleoproteína. La región de 75-80 S ha sido identificada como la unidad ribosomal. La mayoría del material que absorbe luz U.V. sin embargo, sedimenta más rápido que las unidades ribosomales y ha sido identificado como polirribosomas (grupos de ribosomas que están unidos a moléculas de ARNm, activos en la síntesis de proteínas). En los perfiles de absorbancia se observan a sí mismo, dos poblaciones que sedimentan más ligeramente que las unidades ribosomales, estas son las subunidades ribosomales libres. La constante de sedimentación de estas, difieren del método de preparación. Utilizando EDTA, tienen constantes de sedimentación de 50 S y 30 S ), y al ser preparadas en presencia de alta concentración de potasio, tienen constantes de sedimentación de 60 S y 40 S respectivamente (Peterman y cols. 1964; Arellano y cols. 1977).

Los ribosomas eucarióticos contienen alrededor de 70 proteínas aproximadamente, 40 en la subunidad 60 S y 30 en la subunidad 40 S.

El estudio de la fisiología de la traducción, en la que, como ya se mencionó, juega un papel medular el ribosoma, se ha dividido para su estudio en: a) Iniciación, que permite el comienzo de la síntesis de proteínas; b) Alargamiento, que resulta en el crecimiento de la cadena polipeptídica por la adición de un aminoácido durante cada ciclo y c) Terminación, en la que se concluye la síntesis de la proteína. Cada uno de estos pasos requiere de su propio grupo de factores de iniciación, alargamiento y terminación asociados. Los factores ribosomales son proteínas que tienen una función específica durante la traducción y se unen al ribosoma en forma transitoria.

Al menos dos moléculas de ARNt pueden unirse simultáneamente a un ribosoma, el modelo aceptado tiene dos sitios de unión: uno, llamado A o sitio de unión del aminoacil-ARNt, y el otro P o sitio de unión del peptidil-ARNt.

Se sabe que durante la infección de células permisivas con polovirus, la inhibición de la síntesis de proteínas del huésped, se acompaña de cambios en el perfil polisomal

Durante la infección tardía, se observa desagregación de polisomas celulares y una nueva clase de polisomas, generalmente más grandes que los de las células no infectadas (Rich y cols. 1963); la aparición de estos polisomas se atribuye a la traducción del ARNm viral. La presencia de nuevos polisomas sugiere que la mayoría de los ribosomas preexistentes no son inactivados como consecuencia de la infección, puesto que participan en la síntesis de proteína viral.

## **Antecedentes Directos**

Los mecanismos de patogenia viral que conducen a la inhibición de la síntesis de macromoléculas, son diversas. Se han propuesto numerosas hipótesis para elucidar el mecanismo (s) responsable (s) de la inhibición de la síntesis de proteínas y ARN desencadenados por la infección con el virus de polio, pero hasta el momento ninguna de las propuestas ha explicado satisfactoriamente este fenómeno.

En relación a la inhibición de la traducción existen trabajos reportados en la literatura que sugieren que dicha inhibición ocurre durante la adsorción y penetración viral y que no requiere aparentemente de la expresión de genes virales. También se han involucrado varios eventos (ya mencionados en la Introducción) como la hidrólisis de un péptido celular (220 Kd) que participa en el reconocimiento de los ARNm, que poseen la cubierta o "cap" (residuo de guanina metilado en la posición 7) en su extremo 5' terminal, durante la formación del complejo de iniciación con la subunidad ribosomal 40 S.

Realizando estudios sobre el posible papel modulador del Na<sup>+</sup> sobre la traducción celular y viral, se ha encontrado que, aunque el sodio es indispensable para inhibir la traducción del huésped no es suficiente para permitir la traducción viral (Sanchez T. 1983; Alonso y Carrasco 1981). Paralelamente a estos experimentos, se demostró la asociación de proteínas de cápside a polisomas virales, durante la síntesis "de novo" de proteína viral.

Durante la infección, los ARNm celulares dejan de traducirse y el viral inicia su traducción de manera exponencial, de tal forma que la maquinaria de la célula huésped se ve modificada, para ser utilizada en la expresión del ARNm viral, estructuralmente diferente al ARNm de la célula infectada.

A lo largo de la infección con poliovirus, existe una modificación en el patrón polisomal, ya que los polisomas celulares heterogéneos, con coeficiente de sedimentación entre 200 y 300 S se desagregan, y comienza la formación de una nueva especie de polisomas homogéneos con un coeficiente de sedimentación mayor al de los polisomas celulares (300 -350 S).

Se ha sugerido la participación de las proteínas estructurales del virus en la traducción del ARNm viral. Se ha reportado la asociación de proteínas estructurales del virus a polisomas durante la infección de células HeLa (Cooper y cols. 1973 ). Sin embargo, si las proteínas estructurales participan en la traducción del ARNm viral, ello no explica como es traducido el ARN infectante. A pesar de que no existe evidencia directa de la participación de estas proteínas en el proceso de la traducción, su presencia en los polisomas virales sugiere una posible función en la traducción viral.

Conjuntando las evidencias analizadas hasta el momento; puede decirse que las proteínas estructurales del virus de la poliomielitis se encuentran involucradas en la morfogénesis del virus y en la respuesta inmune desarrollada por el organismo infectado, en el reconocimiento del receptor celular, y posiblemente, en funciones replicativas de traducción del ARNm viral.

## Objetivo

El papel de las proteínas de poliovirus en la síntesis de las proteínas virus-específica no ha sido claramente definido, el modelo atractivo sería que, a fin de permitir la traducción del ARN<sub>v</sub>, las proteínas de la cápside derivadas del virión (PDV) pudieran permanecer asociadas al ARN<sub>v</sub> durante la penetración a la célula y fuesen utilizadas para la formación del complejo de iniciación de la traducción del virus.

Por lo tanto el objetivo que se ha planteado en el presente trabajo es:

Determinar si la proteína estructural del virus infectante, se introduce a la célula durante la penetración del genoma viral, y su posible asociación a los polirribosomas.

La estrategia del experimento, fue el seguimiento de la proteína estructural, mediante la infección de células HeLa crecidas en suspensión ( $6-8 \times 10^6$  células/ml) con virus radiactivos (metionina S-<sup>35</sup>) purificados a través de gradientes de sacarosa a una moi de 500 UFP. A diferentes tiempos de infección, de acuerdo a nuestro objetivo, se analizó la asociación de proteína-metionina S-<sup>35</sup> a polirribosomas virales.

## METODOS

### Cultivo de células HeLa

Las líneas celulares HeLa R y HeLa S, fueron cultivadas tanto en monocapa (HeLa R y HeLa S), como en suspensión (HeLa S) en MEM modificado por Joklik, y suplementado con a.a. no esenciales, (PE) 100X, y 10 % de suero fetal de bovino, a un pH de 7.3-7.4, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 10 % y a una temperatura de 37°C.

Particularmente, las células HeLa R tienen la característica de formar una monocapa confluyente lo cual, permite infectar directamente sobre esta monocapa. Principalmente esta línea celular se utilizó entre otros: para la titulación del virus de la poliomielitis por el método de unidades formadoras de placa, y como reserva permanente en el laboratorio. Las células HeLa R se cultivaron en cajas petri de 100 mm, y botellas falcón de 75 cm.

Cultivo y proliferación celular en suspensión (HeLa S). Este sistema es conveniente para crecer grandes cantidades de células. Provee un constante origen de estas en fase logarítmica con ciertas ventajas a monocapa y en especial las líneas celulares derivadas de tumores como son las células HeLa S, que pueden ser adaptadas a crecimiento en suspensión o viceversa.

HeLa S por las características antes mencionadas permitió ser cultivadas en grandes volúmenes y ser fácilmente manejables, en especial; para la realización de pilotos de infección con poliovirus a diferentes m.d.i. (100-500 UFP); la preparación de una reserva de virus a partir de células HeLa S infectadas; la purificación y el análisis de virus radiactivos (metionina-S<sup>35</sup>) la obtención de caracterización de polisomas virales, además de que se contó con la existencia permanente de células tanto en monocapa, como en suspensión. Las células HeLa S, se cultivaron preferentemente en cajas petri de 100 mm, y botellas falcón de 75 cm, para el caso de los cultivos en suspensión, las

células fueron crecidas a una densidad de  $6 \text{ a } 8 \times 10^6$  células/ml., dentro de matraces con tapa de rosca o, en recipientes especiales para cultivo en suspensión, de acuerdo al requerimiento del experimento planteado.

### **Infección de células HeLa con poliovirus**

1.- Un cultivo de células HeLa S en suspensión se colectó por centrifugación a una velocidad de 2000 rpm durante 5 min a t.a., utilizando una centrífuga Internacional (Mod. PR-6000, Damon-IEC-División). Posteriormente se lavaron en dos ocasiones con 0.5 a 1.0 volúmenes de MEM de infección 1X, suero-, met-, glut-, (PE)-. Dadas las condiciones de infección, las células se resuspendieron a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml (cien veces concentradas), para permitir una mayor interacción de células-virus y manteniéndose en agitación por 10 min a t.a. (estabilización celular). Las células fueron entonces infectadas con poliovirus a una m.d.i. de 100 UFP por células, continuándose la infección en las mismas condiciones por 30 min más, para permitir la adsorción del virus a la célula. Pasado este tiempo, las células se diluyeron con MEM de infección precalentado hasta una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml. (10X concentradas) dejando 15 min más en agitación y a t.a. a fin de asegurar la irreversibilidad de la adsorción del virus. Para una infección sincronizada, las células se centrifugaron (para eliminar virus no adsorbidos) en las condiciones antes mencionadas, descartando el sobrenadante, y resuspendiéndolas a la misma concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml con MEM de infección precalentado más la adición de suero fetal dializado (2-5 %), glutamina+, a la temperatura de  $37^\circ\text{C}$  y con agitación suave. Este momento correspondió a nuestro tiempo cero de infección.

2.- A células HeLa R crecidas en monocapa en cajas de petri (P-100) se les retiró el medio de cultivo, y se lavaron con MEM de infección estéril: suero-, (PE)-, glut-, met+, posteriormente se les retiró ese medio y se procedió a colocar las diluciones necesarias del virus en aproximadamente 1

ml de MEM de infección estéril a cada caja. Se mantuvieron a t.a. y en agitación suave por una hora (tiempo de adsorción), seguidamente se retiró por succión del medio, el virus no adsorbido. Por otro lado, se preparó el siguiente medio: MEM-agar al 1.5 % y manteniendo a una temperatura de 45 °C. Adicionándose este a cada caja (10 ml) al final, las cajas con el medio solidificado se colocaron dentro de una incubadora a una temperatura de 37 °C con atmósfera de CO<sub>2</sub> y se mantuvieron en observación cada 24 hrs.

#### **Marcaje a cultivos de células HeLa con radioisótopos**

La cantidad de material radioactivo y el tiempo de marcaje, está señalado en los pies de figura de cada experimento. La incorporación del radioisótopo se ve disminuida mediante la adición del aminoácido no radiactivo a una concentración de 500 veces más a la del precursor radioactivo.

#### **Determinación de la incorporación de material radioactivo ( <sup>3</sup>H, metionina-S 35), durante la infección**

De acuerdo al experimento realizado, se extrajeron muestras del cultivo (si este era el caso) a diferentes tiempos de infección y con alícuotas que variaron en volumen (dependiendo de la cantidad de material radioactivo adicionado), y se colocaron sobre papel filtro Whatman 3MM (estéril), al mismo tiempo que se les agregó a las muestras sobre el filtro, TCA al 5 % frío, y se dejaron secar, fue entonces que se lavaron con TCA al 10% por 10 min; TCA al 5% 10 min y finalmente con etanol al 30 % durante 20 min. (el lavado se llevó a cabo a temperatura de 0 – 4 °C). Una vez secos los filtros, se colocaron dentro de viales que contenían líquido de centelleo (tolueno-tritón I). La radiactividad (cpm), fue medida a través de un contador de centelleo líquido Packard Tri-Carb (mod. 3385).

### **Monitoreo de la Infección ("Piloto de Infección")**

Después del periodo de adsorción de 45' a T.A., el cultivo celular infectado con poliovirus en ausencia de metionina, fue suplementado con suero dializado y glutamina y, llevado a la temperatura de 37°C (tiempo cero de infección). En este momento se comenzó la cinética de infección, mediante un experimento de "pulso y caza". A diferentes tiempos de la infección, alícuotas del cultivo (50-100 ul), fueron suplementadas con metionina-(S (2uCi/ml.)), manteniendo estas en incubación por 5' a 37°C, inmediatamente después, le fue añadido un exceso de metionina no radioactiva (20X mas concentrada) (experimento de pulso), continuando la incubacion por 2 minutos mas.

### **Purificación y análisis de viriones radioactivos-metionina-(S<sup>35</sup>) de células HeLa infectadas con poliovirus**

Celulas HeLa crecidas en suspensión (3.5 X 10<sup>6</sup> totales) fueron infectadas con poliovirus (vease Métodos) a una m.d.i. de 100 U.F.P., pasado el tiempo de adsorción (45') se colocaron las células infectadas a 37°C y en agitación (tiempo cero). A las dos horas con treinta minutos post-infección, las células se marcaron con metionina-(S[35]) a una concentración de 10 uCi/ml., (en donde dadas las condiciones, la marca se incorporo preferencialmente a la síntesis de proteína viral) la infección tuvo una duración total de 7 horas. Una vez concluido este tiempo al cultivo infectado se le adicionó metonina fría (20X), permitiendo la incubación por 5 min. mas (con el objeto de inhibir la incorporación de mas material radioactivos).

El paquete celular obtenido de la infección se lavo con PBS estéril frío y se resuspendió posteriormente en buffer RSB Mg<sup>++</sup>I (aproximadamente 7 ml.), las células entonces, se homogenizaron en frío, o bien se congelaron (-80 °C) y descongelaron (37 °C) por 3 ocasiones, para homogenizarse con 7 a 10 golpes, hecho esto la muestra se centrifugo (10000 g por 10'), y el sobrenadante recuperado fue clarificado con DOC y Brij-58 a una concentracon final de 1%.

Cabe aclarar que el orden de adición de ambos reactivos fue el siguiente: DOC por l' en agitación Brij-58 consecutivamente. El sobrenadante clarificado, se colocó sobre gradientes de sacarosa (p/p y no más de 2 a 3 ml por gradiente), de 15-30% en RSB-Mg<sup>++</sup>I preparado en tubos de polialomero para rotor SW28 (Beckman), las condiciones de centrifugación fueron de 13 horas a 17 000 rpm y a 4 °C, la centrifuga utilizada fue una ultracentrifuga Beckman modelo L8-55. Los gradientes se colectaron manualmente, en fracciones de 1 ml y se ensayaron por radioactividad (fig. ). El pico denominado B en la gráfica obtenida del gradiente y que correspondió al tercio inferior (aproximadamente 155 S) se diluyo en RSB-Mg<sup>++</sup>I para después centrifugarse en tubos de policarbonato en el rotor 60 de titanio (60Ti) por 3 horas a 40 000 rpm y 4 °C, y la pastilla obtenida fue resuspendida en el menor volumen posible, y se procedio a realizar análisis de actividad y pureza del virión (vease gráfica de pureza obtenida a partir de geles de poliacrilamida al 10 % - SDS).

#### **Titulación de los virus radiactivos-metionina S-35 (método de UFP)**

24 horas antes de la infección con el virus se sembraron células R en monocapa (% X10 células por caja de 100 mm), y antes de la infección las células fueron lavadas con MEM de infección estéril (cuidando de no desprender la monocapa). Por otra parte, se procedieron a preparar las diluciones del vius (desde 10<sup>-6</sup> hasta 10<sup>-12</sup>) en MEM de infección estéril. Las monocapas se infectaron entoces con 1 ml por caja de cada dilución y por duplicado incluyendo el control (manejado en las mismas condiciones pero en ausencia de virus), la adsorción fue de 1 hora a t.a. y en agitación suave. Después de la adsorción, se retiró el sobrenadante que contenia virus no adsorbidos, para hacer añadida una mezcla de MEM-agar 1.5 % (vease material) a 45 °C.

Aproximadamente 10 ml por caja y se dejó solidificar por 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez solidificado este, las cajas se incubaron invertidas a 37 °C y 10 % de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Las placas líticas fueron visibles a este tiempo y se procedió a determinar el número de estas.

### **Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida al 10%-SDS (PAGE)**

Los geles de poliacrilamida al 10 % se prepararon en presencia de SDS siguiendo el método descrito por Laemmli, en una cámara de electroforesis en placa, marca Bio-Rad, modelo proteom 16 cm. El procedimiento fue el siguiente: las soluciones se estabilizaron a temperatura ambiente y se preparó el persulfato de amonio el mismo día de su uso. Procediéndose a preparar el gel separador al 10 % (inferior), adicionando los siguientes reactivos: 12.5 ml de acrilamida al 30%, 5.05 ml de bis-acrilamida al 2%, 14.05 ml de Tris-base 1M pH 8.8, 187.5 µl de SDS al 20%, 4.75 ml de agua bidestilada estéril, 30 µl de TEMED y 225 µl de persulfato de amonio, (100 µg/ml) dando un volumen total de 36.70 ml, y se mezclaron perfectamente procediendo al llenado de la cámara hasta 3 cm abajo de la línea superior del gel y se dejó polimerizar.

Preparación del gel concentrador al 4% (gel superior). Se utilizaron los siguientes reactivos: 850 µl de acrilamida, 350 µl de bis-acrilamida, 625 µl de Tris-base 1M pH 6.8, 25 µl de SDS al 20%, 3.39 ml de agua bidestilada, 5 µl de TEMED y 25 µl de persulfato de amonio para un volumen final de 5.27 ml. Toda la solución se mezcló perfectamente y de inmediato se colocó sobre el gel separador, una vez polimerizado el gel se recorrió durante 60 min a 100 volts.

Preparación de las muestras de proteína.

De las muestras obtenidas de los diferentes experimentos, se tomaron cantidades necesarias para la localización de las proteínas, tanto por tinción (20-50 µg), como por cpm (10 000-20 000 cpm). Las

muestras se resuspendieron v/v en buffer de muestra (no más de 80 ul de volumen final) y se desnaturalizaron por calentamiento en un baño a ebullición, antes de ser colocadas sobre los pocillos del gel.

**Condiciones de corrida para los geles de poliacrilamida 10%-SDS.**

Una vez preparadas las muestras, estas se colocaron en el aparato de electroforesis. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 100 volts, durante el tiempo requerido para que el colorante utilizado como fuente de la corrida llegará a un centímetro pro arriba del fondo del gel.

**Procedimientos para la detección de las proteínas en geles de poliacrilamida 10%-SDS. Tinción de Geles.** Al finalizar la corrida, los geles se tiñeron durante 30 min, con una solución de azul de Coomassie (vease material), y se destiñeron con varios cambios de una solución desteñidora que contenía metanol-ácido acético.

**Fluorografía.** La detección de los polipéptidos radioactivos fraccionados por electroforesis unidimensional se realizaron entre otros por el método de fluorografía ( ). Para esto, los geles desteñidos se deshidrataron con 2 volúmenes de DMSO por 45 min. enseguida, los geles se trataron con 4 volúmenes de una solución PPO-DMSO, durante 3 horas, y, finalmente se transfirieron a una solución de glicerol al 1% en agua, donde se mantuvieron por un tiempo mínimo de 1 hora. Los geles se secaron (secador Bio-Rad) y, se colocaron en contacto con una película de rayos X (Kodak) por tiempos variables.

**Medición de la radiactividad incorporada a proteínas en banda, mediante la digestión de**

### **geles de poliacrilamida 10%-SDS**

Para el caso de las muestras de proteínas radioactivas de virus purificados, se utilizó la siguiente metodología para diferenciar la cantidad de radioactividad localizada en cada banda de estas proteínas. Del volumen obtenido de virus radioactivos purificados, se tomo la cantidad necesaria (vease explicación anterior) para la localización de las proteínas tanto por tinción como por cpm. Del gel de poliacrilamida al 10%-SDS, una vez teñido y desteñido, se corto cada carril en fracciones de 2mm de espesor, y estas fracciones fueron colocadas en viales que contenían 0.25 ml de HO al 30%, alcalinizadas con 1/50 de volumen de hidroxido de amonio. Los viales con las muestras en solución se colocaron en agitación a 37 °C toda la noche, al día siguiente a cada uno de los viales se les adicionó un volumen final de 1 ml de agua bidestilada y por último se agregó de 5-15 ml de líquido de centelleo se colocaron de 2-3 horas en ausencia de luz y a temperatura de 4 °C. Posteriormente se determinaron las cpm.

### **Técnica de Inmunodecoración (tinción negativa) para microscopía electrónica**

Una pequeña cantidad de muestra de antígeno (virus purificados radiactivos) diluida en RSB-Mg<sup>++</sup>I (1:10; 1:100), se colocó sobre una capa dental de parafina muy limpia, posteriormente se tomo una rejilla para M.E. (que contenía una película de polivinil-formol y una cubierta de carbón) y se colocó sobre la gota de antígeno por 2'. La rejilla con el antígeno adherido se lavo entonces con PBS estéril por algunos segundos, se tomo la rejilla con unas pinzas finas y se colocó ahora sobre una gota de anticuerpo (suero anti-proteínas estructurales virales) diluido en RSB-Mg<sup>++</sup>I (1:10), por 20 min. El exceso de anticuerpo se retiro, lavando la rejilla con PBS estéril y después con agua bidestilada por 20 seg. El siguiente paso fue exponer la rejilla (lavado rápido) a una solución de acetato de uranilo ( $5 \times 10^{-3}$  M, 50 mM HCl) eliminando el exceso de inmediato sacudiendo la rejilla y finalmente secandola suavemente de los bordes con papel filtro (Whatman 1

M). Una vez secas las muestras a t.a. se examinaron al microscopio electrónico.

**Prueba por inmunoprecipitación de la reacción de los sueros anti-VP contra polipeptidos estructurales virales Poliovirus tipo I (Mahoney), marcados con metionina-S35, y purificados por centrifugación en gradientes de sacarosa.**

Los virus fueron disociados por calentamiento durante 3 min en 150 mM de NaCl, 5mM EDTA, 50 mM Tris pH 7.4 y 0.2 de NN (buffer NET) con 0.05% de Nonident P-40 (NP-40), 2 % de SDS y 5% de b-mercaptoethanol, diluyendo después 20X en buffer NET con 0.05% de NP-40. Alicuotas de 25 ul por reacción, para las siguientes proteínas estructurales, con el siguiente número de cuentas aprox.; 15 000 cpm para VP1, 19 000 cpma para VP2 y 31 000 para VP3. Estas alicuotas fueron incubadas por 18 hrs a 4°C con las adecuadas diluciones de antisueros (diluciones de anti VP1 1:20; de anti-VP2 1:40; y de anti-VP3 1:40). Los complejos inmunológicos, fueron precipitados, usando *Staphylococcus aureus* (cepa Cowan I) ( ).

Para la elución de lo adsorbido, se ajustaron las muestras a 1% de SDS, y se hirvieron por 3 min, posteriormente se centrifugaron y del sobrenadante obtenido, se tomo la radioactividad equivalente a 15 000 cpm por muestra, analizando estas en geles de poliacrilamida 10%-SDS.

**Infección a células HeLa con poliovirus radioactivos metionina-S35, y la centrifugación de las mismas en gradientes de sacarosa**

Células HeLa S fueron infectadas con virus purificados radioactivos a una moi de 500 UFP, el cultivo celular ( $10^7$  células/ml) se mantuvo a 15 °C o a t.a. para permitir la adsorción del virus. 45 min más tarde, se añadieron 2% de suero fetal dializado y 1% de glutamina, y, el cultivo se diluyo entonces a  $5 \times 10^6$  células/ml en MEM de infección para ser incubado a la temperatura de 37 °C (tiempo cero de infección).

A diferentes tiempos a través de la infección, fué analizada la asociación de proteínas de la cápside radiactivas a estructuras virales. Alicuotas de  $0.8 \times 10^8$  células se lavaron con PBS estéril, y otra segunda vez con solución amortiguadora (polis), finalmente la pastilla celular se resuspendió en 2 ml de está solución amortiguadora, colocando las muestras sobre gradientes discontinuos de sacarosa que contenian, del fondo, a la parte superior del tubo, la siguiente disposición; 3 ml de sacarosa al 60%, 30 ml de un gradiente lineal de sacarosa 15-30% (p/p) y 2 ml de sacarosa 10%-DOC-Brij58 ( ). La centrifugación se llevó a cabo en un rotor de Beckman SW28 a 26 000 rpm y a 4 °C. Las fracciones del gradiente se monitoriaron por absorbancia a 260-280 nm en un espectrofotometro (Carl-Zeiss PMQII) y ensayadas por radioactividad como describen Flores-Otero y cols (1982).

#### **Fijación de Complejos Nucleoproteicos**

Fracciones de 1 ml obtenidas de regiones seleccionadas de los gradientes discontinuos de sacarosa (fig. ), fueron fijados con glutaraldehído a la temperatura de 4 °C de la siguiente manera: por cada 0.8 ml de estas muestras, se añadieron 0.2 ml de 33% de glutaraldehído, neutralizando a pH de 7.0 con NaHCO 1M justo antes de usarlo. Las muestras se colocaron inmediatamente para su análisis en gradiente de CsCl lineales, preforamados, de 25-53% preparados en RSB-Mg<sup>++</sup>I que contenia 0.8% de Brij-58 en tubos de nitrato de celulosa con capacidad para 5 ml. La centrifugación se llevó a cabo por 5 hrs. a 42 600 rpm en un rotor Beckman SW50 a 4°C. Los gradientes se colectaron en fracciones de 200 ul y se ensayaron por, índice de refracción, y radioactividad ácido precipitable. Las densidades se obtuvieron por la medida del índice de refracción (manera adecuada para eliminar aparición de absorbancia de sacarosa y glutaraldehído) en un refractometro Bausch & Lomb (USA).

## RESULTADOS

### **Proteínas virales asociadas a poliribosomas en células HeLa infectadas con el virus de la poliomielitis**

Con el fin de explorar la asociación de proteínas de la cápside derivadas del virión (PDV) a componentes virales intracelulares, se decidió analizar el destino de entrada de las proteínas estructurales del virus. Para abordar nuestro objetivo, se procedió en primera instancia a la preparación de virus de la poliomielitis (poliovirus) altamente purificados y marcados en su proteína estructural con metionina-S<sup>35</sup> (sección de Métodos). Se comprobó su pureza, mediante geles de poliacrilamida-SDS (Figs. 2A y 2B), microscopía electrónica (Figs. 2C), reacciones inmunológicas con anticuerpos policlonales dirigidos contra tres de las proteínas estructurales del virus, para su análisis posterior en geles (Fig. 3) y finalmente, la titulación de los mismos por la técnica de UFP.

Una vez obtenidos los virus purificados y radioactivos, éstos fueron adsorbidos a cultivos en suspensión de células HeLa S (con una relación aproximada de  $2.7 \times 10^7 / 4 \times 10^8$  células) por 45 min a 15 °C. Posteriormente se permitió la penetración del virus, mediante la incubación del cultivo infectado a la temperatura de 37°C (tiempo “cero” de infección), como se describe en Métodos. Debido a la baja actividad específica (cpm/UFP) del virus radioactivo, la infección se realizó a una m.d.i. de 500 UFP/célula.

Para seguir la penetración y estabilidad de las proteínas derivadas del virión (PDV) durante la infección fue necesario realizar dos clases de experimentos. El primero consistió en determinar las proteínas radioactivas mediante la toma de alicuotas ( $0.25 \times 10^6$  células por duplicado) del cultivo de células HeLa infectadas con los virus radioactivos, a diferentes tiempos después de la infección, cuantificando el total de radioactividad ácido-insoluble en la pastilla celular (Fig. 4A). En segundo término se decidió analizar a los tiempos “cero” y 180 min post-infección (p.i.) los extractos

citoplasmáticos postnucleares de alícuotas del cultivo y someterlos a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (Figs. 4B y 4C).

Haciendo un breve resumen de los resultados obtenidos de la figura 4, se puede concluir lo siguiente: hasta las tres horas p.i. más del 90% de la proteína radioactiva adsorbida actúa como proteína ácido-insoluble, y esto se demuestra de acuerdo al patrón esperado de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 de las figuras 4B y 4C. Esta es una evidencia de que las partículas virales fueron adsorbidas a las células. Bajo nuestras condiciones experimentales, sólo del 1 al 1.5% del total de la proteína radioactiva llegó a asociarse a la célula después del período de adsorción de 45 min a 15 °C, dado que al ser incubado el cultivo celular infectado a la temperatura de 37 °C, las PDV radioactivas unidas a la pastilla celular, no fueron liberadas aun después de varios lavados. Bajo las condiciones experimentales empleadas cabe mencionar que no pudieron ser detectadas las proteínas VP4 y VPg; en esta última no hay residuos de metionina en la molécula.

Para estudiar la aparición de la PDV en subpartículas virales se efectuó un análisis por gradientes discontinuos de densidad en sacarosa (Sección de Métodos). La metodología que se empleó en estos experimentos permitió evitar una degradación importante del ARN localizado en las preparaciones, así como el facilitar la separación de los diversos componentes virales intracelulares encontrados durante la infección con poliovirus. Después de los 180 min de la infección a 37 °C con los virus radioactivos, las células se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS), y se continuó con un segundo lavado con el amortiguador "polis". Inmediatamente después fueron sometidas a un fraccionamiento por gradiente discontinuo de sacarosa-RSB en presencia de magnesio, para prevenir la disociación de polisomas. Durante la centrifugación las células fueron rotas con los detergentes DOC/Brij-58 colocados en la solución de sacarosa al 10%, localizada en

la parte superior del gradiente. El DOC contenido en el gradiente (0.5%) da lugar a la disociación de estructuras virales grandes (polisomas virales específicos y complejo de replicación "CR"), atrapadas en material de membrana. La **figura 5** muestra el perfil de sedimentación del lisado de células infectadas radioactivas, después de su centrifugación en presencia de detergente. La gráfica revela que la adsorción de las PDV marcadas con metionina-S<sup>35</sup> se localizan en dos fracciones importantes: una fracción heterogénea de bajo coeficiente de sedimentación (FL), la cual migra por arriba de la posición de los virus nativos, (aproximadamente un 52% del total de radioactividad ácido-insoluble colocada sobre el gradiente) y, la segunda, compuesta de un material de sedimentación rápido (equivalente a las fracciones 35-38 del gradiente), abarcando el 45 % aproximado del total de las PDV-radioactivas, a la que se le denominó como fracción pesada (FP) (**Fig. 5**).

Realizando experimentos de doble marca se pudo establecer, que la FP estaba compuesta de ribonucleoproteína (s) (RNP). Para ésto, se trabajaron células HeLa infectadas con poliovirus y células HeLa control y a las 2 hrs p.i. fueron suplementadas con metionina-S<sup>35</sup> y uridina-H<sup>3</sup>, después de 60 min de incubación en presencia de los isotopos radioactivos, ambos cultivos se sujetaron a las mismas condiciones de análisis a través de gradientes discontinuos de sacarosa. La **figura 6**, indica que la radioactividad incorporada a las RNP, comigra hacia la región de sedimentación rápida conocida como FP, y, que sólo se detecta en células HeLa infectadas con poliovirus (**Figura 6A**)

La pregunta que surgió entonces, fue saber si la acumulación de las PDV-radioactivas en la FP eran dependientes de la penetración y/o modificación del virus. Para esto se realizó un experimento que consistió en trasladar la infección a células HeLa con poliovirus, a baja temperatura, dado el

antecedente de que la infección viral es un evento dependiente de la misma. De tal manera que el progreso de la infección se siguió por la incorporación de metionina-S<sup>35</sup> y, de manera paralela a las temperaturas de 15 y 37 °C. Las células HeLa fueron infectadas con virus radioactivos (como se especifica en la figura 5), y pasado el tiempo de la adsorción de 45 min, éstas se colocaron a la temperatura de 15 °C, finalizados los 180 min de infección requeridos, se procedió a analizar el cultivo, bajo las mismas condiciones de fraccionamiento por gradientes de sacarosa. Hay que hacer notar que no se detectaron PDV ni en la región heterogénea FL, ni en la región de sedimentación rápida FP. Estos resultados muestran y apoyan evidencias previas que demuestran que la llamada "reacción modificadora" mediada por la membrana plasmática durante la infección, ocurre sólo a la temperatura de 37 °C, y además sugieren que esta posible modificación de los virus y/o su penetración, son necesarios para la detección de las PDV en la zona de sedimentación rápida o FP.

Esta bien fundamentado en la literatura que cuando células permisivas con virus marcados son incubados a 37 °C, los virus pierden una de sus proteínas de cápside, la proteína VP4 o bien la P1a de acuerdo a la nomenclatura L434. Esta es la causa por la que en un gradiente de sedimentación, el virión sedimenta más lentamente, y de manera más heterogénea que los virus intactos (ver figura 5).

El papel de las proteínas de cápside virales, en la síntesis de proteínas de células infectadas, ha sido reportado. La unión de proteínas de cápside a subunidades ribosomales fue descrito en células infectadas con Alfavirus y Picornavirus (Huang y Baltimore 1970). Una posible consecuencia de la asociación de proteínas de cápside a subunidades ribosomales puede traer como resultado, la interferencia específica entre los ARNm del hospedero dentro del complejo de iniciación 80 S. Esto último ya había sido propuesto en células HeLa infectadas con poliovirus (Baltimore y Huang

1968), y con virus SFV (Semliki Forest Virus) (Bolognesi D. 1974). Por lo tanto, si en los experimentos realizados, las PDV encontradas en células HeLa infectadas, ejercían un efecto inhibitorio en la síntesis de proteínas del hospedero, se hizo el planteamiento de la posible unión de las PDV a las subunidades ribosomales acumulándose tempranamente en la infección. Para investigar la presencia de las PDV radioactivas en las subunidades 40 y 60 S, se decidió analizar la fracción de sedimentación heterogénea o ligera (FL), que se aisló a las 3 hrs p.i. mediante un bandeo isopícnico (Figura 9). En una primera instancia esta marca radioactiva había correspondido al de las proteínas estructurales del virus con el que se había realizado la infección a las células HeLa. La FL fue analizada por bandeo isopícnico siguiendo el procedimiento descrito en Métodos, donde se separan por densidad de flotación los grandes complejos ribonucleoproteicos de citoplasmas de células HeLa infectadas con poliovirus. En resumen, la porción de la FL-radioactiva proveniente del gradiente de sacarosa mostrado en la figura 5, fue aislado, fijado y sujeto a una sedimentación por equilibrio en gradientes preformados de CsCl a una concentración del 25 al 53 %. El análisis mostró la detección de tres componentes radioactivos (Figura 9) equivalentes a las densidades de: 1.4, 1.54 y 1.59, que correspondieron respectivamente para el 38, 19 y 41 % de la radioactividad total en la fracción. La densidad de flotación de estas partículas implica, que la FL obtenida de células infectadas, mantenida a 37 °C, con su respectivo período de adsorción de 45 min a t.a. (aproximadamente 15 °C), contiene complejos subvirales de ribonucleoproteína, y que son compatibles con los intermediarios del virus de la poliomiелitis durante la infección. Por ejemplo, el componente que corresponde a la densidad de 1.4, que contiene un porcentaje mayor de radioactividad, es idéntico al complejo proteína-ARN 35 S (RNPv), con un coeficiente de sedimentación de alrededor de 80 S y que ha sido descrito con anterioridad en el citoplasma de células HeLa infectadas con poliovirus. Esta RNPv se ha sugerido como posible candidato del precursor polisomal viral. Los componente que corresponden a las

densidades de 1.54 y 1.59 pueden representar a los RNPv (80S) con un único ribosoma unido a ésta, o a un ARNv acompañado con proteínas de la cápside. Sin embargo no se puede descartar la presencia de algunos otros intermediarios del virión que se forman durante la penetración y/o desnudamiento. Es de especial interés, decir, que en los resultados obtenidos de los experimentos, no se detecta radioactividad (PDV, metionina-S<sup>35</sup>), en las densidades reportadas para las subunidades 40 S (1.49 g/cc) o para la 60 S (1.57 g/cc), ni en el complejo de replicación (CR) de poliovirus (1.44 g/cc).

**Acumulación de las PDV-metionina S<sup>35</sup> en la fracción de sedimentación rápida (FP) durante la infección con poliovirus, y paralelamente, su inhibición en presencia de cicloheximida.**

Para relacionar la acumulación de las proteínas derivadas del virión (PDV) radioactivas, durante el tiempo de la infección, se decidió realizar experimentos de cinética para determinar la aparición de estas proteínas en las fracciones subcelulares. Se infectaron células HeLa con virus radioactivos purificados, a la temperatura de 37 °C, y a diferentes tiempos de la infección, alícuotas del cultivo se analizaron por gradientes discontinuos de sacarosa en presencia de detergentes (véa Métodos). Los perfiles de radioactividad obtenidos, se muestran en la **Figura 11**, donde nuevamente se observa, que posterior al tiempo de adsorción a t.a. (aprox. 15 °C), la mayor parte de la marca, si no toda se recupera en una fracción única de sedimentación cercano al 150 S (**Fig. 11 A**). Para el tiempo 60 min post-infección (**Fig. 11 B**), se hace evidente la aparición de un segundo “pico radioactivo en la posición donde migra la FP (24% del total de la radioactividad); dicho porcentaje se incrementó conforme la infección transcurrió (45 % alrededor de las tres horas p.i.). Cabe mencionar que la radioactividad ensayada para los diferentes tiempos de la infección, fué estandarizada sobre cada uno de los gradientes. Esta cuantificación se haya resumida en la **Figura 11 D**. La cinética obtenida en estos experimentos, evidencian que conforme transcurre la infección

la acumulación de PDV en la FP se va incrementando linealmente a la disminución del material en FL. Para hacer la comparación, se incluyen los datos obtenidos de la distribución de las PDV-radioactivas durante la infección a 15 °C . Las graficas son consistentes, sugiriendo que la FL es la precursora de la FP.

Un experimento importante que también debe ser tomado en cuenta, es precisamente la cinética de la síntesis de proteína en células HeLa infectadas con el virus de la poliomielitis, y que es dependiente tanto de la multiplicidad de infección, de la línea celular trabajada, así como de la cepa de virus que se utiliza. Para hacer una relación de la acumulación de las PDV marcadas con metionina-S<sup>35</sup> en las fracciones subcelulares, fue preciso estandarizar, la cinética de síntesis de proteína bajo las condiciones experimentales del laboratorio. Para cumplir este objetivo se realizaron los siguientes experimento. El primero consistió en utilizar células “control” (mock) y células infectadas y, a distintos tiempos de la infección, alícuotas de ambos cultivos se suplementaron con metionina-S<sup>35</sup>, durante un periodo de 5 minutos, seguida de la adición de un exceso de metionina no radioactiva (experimento de pulso). El resultado de este ensayo demuestra el patrón obtenido de la síntesis de proteínas de las células control, así como el “apagamiento” de las mismas al ser infectadas con el virus (Fig. 13). También permitió observar la iniciación de la síntesis virus-específica a partir de los 90 min. p.i.

En segundo término se decidió analizar la síntesis de ARNv conjuntamente con el de la síntesis de proteínas. Células HeLa infectadas fueron suplementadas con metionina-S<sup>35</sup>, y Uridina-H<sup>3</sup> después de las 2 horas p.i. a 37 °C (experimento de “marca continua”). La Figura 13 muestra que después del “periodo de eclipse” de 2 horas, existió un periodo exponencial de síntesis de proteína viral, precedido ligeramente, de la síntesis de ARNv. En esta Figura también se relaciona el dato sobre la acumulación de las PDV-metionina-S<sup>35</sup> en función del tiempo, demostrando la estrecha

correspondencia entre la asociación de estas PDV a fracciones subcelulares de sedimentación rápida y la replicación viral.

Está bien establecido el efecto inhibitorio de la síntesis de proteínas por cicloheximida. Con el fin de investigar el efecto de la droga sobre la aparición de las PDV en la FP se infectaron células con los virus radioactivos en presencia de cicloheximida (75 ug/ml). A las 3 horas p.i., las células se colectaron para cuantificar la FP-radioactiva. En la **Figura 12** se describe la inhibición en la síntesis de las proteínas, y la cantidad obtenida de las PDV en la FP tratadas con cicloheximida. Solamente del 10 al 15 % de las PDV absorbidas se recobraron en este material de sedimentación rápida, del total del 45 % obtenido, cuando las células HeLa fueron infectadas en ausencia de la droga. Este resultado demuestra que cicloheximida, previene de manera marcada, la aparición de las PDV radioactivas en la FP.

#### **Caracterización de componentes en la FP**

Para identificar de manera adecuada los componentes radioactivos en la FP, fue necesario compararlos respecto a los del poliovirión maduro, por medio del patrón obtenido a través de geles de poliacrilamida al 10 %-SDS (ver Métodos). En la **figura 8**, pueden observarse las proteínas mayoritarias del virión: VP1, VP2 y VP3 obtenidas a partir de la FP.

Por otro lado, se sabe que la lisis celular en presencia de dexosicolato de sodio (DOC-Na) libera los componentes virales asociados a membranas celulares (polisomas y CR). Con respecto al CR de poliovirus, este es separado en una fracción mayoritaria, un CR pequeño y otro mayor con un coeficiente de sedimentación de 70 y 150 S respectivamente, además del polisoma viral localizado en la fracción correspondiente a 300 S (**Figura 8**). Así mismo, la FP obtenida a partir de la

infección a las células HeLa con poliovirus en la presencia de precursores radioactivos como metionina y uridina muestran, a las 2.5 horas p.i. la presencia de una ribonucleoproteína subviral-metionina S<sup>35</sup>. Esta RNPv demuestra la clásica disociabilidad de un complejo ribosoma-ARN al incubarlo en presencia de 20 mM de EDTA o con 1 mM de puromicina.

Otro de los experimentos realizados para caracterizar los componentes localizados en la FP, fue analizar el comportamiento de las PDV-radioactivas cuando se trabajan en condiciones que destruían los complejos ribosoma-ARN. Para esto, una alícuota de la FP radioactiva (obtenida de las fracciones 36-38 de los gradientes de sacarosa descritos en la Figura 5, fue incubada en una mezcla de las ribonucleasas A y T2 bajo condiciones que degradaban completamente el ARN de cadena sencilla (50 mM de acetato de sodio, pH 5.0). Después de la incubación de la FP tratada y no tratada con las enzimas, se analizó bajo las mismas condiciones por gradiente de sacarosa, que sólo varió por la ausencia de los detergentes DOC y Brij-58. Por un lado, mientras que la muestra no tratada fue localizada en la misma fracción de sedimentación rápida, correspondiente a la FP (Figura 6), aproximadamente el 70 % de la proteína radioactiva de la FP tratada con las Rnasas apareció en el tope del gradiente (Figura 7). Por otro lado cuando la FP se expuso en condiciones de pH y sales que degradan el ARN de doble cadena (ARNdc) el 69 % de la radioactividad ácido-insoluble del total utilizado, permaneció concentrada en la región denominada FP (datos no mostrados).

Ya ha sido reportada la densidad obtenida para el caso del complejo denominado RNPv en el citoplasma de células HeLa durante su infección con poliovirus, por lo tanto, una manera adecuada de definir claramente al componente conocido como FP fue precisamente, su análisis a través de gradientes de cloruro de cesio, tal como está descrito en la figura 8. De manera concisa, se aisló la FP-radioactiva de gradientes de sacarosa como se muestra en la figura 5 y posteriormente, se analizó mediante sedimentación al equilibrio en gradientes preformados de CsCl del 25 % al 53 %,

con una previa fijación de la fracción con glutaraldehído antes de ser colocada sobre los gradientes. Los productos obtenidos de la centrifugación fueron 3 especies radioactivas distintas que mostraron densidades de 1.54, 1.5 y 1.44 g/cc, no detectándose esta misma a la densidad de 1.34 g/cc (virión) (Figs. 8). Realizando un análisis porcentual se encontró, que aproximadamente el 61 % de la metionina-S<sup>35</sup> recobrada en la FP correspondio a 1.54, y que de acuerdo a la densidad de flotamiento reportada, es para el polisoma viral. Así mismo, cuando se decidió examinar la FP incubándola en una solución de 20 mM de EDTA, antes de su fijación y bandedo en CsCl, la cantidad recuperada de las PDV radioactivas en la densidad de 1.54, disminuyo desde un 61% a menos del 5 % . Por otra parte el hecho de haber trabajado con la presencia del DOC duante la lisis celular y la obtención de pequeñas cantidades de material a las densidades de 1.5 y 1.44, da la pauta a creer que estas pudieran corresponder a productos de degradación y no la contaminación de otras grandes estructuras virales como podría llegar a pensarse.

## DISCUSION

El proceso de infección de poliovirus a la célula permisiva, involucra la transmisión de su genoma del espacio extracelular hacia dentro del citosol. Este evento requiere su transporte a través de una o mas barreras de membrana. Antes de penetrar a la célula, el virus se adhiere a la superficie de esta en un proceso en que se encuentran involucrados los receptores de la membrana del hospedero (De Fasekes S. 1948).

Aunque se tiene entendido solo parcialmente el mecanismo de entrada y desnudamiento de algunos picornavirus dentro de la célula y la liberación del ARNv dentro del citoplasma (Arevalo G. S. 1983; Baltimore y Huang 1968; Baltimore y cols. 1966), y este también es el caso con el destino de entrada de las proteínas infectantes de la cápside del virus, a excepción de los estudios realizados por Habermehl y cols. (1973). Por lo tanto fue de gran interes, el estudiar tanto la penetración como la estabilidad de las proteínas de la cápside derivadas del virión (PDV), durante la infección con poliovirus en células HeLa. La manera de abordar este planteamiento, fue precisamente la infección de las células a partir de virus purificados radioactivos (metionina- $S^{35}$ ), y el aislamiento de los diversos componentes marcados para su posterior análisis, así como el estudio del tiempo requerido de las PDV-metionina  $S^{35}$  que llegaron a asociarse a estas diferentes estructuras.

Algunos autores han mostrado que las fracciones aisladas de membranas celulares, que son sensitivas a poliovirus, son capaces de alterar a las partículas virales "in vitro". Esta alteración, "in vivo", sería en el sentido de que partículas subvirales que se producen en estas condiciones carecen de VP (De Sena y Mandel 1977). En este trabajo, los virus radiactivos purificados a quienes se les permitió interactuar con las células a la temperatura de 15 °C y posteriormente un cambio a la temperatura de 37 °C, se les detecto una cierta modificación, con respecto a su coeficiente de

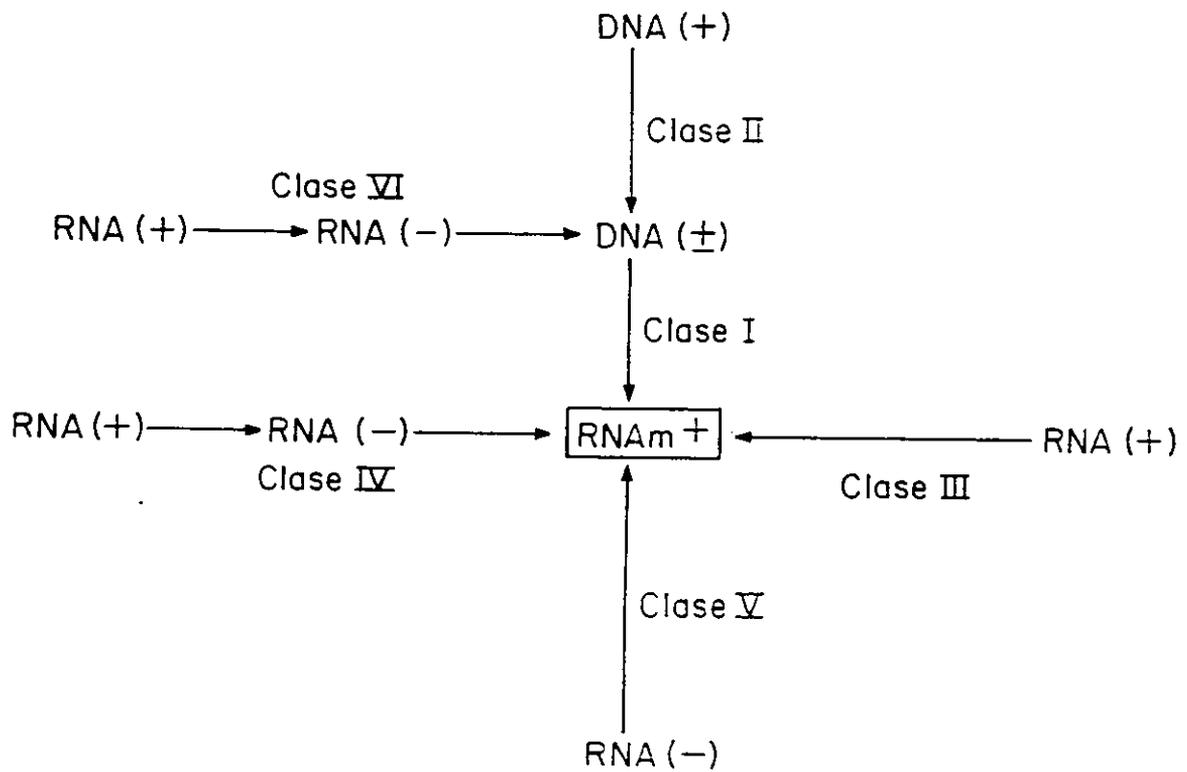
sedimentación (Fig. 5) y densidad de flotamiento (Fig. 8). Estas partículas modificadas durante el proceso de la infección, que son resistentes al DOC, parecen ser parte de intermediarios que intervienen durante el desnudamiento del virus y/o penetración ya que, aunque contienen ARN (1.4, 1.54 y 1.59 g/cc en densidad de flotamiento en CsCl), estas estructuras son menos compactas (por abajo de 150 S). Tal vez estos complejos son resultantes de la pérdida de material de cápside, y/o un rearrreglo de la estructura basal del virus. Este resultado sugiere, que células susceptibles al virus, son capaces de modificar al virus a través de su membrana, estos resultados son compatibles con los reportados; sobre la asociación de partículas virales a fracciones de membrana plasmática, las cuales causan, a la temperatura de 37 °C, una transición de un estado de 150 S a otro de menor densidad de 130 S.

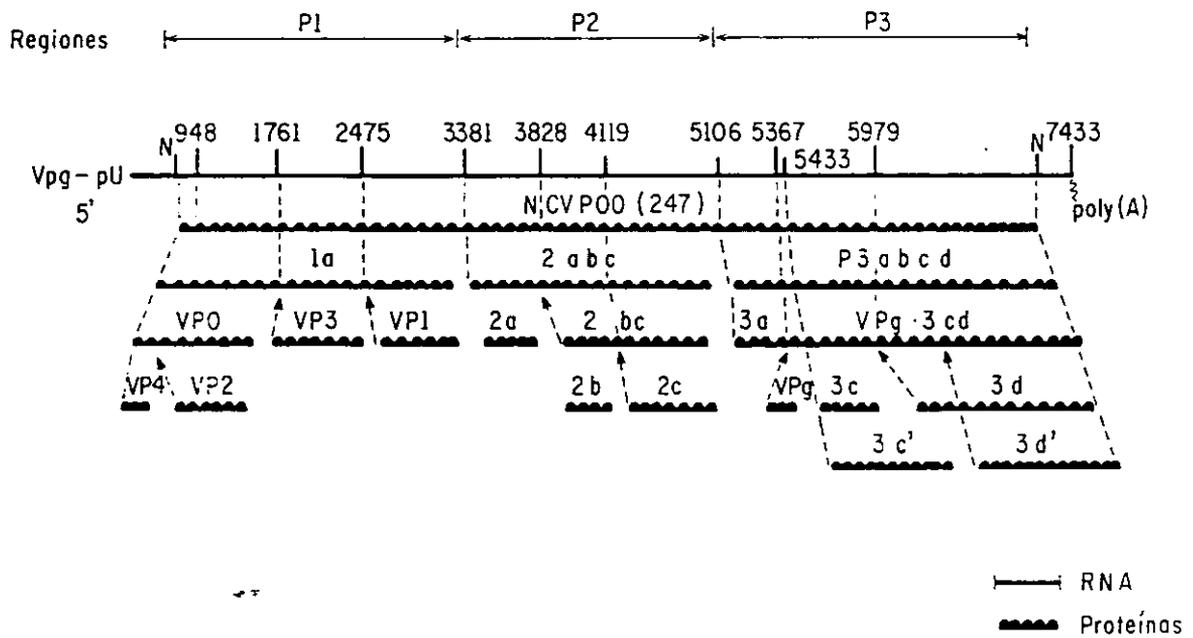
Algunos reportes previos han mostrado que los detergentes DOC y Brij-58 entre otros, inhiben la actividad "modificadora" de fracciones de células HeLa (De Sena y Torian 1980). Tal vez como consecuencia del rompimiento de la integridad de la membrana.

En los experimentos que se realizaron para este trabajo, es probable que el complejo formado entre el virus-membrana celular, fue roto durante el tratamiento con los detergentes, puesto que no se detectaron componentes de baja densidad (vea las figuras 5 y 8).

Basandonos en los datos reportados por Joklik y Darnel (1961) de que del 10 al 20 % de las partículas virales son capaces de desarrollar infección sucesiva, durante la interacción de poliovirus a las células HeLa es probable que solo aquellas partículas que hayan sufrido el cambio conformacional que les permita penetrar a la células y mantener su "integridad" para poder ser expresados en las células infectadas sean las que son capaces de continuar su ciclo replicativo.

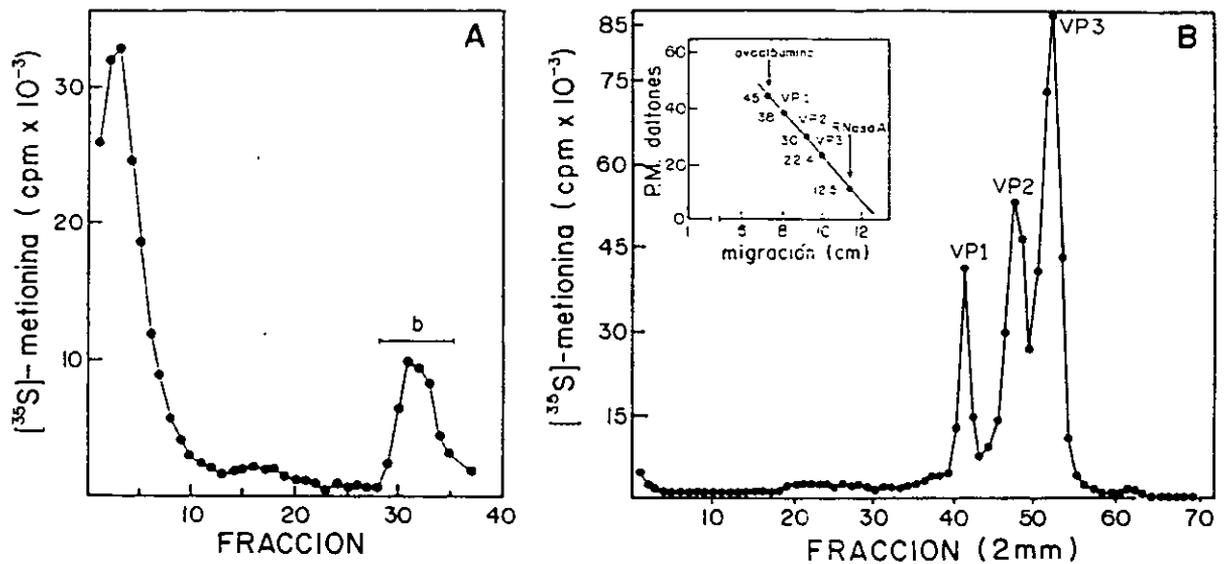
ESQUEMA 1. ESTRATEGIAS DE REPLICACION . CLASIFICACION PROPUESTA POR DAVID BALTIMORE  
 (Baltimore D. 1971. Expression of animal virus genomes. Bac. Rev. 35: 235-241)





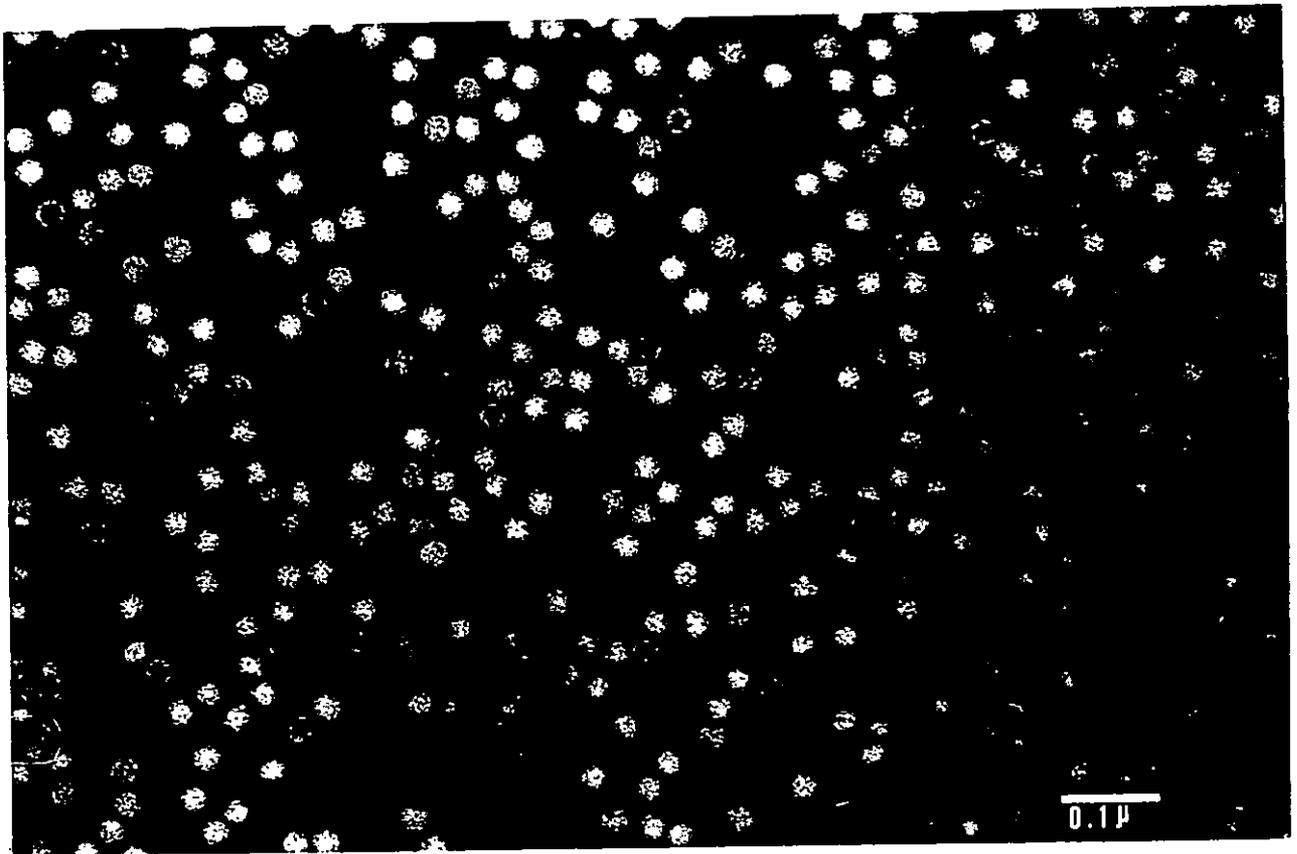
**FIGURA 1. MAPA DE TRADUCCIÓN Y PROCESAMIENTO POLIPEPTIDICO DE POLIOVIRUS.**

La barra sólida representa el ARN del virión con la proteína VPg unida covalentemente al extremo 5' terminal; y en el extremo 3' terminal el fragmento de poly (A) (tomado y modificado de Kitamura y cols. 1981; Hanecak y cols 1982; Semler y cols. 1983 y Rueckert y Wimmer, 1984).



**FIGURA 2 . PURIFICACION DE VIRUS RADIOACTIVOS.**

Células HeLa crecidas en suspensión, fueron colocadas en un medio de cultivo libre de metionina, fueron infectadas con poliovirus tipo I (Mahoney) a una m.d.i. de 100 UFP. A las 2.5 horas. p.i. 10 uCi/ml de metionina-S35 fueron adicionadas al cultivo, y, 7 horas más tarde, el extracto citoplásmico fué estratificado sobre un gradiente lineal de sacarosa-RSB-Mg<sup>++</sup> (ver Métodos). Fracciones de 1.0 ml se colectaron, y posteriormente les fue determinada la cantidad de cpm en una base de líquido de centelleo. Las fracciones obtenidas de la región b (Panel A) se analizaron en un gel de poliacrilamida-SDS para electroforesis en placa (SDS-PAGE), y se determinó su contenido de proteínas (Panel B) como se expone en la Metodología. Proteínas de peso molecular conocido se incluyeron como marcadores.



**FIGURA 2<sup>a</sup>. MICROGRAFIA ELECTRONICA DE VIRUS RADIOACTIVOS (METIONINA-S35), PURIFICADOS.**

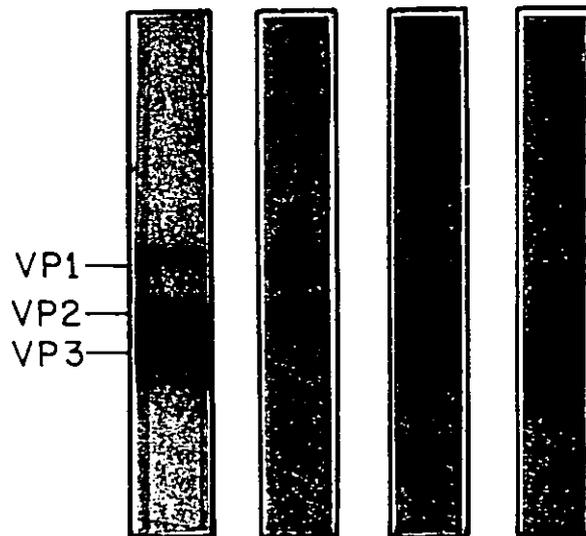
A) Virus aislados a partir de la fracción b de la figura 2A, y procesados mediante tinción negativa con acetato de uranilo.

B) Los virus purificados a partir de la fracción b, fueron preincubados con anticuerpos contra las proteínas de cápside VP1, VP2 y VP3 (como esta descrito en Métodos), y posteriormente procesados para microscopía electrónica. La barra horizontal corresponde a un diámetro de 0.1 um.

TABLA I. Relación de las proteínas de poliovirus.

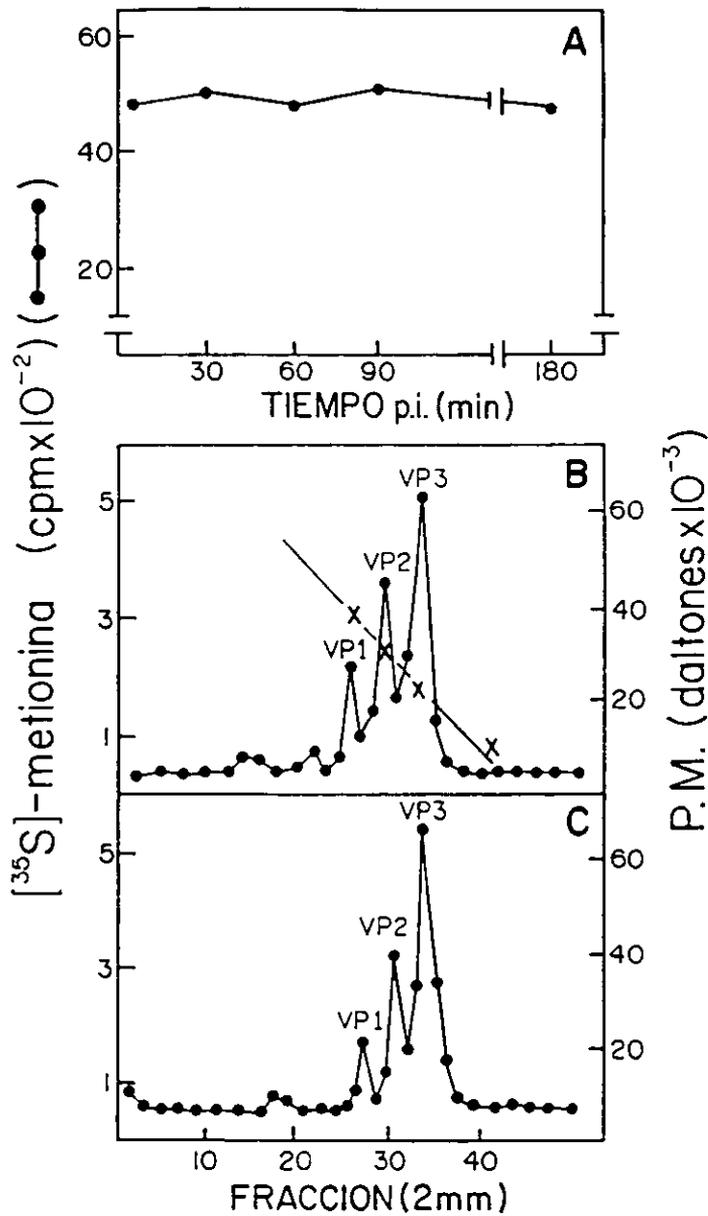
Kitamura y cols. (1981)	Rueckert y Wimmer (1984)	
	L434	P.M. (Kd)
NCVP 00		247
P1-1A	1 ó P1	97
P2-3b	2 ó P2	65
P2-5b	2 Bc	48
P2-X	2 c	38
P3-1b	3 ó P3	84
P3-9	3AB	11.5
P3-7c	3 c	20
P3-4b	3 d	52
P3-2	3 cd	72
P3-6a+	3 c'	36.4
P3-6b+	3 d'	35.6
VPO	1 ab	37
VP1	1 d	34
VP2	1 b	30
VP3	1 c	26
VP4	1 a	7

Los productos + provienen de un rompimiento alternativo de P3-2.



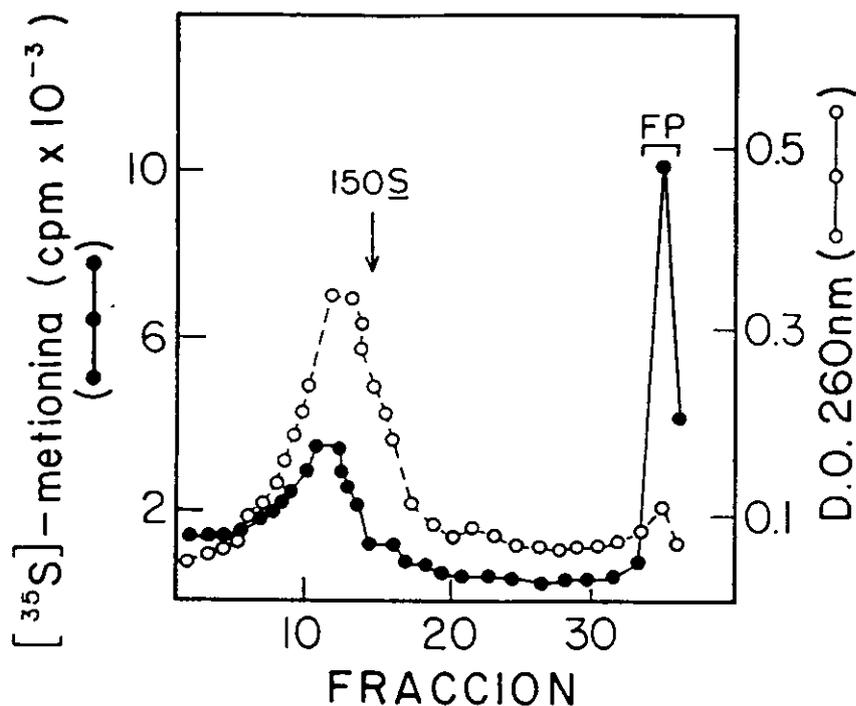
**FIGURA. 3. AUTORADIOGRAFIA DE PROTEINAS ESTRUCTURALES DE VIRUS PURIFICADOS, OBTENIDOS MEDIANTE REACCION INMUNOLOGICA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA PROTEINAS ESTRUCTURALES DE POLIOVIRUS.**

Virus purificados radioactivos se desnaturalizaron en buffer Net-SDS durante 3' a 100 °C como describen Blondel y cols (1982) (ver Material y Métodos), posteriormente la muestra se dividió en 3 fracciones que fueron trabajadas con los 3 diferentes anticuerpos contra las tres de las proteínas estructurales y finalmente inmunoprecipitadas utilizando como acarreador a la pansorbina (lisado de *Staphilococcus Aureus*). El carril 1) corresponde a un control de virus completos; 2) fracción inmunoprecipitada con ab. contra la proteína VP1; 3) proteína VP2 inmunoprecipitada con ab. contra VP2 y 4) proteína VP3 inmunoprecipitada con ab. contra VP3.



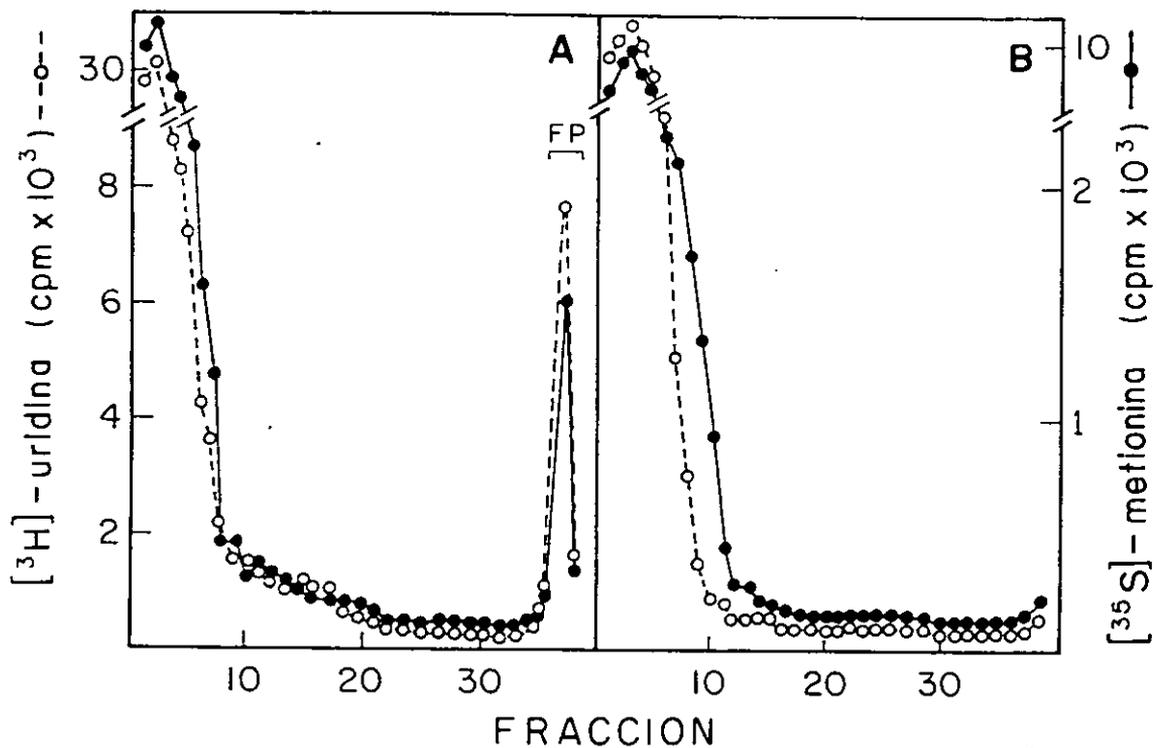
**FIGURA 4. ESTABILIDAD DE PROTEINAS DE CAPSIDE RADIOACTIVAS DERIVADAS DEL VIRION, ADSORVIDAS DURANTE INFECCION.**

Las células fueron infectadas con virus purificados marcados, como se describe en Material y Métodos. A) A diferentes tiempos, alicuotas del cultivo infectado fueron ensayadas para medir radioactividad ácido-insoluble total. B) Patrón de proteínas en gels PAGE-SDS a partir de células colocadas en gradientes discontinuos, de sacarosa-RSB, Brij-58, DOC (Fracción FP) obtenido a tiempo cero y C) 3 horas p.i.



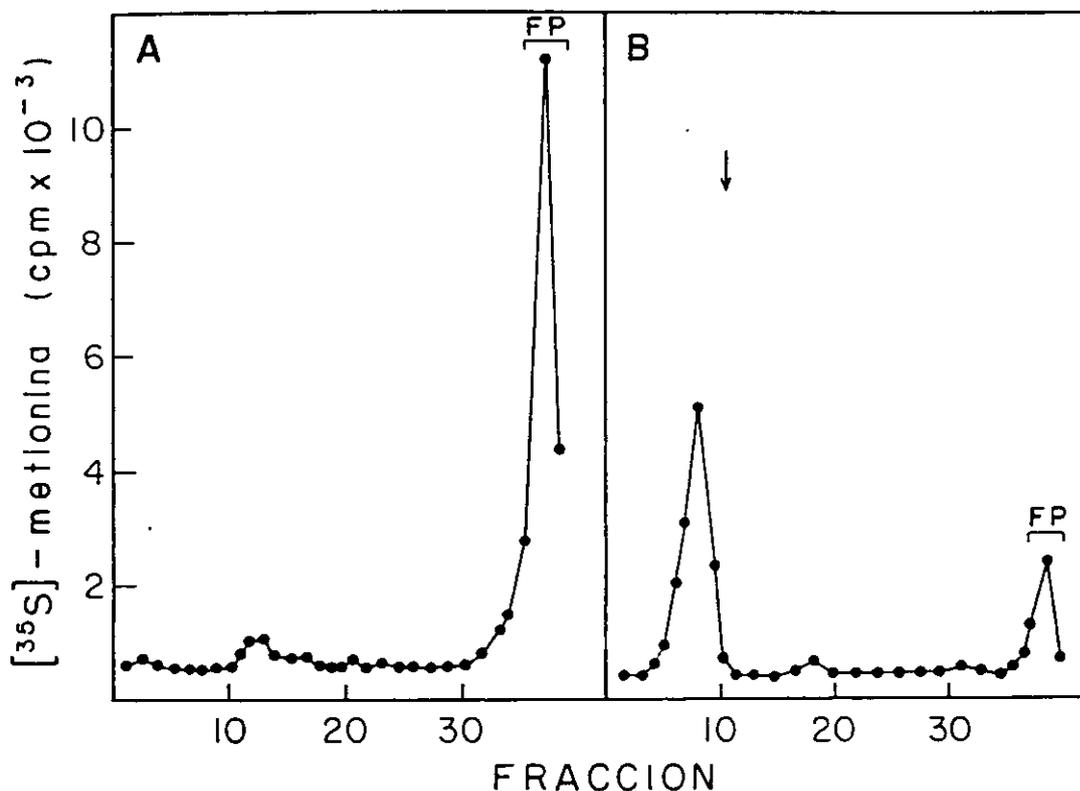
**FIGURA 5. CENTRIFUGACION DE CELULAS HeLa INFECTADAS CON POLIOVIRUS MARCADOS A TRAVES DE UN GRADIENTE DE SACAROSA PREFORMADO EN PRESENCIA DE DOC/BRIJ 58.**

0.8 X10<sup>8</sup> células HeLa fueron infectadas con virus radioactivos a una *moi* de 500 UFP (con una inversión en radioactividad de 2.5 X 10<sup>6</sup> cpm). Tres horas después las células fueron lavadas y resuspendidas en buffer "polis" colocándose estas sobre un gradiente de sacarosa preformado que contenía 1 % DOC/Brij 58 en la parte superior del gradiente (vea Material y Métodos). Las muestras fueron sedimentadas por 90 min a 26 000 rpm a una temperatura de 4 °C, en un rotor Beckman SW28. Porciones de cada una de las fracciones fueron precipitadas con ácido tricloroacético (●—●), o ensayadas por densidad óptica a 260 nm (○—○). La dirección de centrifugación fue de la izquierda a derecha; la posición del poliovirión como marcador (150 S) fue determinada en un gradiente paralelo.



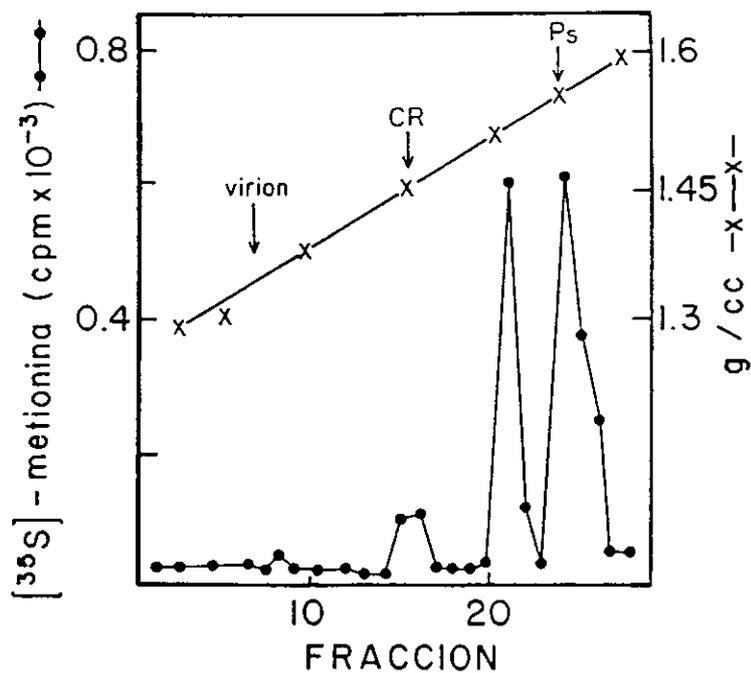
**FIGURA 6. ASOCIACION DE RNA<sub>v</sub> Y PROTEINAS EN FP DE CELULAS HeLa INFECTADAS CON POLIOVIRUS.**

A un cultivo de células control (mock) o infectadas con poliovirus (mdi 500) con una densidad de  $5 \times 10^6$  células/ml fueron resuspendidas en un medio libre de metionina, y después de un período de adsorción de 45 min. las células fueron incubadas a 37°C. A las 2.5 hrs. p.i. los cultivos fueron suplementados con uridina- $H^3$  (5 uCi/ml) y metionina- $S^{35}$  (10 uCi/ml) continuandose la incubación por 30 minutos más. Los cultivos radioactivos fueron analizados por centrifugación en gradientes preformados DOC/Brij 58 como se describe en la figura 5. A) Células HeLa infectadas con poliovirus y B) células HeLa mock infectadas.



**FIGURA 7. SENSIBILIDAD A RIBONUCLEASAS DEL MATERIAL DE SEDIMENTACION RAPIDA (FP).**

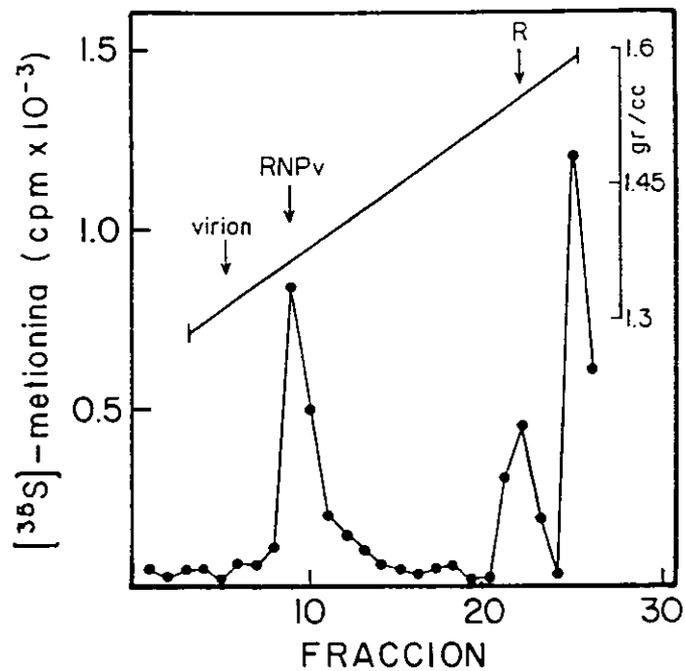
La mezcla de las fracciones 36-38 de la preparación de PDV radioactivas en FP, representado gráficamente en la Figura 6, se dividió en dos lotes; el primero fué probado por resistencia a ribonucleasas A + T2 (150 y 50 unidades respectivamente), incubandolo durante 30 min a 24 °C en 50 mM de acetato de amonio, pH 5.0. Ambas muestras, incubada en ausencia de ribonucleasas (A), y en presencia de ribonucleasas (B), fueron recentrifugadas a través de gradientes discontinuos de sacarosa, ya antes descritos, pero omitiendo los detergentes. Las muestras de cada fracción se analizaron por radioactividad ácido-insoluble como describen Flores-Otero y cols. (1980).



**FIGURA 8. DENSIDAD DE FLOTACION DE PDV RADIOACTIVO ASOCIADO A ESTRUCTURAS DE SEDIMENTACION RAPIDA EN FP.**

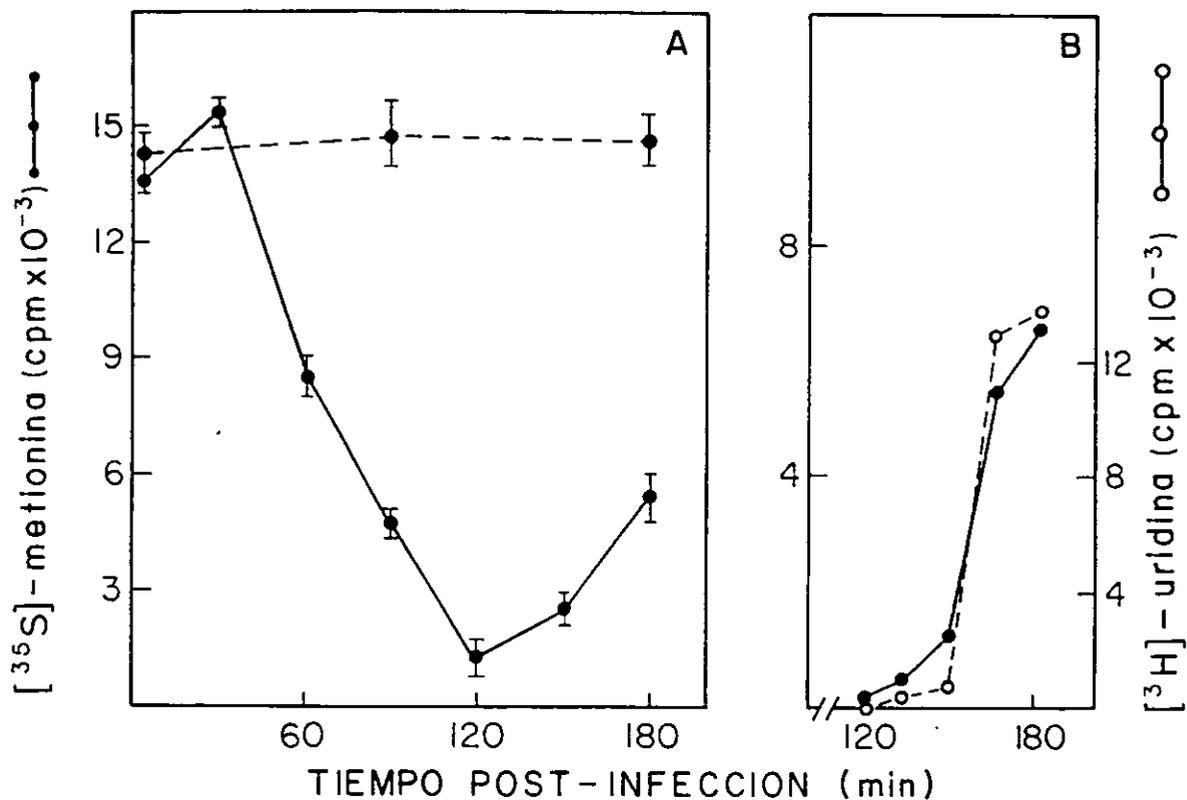
La preparación de PDV en FP radioactivo obtenida como se describe en la Figura 5 se fijaron con glutaraldehído (vea Material y Métodos) y se recentrifugo al equilibrio en 25 a 53 % de CsCl, centrifugado por 5 hrs. a 4 °C.

Las flechas indican la densidad de flotación reportada para el complejo de replicación de polio (CR) y polisomas virales (Ps) (Huang y Baltimore, 1970; Wright y Cooper, 1974).



**FIGURA 9. CARACTERIZACION DE VDP-RADIOACTIVO A TRAVES DE UNA SEDIMENTACION LENTA DE FL.**

La PDV de la FL radioactiva (unión de fracciones 11 a 19 representada en la Figura 5) fué analizada por gradientes isopícnicos preformados de CsCl como se describe en la Figura 8, las flechas indican la densidad reportada de RNV (ribonucleoproteína viral 80 S), del virión y R (ribosomas 80 S unido a RNAv) (Huang y Baltimore 1970; Wright y Cooper 1974).



**FIGURA 10. SINTESIS DE PROTEINAS EN CELULAS HeLa INFECTADAS CON POLIOVIRUS A UNA MOI DE 500 UFP.**

Después del período de adsorción de 45 min a temperatura ambiente, el cultivo infectado con polio en medio de cultivo, libre de metionina fué suplementado con 2 % de suero fetal de ternera dializado y 1 % de glutamina é incubado a 37 °C. A diferentes tiempos de infección, se tomaron alícuotas del cultivo, que fueron suplementadas con metionina- $\text{S}^{35}$  (2-5 uCi/ml) por 5 minutos seguidos por un exceso de metionina fría (experimento de pulso). ( ) células infectadas; ( ) células control. B) a las 2 horas post infección la mitad del cultivo de células HeLa infectadas fue marcado con una mezcla de metionina- $\text{S}^{35}$  (10 uCi/ml) y uridina- $\text{H}^3$  (5 uCi/ml) y muestras de éste se ensayaron por radioactividad ácido-insoluble a diferentes tiempos (experimento de marca continua) como describen Flores-Otero y cols (1982).

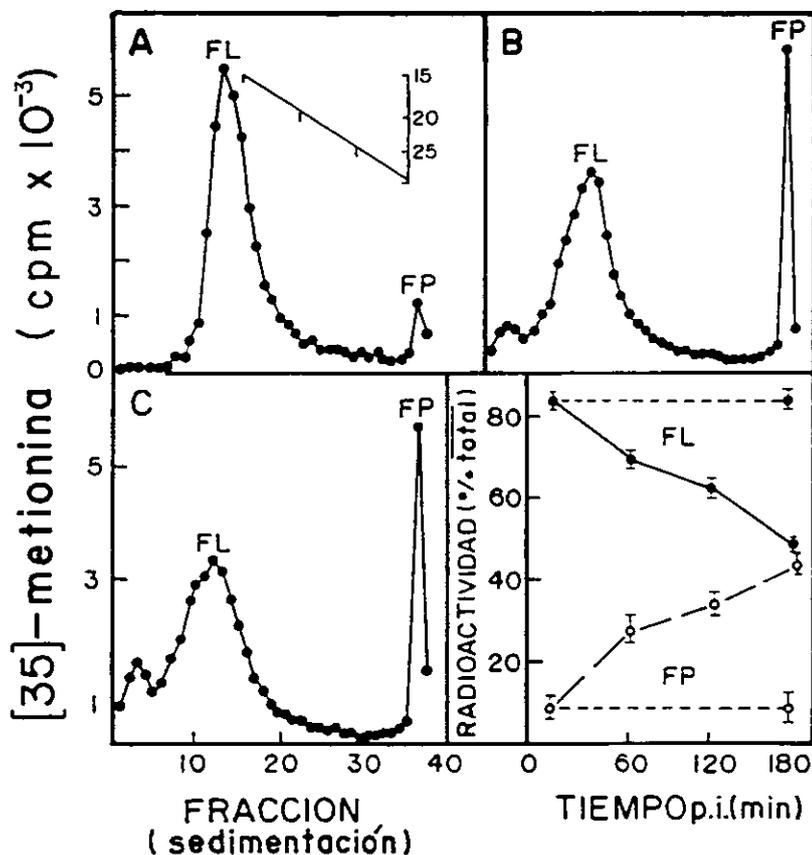
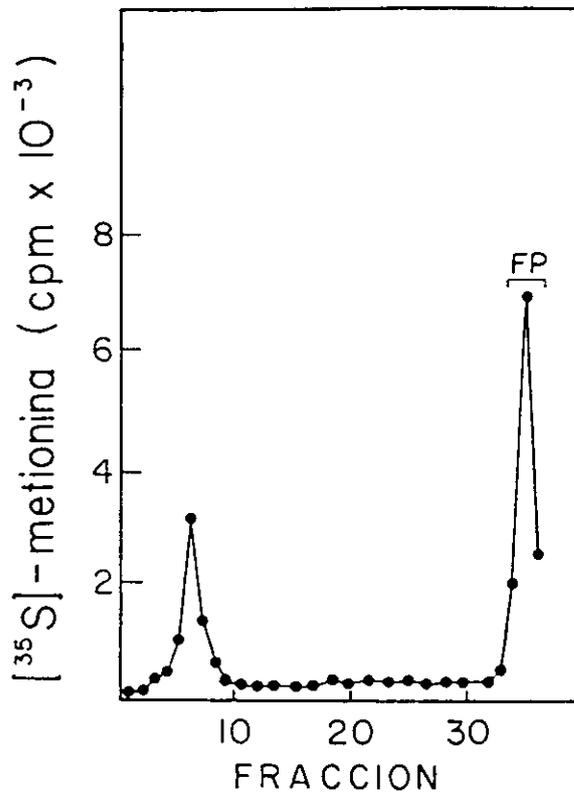


FIGURA 11. CINETICA DE ACUMULACION DE PDV RADIOACTIVA A DIFERENTES TIEMPOS DESPUES DE LA INFECCION EN LA FP.

Un total de  $3.2 \times 10^8$  células fueron infectadas sincrónicamente con virus purificados, marcados con metionina- $S^{35}$  a una m.d.i. de 500 pfu ( $1 \times 10^7$  cpm totales). A diferentes tiempos de infección, cero (A), 60 min (B) y 120 min (C), alícuotas de  $0.8 \times 10^8$  células se analizaron en gradientes discontinuos de sacarosa como se describió en la Fig. 4 (D). La cantidad de radioactividad detectada en la FL y FP a diferentes tiempos después de infección (incluyendo el dato de 3 horas p.i. graficado en la figura 5), fué medido y normalizado a el por ciento del total de radioactividad ácido-insoluble colocada sobre los gradientes.



**FIGURA 12. EFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE LA ASOCIACION DE PDV RADIOACTIVA A RNA DE CADENA SENCILLA DE LOS POLISOMAS CONTENIDOS EN FP.**

$0.8 \times 10^8$  células fueron infectadas con virus radioactivos purificados con una mdi de 500 ( $2 \times 10^6$  cpm de entrada de radioactividad). Después de 45 min de adsorción, las células que fueron infectadas sincronicamente, se suplementaron con 2 % de suero fetal de ternera dializado, glutamina y cicloheximida 75 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), la infección se llevó entonces a  $37^\circ\text{C}$  continuándose la incubación hasta las 3 horas. A éste tiempo, las células se procesaron hasta la obtención de la FP radiactiva como se describe en la figura 4, la FP fué incubada en presencia de una mezcla de Rnasas A y T2 en 50 mM acetato de amonio, como se explica en le pie de la figura 7. Después de 30 min de incubación la muestra fué recentrifugada en un gradiente discontinuo de sacarosa, las fracciones fueron analizadas por radioactividad ácido-insoluble.

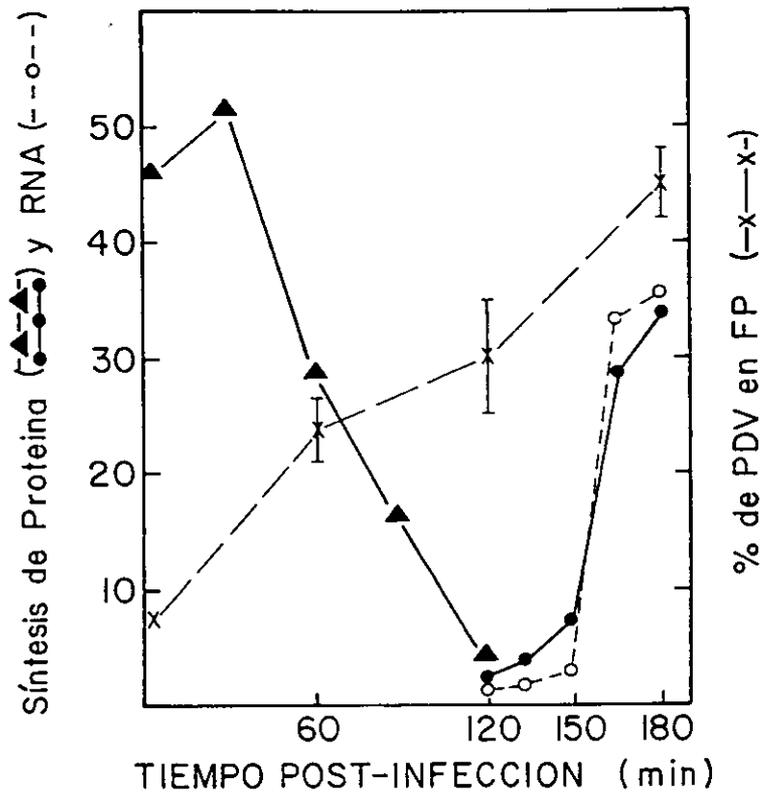


FIGURA 13. RESUMEN DE LOS PATRONES OBTENIDOS DEL APAGAMIENTO DE LA SINTESIS DE PROTEINAS DEL HUESPED, DE LA SINTESIS DE RNA Y PROTEINA VIRAL Y DE LA ACUMULACION DE LA PDV EN LA FP CONTENIENDO POLISOMAS VIRALES.

Los datos fueron obtenidos y sumariados de las figura 10 y 11.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alonso, M. A. Y Carrasco, L. (1981). Revisión by hypotonic medium of the shut-off of protein synthesis induced by Encephalomyocarditis virus. *J. Virol.* 37: 535-540.
- 2.- American Public Health Association. (1975). Control of Communicable Diseases in Man. Twelve Edition. ISBN0-87553-077-X.
- 3.- American type culture collection (1981). Catalogue of strains II. Third Edition.
- 4.- Argelini, A. (1966). Fundamentos para el uso profiláctico de sueros y vacunas. Mexico, D. F.
- 5.- Arévalo, G. S. (1983). Proteínas virales asociadas a ribosomas de células HeLa infectadas con Poliovirus. Tesis de Maestría. CINVESTAV-IPN.
- 6.- Bablanian, R. (1972). Depression of macromolecular synthesis in cells infected with guanidine-dependent Polio-virus under restrictive conditions. *Virology* 47; 255-259.
- 7.- Bacharch, H. L. (1978). Comparative strategies of animal virus replication. En: Advances in virus research. Lauffer, M. A. Bang, F. B., Maramorosh, K. & Smith, K. M. (Eds). Academic Press. New York, USA. 22: 163-186.
- 8.- Baltimore, D. (1964). In vitro synthesis of viral RNA by the poliovirus RNA polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 51: 450-456.
- 9.- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genome. *Bact. Rev.* 35: 235-241.
- 10.- Baltimore, D., Franklin, R., (1962). The effect of Mengovirus infection on the activity of the DNA-dependent RNA polymerase of L-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 48: 1383-1390.
- 11.- Baltimore, D., Franklin, M. R., y Callender, J. (1963). Mengovirus induced inhibition of host ribonucleic acid and protein synthesis. *Biochem. Biophys. Acta.* 76: 425-430.
- 12.- Baltimore, D., Franklin, R., Callender, J. (1964). Mengovirus-induced inhibition of host ribonucleic acid and protein synthesis. *Biochem Biophys. Acta.*
- 13.- Baltimore, D., Virard, M. Y Durnell, J. (1966). Aspects of the synthesis of poliovirus RNA and the formation of virus particles. *Virology* 29: 179-189.

- 14.- Baltimore, D., Girard, M., Darnell, J. E. (1966) *J. Mol. Biol.* 18: 421-
- 15.- Baltimore, D., y Huang, A. (1968). Isopycnic separation of subcellular components from poliovirus-infected and normal cells. *Science* 162: 572-574.
- 16.- Blondel, B., Crainic, R. Akacem, O., Brunew, P., Girard, M. Y Girard, M. (1982). Evidence for common intertypic antigenic determinants on poliovirus capsid polypeptide. *Virology* 123: 461-463.
- 17.- Bolognesi, D. P. (1974). Structural Components of RNA tumor Viruses. *Adv. Virus Research.* 19: 315-360.
- 18.- Curso teórico-práctico. Diciembre de 1983. Departamento de Genética y Biología Molecular. CINVESTAV-IPN. Dirección Dr. Charles Bracker (Universidad de Purdue, Indiana, USA).
- 19.- Caliguri, L. A. (1974). Analysis of RNA association with the poliovirus RNA replication complexes. *Virology* 58: 526-535.
- 20.- Carrasco, L. (1977). The Inhibition of Cell Functions after Viral Infection. *FEBS Lett.* 76: 11-15.
- 21.- Carrasco L., y Smith, A. E. (1976). Sodium ions and the shut-off of host cell protein synthesis by picornavirus. *Nature (London)* 264: 807-809.
- 22.- Carrasco, L., and A. E., Smith (1980). Molecular Biology of animal virus infection. *Pharmacol. Ther.* 9: 311-355.
- 23.- Golby, M. D., Shatkin, A. J., y Levintow, L. (1963). Association of Newly Formed Viral Protein with Specific Polyribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50: 686-694.
- 24.- Colby, S. D., Finnerty, V., y Lenard Lucas, J. (1974). Fate of mRNA of L-cells infected with mengovirus. *J. Virology* 13: 858-869.
- 25.- Contreras, A., y Carrasco, L. (1979). Selective of Protein Synthesis in virus-infected Mammalian Cells. *J. Virology* 29: 114-122.
- 26.- Cooper, P. D., a. Steiner-Pryor y P. J. Wright. (1973). A proposed regulator for poliovirus: the equestron. *Intervirology* 1: 1-10.
- 27.- Crawford, N., Fire, A., Samuells, M., Sharp, A. P., y Baltimore, D. (1981). Inhibition of transcription factor activity by poliovirus. *Cell* 27: 551-561.

- 28.- Crowell, R. L., y Phillipson, L. (1971). Specific alterations of Coxsackie-virus B3 eluted HeLa cells. *J. Virol.* 8: 509-515.
- 29.- Dales, S. (1973). Early events in cell-animal virus interaction. *Bacteriological Reviews* 37: 103-135.
- 30.- Darnel, J. E., Girard, M., Baltimore, D., Summers, D. F., Maizel, J. V. Jr. ( ). The Synthesis and translation Poliovirus RNA. *The Molecular Biology of Viruses.* Academ Press. New York USA. 375-401.
- 31.- Dasgupt, A., Zabel, P., y Baltimore, D. (1980). Dependence of the activity of the poliovirus replicase on a host cell protein. *Cell* 19: 423-429.,
- 32.- De Sena, J., y Mandel, B. (1977). Studies on the "in vitro" uncoating of poliovirus II. Characteristics of the membrane modified particles. *Virology* 78: 554-566.
- 33.- De Sena, J., Torian, B. (1980). Studies on the "in vitro" uncoating of poliovirus II. Role of membrane-modifying and stabiling factors in the generation of subviral particles. *Virology* 104: 149-163.
- 34.- Ders'ch-Hasler, K., Yogo, Y., y Wimmer, E. (1975). Replication of picornavirus I. Evidence from in vitro RNA synthesis that poly (A) of the poliovirus genome is genetically coded. *J. Vriol.* 16: 1512-1527.
- 35.- Ehrenfeld, E. (1982). Poliovirus Induced Inhibition of Host-Cell protein Synthesis. *Cell* 28: 435-436.
- 36.- Emini, E. A., B. A. Jameson, A. J. Lewis, G. R., Larsen, y E. Wimmer. (1982). Poliovirus neutralization epitopes: analysis and localization with neutralizing monoclonal antibodies. *J. Virol.* 43: 997-1005.
- 37.- Emini, E. A., Kao, S., Lewis, A. J., Crainic, R., y Wimmer, E. (1983). Functional basis of poliovirus neutralization determined with monospecific neutralizing antibodies. *J. Virol.* 46: 466-474.
- 38.- Etchinson, D. C. (1982). Inhibition of HeLa Cells Protein Synthesis Following Poliovirus Infection Correlates with the Proteolysis of a 220,000 dalton Polypeptide Associated with Eukaryotic Initiation Factor 3 and cap Binding Protein Complex. *J. Biol. Chem.* 257: 14806-14810.
- 39.- Etchinson, D., J. Hansen, E. Enhernfeld. I. Edny, N. Sonenberg, S. Mielburn, y J. W. B. Hershey. (19184). Demonstration "in vitro" that eukaryotic initiation. Factor 3 is active but

- that a cap-binding protein complex is inactive in poliovirus infected HeLa cells. *J. Virol.* 51: 832-837.
- 40.- Erans, D. M. A., Minor, P. D., Schild, G. C., y Almond, J. W. (1983). Critical role of an eight aminoacid sequence of VP1 in neutralization of poliovirus type 3. *Nature (London)* 304: 459-462.
- 41.- Fasekes De. St. Groth, S. (1948). Viropexis, the mechanism of influenza virus infection. *Nature (London)* 162: 294-295.
- 42.- Fenwick, M. L., y Cooper, P. D. (1962). Early interactions between poliovirus and ERK cell. Some observations on the nature and significance of the rejected particles. *Virology* 18: 212-223.
- 43.- Fenwick, M. L. (1963). The influence of poliovirus infection on RNA synthesis in Mammalian cells. *Virology* 19: 241-249.
- 44.- Fernández-Puentes, C., y Carrasco, L. (1980). Viral Infection permeabilizes mammalian cells to protein toxins. *Cell* 20:
- 45.- Fernández-Tomás, C., y Baltimore, D. (1973). The morphogenesis of poliovirus II. Demonstration of a new intermediate the Provirion. *J. Virol.* 12: 1122-1130.
- 46.- Fernández-Tomás, C. (1982). The presence of viral-induced proteins in nucleic from poliovirus-infected HeLa Cells. *Virology* 116: 629-634.
- 47.- Fernández-Muñoz, R., y Darnell, J. E. (1976). Structural difference between 5' termini of viral and cellular mRNA in poliovirus-infected cells. *J. Virol.* 126: 719-726.
- 48.- Flanagan, J. B., Petterson, R. F., Ambros, U., Hewlett, N. J., y Baltimore, D. (1977). Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5' terminus of virions and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 961-965
- 49.- Flores-Otero, G., Fernández-Tomás, C., and Gariglio, P. (1982). DNA bound RNA polymerases during poliovirus infection: reduction in the number of form II enzyme molecules. *Virology* 116: 619-628.
- 50.- Franklin, R. M., y Baltimore, D. (1962). Patterns of macromolecular synthesis in normal and virus infected mammalian cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 27: 175-198.
- 51.- Giorgi, C. And K. Kolakofs Ky (1984). Effect of Poliovirus super-infection on sendal virus protein synthesis. *J. Virol.* 52: 298-299.

- 52.- Gutierrez E. L. Tesis de Doctorado. Depto. de Patología Experimental. CINVESTAV IPN (1986).
- 53.- Habermehl, K. O., Diefenthal, W., y Bucholz, M. (1973). Distribution of parental viral constituents in the course of polio-infection. *Advance in the Bioscience* 11: 41-64.
- 54.- Helentjaris, T., Ehrenfeld, E. (1978). Control of Protein Synthesis In Extracts From Poliovirus Infected. Cells mRNA Discrimination by Crude Initiation Factors. *J. Virol.* 26: 510-521.
- 55.- Holland, J. J., y McLaren, L. C. (1959). The mammalian cell-virus relation ship. *J. Exp. Med.* 109: 487-504.
- 56.- Holland, J. J., y McLaren, L. C. (1961). The location and nature of enterovirus receptors in susceptible cells. *J. Exp. Med.* 114: 161-171.
- 57.- Holland, J. (1962). Inhibition of DNA-primed RNA synthesis during Poliovirus Infection of Human Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol. 9, No. 6, 556-562.
- 58.- Leibowitz, R., y Penman, S. (1971). Regulation of protein synthesis in HeLa cells. *J. Virol.* 8: 661-668.
- 59.- Leonardo, O., Arellano, Carlos, J. Goldenber and George, L. Eliceiri. (1977). In vivo incorporation of ribosomal proteins into HeLa Cell, ribosomal particles. *Biochemica et Biophysica Acta* 475: 652-658.
- 60.- Livingston, D. M. (1977). Inheritance of the 2 um DNA plasmid from *Saccharomyces*. *Genetics* 86: 73-84.
- 61.- Lonberg Hol, K., y Korant, B. D. (1972). Early interaction of rhino viruses with host cell. *J. Virol.* 9: 29-40.
- 62.- Lonberg\_Holm, k., y Philipson, L. (1974). Early interaction between viruses and cells. Karger, New York USA
- 63.- Lonberg-Holm, K. (1975). The effects of concanavalin A on the early events of infection by rhinovirus type 2 and Poliovirus type 2. *J. Gen. Virol.* 28: 313-327.
- 64.- Lucar-Lenard, Jean M., (1978). The molecular biology of picornavirus. Perez-Bercoff, R. Ed. Plenum. New York, USA 72-99.

- 65.- Lundsquit, R., y Maizel, J. V. Jr. (1978). In vivo Regulation of the Poliovirus RNA polymerase. *Virology* 89: 484-493.
- 66.- Luria, S. E. Darnell, J. E. Jr., Baltimore, D., Campbell, A. (1978). *General Virology* John Wiley & Sons, USA 343.
- 67.- Madshus, I. H., Olsnes, S., y Sanduig, k. (1984). Mechanisms of entry into the citosol of poliovirus type 1; requeriments for low pH. *J. Cell Biol.* 98: 1194-1200.
- 68.- Mathews, F. E. (1982). Classification and Nomenclature of Viruses: 4° Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed. Kerger.
- 69.- McCormick, W., y Penman, S. (1967). Inhibition of RNA synthesis in HeLa and L cells. By mengovirus. *Virology* 31: 135-141.
- 70.- Minor, P. D., Evans, D. M. A., Fargunson, M., Schild, G. C., Westrop, G., y Almond, J. W. (1985). Principal and Subsidiary antigenic sites of VP1 involved in the neutralization of poliovirus type 3. *J. Gen Virol.* 65: 1159-1165.
- 71.- Minor, P. D., Schild, G. C., Bootman, J., Evans, D.M.A., Ferguson, M., Reeve, p, Spitz, M., Stanway, G., Cann, a. J., Hautmann, R., Clarke, L. D., Mountford, R. C., y almond, J. W. (1983). Location and primary structure of a major antigenic site for poliovirus neutralizastion. *Nature (London)* 301: 674-678.
72. Nair, C. N. (1984). Nat and K. Changes in animal virus infected HeLa cell. *J. Gen Virol.* 65: 1135-1138.
- 73.- Nobis, P., Zibirre, R., Meyer, G., Kuhne, J., Warnecke, G., and Koch, G. (1985). Production of monoclonal antibody against an epitope of HeLa cell that it is the functional poliovirus binding site. *J. Gen. Virol.* 66: 2563-2569.
- 74.- Nomoto, a., Lee, Y. F., y Wimmer, E. (1976). The 5' end of poliovirus mRNA is not capped with m G (5') ppp (5') Np. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 375-380.
- 75.- Nomoto, Detjen, B. M., Pozza Hi, R., y Wimmer, E. J. (1977). The location of the poligenome protein in viral RNA and its. *Nature* 268: 208-213.
- 76.- Nuss, D. L. Opperman, H., y Koch, G. (1975). Selective Blockage of Initiation of Host Protein Synthesis mRNA Virus Infected Cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 1258-1262.
- 77.- Pallansch, M. A., Kew, O. M., Semler, B. L., Omilianowski, D. R., Anderson, C. W., Wimmer, E., y Rue C. Kert, R. R. (1984). Protein Processing Map of Poliovirus. *J. Virol.* 49: 873-880.
- 78.- Penman, S., Scherrenge, K., Becker, Y., y Dannel, j. E. (1963). Polyribosomes in normal and poliovirus infected HeLa cells and their relationship to mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 49: 654-662.

79.- Penman, S., y Summers, D. (1965). Effects on Host cells metabolism following synchronous infection with poliovirus. *Virology* 27: 614-620.

80.- Petermann, M. L. (1964). The physical and chemical properties of ribosomal .Elsevier New York USA

81.- Putnak, J. R., y Phillips, B. A. (1981). Picornavirus Structure and Assembly. *Microbiol. Rev.* 45: 287-315.

82.- Racaniello, V., y Baltimore, D. (1981). Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4887-4891.

83.- Rekosh, D. M. K., en: *The Molecular Biology of Animal Viruses, Vol. 1; The Molecular Biology of Picornavirus*, eds. Debi Prosad Naya K., Marcel Dekker, Inc. New York and Basel USA (1977) Cap. 3, 63-110.

84.- Rich, A., Penman, S., Becker, Y., Darnell, J., y Hall, C. (1963). Polyribosomes: Size in Normal Polio-Infected HeLa cells. *Science* 142: 1658-1663.