

Tesis de Posgrado

Inhibidores de la replicación del virus aftoso

Firpo, Eduardo Jorge

1983

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

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

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

Cita tipo APA:

Firpo, Eduardo Jorge. (1983). Inhibidores de la replicación del virus aftoso. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1804_Firpo.pdf

Cita tipo Chicago:

Firpo, Eduardo Jorge. "Inhibidores de la replicación del virus aftoso". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1804_Firpo.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INHIBIDORES DE LA REPLICACION DEL
VIRUS AFTOSO

Eduardo Jorge FIRPO

Director de Tesis : Dr. Eduardo Lucio PALMA

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas

1983

1804
Ej. 2

A Patricia,
Juan Pablo,
María Florencia y
María Paula

A G R A D E C I M I E N T O S

- ... al Dr. Eduardo Lucio Palma por su invaluable dirección científica y los largos momentos pasados discutiendo y esclareciendo muchos de los temas tratados en esta tesis. Asimismo, por su firme apoyo y amplia comprensión, sin los cuales, este trabajo no hubiera sido posible.

- ... al Departamento de Virología del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias del INTA (Castelar) y, en particular, al Dr. Scholein Rivenson, por el invalorable apoyo brindado durante mi permanencia en ese laboratorio.

- ... al Instituto Científico Paul por el constante apoyo brindado durante la redacción del manuscrito y permitirme la utilización de las facilidades del laboratorio para la impresión del mismo.

- ... a la Srta. María Silvia Traba por su excelente colaboración en el pasado a máquina del manuscrito.

I N D I C E

	Pág.
I.- OBJETIVO	1
II.- INTRODUCCION	2
II.1.- FIEBRE AFTOSA	2
II.1.1.- Descripción de la enfermedad.	2
II.1.2.- Perjuicios económicos	3
II.1.3.- Control y prevención de la fiebre aftosa. . .	4
II.1.3.1.- Antecedentes en América	4
II.1.3.2.- Programas de lucha	5
II.1.3.3.- Planes de erradicación y control	6
II.1.3.4.- Vacunaciones	8
II.1.3.5.- Controles sanitarios	11
II.1.3.6.- Roturas de inmunidad	12
II.1.4.- Nuevas técnicas para la producción de antígenos vacunantes contra la fiebre aftosa . . .	14
II.1.5.- Elección de cepas vacunales	18
II.2.- VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA	20
II.2.1.- Estructura de la cápside y del genoma viral .	20
II.2.2.- Replicación	22
II.2.2.1.- Síntesis de ARN viral y partículas virales	24
II.2.2.2.- Estructuras ARN virales inducidas por el virus	25
II.2.2.3.- El complejo de replicación	27
II.2.3.- Síntesis y procesamiento de las proteínas virales	28
II.2.3.1.- Evidencias acerca de un único sitio de iniciación de síntesis de proteínas	29
II.2.3.2.- Procesamiento proteolítico de las proteínas virales	31
II.2.3.3.- Tipos de escisiones en el procesamiento proteolítico de los picornavirus	33
II.2.3.4.- Evidencias acerca de la poliproteína	36
II.2.3.5.- Precursores primarios del virus aftoso	38
II.2.3.6.- La actividad proteolítica en células infectadas	40
II.2.3.7.- Origen de las proteasas en las infecciones virales	40
II.2.4.- Características inmunológicas	43
II.2.5.- Propiedades antigénicas	44
II.3.- INHIBIDORES DE LA REPLICACION DEL VIRUS AFTOSO.	46
II.3.1.- Inhibición del procesamiento proteolítico . .	46
II.3.1.1.- Análogos de aminoácidos	47
II.3.1.2.- Temperatura	48
II.3.1.3.- Iones zinc	48
II.3.1.4.- Inhibidores proteolíticos	51

	Pág.	
III.-	MATERIALES Y METODOS	58
III.1.-	LINEA CELULAR Y CEPA DE VIRUS.	58
III.2.-	REACTIVOS.	58
III.3.-	PROCEDIMIENTOS DE INFECCION Y MARCACION. . .	59
III.4.-	PROCESAMIENTO DE LAS CELULAS INFECTADAS Y DE LOS SOBRENADANTES.	60
III.5.-	ANALISIS DE VIRUS Y PROCAPSIDES EN GRADIENTES DE SACAROSA Y MEDICION DE LA RADIOACTIVIDAD ACIDO PRECIPITABLE	60
III.6.-	MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA REPLICASA VIRAL "IN VIVO" EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE INHIBIDORES.	61
III.7.-	EXTRACCION DE LAS PROTEINAS INTRACELULARES DEL VIRUS AFTOSO	62
III.8.-	ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PLACAS	63
III.9.-	CURVA DE CALIBRACION	64
IV.-	RESULTADOS	67
IV.1.-	IONES ZINC	67
IV.1.1.-	Efecto sobre la síntesis de macromoléculas celulares y virales.	67
IV.1.2.-	Inhibición diferencial de virus y procápsides.	69
IV.1.3.-	Efecto de 0,15 mM de ZnCl ₂ en la síntesis de virus, procápsides y ARN viral a distintos tiempos p.i.	73
IV.1.4.-	Efectos de los iones zinc en la actividad de la replicasa viral "in vivo"	79
IV.1.5.-	Reversibilidad de la inhibición por los iones zinc	84
IV.2.-	INHIBIDORES PROTEOLITICOS.	87
IV.2.1.-	Efectos sobre la síntesis de macromoléculas celulares y virales.	87
IV.2.2.-	Acción de los inhibidores proteolíticos sobre la actividad de la replicasa viral . . .	91
IV.2.3.-	Producción de partículas virales en presencia de inhibidores proteolíticos	96
IV.2.4.-	Síntesis de proteínas intracelulares en presencia de inhibidores proteolíticos.	98
V.-	DISCUSION	102
VI.-	BIBLIOGRAFIA	115

L I S T A D E A B R E V I A T U R A S

ADN = ácido desoxiribonucleico

ARN = ácido ribonucleico

Células BHK-21 = línea celular de riñón de hamster

d ; dalton = unidad de masa igual a $1,68 \times 10^{-24}$ g

FMDV = (Foot-and-Mouth Disease Virus) virus de la fiebre aftosa

IAA = iodoacetamida

min = minuto

m.o.i. = multiplicidad de infección

mRNA = ARN mensajero

mutantes ts = mutantes temperatura sensibles

p.i. = post infección

PM = peso molecular

pUp = nucleótido 5'-3'-difosfato uridina

RNasa H = endonucleasa que digiere cadenas híbridas ARN-ADN

r.p.m. = revoluciones por minuto

S = coeficiente de sedimentación Svedberg

SAT = virus aftoso de territorios del sudoeste africano

SDS = dodecil sulfato de sodio

TLCK = tosil-lisil-clorometil cetona

TPCK = tosil-fenilalanil clorometil cetona

VP1-4 = proteínas de la cápside numeradas de 1 a 4

VPg = proteína viral unida al genoma del virus

I.- OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo de investigación ha sido estudiar el mecanismo de inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos del virus de la fiebre aftosa para favorecer la producción de un tipo de subpartícula viral: las procápsides (también llamadas partículas vacías o partículas 75S).

Para ello fue necesario inhibir la formación de nuevas moléculas de ARN utilizadas en la síntesis de las partículas virales infecciosas -los viriones-, sin afectar la síntesis de las proteínas estructurales que dan origen a las procápsides.

Las procápsides del virus aftoso poseen todas las propiedades antigénicas de los viriones pero carecen de ARN infeccioso. Una vacuna antiaftosa preparada con este tipo de antígeno posibilitaría mejorar sensiblemente la capacidad inmunogénica de la misma, ya que no requeriría de los procesos de inactivación a que son sometidas las vacunas convencionales.

II.- INTRODUCCION

II.1.- FIEBRE AFTOSA

II.1.1.- Descripción de la enfermedad

La fiebre aftosa es una enfermedad febril, aguda y altamente contagiosa que afecta, principalmente, a treinta o mas especies de animales biungulados, algunas de las cuales son de gran valor económico para el hombre (bovinos, porcinos, ovinos y caprinos) (17). La enfermedad ha sido citada en animales salvajes tales como ciervos, impalas, antílopes, pecaríes, camellos, jirafas y elefantes (9). Experimentalmente, se puede inducir la infección a otras especies que incluyen perros, gatos, gallinas, ratas, ratones, conejos y cobayos (92).

La infección en el hombre es rara. Menos de 30 casos probados han sido descritos en la literatura (478). Sin embargo, puesto que el virus puede persistir por 24 horas en las regiones nasofaríngeas y sobre superficies inanimadas, incluyendo vestimentas por largos períodos, el hombre puede jugar un activo papel como vehículo transmisor de la enfermedad (248,432).

Si bien esta enfermedad se la conoce desde hace mas de 2000 años (Hiérocles, veterinario griego, hablaba de las enfermedades aftosas), su historia científica se inicia recién a mediados del siglo XVI (188), describiéndosela como una epizootia vesicular muy contagiosa que afectó a los bovinos en Italia y que, posteriormente, se propagó a otros países de Europa (Francia e Inglaterra). Desde entonces, ha sido considerada como una de las plagas animales de mayor importancia mundial (219).

Aunque la mortalidad rara vez excede al 5% de los animales adultos, puede llegar al 50% en animales jóvenes (bovinos y porcinos) como consecuencia de una miocarditis (17). Normalmente, la enfermedad se caracteriza por lesiones vesiculares sobre las patas y la boca del animal infectado, pero también pueden estar involucradas la piel, las mamas y el hocico. En los bovinos hay una profusa secreción de

baba pegajosa y ruptura de vesículas linguales, exponiendo grandes áreas en carne viva de la lengua. El dolor de la boca y la lengua impiden al animal comer normalmente y las lesiones en las patas, las cuales pueden ser infectadas con bacterias, hongos o parásitos, pueden presentar, además, complicaciones traumática que causan la cojera del animal (24,94).

El análisis del aspecto epidemiológico de un foco o un brote, o la simple observación de la sintomatología clínica, sólo permiten determinar que los animales están padeciendo una enfermedad del tipo vesicular. Si la enfermedad sólo afecta equinos, se trataría de la estomatitis vesicular, ya que esta especie es resistente a las otras enfermedades del grupo. Afectando bovinos, ovinos y/o caprinos, el diagnóstico se hará entre la estomatitis vesicular y la fiebre aftosa, ya que los porcinos son susceptibles a todas las enfermedades vesiculares conocidas hasta el presente (7).

II.1.2.- Perjuicios económicos

La mayoría de los animales que han padecido la enfermedad eventualmente se recobran y pueden desarrollar una inmunidad relativamente corta (1 a 3 años) contra el agente infectante. Sin embargo, los animales recuperados no vuelven a ser la entidad productiva o comerciable que eran antes de la enfermedad. Algunas de las secuelas son la esterilidad, el aborto, pérdida de peso excesiva, pérdida significativa en la producción de leche, daño al corazón, cojera y una condición general disminuída.

Los efectos de una ruptura de inmunidad en países libres de la enfermedad, pueden llegar a ser altamente perjudiciales. Un estudio realizado en 1977 (55) sobre la incidencia económica de un brote generalizado de esta enfermedad en la totalidad del ganado susceptible en los Estados Unidos, fue calculado en 4 mil millones de dólares en forma directa para el primer año solamente. Las pérdidas directas o indirectas sobre la agricultura debido al ganado afectado podrían ser 10 veces mayores. La ruptura de inmunidad en Inglaterra, desde 1967 a 1968 costó mas de 200 millones de dólares y la de Canadá en 1952, la cual implicó el sacrificio de 1073 bovinos, costó mil millones de dólares (55).

En relación al comercio internacional de carnes, el mundo está dividido en países exportadores e importadores y éstos, a su vez, en países libres de aftosa y con aftosa esporádica o endémica (61). Como grandes naciones importadoras podemos citar: Estados Unidos, Rusia, Japón y entre los exportadores a Australia, Nueva Zelandia, México y algunos países del Caribe, todos éstos libres de aftosa. Entre los países con fiebre aftosa esporádica o endémica están Argentina, Uruguay, Brasil, Yugoslavia y algunos países del Este. Entre los países libres de fiebre aftosa figuran: todo Centroamérica, México, Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Dinamarca, Suecia, Noruega, Finlandia, Groenlandia, Australia, Japón, Chile y algunas pequeñas islas del Pacífico. Nueva Zelandia y Nueva Guinea nunca han sufrido esta enfermedad (180).

En países donde la enfermedad es endémica resulta particularmente grave. Además del perjuicio en la producción de los derivados del animal (estimados en un 25% (68)) hay que considerar igualmente las pérdidas debidas al trastorno del comercio normal de importación y exportación de animales, materias de origen animal y otros productos agrícolas. Esta dificultad deriva de la aplicación de severas medidas restrictivas para el control y la erradicación o de las decisiones adoptadas por países libres de la enfermedad en relación a los productos del país afectado. De un modo u otro, la fiebre aftosa causa perjuicios a todos los países con interferencia directa en los factores económicos, sociales y políticos (102,110,124,144,156, 180,286,320,502).

II.1.3.- Control y prevención de la fiebre aftosa (398)

II.1.3.1. Antecedentes en América

El primer brote de fiebre aftosa fue registrado en América en 1870, describiéndoselo simultáneamente en los Estados Unidos, en la provincia de Buenos Aires, en la región central de Chile, en Uruguay y en el sur de Brasil. La presencia de la enfermedad en forma contemporánea se asocia con la importación de bovinos desde Europa, en circunstancias en que ocurría una extensa epidemia de la enfermedad en ese continente (55).

En Estados Unidos fue erradicada mediante la aplicación de medidas de aislamiento, cuarentena, desinfección y sacrificio de animales enfermos y expuestos. A partir del último brote en 1929, se implantó un riguroso programa preventivo destinado a impedir la introducción del virus, prohibiéndose toda importación de animales y subproductos de origen animal provenientes de países donde la enfermedad fuera endémica.

La situación en América del Sur, a fines del siglo XIX, registraba una gran difusión: Argentina, Chile, Uruguay y extensas regiones del centro y sur del Brasil tenían fiebre aftosa. A comienzos de este siglo, ya se había extendido al resto de Brasil, Bolivia, Paraguay y Perú. En 1950, una remesa por vía marítima de bovinos procedentes de las zonas afectadas, introdujo la enfermedad en Venezuela, propagándose el mismo año a Colombia y luego a Ecuador en 1961. En 1946, la enfermedad fue introducida en México, lográndosela erradicar en 1954. En Ecuador, Colombia, Venezuela y Perú sólo han sido detectados los tipos O y A del virus aftoso, mientras que en el resto de Sudamérica existen los tres tipos clásicos: O, A y C (61).

II.1.3.2. Programas de lucha

Los tres principales programas de lucha usados por los gobiernos contra la fiebre aftosa son: 1) reducción del riesgo de introducción de la enfermedad en un país libre de la misma por regulación de los productos importados que puedan servir como vehículos de la enfermedad (prevención); 2) Vacunación del ganado susceptible (control); y 3) Sacrificio (rifle sanitario) de los animales expuestos o infectados durante una ruptura de inmunidad (control).

Es posible evitar la introducción del virus a un área libre -con un margen aceptable de seguridad-, evitando el ingreso de animales de especies susceptibles y sus subproductos provenientes de zonas afectadas, cualquiera sea la magnitud de la enfermedad en los países de origen.

Esta norma es seguida por todos los países de Norte y Centroamérica, Panamá y en la mayoría de los del Caribe. En algunas áreas se permite -ocasionalmente-, el ingreso de animales y/o subproductos de los mismos, bajo un estricto control sanitario. Este hecho se relaciona

con la presencia de brotes de aftosa en Guyana (1969), Curazao (1970), en el sur de Chile (1970 y 1971) y en cinco oportunidades en la patagonia Argentina (entre 1966 y 1972).

En los países libres de la enfermedad y en las áreas libres de los países afectados, el control se lleva a cabo a través de programas de erradicación que implican el sacrificio de los animales enfermos y/o expuestos. Esta política demostró ser efectiva en Tierra del Fuego en 1968 y en Magallanes (Chile) en 1970. Programas de vacunación intensivos, en cambio, son llevados a cabo en los lugares donde la enfermedad es endémica.

II.1.3.3. Planes de erradicación y control

La primera vacuna eficaz para el control de la fiebre aftosa fue desarrollada por Waldmann y colab. a fines de la década del 30. La misma era preparada por adsorción del virus a un gel de hidróxido de aluminio y luego inactivando con formalina bajo condiciones definidas (499). Antes de la existencia de esta vacuna, el único recurso disponible para combatir la enfermedad se reducía al aislamiento y la cuarentena, medidas éstas de muy difícil cumplimiento en América Latina.

Paulatinamente, los ganaderos decidieron -en forma voluntaria- adoptar el uso de la vacuna para la lucha contra la aftosa. Sin embargo, la falta de organización, disponibilidades y controles adecuados, impidieron cualquier mejoría significativa en la conducta natural de la enfermedad.

A fines de la década del 50, un factor modificó positivamente esta situación. Los países exportadores de carne vacuna sufrieron el impacto de las restricciones impuestas en el mercado internacional a los productos pecuarios provenientes de zonas donde la enfermedad fuera endémica. Este hecho precipitó, en 1960, la decisión de Argentina de establecer un programa nacional de lucha contra la fiebre aftosa, provocando una reacción similar en los países vecinos (Uruguay, Brasil, Chile, Paraguay).

Cronológicamente, la iniciación de los distintos programas de lucha contra la fiebre aftosa en América del Sur fue el siguiente: Argentina (1960), Brasil (1965), Paraguay y Uruguay (1968), Chile (1970) y Colombia (1972). Venezuela y Perú desarrollaban actividades a nivel nacional desde 1956 y 1965, respectivamente, aunque sin una programación completa. Bolivia y Ecuador fueron los últimos países en incorporarse a esta lucha mancomunada (*).

En caso de una ruptura de inmunidad, el sacrificio es el método de elección en países tales como Australia, Canadá, Irlanda, México, Nueva Zelandia y los Estados Unidos, los cuales, normalmente, están libres de la enfermedad. La política del sacrificio junto con un programa de vacunación general ha reducido notablemente la infección en la Europa occidental, hasta un punto tal que, algunos países, pueden considerarse libres de la misma (55). En América Central y del Norte, donde el último registro de esta enfermedad es en 1954 (México), se mantienen en vigencia programas de prevención (93).

Actualmente, los programas nacionales de lucha contra la fiebre aftosa cubren, aproximadamente, cerca del 60% de la población bovina sudamericana (mas de 200 millones de cabezas de ganado), con excepción de las zonas del continente libres de la enfermedad. Los métodos de lucha están basados en vacunaciones masivas cuatrimestrales y en el control de brotes. Entre las regiones del mundo en las cuales el virus aftoso es endémico, Sudamérica tiene las mas grandes campañas nacionales contra el virus, tanto en el área cubierta como en la cantidad de animales vacunados y tiene, probablemente, el volumen mas grande de producción de vacunas antiaftosas. Se estima que podría llegar a la mitad de la producción total de vacuna en el mundo (359), calculándose ésta en mas de 800 millones de dosis al año.

(*) Datos extraídos de la VI Reunión Interamericana a nivel ministerial sobre el control de la fiebre aftosa y otras zoonosis, diciembre 1972, RICAZ 6/19.

Algunas de las razones por las cuales la fiebre aftosa es tan seria y de tan difícil control, pueden resumirse del siguiente modo:

- 1.- Es una enfermedad altamente contagiosa (17);
- 2.- Afecta a todos los animales domésticos biungulados y a muchas especies salvajes (109,260);
- 3.- Muchos animales, aparentemente sanos, pueden ser portadores del virus durante mucho tiempo (95,97-99,174, 322,400,465,467,487-488);
- 4.- El virus puede sobrevivir durante largos períodos de tiempo en el medio ambiente (109,208);
- 5.- El virus está dotado de gran plasticidad teniendo la propiedad de mutar muy fácilmente (177). Ello explica el hecho de que hay 7 tipos inmunológicos distintos y mas de 65 subtipos, algunos de los cuales son tan diferentes entre sí que una vacuna preparada con uno de ellos no protege contra algunos de los otros (334).

II.1.3.4. Vacunaciones

En América del Sur se realizan campañas de vacunación cuatrimestrales, cubriendo entre el 80 y el 90% de los bovinos existentes en la mayoría de las áreas bajo programa. La revacunación regular es necesaria para que se mantenga el índice de anticuerpos a un nivel suficiente y constante (127). Desde 1968, en la Argentina se vacuna también a la población ovina en períodos semestrales.

Dependiendo de las circunstancias, el método de vacunación a seguir es uno de los tres que se detalla a continuación:

General.- Los programas de este tipo implican la vacunación de todos los animales susceptibles en un tiempo determinado, el cual depende de la duración de inmunidad otorgada por la vacuna.

En barrera.- En estos programas -usados con éxito en Dinamarca, México y Colombia- todos los animales susceptibles de una zona son vacunados contra el subtipo de virus que provocó la ruptura de inmunidad, en un intento de contener la enfermedad dentro de un área infectada.

En anillo.- En el programa en anillo son vacunados todos los animales susceptibles en un área determinada alrededor de la ruptura. Los

animales usualmente son vacunados junto con el sacrificio de aquellos que han sido infectados o expuestos.

La vacuna utilizada es trivalente, para los tipos de virus O,A y C en los países del cono sur y bivalente, para los tipos O y A, en Ecuador, Colombia, Perú y Venezuela. Las vacunas son producidas normalmente en el país de uso y pueden ser de dos tipos: a virus inactivado o a virus vivo atenuado.

Las vacunas a virus inactivado son usadas como control de la enfermedad en países de Europa, Sudamérica, Asia, Africa y Medio Oriente y representan más del 90% del total de las utilizadas en América (3).

La primera vacuna inactivada efectiva en bovinos estuvo disponible para su uso en 1938 (499-500). El antígeno era obtenido a partir de lesiones en la lengua de animales infectados, lo cual era bastante tedioso y muy caro. En 1951, este proceso fue reemplazado utilizando explantes de epitelio lingual bovino -método Frenkel- (189-191,356). En 1960, se inició la producción industrial de antígeno aftoso usando cultivos primarios de células de riñones bovinos, crecidas en frascos Roux y luego en frascos rotantes (20,297,481). Este método tiene la desventaja en la dificultad para el procesamiento de los riñones y en la baja densidad celular alcanzada en las monocapas. Los cultivos primarios usando riñones de cerdo también fueron ensayados para la producción a gran escala de antígeno aftoso (360-361).

El cultivo de virus aftoso en líneas celulares estables surgió en 1962 (337) con la línea celular fibroblástica derivada de riñones de hamster (BHK-21). Puede ser usada en monocapas en botellas rotantes (339,377,394) o en suspensión (101,103,442). Las vacunas preparadas a partir de células BHK son tan potentes como otras y libres de complicaciones tumorales (101,483).

En algunos países -como por ejemplo Brasil- la producción del antígeno puede realizarse utilizando conejos neonatos, en los cuales la multiplicación del virus ocurre, principalmente, en el tejido muscular (3,180).

La formalina (formaldehído o formol) fue el primer inactivante aplicado en la producción de vacunas contra la fiebre aftosa (134,218, 485,505). Actualmente, la utilización del formol está siendo reemplazada por inactivantes de primer orden, teniendo en cuenta los re

sultados obtenidos al comparar la degradación del virus en presencia de ambos tipos de sustancias (75,321). Una cinética de neutralización es de primer orden cuando una sola molécula de anticuerpo es capaz de inactivar al virión (159). De los muchos compuestos que muestran una cinética de inactivación de primer orden pueden citarse: el glicildaldehído (60,321), la betapropiolactona (BPL) (171-172) y derivados de las aziridinas tales como la etileneimina (EI) (27, 131), la etileneimina binaria (BEI) (28-29), la etiletileneimina (EEI) (44) y la acetiletileneimina (AEI) (74,222,321,424), siendo esta última una de las más usadas en la producción de vacunas inactivadas. La luz U.V. también fue usada como inactivante (301).

La mayoría de las vacunas inactivadas llevan hidróxido de aluminio como adyuvante y muchas de ellas también contienen saponinas para mejorar la adyuvancia (359). Las saponinas son un grupo de sustancias glucosídicas de origen vegetal, extraídas de una amplia variedad de especies (133). Su acción adyuvante en relación al virus de la fiebre aftosa fue descrita por primera vez en 1932 (198) pero no fue tomada en cuenta sino hasta 1951 (167). Las vacunas acuosas convencionales son preparadas adsorbiendo el virus al gel de hidróxido de aluminio suplementadas con 5-25 mg de saponina por dosis bovino (448). Una característica de estas vacunas es la variación de la potencia en función del serotipo de virus aftoso usado como antígeno para la preparación de las mismas (170,451).

Si bien el adyuvante oleoso comenzó a usarse desde 1930, recién en 1963 fue informado el uso de los mismos para la preparación de vacunas comerciales contra el virus de la fiebre aftosa (132). Un alto porcentaje de bovinos fue inmunizado cuando el antígeno aftoso se emulsificó en aceite respecto del mismo antígeno pero absorbido al coloide de hidróxido de aluminio. Resultados acerca de la mayor efectividad del adyuvante oleoso frente al convencional han sido citados en la literatura (221,321,395).

El uso de vacunas a virus vivo modificado en programas de lucha contra esta enfermedad ha sido ensayado en países del Medio Oriente (Israel) (263), algunos países africanos (Kenia, Sudáfrica, África del Sudoeste) (199,338,494) y en Sudamérica (Venezuela, Brasil, Colombia, Chile, Guyana y Ecuador) (30,210,352-353). Las primeras in-

investigaciones sobre la posibilidad de adaptación del virus aftoso a otros huéspedes no naturales fueron iniciadas en 1937 y confirmadas pocos años después (205,337,354,444). Sin embargo, el uso de este tipo de vacunas está limitado a algunos países que no son exportadores de carne, debido a las restricciones que imponen los países importadores en previsión de que los productos puedan albergar el virus modificado (180,352).

Las vacunas son sometidas a controles de rutina con respecto a su inocuidad, tanto inespecífica (contaminación bacteriana) como específica (inactivación) (73,234). En nuestro país, todas las partidas comerciales de vacunas antiaftosas inactivadas son controladas por el Estado a través del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA), en pruebas de laboratorio en cuanto a inocuidad y antigenicidad y sobre ganado bovino en cuanto a su potencia.

II.1.3.5. Controles sanitarios

La mayoría de los países afectados por esta enfermedad llevan a cabo medidas clásicas de profilaxis y control sanitario. Entre las mismas se incluyen: la suspensión de rodeos y del movimiento del ganado en las áreas de los focos, desinfección de vehículos, materiales y equipos de asistencia a los lugares donde se detectó el brote de aftosa, clausura preventiva de los establecimientos afectados por períodos variables que van desde 30 hasta 90 días. Una vez establecido que el brote fue eliminado, la zona se desinfecta y se limpia con compuestos ácidos o alcalinos a las concentraciones recomendadas. Si no hay nuevos brotes en animales susceptibles dentro de los 90 días subsiguientes a su introducción en la zona, se eliminan las medidas de restricción (17).

La delimitación de un foco (animales afectados) debe incluir la clausura, no sólo del establecimiento en el cual fue detectada la aparación de la enfermedad, sino también establecimientos vecinos y aún otros más alejados, pero que han recibido ganado del lugar donde fue advertido el brote durante el período de incubación de la enfermedad (115).

También se debe tener en cuenta en todo sistema de control sanitario, el posible papel de los portadores y de la fauna silvestre como fuente de infección y/o transmisión del virus aftoso (397).

Por último, puede mencionarse que los sistemas de controles nacionales no resultan suficientes en muchos países para realizar una vigilancia estricta en el cumplimiento correcto de las direcciones impartidas en los programas de vacunación (manejo y conservación de vacunas, por ejemplo) (92,116,398).

II.1.3.6. Roturas de inmunidad

Los problemas de rotura de inmunidad pueden ocurrir aún en países con controles sanitarios muy estrictos y campañas de vacunación obligatorias, tal como ocurrió en 1981 en Francia e Inglaterra (267). El virus responsable de esta rotura fue el serotipo 0, Lausanne 1965 (Suiza), el cual es usado en la preparación de vacunas comerciales. Entre las causas más probables por las cuales se habría producido la reintroducción de este virus en el campo pueden citarse: 1) fuga del virus de un laboratorio de investigación o de una planta de producción de vacuna; 2) el uso de una vacuna contaminada con el virus; o 3) el uso de una vacuna antiaftosa incompletamente inactivada.

Otros ejemplos de roturas de inmunidad fueron citados en Inglaterra (1966/1967), entre Dinamarca y Suecia (1966) y en islas del Canal de la Mancha (1974) (70). De acuerdo a un informe presentado por la Comisión Europea para el control de la fiebre aftosa en 1981 (316), no se descartaría la posibilidad que, la mitad de los casos registrados de roturas de inmunidad en Europa en los últimos 10 años, hayan sido originados por vacunas mal inactivadas.

Otro factor del cual se carece de una información adecuada y que podría contribuir sensiblemente a los problemas de rotura de inmunidad es el de la persistencia del virus en el campo. Si bien se señala al bovino como el principal responsable de la permanencia de la enfermedad en zonas endémicas (14,324,399,465-466,487-488), no se descarta el papel de diversas especies de animales salvajes (especialmente roedores) como reservorios ecológicos del virus aftoso (397).

Se ha demostrado, por vía experimental o en forma natural, que varias especies de mamíferos en estado salvaje, son susceptibles a la fiebre aftosa (95,97-100,174,187,322,325,330,400). Sin embargo, no se ha podido establecer si estas especies constituyen reservorios naturales del virus, si son agentes difusores de la enfermedad durante los brotes en las especies domésticas o si constituyen apenas huéspedes accidentales del virus (400).

En algunas regiones, por sus características ecológicas o geográficas, es imposible la vacunación de animales dentro de los porcentajes previstos, dando origen a núcleos de población altamente susceptibles (398).

Por otra parte, ya se ha mencionado la gran capacidad de mutación de este virus y su relación con la eficacia de las vacunas (II.1.3.3.-). La frecuencia de mutación para un carácter dado del virus se halla en el orden de 10^4 (175), lo cual pone en evidencia que nuevos mutantes son formados continuamente en la población viral. Nuevos tipos inmunológicos pueden surgir por selección de mutantes debido a condiciones favorables del medio ambiente (125,175,247,249). Mutaciones puntuales a nivel del genoma viral serían suficientes para introducir cambios importantes en la patogenicidad del virus hacia el bovino (374-375).

Otra causa que podría dar origen a una rotura de inmunidad es la aplicación de vacunas en malas condiciones durante las campañas sanitarias. Teniendo en cuenta que la inmunogenicidad de las vacunas comercialmente disponibles reside en la partícula 140S intacta del virus (71,73), es importante conocer la estabilidad de la misma a los inactivantes usados para dar virus no-infeccioso.

La partícula 140S es muy lábil al pH por debajo de 7, generando ARN viral, una subunidad proteica 12S conteniendo todos los polipéptidos estructurales a excepción de VP4 y un agregado insoluble del polipéptido no presente en el componente 12S (474). Puesto que la mezcla posee poca o nada actividad inmunizante (154), es necesario asegurar que el pH de las suspensiones virales para la producción de vacunas permanezcan lo suficientemente alto para evitar esta ruptura. La actividad inmunizante de varias cepas del virus también son considerablemente reducidas por enzimas proteolíticas, aún cuando

las partículas virales sedimentan a 140S. Esta reducción en la actividad inmunizante es causada por la hidrólisis parcial de uno de los polipéptidos de la cápside del virus (474,512).

Cepas del virus aftoso de la misma especificidad serotípica pueden ser diferentes en la estabilidad de la cápside a los inactivantes usados en la elaboración de vacunas. Por ejemplo, mientras que la cápside de una cepa del virus aftoso es lábil a concentraciones de 0,001% de AEI (340,404), otra cepa serológicamente similar posee una cápside estable frente al mismo tratamiento. Esta inestabilidad de la cápside puede dar lugar a vacunas de baja potencia y/o de corta vida. Como se señalará mas adelante (II.2.5.-), la inmunogenicidad de la cápside del virus aftoso depende de determinantes antigénicos específicos de uno de los polipéptidos capsídicos, VP1. Poca atención ha sido dada a la estabilidad relativa de este polipéptido para diferentes cepas virales durante la producción y el almacenamiento de vacunas (410).

Otros factores que pueden afectar la calidad de una vacuna contra el virus aftoso y, con ello, favoreciendo la aparición de un nuevo brote de la enfermedad, son los siguientes: aunque actualmente se han perfeccionado pruebas de ensayo de potencia en bovinos, los sistemas usados implican el uso de animales susceptibles y el desafío al virus infeccioso algunas semanas después de la vacunación. La ausencia de lesiones generalizadas es considerada como protección suficiente. La edad y la carga genética de los animales pueden influenciar el éxito de las pruebas. Además, las vacunaciones previas y la presencia o ausencia de anticuerpos: maternos pueden afectar la acción de las vacunas en el campo. Los contagios tienen lugar de manera diferente a las empleadas en los ensayos de laboratorio (486).

II.1.4.- Nuevas técnicas para la producción de antígenos vacunantes contra la fiebre aftosa

En la sección II.2.5.- se señala el importante papel en la producción de anticuerpos neutralizantes que desempeña el polipéptido VP1. Las evidencias que apoyan este hecho surgen a partir del descubrimiento de que el virus aftoso -a diferencia del resto de los picornavirus- es sensible a la acción de la tripsina (316).

Esta proteasa produce la escisión "in situ" de dicho polipéptido (474,509,512). Si bien la infectividad y -dependiendo de la cepa viral- la actividad inmunizante es reducida por la tripsinización, las partículas virales tratadas retienen completamente su capacidad de fijación y contienen ARN infeccioso (19,73,512). Se demostró -por medio de ensayos de inmunodifusión- que fue perdido un sitio antigénico después del proceso de tripsinización de las partículas virales (328,512). Por otra parte, VP1 aislada de partículas virales intactas tiene cierta actividad inmunizante (23,26,258,288,329) mientras que los otros tres polipéptidos virales no muestran actividad alguna.

Estos resultados indican que VP1 aislado a partir de partículas 140S intactas del virus aftoso muestran un determinante antigénico muy similar al de VP1 en la cápside viral. Por lo tanto, una cierta conformación tridimensional crítica en el sitio inmunogénico de VP1 en el virión también debe estar presente en un número significativo de moléculas aisladas y purificadas de VP1. Varias líneas de evidencia apoyarían esta suposición (21,24,47,289,509).

La proteína VP1 podría, entonces, ser usada como un inmunógeno aislado para la producción de vacunas a subunidades virales (527). Se lograrían así ciertas ventajas respecto de las vacunas convencionales, siendo las más importantes las siguientes: Primero, se eliminaría la formación de anticuerpos contra muchos determinantes antigénicos no neutralizantes del virus y de proteínas no virales que contaminan las vacunas virales actuales. Reacciones secundarias no deseables serían reducidas a un mínimo (24). Segundo, se evitaría el uso de inactivantes dado que el inmunógeno aislado carece de infectiosidad (no hay ácido nucleico viral presente). Tampoco habría riesgo de infecciones o de una enfermedad progresiva subaguda. Tercero, algunas cepas virales crecen escasamente en cultivos celulares siendo cepas vacunales pobres por ese motivo, mientras que, otras son muy inestables o no son buenas productoras de anticuerpos. Estos problemas serían solucionados al usar solamente VP1 purificados. Cuarto, las partículas virales intactas son inestables a la temperatura y especialmente a pH menores que 5 (152). La subunidad viral es mucho más estable a los cambios de pH y a la temperatura.

Se eliminaría así la necesidad de conservar las vacunas antiaftosas a bajas temperaturas. Actualmente, se conocen muchos ejemplos de vacunas a subunidades proteicas para enfermedades virales en animales (ver revisión en refer. 24).

Varios laboratorios en Estados Unidos y Europa (58,268,283) han logrado producir VPI por medio de la ingeniería genética señalándose que, al menos, 1000 moléculas de VPI eran sintetizadas por célula bacteriana (283). También se señalaba que se necesitaba 1000 veces mas antígeno cuando el VPI ha sido aislado que cuando era llevado intacto sobre la partícula viral inactivada. Los rendimientos a partir de cultivos bacterianos fueron mejorados, lográndose un rendimiento de hasta 2×10^6 moléculas de VPI por bacteria (cerca del 17% de la proteína en el lisado bacteriano) (268). En estos experimentos, la proteína producida por la célula bacteriana ha sido identificada por su reacción con anticuerpos específicos contra VPI y por reacciones serológicas.

Si bien la proteína parece ser estable en los extractos celulares (268), no puede descartarse cierto grado de desnaturalización o digestión enzimática como causantes de cambios en la antigenicidad de VPI. Por otra parte, estos hechos sugieren que la mayoría de los determinantes antigénicos de las proteínas son conformacionales antes que secuenciales (46).

Para despertar la respuesta protectora inmunitaria, la proteína clonada debe ser capaz de presentar un sitio inmunológico tal como aparece en el virión intacto. El sitio inmunogénico debe sobrevivir el tiempo suficiente como para ser reconocido por el sistema inmune y los anticuerpos inducidos deben unirse a los viriones con una afinidad y especificidad suficientes para dar protección (431). Es de esperar que la proteína VPI produzca anticuerpos para varios sitios antigénicos diferentes, estando sólo algunos de ellos presentes en el virión intacto (268).

El uso de VPI para la elaboración de vacunas antiaftosas no ha probado ser tan efectivo en su capacidad de producir inmunización -peso a peso- en relación a la partícula viral obtenida para vacunación con los métodos tradicionales (23,237,268,283). Varias razones tratan de explicar esta diferencia, siendo la mas aceptada que

la proteína VP1 no adopta la conformación adecuada cuando se halla fuera del armazón provisto por las otras proteínas capsídicas (46, 105, 296).

El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante ha permitido conocer la secuencia nucleotídica del genoma del virus aftoso a partir de la cual es posible deducir la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína VP1. Estas secuencias son conocidas para varias cepas del virus aftoso (58-59, 268, 284). Por lo tanto, es posible preparar, por medio de una síntesis química controlada, cortos polipéptidos (15-20 aminoácidos de longitud) que representan diferentes secuencias aminoacídicas del polipéptido inmunogénico en cuestión. Estos péptidos sintéticos, acoplados a una proteína inmunogénica transportadora, pueden ser usados como antígenos para vacunas (8, 13, 15, 45, 209). La capacidad de distintos péptidos sintéticos para producir anticuerpos neutralizantes y protectores contra la fiebre aftosa han sido evaluados en vacunas con adyuvantes oleoso o hidroxisaponinadas (26, 50, 407).

Hay evidencias de que los sitios que inducen anticuerpos neutralizantes del VP1 de la cepa tipo 0 del virus aftoso, estarían localizados en la mitad carboxiterminal de la molécula (458). Estudios realizados usando cortos péptidos correspondientes a dos regiones diferentes de VP1 de este virus -incluida la mitad carboxiterminal- produjeron altos niveles de anticuerpos neutralizantes en bovinos, cobayos y conejos (50).

Los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos por péptidos son de varios órdenes de magnitud mas grande que los obtenidos por inmunización con la proteína capsídica VP1, independientemente de si la misma era producida por rotura de partículas virales intactas o por expresión en células de Escherichia coli (50). Probablemente, esta diferencia sea debida a que el sitio inmunológico presentado por el péptido sintético al sistema inmune induce la formación de anticuerpos mucho mas relacionados cualitativamente al sitio inmunogénico dominante en la proteína VP1 de la partícula viral intacta.

Varios son los factores que aún necesitan una mayor investigación en el campo de los péptidos sintéticos para mejorar la efectividad

de las vacunas preparadas a partir de los mismos. Como ejemplos se puede mencionar: a) la factibilidad y la economía de estas vacunas son aún difíciles de estimar. Las vacunas convencionales son relativamente baratas y de un alto grado de efectividad, situaciones ambas que hacen necesario un mayor perfeccionamiento, tanto a nivel de la inmunogenicidad del péptido como en el desarrollo de técnicas de muy bajos costos para la producción a escala industrial;

b) el grado de pureza del péptido es otro importante factor a considerar, ya que debe establecerse que los efectos observados son debidos al péptido deducido realmente a partir de la secuencia del ADN patrón. Esto implica tener un proceso sintético de alta fidelidad y reproducibilidad.

c) el tamaño del péptido a ser usado es otro factor clave en el éxito del proceso, puesto que cuanto mas grande sea el péptido mayor es la probabilidad de que el mismo adopte conformaciones inadecuadas (296);

d) la proteína transportadora a la cual se acopla el péptido es otra interesante área que requiere una gran atención. Por ejemplo, la proteína KLH -hemocianina de la lapa- impide algunas de las ventajas que representa una vacuna sintética ya que puede dar origen a problemas de hipersensibilidad luego de repetidas vacunaciones (46).

II.1.5.- Elección de cepas vacunales (410)

Hay dos criterios importantes para la selección de cepas vacunales del virus aftoso. La primera es identificar vacunas adecuadas para un programa de control específico. Esto implica, necesariamente, la comparación serológica de las cepas virales a campo con aquellas incorporadas en las vacunas disponibles para reconocer cuál de los virus vacunales es el mas parecido al virus responsable de la enfermedad en el campo. El segundo objetivo es identificar una cepa viral adecuada para usar en la producción de vacunas. Se pueden hacer las siguientes consideraciones acerca de una cepa vacunal ideal contra la fiebre aftosa:

- a) Debe tener la especificidad serotípica correcta;
- b) Crecer rápida y regularmente en los sistemas de cultivos empleados en la producción de vacunas;
- c) Dar lugar a altos rendimientos virales;
- d) Producir altos niveles de antígeno inmunizante, el cual sea estable hasta después de la inactivación;
- e) En las condiciones que se encuentra en la vacuna debe ser ca paz de inducir anticuerpos protectores en los animales vacunados. El antígeno debe ser estable, al menos por un año, a temperaturas de 4°C.

II.2.- VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

II.2.1.- Estructura de la cápside y del genoma viral

Loeffler y Frosch demostraron en 1897 la filtrabilidad del agente causal de la fiebre aftosa (302). Este fue el primer reconocimiento de un patógeno animal en el grupo al cual pertenecía la clase de los virus filtrables. El virus de la fiebre aftosa es un miembro de la familia Picornaviridae y constituye el subgrupo aftovirus (Tabla 1) (123,318,327).

TABLA N° 1.- Clasificación y principales características de los Picornavirus (modificado de 56)

Géneros	Principales miembros	Densidad ClCs(g/ml)	Sensibilidad al pH
Enterovirus	Poliovirus; Coxsackievirus; Enterovirus bovino; Echovirus;	1,33-1,34	Estables a pH 3
Cardiovirus	Encefalomiocardi- tis virus; Mengovirus;	1,33-1,34	Inestables a pH5-6 en presencia de 0,1M BrNa
Rhinovirus	Rhinovirus huma- nos y bovinos;	1,38-1,41	Inestables por debajo de pH 5-6
Aftovirus	Virus de la fiebre aftosa;	1,43-1,45	Inestables por debajo de pH 5-6

La partícula viral infecciosa (PM aproximado $8,4 \times 10^6$ daltons) (473) se compone de una cubierta proteica desnuda -denominada cápside- dentro de la cual se encuentra el genoma del virus (4,18,415). Este se compone de una cadena simple de ARN con un PM entre $2,0$ y $3,1 \times 10^6$ daltons (389,414,455,473), la cual actúa, directamente, como mensajero (35) y representa el 31% del peso de la partícula viral (20). La cápside, la cual asume una forma icosaédrica (300, 408,473), se compone de 60 copias de cuatro proteínas principales: tres con PM entre 37.000 a 24.000 d (VP1,VP2,VP3) y una menor con un PM en el rango de 7.000 a 13.500 d (473-474); una o dos copias

de un precursor proteico no escindi o (VP0) (415,491) y cantidades muy pequeñas de una proteína de 52.000 d componente de la polimerasa viral (415). Recientemente, han sido asociadas a viriones purificados del virus de la fiebre aftosa ciertas actividades enzimáticas, tales como la de una ribonucleasa (145) y de una quinasa (225, 228).

La proteína de 30.000d del virus aftoso, equivalente a la proteína VP1 de poliovirus, sensible a la tripsina (83,287,509), ha sido designada de diferentes maneras. Debido a su posición variables en distintos sistemas de geles de poliacrilamida fue denominada VP1 (83,456), VP2 (491) o VP3 (23,288). En efecto, en presencia de una fuerte concentración de urea, el orden de migración de VP1 y VP3 es inverso: VP1 (83) migra mas rápidamente que VP2 y VP3. Por el hecho de esta migración anormal de la proteína fue sugerida se la denominara VPT, donde T significaba sensibilidad a la tripsina (25, 457) o VPT_h donde Th representa a la treonina (25,317,457), el aminoácido N-terminal de su secuencia primaria (18,317). En este trabajo de tesis, se sigue la nomenclatura de Burroughs y colab.(83).

Como en el caso de todos los picornavirus hasta ahora estudiados (12, 81-82,244,523), el ARN del virus aftoso contiene un fragmento de longitud variable (20-50 residuos) de ácido poliadenílico (poliA) en su extremo 3' (111,227). En lo referente al papel de esta región en los picornavirus, hay resultados conflictivos: por una parte, fue demostrado que, tanto en el virus de la polio como en el virus de la encefalomiocarditis, un aumento en la cantidad de residuos de ácido poliadenílico se correlacionaba con un incremento en la infectividad de los ARN virales (214,244,449). Para el virus de la fiebre aftosa, en cambio, un ARN conteniendo un poliA de menos de 10 residuos de longitud presentaba la misma infectividad que el ARN del virus normal (227). Un resultado aún mas contradictorio es el del virus nodamura, con un ARN de polaridad semejante a la del ARN mensajero de los picornavirus, el cual, aparentemente, carece de poliA (342).

Recientemente, una pequeña proteína (PM 40.000 d) denominada VPg y sintetizada por el virus (211,294), ha sido demostrado que se halla unida al nucleótido pUp (224) del extremo 5' del genoma (157,417). Fue sugerido que esta proteína estaría implicada en la iniciación de la síntesis de ARN "in vivo" (346), ya que se halla presente en las nuevas cadenas de ARN recién sintetizadas. Por estudios de mapeo de péptidos con el virus de la encefalomiocarditis, se lo ha ubicado cercano al extremo N-terminal de la proteína C (355), la cual es equivalente al precursor primario p100 (Ver II.2.3.5.-) del virus aftoso. También ha sido demostrada la heterogeneidad de los VPg en el virus aftoso (266).

A diferencia del resto de los miembros de la familia, cerca del extremo 5' del genoma de los aftovirus y cardiovirus, se halla un corto segmento de 100 a 200 residuos de ácidos citidílicos (poliC) (54,78,194,231,384). El poliC puede ser digerido tratando el ARN del virus de la fiebre aftosa con RNasa H en presencia de un oligo dG (deoxiguanidina). Con este tratamiento se obtienen dos fragmentos: el más corto (denominado S) tiene cerca de 400 nucleótidos y contiene al VPg, indicando que el poliC no está en el extremo 5' del ARN; el fragmento más largo (denominado L) de cerca de 7500 nucleótidos contiene el resto del ARN, incluyendo el poliA en el extremo 3' (406) (Ver figura 1).

El mapa genético del virus aftoso es lineal con los genes de las proteínas estructurales ubicados cerca del extremo 5' del ARN y con los genes de la replicación hacia el extremo 3' (147,151,253,416) (Ver figura 1).

II.2.2.- Replicación

La replicación del ARN del virus aftoso es un proceso transcripcional de dos etapas, implicando la síntesis de una cadena complementaria (menos) en un primer paso, seguida por la síntesis de nuevas cadenas de ARN de la polaridad original, usando la cadena "menos" como templado (127,368). La síntesis del ARN viral se realiza exclusivamente en el citoplasma de las células infectadas y, a diferencia del virus de la polio (89-90), la polimerasa del virus de

FIGURA N° 1.- ESQUEMA DEL PROCESAMIENTO PROTEOLITICO DE LAS
PROTEINAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA (414,
modificado)

El genoma del virus aftoso consta de una cadena simple de ARN, la cual termina hacia su extremo 5' en una proteína -VPg- covalentemente unida al primer nucleótido de la cadena ribonucleoproteica (pUp). El extremo 3' termina en una cadena de longitud variable de poliadenina (poliA).

La entrada de este ARN a síntesis proteica implica la escisión de esta proteína, la cual se indica en la figura como "ARN mensajero". La traducción completa de este ARN daría origen a una proteína gigante -la poliproteína- la cual, por acción de proteasas celulares, formaría los cuatro precursores primarios del virus aftoso: p20, p88, p52 y p100 en el orden 5' a 3', respectivamente. Este último presenta formas alternativas de escisión, pudiéndose formar un precursor de PM distinto, p122.

Los precursores primarios son escindidos por proteasas virales y/o celulares (situación aún no aclarada totalmente), formándose así los polipéptidos estables, algunos de los cuales se indican en la figura. El último de los pasos del procesamiento proteolítico del precursor estructural -p88- es la escisión de VP0 para dar VP2 y VP4.

El polipéptido p20 originado de la escisión del precursor p100 podría tener actividad proteolítica, según lo sugieren estudios realizados con la proteína C del virus de la encefalomiocarditis (357).

Por analogía con el polipéptido NCVPX del virus de la polio, el polipéptido p34 podría estar asociado con la unión del complejo de replicación (Ver II.2.2.4.) a las membranas lisas de la célula huésped (88,91). Esta suposición proviene de experimentos con mutantes del FMDV resistentes a la guanidina (419) y de ensayos con este inhibidor sobre las estructuras de replicación del virus de la polio (518).

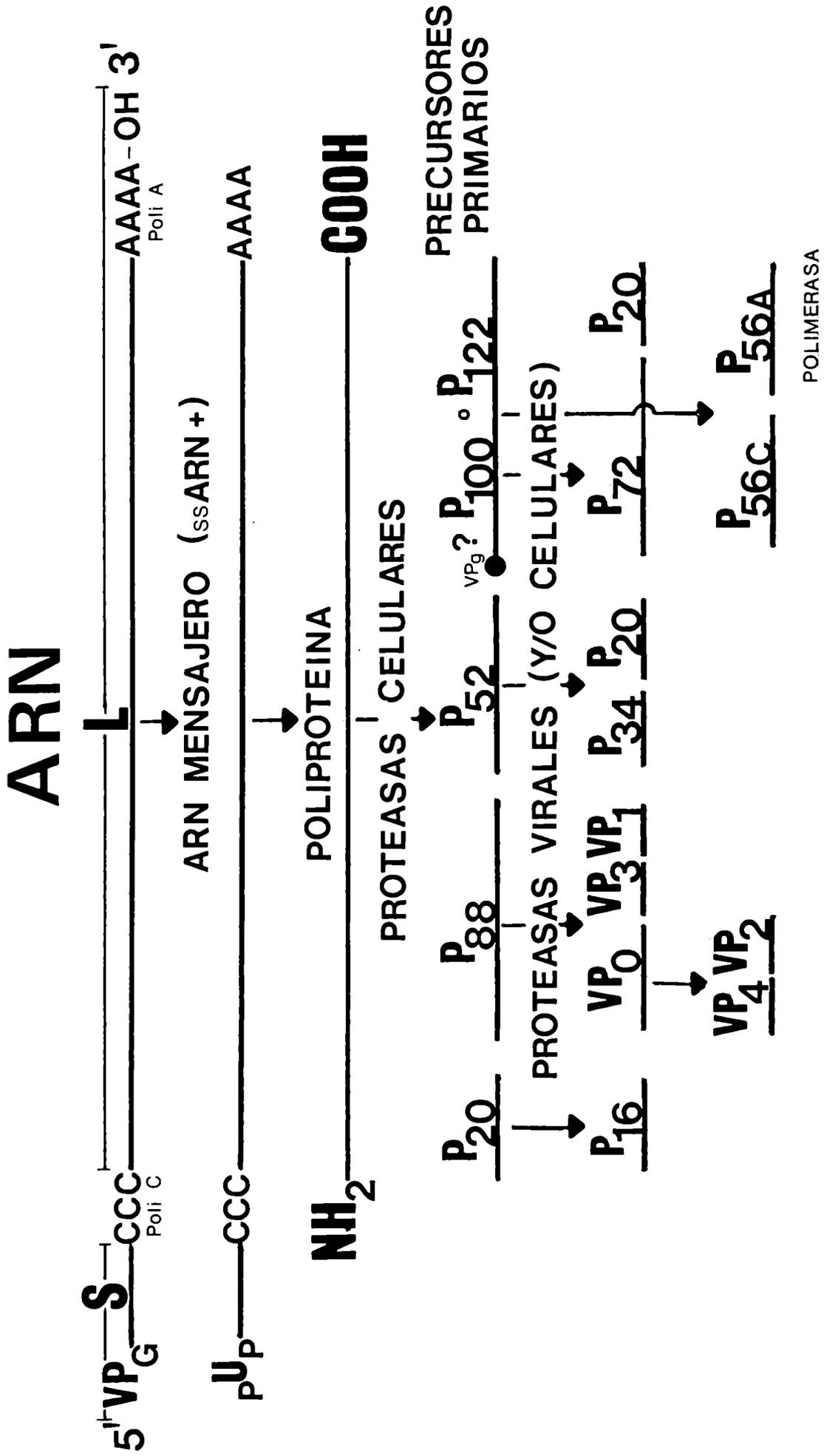


FIGURA N° 1

la fiebre aftosa se halla asociada con membranas citoplasmáticas lisas recién sintetizadas (382,514) conteniendo ribosomas (293). Tal como se describe mas adelante, la síntesis del ARN del virus aftoso presenta un máximo a las 3,5 horas p.i. para luego comenzar a decaer, mientras que la síntesis de membranas continua inter^urrupidamente desde las 2,5 horas hasta las 4,5 horas p.i. (382). La polimerasa se halla unida a una estructura denominada complejo de replicación (Ver II.2.2.4.-), la cual ha sido observada en el exterior de la membrana de vacuolas membranosas lisas de células de cobayos infectadas con el virus.

La infección con picornavirus produce una fuerte -aunque selectiva- inhibición de la síntesis de proteínas y del ARN celular (37,179, 238,238,295,413,475,522), sugiriéndose que la misma es el resultado del bloqueo general de la expresión del DNA por histonas (77). Sin embargo, hay evidencias conflictivas respecto del efecto del virus aftoso sobre la síntesis de proteínas celulares (Ver II.2.3.).

II.2.2.1.- Síntesis de ARN viral y partículas virales

La síntesis de ARN viral en células infectadas con el virus aftoso sigue un comportamiento temporal bien definido. No hay síntesis significativa de ARN hasta los 60 min después de la infección. Luego de este período de latencia, la síntesis de ARN viral muestra un crecimiento exponencial por, aproximadamente, 2 horas. Cuando cerca del 20-25% del ARN viral ha sido producido, hay un cambio abrupto en la velocidad de síntesis del ARN y durante 60-90 min el ARN se acumula a una velocidad lineal. Al final de esta fase (entre 3-4 horas p.i.), la mayor parte del ARN viral ha sido sintetizado y, en consecuencia, la velocidad de síntesis disminuye (77, 182).

Una curva de síntesis del ARN del virus de la fiebre aftosa en función del tiempo p.i. se muestra en la figura 11. La forma de la curva depende, sin embargo, del estado metabólico de las células (la síntesis de ARN viral es máxima cuando la velocidad de síntesis del DNA celular es también máxima) y de la multiplicidad de infección (a altas m.o.i. la curva se desplaza hacia los tiempos mas tempranos (41)). Se piensa que la finalización de la fase lineal es debida al daño infligido a la maquinaria metabólica ce-

lular incapaz -en este momento- de restaurar el pool intracelular de nucleótidos, el abastacimiento de energía o la disociación de los polisomas (460). Alternativamente, también puede deberse a la permeabilidad alterada de la membrana celular.

En el momento de máxima actividad (o sea, cuando el ARN se acumula a una velocidad lineal), la síntesis de moléculas completas de ARN del virus de la polio requiere 1 min (135). El ácido ribonucleico formado puede ser encapsidado por proteínas virales preexistentes dentro de los 5 min siguientes a partir de su síntesis (41). En esta etapa del ciclo infeccioso, una única célula infectada produciría alrededor de 3000 moléculas de ARN por min (41), lo cual daría un rendimiento final de cerca de 2×10^5 moléculas de ARN viral por célula (33).

La síntesis de virus y procápsides durante el ciclo infeccioso del virus aftoso en células BHK-21, clon 13, se muestra en forma de histograma en la figura 6, representando cada barra del mismo la cantidad acumulada de partículas virales hasta un cierto tiempo p.i., el cual se indica en las abcisas. De dicha figura puede apreciarse que la síntesis de partículas virales antes de las 2 horas p.i. es, prácticamente, nula, acumulándose gran cantidad de las mismas a partir de este momento hasta que se produce el efecto citopático total del cultivo. Este comportamiento coincide con el ya informado para el virus aftoso (51,77) y para otros picornavirus (41).

II.2.2.2.- Estructuras ARN virales inducidas por el virus

Pueden aislarse tres estructuras ARN inducidas por picornavirus en las células infectadas (368):

- 1) El ARN recién sintetizado (ARN de cadena simple, ssARN);
- 2) La forma replicativa (FR) de cadena doble; y
- 3) El intermediario de replicación (IR) parcialmente simple y parcialmente de doble cadena.

El ssARN es la especie molecular mas significativa encontrada en células infectadas y comparte con el ARN extraído de los viriones las mismas propiedades biológicas y físicoquímicas.

La forma replicativa es una doble cadena estable, formada por una cadena simple de ARN viral unida por enlaces hidrógeno a una cadena complementaria completa (519). A tiempos tempranos del ciclo infeccioso, la FR representa no mas del 0,5% del ARN inducido por el virus mientras que al final del ciclo estas moléculas pueden representar hasta el 10% del ARN sintetizado hasta ese momento.

Debido a esta particularidad de la FR de acumularse hacia el final del ciclo infeccioso cuando la síntesis de proteínas y de ARN viral disminuyen, condujo a la suposición que dichas moléculas representan un producto final sin ningún papel fisiológico. Hasta el momento no hay pruebas definitivas acerca de su posible participación en el proceso replicativo del virus.

La tercera estructura -el IR- fue rápidamente identificado como el sitio de síntesis del ARN de los picornavirus (32,40,49). Consiste en un núcleo de doble cadena, resistente a la RNasa, mas varias cadenas nacientes de ssARN de diferentes longitudes, adheridas al templado (la cadena "menos" de ARN (207)) por uniones hidrógeno (11).

El ARN genómico de los picornavirus contiene un fragmento de poliA de diferentes longitudes en el extremo 3' de la molécula. Este fragmento permite la transcripción de un poliU -oligonucleótido de ácido poliuridílico- en el extremo 5' de la cadena "menos", la cual, a su vez, sirve como templado para reproducir el poliA en el ARN viral recién sintetizado (184). A diferencia del fragmento de poliA de los ARN mensajeros eucarióticos, el poliA de los picornavirus no es añadido post-transcripcionalmente sino que está codificado genéticamente.

II.2.2.3.- El complejo de replicación

Todas las estructuras implicadas en la síntesis de ARN de los picornavirus están estrechamente asociadas con las membranas citoplasmáticas lisas (366). La síntesis del ARN viral se produce exclusivamente en el complejo de replicación (CR), una compleja estructura que incluye el ARN templado y la ARN polimerasa codificada por el virus (164,207,303).

Han sido demostradas dos actividades enzimáticas en el CR de los picornavirus:

Una polimerasa o replicasa codificada por el virus, ARN-dependiente, resistente a la actinomicina D (31,37,39), la cual puede copiar un templado poliadenilado (poliA) unido a un cebador de ácido oligouridílico (28,184).

Esta enzima es la responsable "in vivo" de la replicación del ARN en células BHK-21 del virus de la fiebre aftosa (305,378). Por otra parte, se aisló un complejo proteína-ARN del FMDV capaz de permitir la elongación de cadenas de ARN "in vitro" identificándose una proteína viral, p56a, como la responsable de la elongación de las cadenas ssARN en el CR (305,343,376). La proteína está codificada en la región cercana al extremo 3' del genoma del virus (Ver figura 1) (151,416). Esta región del ARN viral codifica también para la polimerasa de otros picornavirus (184).

Una segunda actividad enzimática, la poliU polimerasa poliA-dependiente, la cual necesita tanto de un templado de poliA como de un cebador de oligouridina para condensar residuos de UMP (uridín monofosfatos) en el extremo 3' del primer (368). Esta actividad de poli(U) polimerasa fue identificada, posteriormente, en el citoplasma de células infectadas con el virus aftoso (376), la cual requería, además del templado de poliA, un oligo(U) cebador, iones magnesio y uridín trifosfatos (UTP). Esta enzima sería la responsable para la iniciación de la síntesis de la cadena "menos". La actividad de poli(U) polimerasa ha sido asociada a una proteína viral de un PM de 56.000 d, la cual formaría parte de un complejo que sedimenta a 70S en gradientes de sacarosa. Dicho complejo consistiría de una proteína inducida por el virus (p56) (186) y

cuatro componentes de la célula huésped (376). En el virus de la polio, la proteína p63 parecería ser el principal constituyente de la replicasa viral mostrando ambos tipos de actividades enzimáticas (185,307,489).

La polimerasa del FMDV se halla asociada a un templado endógeno de ARN (10-11). En base a pruebas de microscopía electrónica se propuso que se trataba de una cadena en su mayor parte ssARN(476). Sobre evidencias bioquímicas, fue sugerido que las cadenas nacientes están unidas por enlaces hidrógeno a una pequeña región del templado, quizás mantenidas en dicho lugar debido a la polimerasa (349). Actualmente, es aceptado que es necesaria una porción de doble cadena sobre el templado para la síntesis del ARN viral (308,331).

II.2.3.- Síntesis y procesamiento de las proteínas virales

Aunque varios autores han informado que la infección de células BHK con el virus aftoso provocó la inhibición de la síntesis de proteínas de la célula huésped (77,287,377,379), otros investigadores no pudieron detectar tal inhibición (51,53).

En aquellos casos en que fue posible observar una rápida inhibición en la síntesis de proteínas en células infectadas con el virus aftoso, se identificaron tres picos de máxima actividad a lo largo del ciclo infeccioso. Experimentos en los cuales fue usada la guanidina (un inhibidor de la síntesis de la replicasa del virus aftoso (385)) como inhibidor viral, sugirieron que el primer pico producido a los 60 min p.i. podía estar asociado con la formación de la replicasa viral. El tercer pico a los 150 min p.i. coincidía con la síntesis de las proteínas estructurales pero el segundo, a los 120 min p.i. no pudo ser relacionado a ninguna actividad viral conocida (51,77).

El análisis de los extractos citoplasmáticos por electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas inducidas por el virus aftoso reveló, al menos, 11 proteínas virales diferentes (51). Al determinarse la presencia de las proteínas inducidas en las partículas virales se vio que este proceso era muy ineficiente

(51):solamente pudo detectarse un 8% de incorporación máxima a los 180 min p.i., momento en el cual se obtenía el mas alto rendimiento viral. Para el virus de la polio, la eficiencia resultó ser de un 25-50% (122,251).

Fue demostrado para los picornavirus que los aminoácidos eran rápidamente incorporados a proteínas virales específicas dentro de los 5 a 20 min después de ser incorporadas al medio de cultivo. Las proteínas así marcadas se encontraban en las partículas virales dentro de los 20 min, con un máximo de 60 min (265,459). Si bien en el virus aftoso las proteínas inducidas eran rápidamente marcadas, se necesitaban entre 30 y 45 min para que todas las proteínas estructurales sean formadas (51).

II.2.3.1.- Evidencias acerca de un único sitio de iniciación de síntesis de proteínas

Actualmente, es aceptado para todos los picornavirus (163,350) y, en particular, para el virus aftoso (417-418), un sólo sitio de unión principal "in vivo" para ribosomas. Para el virus de la polio este lugar fue identificado en el nucleótido 743 del primer codón AUG a partir del extremo 5' del ARN (158).

Sin embargo, hay evidencias de sitios secundarios internos, puestos de manifiesto en sistemas de síntesis de proteínas "in vitro", usando ARN de polio como mensajero exógeno (1,114,200,246,254) o utilizando fragmentos pequeños del ARN del virus aftoso (418). En este caso se señala que, fragmentos conteniendo el poliA del extremo 3' del genoma del virus, dirigen la incorporación de metionina en proteínas. Los productos obtenidos son distintos de aquellos sintetizados con el ARN entero o con fragmentos conteniendo el poliC. Parecería que hubiera sitios menores internos de iniciación en el ARN bloqueados "in vivo" (365).

De acuerdo a la hipótesis de un solo sitio de iniciación, cabe esperar que todos los genes codificados por el genoma viral sean expresados con igual frecuencia. Los primeros estudios sobre la multiplicación del virus de la polio mostraron que los patrones electroforéticos de la síntesis de polipéptidos obtenidos de células infectadas permanecían inalterados durante toda la infección viral (459,461).

Por otra parte, si el mismo virus se infectaba en distintos sistemas celulares, la velocidad relativa de producción de polipéptidos era muy poco influenciada por la célula huésped. Solamente la cantidad total de proteínas virales sintetizadas variaba de célula a célula (independientemente de cuánto era el rendimiento de virus infeccioso). Esto implicaba que todos los genes virales eran traducidos en la misma proporción relativa, sin importar en qué células eran producidos (239-240,265). Midiendo la velocidad de síntesis de las proteínas en varios picornavirus (encefalomiocarditis, polio, rinovirus humanos), se encontró que todos los polipéptidos virales se hallaban en cantidades equimolares (84-86,314).

Sin embargo, estudios hechos en mengovirus (otro miembro del grupo de los enterovirus) muestran una discrepancia con los datos anteriores: el precursor de las proteínas estructurales se hallaba en una proporción entre dos y tres veces mayor que los otros precursores primarios (306,362). Resultados en este mismo sentido también fueron citados para el virus de la polio (2,254,363) y para otro virus tal como el virus Sindbis (un Togavirus) (96).

Estas observaciones han sido interpretadas como evidencias para la existencia de dos sitios de iniciación, uno antes del cistrón para las proteínas estructurales y otro distinto, interno. Tampoco puede descartarse una terminación prematura de la traducción del mRNA, quizás debida a la presencia de codones específicos silenciosos al final del cistrón de la cápside. Otra posibilidad es que los polipéptidos individuales no hayan sido suficientemente bien resueltos como para permitir un análisis cuidadoso de las cantidades relativas de cada polipéptido.

Por otra parte, también puede suponerse que las preparaciones de ARN usadas en los ensayos de síntesis proteica "in vitro", contengan fragmentos monocistrónicos que codifican para las proteínas de la cápside solamente.

Las variaciones observadas en los picornavirus en las determinaciones de los cocientes molares de los polipéptidos virales sintetizados, no necesariamente significa descartar la existencia de un único sitio de iniciación, ya que podemos encontrar formas alternativas de escisión (84) o la degradación específica de algunos de los polipéptidos (323).

II.2.3.2.- Procesamiento proteolítico de las proteínas virales

En 1965 comenzaron una serie de experimentos que llevaron al conocimiento de la síntesis proteica del virus de la polio. Fue posible descubrir un nuevo mecanismo de traducción para el ARN mensajero de este virus, el cual, poco mas tarde, sería demostrado para el resto de los picornavirus.

El análisis de los polipéptidos virales específicos producidos en células HeLa infectadas con el virus de la polio, mostraron que, además de los 4 polipéptidos de la cápside, se detectaban cerca de 10 polipéptidos no-capsídicos en el citoplasma de las células infectadas (313,459). La suma de los PM de los 14 polipéptidos virales era mayor de 450.000 daltons, la cual sobrepasaba la capacidad máxima de codificación del genoma de polio que es de 250.000 daltons (420).

Esta paradoja permaneció inexplicable hasta 1968, cuando Summers y Maizel (314,461) y Holland y Kiehn (240) sugirieron un nuevo mecanismo para la traducción del ARN de poliovirus. Se demostró que se producían primero polipéptidos de alto PM, los cuales eran procesados a través de una serie de escisiones proteolíticas hasta dar polipéptidos mas pequeños, tales como los que se encuentran formando la cápside del virión.

Jacobson y Baltimore (251,253) lograron acumular estos precursores de alto PM en células infectadas agregando análogos de aminoácidos al medio de cultivo. De esta manera, se inhibía el proceso de escisión y se acumulaban grandes polipéptidos, incluso de mas de 200.000 de PM. Un inhibidor de enzimas proteolíticas, tal como el diisopropil fluorfosfato (DFP), también causaba acumulación de grandes polipéptidos (253).

Con el estudio de los restantes miembros de los picornavirus se encontró, al igual que lo sucedido con poliovirus, que la suma de los PM de los polipéptidos virales excedía la capacidad de traducción del genoma del virus (84,86,251,314,326,459,492). Por lo tanto, fue posible demostrar que este proceso era común a todos los picornavirus, incluyendo el virus aftoso (51,287), habiéndose logrado un casi completo procesamiento "in vitro" de los precursores sintetizados a partir del ARN viral (112,229,418).

La formación de proteínas por procesos de escisión post-traducción a partir de precursores de alto PM es una característica común a casi todos los virus animales (463) y pueden variar desde una modificación menor de un polipéptido estructural durante la maduración (formación del virión (506)) a los procesos de escisión múltiples y secuenciales que producen todos los polipéptidos virales, como en el caso de los picornavirus. También ha sido citado para algunos virus vegetales (333).

Experimentos "in vivo" (pulso y búsqueda de la marcación a 32°C, análogos de aminoácidos, pulsos cortos de radioisótopos) tendientes a demostrar precursores de las proteínas estructurales en el Semliki Forest virus (un togavirus) fueron negativos (193). Sin embargo, posteriormente fue demostrado que, ciertas proteínas especificadas por este virus en células infectadas, provenían de escisiones post-traducción (335). Usando un inhibidor del tipo de las clorometil cetonas (370) o un inhibidor de síntesis proteica tal como el ácido aurintricarboxílico (454), fue posible observar, en células infectadas con el virus Sindbis, la acumulación de proteínas de alto PM y una disminución en la cantidad de proteínas virales estructurales. En ensayos "in vitro" el mayor polipéptido viral producido por el mRNA del virus Sindbis fue el de las proteínas estructurales (96). Por otra parte, las proteínas estructurales y de la envoltura de los oncornavirus también se origina de escisiones proteolíticas a partir de una proteína de alto PM (257,264,496).

El proceso viral mas frecuente en el cual es observada la escisión es en la maduración (para una revisión en el tema ver referencia 271, págs. 622-623). La importancia del mismo podría ser debida a que lleva a la formación de conformaciones específicas en las proteínas afectadas o un aminoácido libre terminal, de manera de asegurar el reconocimiento del ácido nucleico viral homólogo. Otra posibilidad es que los procesos de escisión estabilizan al virión impidiendo la entrada a otros ácidos nucleicos o proteasas.

También fue sugerido que la escisión proteolítica era debida a que las células eucarióticas no podían traducir mensajes policistrónicos (251,446) pero datos obtenidos de virus con genomas monocistrónicos (169,292,526) indicarían otro papel además del mencionado.

II.2.3.3.- Tipos de escisiones en el procesamiento proteolítico de los picornavirus

En el procesamiento de las proteínas virales de los picornavirus podemos distinguir tres tipos de escisiones:

Escisiones primarias.- Ocurren en los polisomas sobre la cadena proteica naciente -la poliproteína- dando origen a los precursores primarios (84,461).

Escisiones secundarias.- Esta etapa se inicia sobre los precursores formados en el estadio anterior. Ocurre dentro de los 5 a 10 min siguientes a la síntesis y no es afectada por inhibidores de la síntesis proteica (315).

Escisión de VP0.- El último de estos tipos de escisiones da lugar a la formación de las proteínas estructurales VP2 y VP4, a partir de su precursor VP0. Este proceso se lleva a cabo en las etapas finales del ensamblado del virus y estaría desencadenado por la unión del ácido nucleico a las partículas vacías (357), dando lugar a la partícula viral infecciosa y completando así el proceso de maduración del virión (51,240,252-253,315).

Es muy probable que se requieran enzimas con diferentes actividades proteolíticas para cada nivel. Las evidencias en apoyo de esta suposición provienen del uso de inhibidores proteolíticos. Por ejemplo, en el virus de la polio se ha comprobado que la IAA no inhibe la formación de los precursores primarios pero sí su procesamiento posterior (270) y, en un oncornavirus (rauscher leukemia virus), la escisión del precursor de los antígenos de grupo (gag) p70 es sensible al TLCK mientras que la escisión del precursor estructural p1a es sensible al TPCK (520).

En relación al primer tipo de escisión, podemos señalar lo siguiente: la reacción inicial estaría dada por una enzima de la célula huésped. Las evidencias en favor de esta suposición son:

- a) La inhibición de la multiplicación del virus de la polio por un mismo inhibidor proteolítico dependía del sistema celular usado para el crecimiento del virus (269). Así, el TLCK es efectivo en impedir la escisión de las proteínas del virus de la polio solamente en células HeLa, mientras que, el mas efectivo en células de riñón de mono, fue el TPCK.
- b) Extractos de células no infectadas añadidos a precursores de alto PM del poliovirus, los escinden a fragmentos mas pequeños (269).
- c) Se observan pequeñas diferencias en el tamaño de los productos virales de escisión "in vivo" para un mismo virus, dependiendo de la línea celular usada (269).

Sin embargo, en experimentos usando el mismo sistema celular para la multiplicación de dos cepas distintas del virus de la polio tipo 1 y 2, se obtuvieron patrones electroforéticos diferentes en relación a sus PM. Esto indicaría que las proteínas precursoras de alto PM de cada tipo de virus son escindidas en polipéptidos virales cuyos tamaños están genéticamente determinados por el virus y no por la célula huésped (265).

En el segundo de los estadios de escisión actuarían enzimas proteolíticas de origen viral. Varias son las evidencias que podemos citar en este sentido, como por ejemplo:

- a) En polio fue identificada una actividad proteolítica viral que llevaba a cabo el procesamiento del precursor estructural, dando los polipéptidos capsídicos (279). La cinética de producción de la actividad sigue a la de síntesis proteica viral y el rendimiento enzimático está correlacionado con la cantidad de virus infeccioso (279).

Si bien el agregado de análogos de aminoácidos a partir de las 3 horas p.i. sólo disminuye un 20% la cantidad de proteasas presentes, el rendimiento de virus infeccioso se reduce prácticamente a cero y la enzima producida en estas condiciones es mas sensible al calentamiento que la de un control sin tratar.

Esto indica que la proteína se sintetizó de nuevo en momentos en que la replicación del virus es máxima y en la cual no hay proteínas celulares sintetizadas (274,279). El punto de máxima actividad proteolítica está asociado con el de un polipéptido viral -NCVPX- de, aproximadamente, 40.000 d de PM (279).

Para el virus de la encefalomiocarditis también fue demostrada una actividad proteolítica (291) la cual, posteriormente, fue asociada al polipéptido p22. Esta proteasa permitía el procesamiento del precursor estructural A1 (215-216,468). La proteína se origina por la autoescisión de sus precursores, C y D, lo cual explicaría la liberación de las primeras moléculas de la misma en momentos tempranos de la infección cuando la concentración de proteínas virales libres es, prácticamente, nula (358).

- b) Inhibidores que bloquean la síntesis del ARN o de las proteínas virales específicas, impiden el procesamiento proteolítico normal de los precursores virales (200,272,279).
- c) Mutantes de polio sensibles a la temperatura son deficientes en la producción de proteasas activas a temperaturas no permisivas. En estas condiciones, se induce la síntesis de una proteína viral alterada, la cual no se forma a la temperatura permisiva (272).
- d) La traducción del ARN viral en sistemas libres de células revelaron la presencia de una enzima de procesamiento con actividad proteolítica (357,364,439).

En relación al último de los estadios de escisión, varios trabajos aportan evidencias acerca de la existencia de una actividad proteolítica asociada con los polipéptidos estructurales del virus. Por ejemplo, para el virus de la polio fue sugerido que alguna de las tres proteínas estructurales presentes en la procápside pudiera tener actividad enzimática. Esta se expresaría cuando una molécula de ARN se asocia con dicha cubierta proteica (252,291).

Una hipótesis similar fue planteada para el virus de la encefalomiocarditis participando, además, la proteína capsídica en el proceso de escisión que genera el extremo amino terminal del precursor capsídico (291). También ha sido señalado que algunos de los pasos de escisión de precursores de alto PM de origen viral serían debidos a la actividad proteolítica de proteínas de la cápside, citándose como ejemplos el virus de la estomatitis vesicular felina (FeSV) (264) y el virus Sindbis (5). Tampoco puede descartarse la presencia de algún "factor" proteolítico asociado al virión como responsable de estos procesos (271,275,520).

Trabajos recientes señalan que el origen de esta actividad proteolítica sería exclusivamente viral y estaría asociada con el precursor de la replicasa del virus (357) y no mostraría actividad sensible a inhibidores tales como el TLCK o a los iones zinc (182, 212).

II.2.3.4.- Evidencias acerca de la poliproteína

La posesión de un único sitio de iniciación implica que, una vez comenzada la síntesis de proteínas virales hacia el lado 3' del fragmento de poliC, ésta continúa recorriendo completamente el genoma del virus aftoso hasta llegar al extremo 3' (418). Este mecanismo podría producir, inicialmente, un polipéptido cuyo tamaño abarcará la capacidad total de codificación del ARN viral y que fue denominado poliproteína (34,84,253).

La existencia de esta proteína gigante ha podido ser demostrada en varios picornavirus por medio de ciertas técnicas. Ya en 1968 se encontró en células HeLa infectadas con el virus de la polio, un polipéptido de alto PM (cerca de 200.000 d), el cual coincidía con la capacidad total del genoma viral y no se hallaba presente en células no infectadas (251).

Esta proteína sólo podía ser detectada en presencia de análogos de aminoácidos y no era un artefacto experimental puesto que no era escindida a polipéptidos mas pequeños aún cuando se removiera el exceso de aminoácidos (251,253,269). También era posible demostrar la presencia de esta poliproteína por medio de inhibidores de enzimas proteolíticos, tales como el DFP (253,464).

En el virus coxsackie B1 fue demostrada la existencia de la poliproteína en experimentos en los que no se usó análogos de aminoácidos (265). Se aislaba únicamente en etapas tempranas de la infección haciendo cortos pulsos de marca y procesando las células infectadas al final del mismo. No era un agregado de proteínas pequeñas ya que variando las condiciones de electroforesis, el pico correspondientes a esta proteína no desaparecía. En etapas más avanzadas del ciclo infeccioso no era detectable, quizás debido a un aumento en la velocidad de escisión.

Polisomas unidos a membranas purificadas a partir de células HeLa infectadas con el virus de la polio, producían "in vitro" una proteína con un PM aproximado de 200.000 d, la cual podría representar la traducción completa del genoma (402,495). Sin embargo, en extractos totales la poliproteína no era observada obteniéndose, en su lugar, fragmentos que se asemejaban en tamaño a los productos de escisión sintetizados "in vivo" (402). Por lo tanto, los extractos no purificados tienen una actividad proteolítica que escinde a la poliproteína a medida que es formada en los polirribosomas. Así se explicaría la imposibilidad de aislar la poliproteína en condiciones normales de células infectadas con picornavirus (excepto el virus Coxsackie B1).

Estudios exhaustivos sobre las características del precursor gigante de polio, aislado de células infectadas con el virus en presencia de análogos de aminoácidos (251,253), probaron que:

- 1) Resiste la reducción, alquilación y calentamiento, lo cual implicaría que no es un agregado de pequeños polipéptidos;
- 2) Los análogos de aminoácidos no modifican mayormente el espectro de polipéptidos normales de células HeLa no infectadas, lo cual descarta la posibilidad de ser una proteína artificial que sólo se produciría en presencia de análogos.

Experimentos realizados con mutantes ts de polio mostraban una acumulación de precursores de alto PM a temperaturas de crecimiento no permisivas (200). Al bajar la temperatura hasta un nivel permisivo se observó el procesamiento de estos precursores a polipéptidos de bajo PM. La naturaleza de estos productos no fue claramente establecida.

Cabe señalar que, a la temperatura no permisiva, se obtuvieron proteínas de diferentes PM (160 a 210.000 d) algunas de las cuales podrían representar el primer producto de escisión de la poliproteína (230.000 d) o bien, que existieran distintas poliproteínas debido al reconocimiento de mas de un sitio de iniciación o terminación (200).

Dado que en condiciones normales de infección ocurren escisiones proteolíticas sobre la poliproteína naciente, no ha sido posible aislarla en células infectadas con el virus aftoso, aún en presencia de inhibidores proteolíticos o análogos de aminoácidos (51, 151,416,490,492) ni tampoco en otros picornavirus (306) a excepción del virus coxsackie B1 (265).

II.2.3.5.- Precursores primarios del virus aftoso

Previamente a la iniciación de este tema, se verá cuál es la nomenclatura aplicada para designar a los polipéptidos del virus aftoso. Si bien aún no hay un consenso generalizado respecto del criterio a seguir, actualmente la mas usada es la que antepone a los polipéptidos estructurales el prefijo VP (proteína viral) numerándolos de 0 a 4 (ejemplo: VP0, VP1, VP2, ...) mientras que el resto de las proteínas no estructurales reciben el prefijo p (polipéptido) seguido del PM en miles de daltons (ejemplo: p110 proteína de 110.000 d de PM) (1).

Cabe señalar que los polipéptidos virales fueron denominados por distintos laboratorios con diferentes nomenclaturas. Por ejemplo, los polipéptidos no capsídicos del virus de la encefalomiocarditis se indican con letras mayúsculas mientras que los estructurales con letras griegas (ejemplos: ξ = VP0, α = VP1, ...) (85); los polipéptidos no capsídicos de polio se designan por números anteponiéndoles el prefijo NCVP (proteína viral no capsídica) y a los estructurales tal como se indicó en primer término (459). Además, el descubrimiento de nuevos polipéptidos llevó a usar nuevas letras y subíndices.

Los productos originados a partir de la escisión temprana de la po liproteína se denominan productos primarios (84,86). En principio, fueron reconocidos tres de estos precursores para el virus aftoso (51) como era el caso con la mayoría del resto de los Picornavirus (84-86,471) pero, posteriormente, fue confirmada la presencia de un cuarto producto primario (151,416,418).

El producto primario del virus aftoso precursor de las proteínas estructurales, p88, está codificado por una región del ARN cercana al extremo 5' del genoma (151,416). La proteína VP1 está codificada por una región comprendida entre 2500 a 3300 pares de bases nucleotídicas contadas a partir del extremo 5' del genoma y es, en sí mismo, el extremo carboxílico de p88 (Ver figura 1).

Un polipéptido de tamaño similar, p100, el cual lleva las proteínas necesarias para la replicación del virus (151,416) y, probablemente, parte de la actividad proteolítica de origen viral (438) es traducido a partir del extremo 3' del ARN. Hay evidencias, tan to para el virus aftoso como para los rinovirus, de formas alternativas de escisión derivadas de este extremo del ARN, sugiriendo otro precursor primario, p122 (414).

De la región media del genoma se origina un tercer producto prima rio, p52 (151,146), del cual sólo se conoce su función para el vi rus de la polio (279). El cuarto precursor primario citado, p20, ha sido localizado entre el extremo 5' del ARN y el precursor estructural (151,418) con función aún desconocida.

Mediante síntesis de proteínas "in vitro" ha sido posible obtener polipéptidos de alto PM, cuya movilidad electroforética en geles de poliacrilamida, coincidía con la de algunos precursores virales sintetizados "in vivo" pero que no eran posteriormente procesados a polipéptidos mas pequeños (269,306,326,402). El agregado de extractos de células infectadas a estos precursores obtenidos "in vi tro" permitía llevar a cabo alguna reacción de escisión sobre los mismos, con la consiguiente formación de polipéptidos de bajo PM (269).

El análisis electroforético de estos productos presentaba semejanzas con algunos de los polipéptidos capsídicos (269). En el virus aftoso, usando un lisado de células de reticulocito de conejo, fue posible detectar polipéptidos que "in vivo" son productos de escisión de grandes precursores pero no se encontró ninguno de los productos estructurales (418).

II.2.3.6.- La actividad proteolítica en células infectadas

Estudios realizados en este sentido ya habían demostrado un aumento de la actividad enzimática lisosomal durante la infección con el virus de la polio. Trabajos mas recientes en células HeLa infectadas con el mismo virus, evidenciaron dos tipos de actividades endoproteolíticas: una temprana, hasta aproximadamente 3 horas p.i. y otra tardía, después de las 3 horas p.i. (265,272).

La actividad proteolítica temprana sedimenta con los ribosomas celulares, tiene actividad tipo tripsina y estaría asociada a una de las 70 proteínas ribosomales (273).

La actividad proteolítica de las últimas etapas de la infección no se incrementa si las células son tratadas con cicloheximida (inhibidor de la síntesis proteica celular (119,507) o con guanidina (inhibidor de la multiplicación viral) (38,162). Esto indica que es necesaria tanto la síntesis de proteínas como el funcionamiento del genoma viral para la expresión de dicha actividad (272). Además, esta actividad no degrada las proteínas celulares remanentes durante la infección (o lo hacen en un porcentaje muy bajo) y se halla aún en presencia de actinomicina D (265). La especificidad de la actividad proteolítica tardía encontrada en células infectadas con poliovirus es hacia su sustrato homólogo y no actúa sobre otros virus relacionados (272).

Todas estas evidencias apoyan la suposición de enzimas de origen viral para esta proteolisis tardía.

II.2.3.7.- Origen de las proteasas en las infecciones virales

Estudiando la asociación entre un virus parásito y su huésped, con el objeto de buscar inhibidores de procesos específicos virales, es importante saber si las enzimas implicadas son específicas por el agente infectante o producidas por la célula huésped.

Aunque es aceptado que la mayoría de las nuevas enzimas encontradas en células infectadas están bajo el control genético del virus, no se excluye la posibilidad que las células huéspedes posean el potencial genético para fabricar tales enzimas, permaneciendo ese potencial inexpressado hasta después de la infección viral.

El principio de la economía genética y de los eventos tempranos en la infección viral, favorece la idea de enzimas especificadas por el huésped (409). Así, el tamaño de la región no capsídica es tá relativamente limitado (150 a 170×10^3 d), lo cual hace atractivo el argumento que el virus evolucionó para tener el máximo de ventajas sobre la célula huésped. Las proteasas celulares apoyaron una solución al problema de cómo, durante los estadios tempranos de la infección, la poliproteína traducida a partir del ARN mensajero infectante, podía ser procesada antes que se hubiera formado cualquier producto viral estable.

La importancia de las enzimas celulares en la multiplicación de los virus animales queda demostrada en el virus Sendai, un paramixovirus. El virus producido en células de embrión de pollo es infeccioso, hemolítico y capaz de causar fusión celular (242-243). Sin embargo, el virus crecido en células L de ratón, células HeLa humanas o en células de riñón bovino, carece de estas actividades (423,447). La base de la diferencia esta dada por una actividad proteolítica -tipo tripsina- presente en los embriones de pollo pero faltante -o no disponible- para el virus en las otras líneas celulares (242,423). La proteasa celular debe escindir una glicoproteína en los viriones para activarlos.

Dependiendo de la línea celular elegida para crecer ciertas cepas del virus influenza, se podía observar o no una actividad hemoaglutinante (HA) (292). La proteasa celular encargada de escindir una glicoproteína del virión cuya función es la aglutinación de hemáties, sería liberada de los lisosomas después de la infección.

Una interesante característica de los procesos de escisión que producen los polipéptidos capsídicos del virus Sindbis es que no actúan en forma regular. En células fibroblásticas de embriones de pollo de 7 días de edad, no se observa actividad proteolítica alguna, mientras que, si el virus es multiplicado en las mismas

células pero de 2-3 días de edad, la proteólisis ocurre rápidamente (447). El tratamiento de los cultivos con actinomicina D permite a las células de mayor edad escindir las proteínas virales. Se supone que la actinomicina D liberaría hidrolasas celulares de los lisosomas. Incluso, con un togavirus del grupo alfa, la velocidad de escisión de las proteínas virales difiere en función de la línea celular usada (335,447). El inhibidor de proteasas TPCK bloquea la escisión de los polipéptidos del virus Sinbdis en células de pollo (370) pero no en células HeLa (271).

Una consecuencia predecible por el uso de enzimas celulares para escindir los polipéptidos virales que el virus puede diferir dependiendo de la línea celular usada. Por ejemplo, un estudio serológico del virus de la polio crecido en células HeLa (humanas) o en células de riñón de mono, demostró diferencias en la seroneutralización de los virus producidos en cada línea celular (298).

No se conoce aún con certeza porqué las células huéspedes contienen proteasas ~~er~~ínicas capaces de escindir a las proteínas virales o si algunas de ellas son similares a las proteasas implicadas en el control de las células no infectadas (425).

Luego de los procesos de escisión que dan origen a los polipéptidos primarios de los picornavirus, otras reacciones proteolíticas producen los polipéptidos capsídicos y las proteínas estables no estructurales. El origen de estas enzimas aún no se halla totalmente aclarado. El hecho de que la IAA bloquee algunos de estos procesos de escisión (270), indicaría que una proteasa sulfidrílica es usada en estas reacciones. Se demostró que varias clases de células no infectadas son incapaces de llevar a cabo estos últimos procesos de escisión (161,269,290) y que las células infectadas tienen actividades proteolíticas adicionales (183), las cuales son capaces de procesar los precursores capsídicos de los picornavirus (168,265,269-270).

Estos resultados indican una acumulación de enzimas específicas virales durante la infección o una activación de proteasas celulares a medida que la infección continua. Una situación parecida existe en bacterias infectadas con ciertos bacteriófagos (22,213).

Un hecho que puede llevar a una mejor caracterización de las proteasas implicadas en la maduración es la presencia de enzimas con dicha actividad, íntimamente unida a los viriones de los picornavirus, mixovirus y rhabdovirus (241).

II.2.4.- Características inmunológicas

Se reconocen siete tipos inmunológicos del virus de la fiebre aftosa: los denominados clásicos O, A (Valleé y Carré) (484) y C (Waldmann) (498), SAT-1, SAT-2, SAT-3 (393) y un tipo el cual aparece en varios países europeos, designado como Asia (67,367,393). Los tipos clásicos son los que aparecen en Argentina, así como en el resto de América del Sur, Central y en Europa.

Además de su temprano descubrimiento como el primer patógeno animal filtrable (156), este virus fue también el primero en el cual se reconocieron diferencias antigénicas entre cepas (206). Los subtipos del virus aftoso -actualmente más de 65- fueron estudiados y clasificados en 1926 (498). Las comparaciones de las cepas virales normalmente se realizan con la ayuda de técnicas serológicas, inmunológicas o virológicas (66,130,142,304,310,482), principalmente la fijación del complemento (FC') (69). Actualmente, el empleo de la técnica de la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida ha permitido una mejor distinción entre los diferentes serotipos y subtipos del virus (194).

Los subtipos fueron definidos como cepas dentro de un mismo tipo, las cuales, debido a diferencias antigénicas, no dan reacción inmunológica cruzada completa. Usualmente, se identifican con subíndices numéricos, como por ejemplo: A_1 , A_2 , A_3 , ...

Se acepta que los criterios para las comparaciones serológicas de cepas del virus aftoso para la elaboración de vacunas son distintos de aquéllos requeridos para la taxonomía (411). Las relaciones serológicas entre pares de cepas del virus aftoso no es siempre simétrico y una cepa puede ser dominante sobre otras (411, 452). En este sentido, puede citarse que existe, aproximadamente, entre un 30 y un 60% de homología entre los diferentes serotipos del FMDV (148), mientras que el grado de homología entre los diferentes subtipos del mismo serotipo excede el 70% (149).

La diferencia inmunológica entre los tipos del virus aftoso es de tal magnitud que, animales convalecientes y perfectamente protegidos contra el tipo de virus causante de la enfermedad, no lo están para cualquiera de los otros tipos. El grado de inmunidad entre los distintos subtipos dentro de un mismo tipo varía tanto en intensidad como en duración, siendo mas prolongada para el subtipo homólogo que para los heterólogos (7).

II.2.5.- Propiedades antigénicas

La estructura ribonucleoproteica con un coeficiente de sedimentación en gradientes de densidad de 140S -el virión-, es aceptada como la principal responsable para la estimulación de anticuerpos neutralizantes en animales vacunados (73,510). Algunas cepas del virus aftoso producen una segunda estructura que carece de ARN y tiene un coeficiente de sedimentación de 75S (129,405,412), a menudo referida como procápside o partícula vacía. La partícula 75S tiene idénticas propiedades antigénicas que la 140S (405) y puede contribuir significativamente a la eficacia de vacunas contra el FMDV (154,412). Por ejemplo, las partículas 75 S del subtipo A Cruzeiro son mas estables que las partículas 140S del subtipo O-BFS (152).

El tratamiento del virus de la fiebre aftosa por la tripsina implica una reducción importante en el poder infeccioso, tanto en la capacidad de adsorción del virión a células susceptibles como a la inducción de anticuerpos neutralizantes (19,509,511), con algunas excepciones para determinadas cepas (23,42,403). Estos efectos son causados por la escisión de una de las proteínas de la cápside, VP1 (83,511). Resultados similares se obtienen usando otras enzimas proteolíticas, tal como la quimiotripsina (108,332). Estas observaciones condujeron a la siguiente conclusión: el sitio antigénico responsable de la producción de anticuerpos neutralizantes y el sitio de adsorción celular del virión están asociados a un polipéptido sensible a la tripsina. Esto fue confirmado posteriormente, demostrándose que, de los cuatro polipéptidos estructurales aislados y purificados, sólo VP1 era capaz de estimular la producción de anticuerpos neutralizantes (23,48,65,155,288-289,299).

En cultivos de células BHK-21 infectadas con el virus aftoso, han sido diferenciados cuatro antígenos virales: el virión o antígeno 140S, el 75S, el 12S y el antígeno asociado a la infección viral (VIA) (63,128,220,479). Los cuatro antígenos son inmunógenos, fijan complemento y precipitan en gel de agar en presencia de anticuerpos específicos (128,220). El VIA y los anticuerpos contra este antígeno tienen la particularidad de ser específicos para la fiebre aftosa pero dan reacciones cruzadas entre los diferentes tipos de virus (128,336). El antígeno VIA corresponde a la forma inactiva de la polimerasa viral (ARN replicasa) y se detecta en animales que han sufrido la enfermedad (126,128). En base a estudios serológicos, de mapeo de péptidos y enzimológicos (343,376,378), se ha indentificado al antígeno VIA como p56.

El componente 12S es un constituyente común en las preparaciones virales y puede ser producido a partir de partículas 140S por calentamiento o un tratamiento ácido suave (72). Es una subunidad pentamérica conteniendo iguales cantidades de las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 (493). Si bien estas partículas no estimulan niveles significativos de anticuerpos neutralizantes contra las partículas 140S (73,388), ambas contienen VP1. Estas diferencias en las actividades de la partícula 140S y la subunidad 12S sugiere que la configuración de VP1 en los dos casos es diferente. Mas aún, existen diferencias entre la subunidad 12S y el monómero VP1 aislado de partículas virales, ya que son requeridas grandes cantidades de VP1 para producir el mismo nivel de anticuerpos neutralizantes de la subunidad 12S (23,105-106).

II.3.- INHIBIDORES DE LA REPLICACION DEL VIRUS AFTOSO

II.3.1.- Inhibición del procesamiento proteolítico

El bloqueo del mecanismo a través del cual se forman las proteínas estables del virus aftoso puede efectuarse de dos maneras: modificando los precursores de alto PM, transformándolos en moléculas complejas que ya no son reconocidas por las enzimas proteolíticas intervinientes en el proceso o por inactivación del sitio catalítico y/o de la conformación tridimensional activa de dichas proteasas.

Entre las primeras técnicas aplicadas para la modificación del sustrato en diferentes grupos virales se cita la incorporación de análogos de aminoácidos (271). La adición de mezclas de varios de estos análogos ha permitido -a menudo- la acumulación de polipéptidos modificados en las células infectadas y la interpretación que, en ausencia de análogos, los grandes polipéptidos son precursores de las otras proteínas virales. Una dificultad inherente al uso de análogos para investigar el proceso de escisión es que las proteínas formadas en presencia de los mismos no son procesadas o lo son en forma parcial dando lugar a productos finales anormales.

Otros inhibidores que alteran el sustrato y que pueden ser usados para el estudio del procesamiento proteolítico son: la guanidina, la cual bloquea los procesos de escisión en la formación de las partículas infecciosas de algunos picornavirus (52,120,251), la rifampicina en el virus vaccinia (261), la pleomicina (233) y los iones zinc (87,277) también en los picornavirus.

La inhibición reversible de estas drogas produce mas evidencias acerca de la naturaleza proteolítica del procesamiento a que son sometidas las proteínas de estos virus. Los iones zinc, en particular, probablemente reaccionan no específicamente con residuos de cistidina e histidina, permitiendo la acumulación de grandes precursores virales, los cuales son escindidos para dar los productos finales apropiados una vez que han sido lavados de las células tratadas.

Otro mecanismo para inhibir el procesamiento de escisión proteolítica de los picornavirus puede hacerse por medio de los inhibidores químicos de proteasas. Seleccionados algunos de estos inhibidores irreversibles -por ejemplo, clorometil cetonas (269,428,436, 464), diisopropilfluorofosfato (DFP) (253) o iodoacetamida (IAA) (270)-, se los agrega a las células infectadas y se observa si se acumulan grandes proteínas virales.

Estos inhibidores han dado resultados positivos con varios virus no relacionados y, además, si bien los grandes polipéptidos acumulados en su presencia están estabilizados, pueden ser usados en ensayos "in vitro" para estudios de proteólisis ya que no se hallan alterados (269,271,370).

Hay algunas dificultades en la interpretación de los efectos producidos por estos inhibidores químicos sobre los procesos de escisión. Un gran problema es su falta de especificidad. Por ejemplo, el DFP puede inhibir enzimas con histidina o serina en el sitio activo y la iodoacetamida reacciona con cualquier grupo sulfhidriilo expuesto. Algunos inhibidores, los cuales reaccionan con proteasas del tipo de la serina "in vitro" (ejemplo: benzamidas, proflavinas), no bloquean la escisión de proteínas en células sensibles al TPCK (271).

II.3.1.1.- Análogos de aminoácidos

Se conocen varios análogos de aminoácidos, como por ejemplo: FPA (DL-p-fluorfenilalanina), canavanina (análogo de la prolina), etionina (análogo de la metionina). Son incorporados en las cadenas peptídicas reemplazando a los verdaderos aminoácidos. Una mezcla conteniendo estos compuestos añadidos a células infectadas por picornavirus permite la acumulación de polipéptidos de alto PM (118, 251,253,265,362,421).

Sin embargo, no en todos los picornavirus el uso de análogos de aminoácidos produce el mismo efecto, ya que, por ejemplo, en el virus aftoso no se observó ninguna proteína con PM mas alto que aquellas encontradas en células infectadas no tratadas con análogos (51) ni aún a elevadas concentraciones de los mismos (416).

El uso de análogos tiene la desventaja de que los precursores acumulados son modificados irreversiblemente y no pueden ser usados para estudiar los procesos de escisión "in vitro" o para comparar el hidrolizado triptico de estos precursores con sus productos no-modificados obtenidos "in vivo".

II.3.1.2.- Temperatura

Ha sido citado para mutantes de temperatura del virus de la polio (Lsc) o del virus Sindbis creciendo a la temperatura restrictiva una acumulación de precursores de alto PM (121,200,422). Si luego de un cierto tiempo p.i. el cultivo infectado es llevado a la temperatura permisiva, se observa la escisión de los precursores a los polipéptidos estructurales y funcionales normalmente encontrados si toda la infección se hubiera desarrollado a la temperatura permisiva (200). Productos de alto PM, algunos supuestamente correspondientes a la poliproteína viral, pueden ser obtenidos exponiendo células infectadas con el virus de la polio a temperaturas supraóptimas (34,201).

II.3.1.3.- Iones zinc

a) Importancia

El zinc es esencial para el crecimiento de muchas especies de todos los fila, ya que es imprescindible en importantes procesos metabólicos del desarrollo celular. Es un componente vital de numerosas macromoléculas a través de las cuales ejerce sus mayores efectos fisiológicos.

Una de tales macromoléculas es la DNA-dependiente ARN-polimerasa de Escherichia coli. La enzima purificada posee un sitio de unión específico para nucleósidos trifosfatos purínicos, con una constante de disociación de cerca de 0,15 mM (515-516). La interacción de los nucleósidos trifosfatos en este sitio ocurre en ausencia de iones metálicos divalentes y es bloqueada por la rifampicina (429). Este sitio ha sido propuesto como el responsable de la unión del nucleósido trifosfato 5' terminal implicado en la iniciación de la síntesis del ARN (450,516). La ausencia de un metal requerido para la unión en este sitio sugirió que la enzima contendría un ión metálico unido, el cual fue demostrado era el zinc (387,429).

Se ha señalado que interviene en la estabilización del ácido ribonucleico (197). En este sentido, puede agregarse que, el ARN aislado de una gran variedad de fuentes biológicas -desde simples microorganismos hasta mamíferos- contiene cantidades significativas de metales. Los metales de la primer serie de transición, entre los que se cuenta el zinc, están unidos tan firmemente al ARN que no pueden ser fácilmente removidos por agentes quelantes, los cuales son capaces de unirse a estos iones muy ávidamente (497).

Se ha demostrado que estos metales mantienen -en el ARN- la estructura helicoidal secundaria de la molécula a través de la formación de enlaces intramoleculares (197). Una unión metálica, que sirve como ligamento de residuos de nucleótidos entre giros adyacentes de la hélice, puede fijar o estabilizar la estructura secundaria de uniones de hidrógeno incluida dentro de un asa terciaria, efecto muy bien documentado en las proteínas (revisión bibliográfica en referencia 197).

La acción inhibidora de los iones zinc también ha sido informada en procesos tales como: replicación de virus a ADN (315,440,521), replicación de virus a ARN diferentes de los picornavirus (62), en la activación del plasminógeno en células de ratón transformadas (134), en la actividad de ribonucleasas (524), en el desarrollo de embriones de ratas de corta edad (470), en la inhibición del carcinosarcoma Walker 256 (146). También ha sido citado como parte integral de la placa basal de la estructura de la cola del bacteriófago T 4 D (281,525). Finalmente, en el mejor desarrollo de varias especies domésticas de animales usado como complemento en su dieta (517).

La presencia y la intercambiabilidad del zinc en los sitios de unión del ADN y la ADN polimerasa pueden permitir un nuevo camino para la investigación de la replicación del ADN y ser de gran valor en el diseño de agentes quimioterapéuticos para enfermedades malignas. De esta manera, un agente quelante o un isótopo radioactivo del zinc podría ser llevado al sitio de replicación del ADN o reparar e inhibir estos procesos.

b) Su acción en los picornavirus

En 1974 se informó acerca de la acción antiviral de los iones zinc en la replicación de los picornavirus (87,277). El agregado de la droga a cultivos de células infectadas, en cualquier momento del ciclo replicativo del virus, inmediatamente disminuía la producción de partículas infecciosas.

El estudio de las proteínas virus-específicas en el citoplasma de células infectadas mostraba una acumulación de precursores de alto PM. A medida que se incrementaba la concentración del ión, cada vez se acumulaban polipéptidos virales de mayor tamaño (87,277-278). Estos resultados indicaban una inhibición del procesamiento de escisión de los precursores a los polipéptidos estables, siendo el más afectado por los iones zinc, el que contenía a los polipéptidos estructurales (87,278,341).

El zinc actuaría impidiendo el plegamiento normal del precursor proteico a medida que éste se va formando en los polisomas. La alteración de la estructura terciaria del polipéptido naciente impide el reconocimiento de los sitios de escisión específicos a las proteasas intervinientes (278,341). La importancia de la conformación nativa del precursor para su normal procesamiento también fue señalada como una de las causas que inhibían la escisión de polipéptidos virales de alto PM "in vitro" (269).

El efecto provocado por concentraciones crecientes del ión, favoreciendo la acumulación de precursores proteicos virales cada vez de mayor tamaño, fue explicado de la siguiente manera: el principal punto de iniciación en la síntesis de proteínas en los picornavirus se hallaría cercano al extremo 5' del ARN viral, donde también se encuentran los genes que codifican a las proteínas estructurales. Al ser inhibida la escisión sobre la proteína naciente, no se separa el precursor de las proteínas capsídicas de los otros precursores primarios no estructurales, dando lugar a la aparición de los polipéptidos de alto PM.

Los resultados obtenidos durante este trabajo demostrarán que los iones zinc provocan un mecanismo de inhibición distinto en el virus aftoso respecto al señalado para otros picornavirus. En efecto, la relación existente entre la inhibición de partículas virales y la síntesis de ARN viral como así también la no inhibición de la síntesis de partículas vacías por bajas concentraciones de la droga, sugieren una acción inhibidora sobre la producción de nuevos precursores de la replicasa viral antes que en la estabilización del precursor primario de los polipéptidos estructurales.

II.3.1.4.- Inhibidores proteolíticos

a) Introducción

Los inhibidores sintéticos proteolíticos usados para esta investigación son hidrofóbicos, solubles en lípidos y con un PM menor de 400 d lo que los hace permeables a las células. Actúan como sustratos específicos para varias clases de enzimas proteolíticas, causando una inhibición irreversible por combinación con la enzima en un único sitio (434). Esto ha permitido la identificación de un residuo de aminoácido importante implicado en la acción enzimática. El Cuadro N° 1 muestra un gran número de inhibidores proteolíticos junto con las enzimas a las cuales afectan.

Se han utilizado dos clorometil-cetonas derivadas de aminoácidos: la L-1-tosilamida-2-feniletíl clorometil cetona (TPCK) y la N-alfa-p-tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK). Fueron diseñadas como marcadores de afinidad para proteasas de tipo serina y reaccionan irreversiblemente con residuos de histidina y serina en los sitios activos de dichas proteasas (433-435). La base de selectividad de estas clorometil cetonas está dada por su especificidad para la quimiotripsina (TPCK) y la tripsina (TLCK) (508).

El TLCK inactiva a la tripsina ya que incorpora -por alquilación- una cadena lateral de la lisina sobre el nitrógeno 3 del residuo de histidina 46 (369,433) de la secuencia primaria conocida (501) del sitio activo (433,436), mientras que el TPCK inactiva a la quimiotripsina por combinación equimolecular con el residuo de histidina 57 (428,437) de la secuencia primaria conocida (351) correspondiente al sitio activo de la enzima (427).

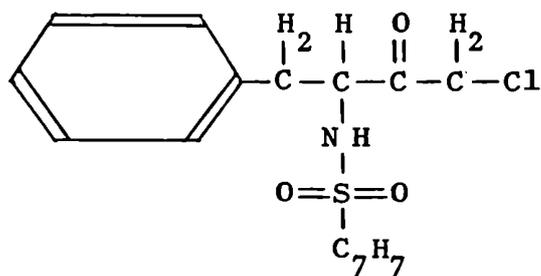
CUADRO N° 1.- INHIBIDORES PROTEOLITICOS

Inhibidor	Enzima proteol. afectada	Refer.	Reversibil.
TPCK (Tolilsulfonil-fenil alanil clorometil cetona)	Quimiotripsina sulfidrílicas	428,433	NO
L-ZPCK (L-carbobenziloxi-fenil-alanil clorometil cetona)	Quimiotripsina	437	NO
D-ZPCK (D-isómero del anterior)	Quimiotripsina	437	NO
TLCK (Tolilsulfonil-lisil clorometil cetona)	Tripsinas sulfidrílicas	433,436	NO
APB (p-amidina fenacil bromuro)	Tripsina	437	
GPB (p-guanidina-fenacil bromuro)	Tripsina	437	
DFP (diisopropil fluorfosfato)	Tripsina Quimiotripsina	255	SI
TAME (N-alfa-tosil-L-arginil metil éster)	Tripsina	245	SI
BTEE (M-benzoil-L-tirosina etil éster)	Quimiotripsina	245	SI
BAA (N-benzoil-L-arginina amida)	Tripsina	435	NO
IAA (iodoacetamida)	Sulfidrílicas	435	NO
CLCK	Inhibe donación grupos carboxilos de Leu o ácido glutámico	279	NO

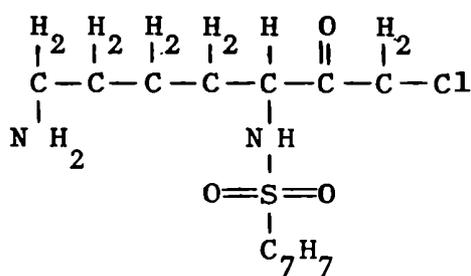
Otro inhibidor proteolítico irreversible usado para los ensayos realizados en este trabajo, ha sido la iodoacetamida (IAA), la cual actúa como un inhibidor general de grupos sulfidrilo. Muchos sitios activos de enzimas proteolíticas cuentan con un residuo de cisteína, pudiendo inhibirse la actividad de las mismas por medio de la reducción del grupo sulfidrilo de la cadena lateral del aminoácido. La IAA suele emplearse en estos casos, provocando la alquilación de los grupos sulfidrilo expuestos.

Fórmulas químicas del TPCK, TLCK y IAA

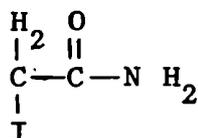
T P C K



T L C K



I A A



b) Efectos y mecanismo de acción

Si bien ha sido señalado que, en general, estos inhibidores alteran el metabolismo celular, aún no se conoce el mecanismo exacto por el cual lo afectan. Algunos autores suponen que estas drogas suprimen la síntesis de ARN y, consecuentemente, la síntesis de ADN (136). La posible vía por la cual se llevaría a cabo este bloqueo podría ser a través de la inhibición de proteasas celulares ubicadas en el núcleo.

Las proteasas están presentes en la cromatina nuclear, algunas de las cuales podrían mostrar afinidad para ciertas fracciones de proteínas nucleares no-histonas. Estas se consideran moduladoras de la actividad génica (6). Un posible papel regulatorio de la transcripción para las proteasas nucleares podría postularse por medio de la hidrólisis de proteínas supresoras de dicha actividad génica. Una hipótesis similar se ha postulado para las histonas (43), en función de la alta afinidad de ciertas proteasas nucleares por las fracciones de histonas (43,195,202) y el probable papel de éstas en la regulación de la expresión génica (348).

Sin embargo, otros autores han encontrado efectos directos sobre la síntesis proteica, tales como: inhibición de la habilidad estimulante del complejo de factores de elongación (113,256) e inhibición en la iniciación de la síntesis proteica (383).

Algunos inhibidores de proteasas causan que cultivos de células transformadas cesen de crecer, manteniéndose a las densidades de saturación características de las células no transformadas (425). Se ha especulado que un alto nivel de actividad tipo proteolítica unida a la membrana celular puede ser requerida para el crecimiento no restringido de las células transformadas y que los inhibidores proteolíticos pueden bloquear dicha actividad (425). Estas especulaciones se hallarían apoyadas por varios descubrimientos indicando que el tratamiento de células no transformadas con enzimas proteolíticas libera a las células de la inhibición por contacto (80,430), induciendo cambios en la superficie celular característicos de las células transformadas (179,250).

Estudiando el efecto del TLCK y otros inhibidores proteolíticos sobre la síntesis de la beta-galactosidasa en células de E. coli, se demostró que dichos compuestos inhibían reversiblemente la inducción de la enzima, como así también la síntesis de ARN y de proteína, sugiriéndose que el principal efecto provocado por las clorometil cetonas era el resultado de sus interacciones con la glutatona intracelular (401).

Otros efectos inhibitorios citados para los inhibidores proteolíticos son: en la formación de tumores en la piel del ratón (480), sobre la mitosis en linfocitos inducidos por la fitohemaglutinina (235), en el desarrollo de los huevos del erizo de mar (223), en el crecimiento y la morfología de células tumorales en cultivos (203), en la inducción enzimática e incorporación de aminoácidos en las proteínas de E. coli privada de fuentes de carbono o nitrógeno (386), en la maduración de polipéptidos celulares en células HeLa (472) y en el contenido heterocarionte de los núcleos de eritrocitos de pollo (137).

Las células en cultivo de tejidos contiene enzimas proteolíticas las cuales juegan un importante papel en la maduración de un gran número de virus a ARN y ADN, escindiendo específicamente las proteínas precursoras virales (36,261). De esta manera, extractos de células no infectadas son capaces de procesar las poliproteínas de los picornavirus en sus productos de escisión primarios (269). Este proceso de escisión puede ser inhibido por varias sustancias "in vivo" e "in vitro", tal como algunos inhibidores irreversibles de enzimas proteolíticas; por ejemplo, las clorometil cetonas (269,464) y la iodoacetamida (270).

Los inhibidores químicos de proteasas han sido ensayados en un gran número de grupos virales, demostrando la existencia de procesos de escisión en distintas etapas de la multiplicación viral. Así, por ejemplo, el uso del TLCK y del TPCK en células infectadas con SV40 (Simian virus 40), sugirió que el antígeno T encontrado en dichas células es derivado de especies mas grandes, a través de procesos de escisión (104).

Por otra parte, los efectos provocados por estos inhibidores depende, en alguna medida, de las condiciones metabólicas de las células infectadas (426). El TPCK no produce acumulación de precursores de alto PM del virus Sindbis en ensayos de síntesis de proteínas "in vitro". Sin embargo, el mismo inhibidor bloquea el procesamiento de las proteínas del virus cuando se lo prueba "in vivo" (370).

c) Ventajas y desventajas de los inhibidores de proteasas

La acción de estos inhibidores en células infectadas con picornavirus ha aportado nuevas evidencias en favor del modelo de procesamiento proteolítico de estos virus. En este sentido, podemos señalar la obtención de precursores de alto PM no procesados, cuyos PM sumados se acercan al estimado para la existencia de la poliproteína (269,306) y el probable origen de las enzimas proteolíticas involucradas en las distintas etapas del proceso (269,279).

Otras ventajas que se obtienen con el uso de estos inhibidores para el estudio de la multiplicación viral de los picornavirus, son el buen resultado producido con muchos virus no relacionados (271, 370) y la estabilización del sustrato que no se altera y puede ser usado para ensayos "in vitro" (269,271).

Entre las principales desventajas podemos citar las siguientes:

- 1.- Ciertas concentraciones de estas drogas pueden inhibir la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos en algunas líneas celulares huéspedes de los picornavirus (157,269,435,464). Aunque las clorometil cetonas son específicas en su habilidad para inhibir actividades proteolíticas, también son fuertes agentes alquilantes especialmente reactivos con ciertos grupos sulfidrilo (401,464), capaces de alquilar constituyentes celulares o virales no específicamente.

Es probable que algunos de sus efectos sobre otras actividades celulares sea una consecuencia de la inhibición ejercida por dichos compuestos sobre la síntesis de proteínas o de los ácidos nucleicos y no tengan relación alguna con las enzimas proteolíticas. No es improbable esta hipótesis ya que, drogas tales como la cicbheximida y el bisbenzilimidazol, si bien no afectan el procesamiento, bloquean drásticamente la síntesis de proteínas y de ARN (271,462).

Sin embargo, cierta especificidad estructural fue observada, ya que, unos inhibidores son mas efectivos que otros dependiendo de la línea celular usada (269,464). Así, por ejemplo, experimentos llevados a cabo con una cepa atenuada de poliovirus mostraron que las proteínas virales producidas en células

HeLa eran escindidas, en parte, por una actividad tipo tripsina (inhibida por TLCK), mientras que, la misma cepa viral propagada en células de riñón de mono, no mostraba inhibición alguna en el procesamiento de las proteínas virales en presencia de la misma concentración de inhibidor (269). Un inhibidor de actividad proteolítica tipo quimiotripsina (TPCK) era mas efectivo en esta última línea celular.

2.- Es posible que algunas de las grandes proteínas producidas en los cultivos de células infectadas en presencia de estos inhibidores, sean productos de escisión anormales, los cuales se producen cuando el procesamiento secuencial de las proteínas es alterado (464).

3.- Ha sido informada una reducción en la incorporación de aminoácidos y una inhibición preferencial en la marcación de péptidos de bajo PM siguientes al tratamiento de células infectadas o no con virus en presencia de TPCK (370,464,471-472). Puesto que este inhibidor no tendría efecto sobre la síntesis de proteínas "in vitro" en extractos libres de células de mamíferos (471), se sugirió que el incremento en la marcación de péptidos ~~de~~ alto PM, después de la adición de TPCK, era debida a una inhibición del procesamiento post-traducción y no debida a la inhibición en la iniciación de la cadena peptídica (471-472).

Otros datos sugieren, en cambio, que el TPCK inhibe la iniciación de la cadena peptídica "in vivo" y podría, por lo tanto, inhibir preferencialmente la síntesis de péptidos de pequeño PM muy tempranamente después de ser agregado al medio de incubación. Por lo tanto, la marcación preferencial aparente de péptidos de alto PM en células tratadas con TPCK no puede ser tomada como evidencia inequívoca para la existencia de un mecanismo de escisión post-traducción.

4.- Con algunas cepas virales no fue posible obtener ningún efecto apreciable con el uso de estos inhibidores. Así, por ejemplo, ni el TPCK ni el TLCK fueron efectivos en la inhibición del virus de la encefalomiocarditis en células ascíticas tumorales (157) o en células BHK-21 infectadas con el virus aftoso (51).

III.- MATERIALES Y METODOS

III.1.- LINEA CELULAR Y CEPA DE VIRUS

Células BHK-21, clon 13 (453,311), obtenidas del Centro Panamericano de Zoonosis, Buenos Aires, Argentina, fueron propagadas en monocapas usando medio Eagle mínimo (MEM) suplementado con 10% de suero bovino o en cultivos en suspensión con medio Eagle modificado (101). Medio Eagle mínimo (Leu^-) con 20mM HEPES pH 7,4 fue usado en aquellos experimentos en los cuales la leucina- ^3H reemplazaba al aminoácido no marcado en el medio de incubación. MEM suplementado con 20mM de HEPES pH 7,4 fue usado para el resto de los experimentos en los cuales se usó como precursor radioactivo la uridina- ^{14}C o uridina- ^3H .

El subtipo A₂₄ Cruzeiro del virus de la fiebre aftosa fue usado en estos experimentos. El virus fue clonado en cultivos de células BHK-21 en monocapa (339) y replicado cerca de 40 veces en las mismas células. Los experimentos llevados a cabo en esta investigación fueron realizados infectando -a una alta multiplicidad- cultivos de células BHK-21, clon 13, crecidas en suspensión (103), a una temperatura de 37°C (309,380). Bajo condiciones normales de infección, esta cepa viral sintetiza una considerable cantidad de partículas vacías o procápsides.

Los stocks virales fueron cosechados en monocapas de células BHK-21, clon 13, crecidas en frascos rotantes (10^8 células/frasco) y guardados a -70°C o en ampollas en nitrógeno líquido (-176°C) hasta ser usados.

III.2.- REACTIVOS

Todas las concentraciones de los inhibidores usadas en este trabajo son referidas a las cantidades de los mismos añadidas a la suspensión celular. La concentración intracelular real es desconocida debido a la falta de información acerca de la solubilidad de los inhibidores en el medio y el grado de absorción de los mismos por las células (87).

Cloruro de zinc ($ZnCl_2$), grado analítico, fue obtenido de Fisher Scientific Co.. Una solución stock concentrada de 20mM disuelta en agua tridestilada, fue usada a través de todos los experimentos. TLCK (N-alfa-p-tosil-L-lisina clorometil cetona ClH), TPCK (L-1-tosilamida-2-feniletíl clorometil cetona), IAA (iodoacetamida), actinomicina D (Grado III), ácido N-2-hidroxietyl piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), cicloheximida, fueron obtenidas de Sigma Chemical Co..

Los radioisótopos usados en estos experimentos han sido obtenidos de New England Nuclear: 3H -Leucine (NET-460, actividad específica 110,0 mCi/mmol), ^{14}C -Uridine (NEC-167, actividad específica 53,2 mCi/mmol) y 3H -Uridine (NET-156, actividad específica 20-30 Ci/mmol).

III.3.- PROCEDIMIENTOS DE INFECCION Y MARCACION

Células BHK-21, Clon 13, creciendo en suspensión, fueron lavadas y resuspendidas en MEM a una concentración de 10^7 células/ml. Se infectaron a una multiplicidad de 50 y después de un período de adsorción de 45 min a $37^\circ C$ fueron diluídas con un volumen de MEM conteniendo 10 ug/ml de actinomicina D y buffer HEPES 40mM pH 7,4 continuando la incubación a $37^\circ C$.

A los tiempos indicados para cada experimento, las células infectadas fueron marcadas con uridina- ^{14}C , a una concentración final de 0,5 uCi/ml o leucina- 3H 10 uCi/ml (concentración final) e incubadas hasta observar efecto citopático total (aproximadamente 270-300 min p.i.). En los experimentos en los cuales se usó uridina- 3H la concentración final fue de 1 uCi/ml.

Las condiciones específicas de cada experimento y las concentraciones añadidas durante los mismos, se indican en las leyendas de las respectivas figuras.

III.4.- PROCESAMIENTO DE LAS CELULAS INFECTADAS Y DE LOS SOBRENADANTES

Al final del tiempo de incubación, células infectadas y no infectadas (controles), fueron centrifugadas a 600 rpm durante 5 min, en frío, y los sobrenadantes guardados a 0°C hasta su procesamiento posterior. Las células fueron resuspendidas a una concentración de 10^7 células/ml en buffer de lisado (0,05 M Tris-HCl pH 7,4, 0,05 M KCl, 0,001 M $MgCl_2$, 0,01% Tritón X-100) y mantenidas por 3-5 min en hielo. Los núcleos fueron separados del extracto citoplasmático por centrifugación a 2000 rpm durante 3 min y la isotonicidad fue restaurada por la adición de 2M NaCl.

Los sobrenadantes celulares y los extractos citoplasmáticos fueron mezclados, tratados con EDTA pH 7,3 (concentración final 1mM) y clarificados por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C en una ultracentrífuga Beckman L50. Viriones y partículas vacías del virus aftoso no fueron afectados por este tratamiento. Resultados similares fueron obtenidos al reemplazar el detergente de la solución de lisis por 0,5% de Nonidet P-40.

III.5.- ANALISIS DE VIRUS Y PROCAPSIDES EN GRADIENTES DE SACAROSA Y MEDICION DE LA RADIOACTIVIDAD ACIDO PRECIPITABLE

Los clarificados de los sobrenadantes de las células infectadas y de los extractos citoplasmáticos, procesados según las condiciones ya mencionadas, fueron colocados sobre gradientes de sacarosa 10-30% (p/v) preparados por medio de un aparato de dos cámaras conectadas entre sí, una de las cuales contiene una solución concentrada de sacarosa (30% en solución NET: 0,05 M Tris-ClH pH 7,4, 0,12 M NaCl, 0,001 M EDTA) la cual era continuamente diluída con una solución menos concentrada de la misma (10% en el mismo buffer). Los gradientes fueron formados en tubos de nitrocelulosa y centrifugados a 3°C durante 4,2 horas a 27.000 rpm en un rotor Beckman SW 27. El pico de absorbancia correspondiente a la partícula viral (140S) y a las procápsides (75S) fue seguido por medio

de un registro continuo de la absorbancia a 260 nm en un espectro fotómetro Gilford equipado con una celda de flujo continuo siguiendo la técnica ya descrita (153).

Se determinó la radioactividad ácido precipitable en cada fracción del gradiente, añadiendo a cada una de las mismas un volumen de ácido tricloroacético (TCA) 20% frío y filtrando a través de membranas Millipore de nitrocelulosa (0,45 micrones). Posteriormente, los filtros se dejaron en presencia de hidróxido de amonio por 15 min. La radioactividad presente en las membranas fue medida colocando cada filtro en viales de vidrio de borosilicato conteniendo 7ml de líquido centellador basado en tolueno-metil cellosolve (Hidrofluor) y determinando las cuentas por min (cpm) precipitadas en un contador de centelleo líquido Beckman LS 3150T.

En algunos experimentos, virus purificados (140S) y subunidades ribosomales (30 y 50S) derivadas del tratamiento con EDTA de los extractos citoplasmáticos de células infectadas, fueron registrados a 260 nm y usados como marcadores de sedimentación internos.

III.6.- MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA REPLICASA VIRAL "in vivo" EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE INHIBIDORES

Cultivos de células BHK-21, clon 13, creciendo en suspensión, fueron infectadas en las condiciones ya mencionadas. A distintos tiempos post-infección, se toman alícuotas de la suspensión celular, procesándose las mismas del siguiente modo: de cada tiempo se extraen dos alícuotas iguales, una de las cuales recibirá una concentración determinada del inhibidor mientras que la otra servirá como control. Los tiempos usados para la toma de las alícuotas, así como el tipo y concentración de inhibidor, se indican en las leyendas de las figuras respectivas.

Tanto de la muestra control (sin inhibidor) como de aquella conteniendo la droga en estudio de cada uno de los intervalos de tiempo p.i. elegidos, se extraen, a su vez, alícuotas mas pequeñas a intervalos de 10 min. Cada una de estas alícuotas permanece durante 8 min en presencia de 1 uCi/ml de uridina-¹⁴C o uridina-³H.

Al cabo de este período, se detiene la reacción por el agregado de un volumen de TCA frío. La alícuota es entonces filtrada a través de membranas de nitrocelulosa (Millipore tamaño 0,45 micrones). Los filtros fueron secados a 60°C durante 30 min y puestos en viales de vidrio de borosilicato conteniendo 5 ml de líquido centellador basado en tolueno (liquid fluor). Las cuentas por min presentes en cada vial fueron leídas en un contador de centelleo líquido Beckman LS 3150 T.

III.7.- EXTRACCION DE LAS PROTEINAS INTRACELULARES DEL VIRUS AFTOSO

Para la obtención de las proteínas intracelulares del virus aftoso, se usaron 3×10^7 células BHK-21, clon 13, crecidas en suspensión e infectadas en las condiciones ya descritas. A los 180 min p.i., se añade al medio de cultivo 20 uCi/ml de leucina-³H, prosiguiéndose la incubación hasta los 240 min p.i.. Al final de este período, las células fueron centrifugadas a 600 rpm por 3 min y el pellet obtenido se resuspende en una solución solubilizadora para electroforesis (0,375 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol), calentándose a 100°C durante 5 min.

Una alícuota de esta solución -equivalente a 4×10^5 células- es sembrada en geles de poliacrilamida, llevándose a cabo la corrida electroforética y el procesamiento de revelado del gel para la individualización de las proteínas, según se describe mas adelante. Para la identificación de cada pico viral se adoptó la nomenclatura descrita en la sección II.2.3.5.-

Este mismo procedimiento fue usado para la separación de las proteínas intracelulares del virus aftoso en presencia de inhibidores, con la única diferencia que el agregado de la droga en estudio se efectúa 5 min antes del añadido del precursor radioactivo (o sea, 175 min p.i.). La incubación continúa hasta los 240 min p.i., procesándose las muestras tal como se señaló mas arriba. Las concentraciones y tipo de inhibidor usado se indican en las leyendas de las respectivas figuras.

III.8.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PLACAS

En este trabajo de tesis se han usado geles discontinuos de poliacrilamida 10%, según el procedimiento -modificado- seguido por Laemmli (285). El gel separador fue de acrilamida 5% polimerizada en: 0,125 M Tris-HCl pH 6,8 y 0,1% SDS. El largo -aproximado- fue de 2 cm. El gel resolutivo de acrilamida 10% fue polimerizado en: 0,375 M Tris-HCl pH 8,8 y 0,1% SDS con una longitud de 12,5 cm. La solución usada para la corrida electroforética estaba compuesta por: 0,025 M Tris-HCl, glicina 0,025 M y 1% SDS a pH 8,3.

Para cada corrida, los pellets de células procedentes de cada experimento son tratados a 100°C por 5 min en una solución solubilizante conteniendo 2% de SDS, 0,6 M Tris-HCl pH 6,8, 10% de glicerol, 5% de mercaptoetanol y 0,001% de azul de bromofenol (Sigma Chemical Co.).

La corrida electroforética se lleva a cabo a corriente constante (20 mA) durante 8 horas a temperatura ambiente. Los geles de poliacrilamida fueron lavados después de la electroforesis con una solución de TCA e isopropanol -10 y 25%, respectivamente- toda la noche con agitación suave. Este tratamiento remueve todas las cuentas ácido-solubles sin afectar a los polipépticos TCA-precipitados en el gel (472). A continuación, los geles son teñidos usando una solución conteniendo 0,05% de azul brillante de Coomassie (Sigma Chemical Co.), 7% de ácido acético glacial y 25% de isopropanol (estos últimos de Carlo Erba, grado analítico). Después de ser teñidos durante 1 hora a temperatura ambiente, fueron desteñidos usando una solución compuesta por 5% de ácido acético glacial y 10% de isopropanol con agitación suave y cambios de la solución por otra nueva cada 2-3 horas hasta que las bandas de proteínas teñidas se visualizaron claramente.

Al final de este proceso de lavado, los geles son procesados de acuerdo al método descrito por Korant (276) el cual, brevemente, consiste en: cada calle del gel donde se ha corrido una muestra es, cuidadosamente, separada del resto, obteniéndose así una tira de gel de aproximadamente 14,5 cm de largo y 1 cm de ancho. Cada una de éstas es cortada en segmentos de 1mm de ancho, utilizando

para ello un aparato cortador de geles consistente en un conjunto de hojas de afeitar separadas 1mm entre sí. Cada segmento de gel es colocado en un vial de vidrio de borosilicato conteniendo agua oxigenada (20-30 volúmenes) durante 18 horas a 60°C. Al cabo de este tiempo, a cada vial se le añaden 7 ml de líquido centellador en base tolueno, compuesto de: 33% Tritón X-100, 0,825% de 2,5-difeniloxasol (PPO) y 0,025% de 1,4-bis(2-(5-feniloxasolil)) benceno (POPOP) (Mallinckrodt). Las cuentas por min presentes en cada vial fueron registradas en un contador de centello líquido marca Beckman LS 3150 T.

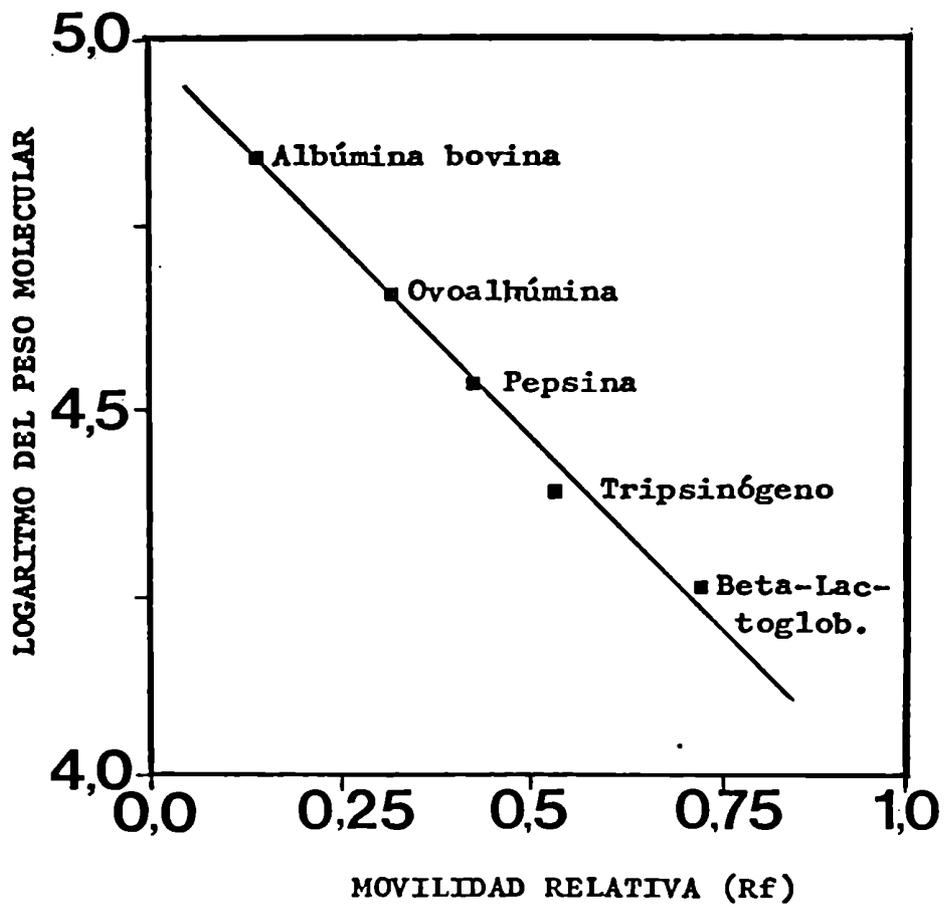
III.9.- CURVA DE CALIBRACION

La caracterización de las proteínas intracelulares sintetizadas en condiciones normales por el virus aftoso, se efectuó determinando el PM de las mismas en base a su movilidad relativa (Rf) en geles de poliacrilamida 10% en SDS, comparando con el Rf de otras proteínas (marcadoras) de PM conocido. Una vez obtenidos los valores de Rf de las proteínas marcadoras, se traza una curva de calibración (ver gráfico a continuación), en la cual la ordenada al origen representa el logaritmo del PM y la abcisa los valores de movilidad relativa (113). Para la determinación del PM de proteínas en geles de poliacrilamida en SDS hay que tener en cuenta que la movilidad de cada polipéptido es inversamente proporcional al logaritmo del PM (240).

Para la determinación de la curva de calibración, las proteínas marcadoras se visualizaron por el método descrito por Laemmli (285). Como marcadores electroforéticos de PM conocido se usaron las siguientes proteínas: albúmina de plasma bovino (PM 66.000 d), albúmina de huevo (PM 45.000 d), pepsina (PM 34.700 d), tripsinógeno (PM 18.400 d) y beta-lactoglobulina (PM 14.400 d) todas obtenidas de Sigma Chemical Co.

Las proteínas fueron disueltas hasta una concentración de 1 mg/ml con la solución solubilizadora descrita en III.6.- a la cual se le añadió un colorante -azul de bromofenol- hasta una concentración de 0,001%. Previo a la siembra de cada una de estas proteínas en el gel, se calentaron a 100°C durante 5-10 min.

CURVA DE CALIBRACION



La corrida electroforética fue llevada a cabo en un gel de poliacrilamida 10% con un gel separador de 5% de acrilamida, en las mismas condiciones descritas en la sección III.8. La individualización de las proteínas en el gel se realizó de acuerdo al procedimiento descrito previamente. Para el cálculo de la movilidad relativa (R_f) de cada proteína se divide la distancia migrada por la proteína en cuestión desde la zona de siembra hasta el centro de la banda proteica (d_x) por la distancia de migración del azul de bromofenol (d_i). Una vez obtenidos los valores de R_f , éstos se representan en una figura en la cual la ordenada representa el logaritmo del PM y la abscisa los valores de R_f (143).

IV.- RESULTADOS

IV.1.- IONES ZINC

IV.1.1.- Efecto sobre la síntesis de macromoléculas celulares y virales

Los iones zinc pueden inhibir la síntesis de ADN (443) y de ARN (236) "in vitro" y ser tóxicos para diferentes sistemas celulares, dependiendo de la concentración y de la línea celular usada (62, 230, 278). Por lo tanto, se probó el efecto de diferentes concentraciones del inhibidor sobre la síntesis de proteínas y de ácido nucleicos en cultivos en suspensión de células BHK-21, clon 13, tratadas con actinomicina D, infectadas o no con el subtipo A₂₄ Cruzeiro del virus aftoso. La actinomicina D impide la síntesis de ARN-dependiente de ADN (390) por intercalación en las secuencias dG-dC del templado de ADN (232), sin afectar la actividad sintetizadora de ARN inducida por la infección con picornavirus (391) y, en particular, con el virus aftoso (52, 76-77). Estas observaciones posibilitaron tratar los cultivos infectados con el antibiótico para suprimir la actividad celular del huésped y medir, específicamente, la incorporación de precursores radioactivos en el ARN viral.

Los resultados obtenidos (Figura 2) muestran que, concentraciones de zinc por debajo de 0,2 mM no inhiben la incorporación de uridina-¹⁴C o de leucina-³H en células no infectadas. Un pequeño incremento, en el orden de un 10 a un 20% en la incorporación de ambos precursores radioactivos, fue observada durante el ensayo. Posiblemente, sea debido a la activación por el zinc de diferentes enzimas celulares (445).

Estas mismas concentraciones del inhibidor fueron probadas en células infectadas por el virus, midiéndose la incorporación de ambos precursores radioactivos al cabo de 270 min p.i. (Figura 2). Puede observarse una inhibición tanto de la síntesis de ácidos nucleicos como de las proteínas virales con el aumento de las concentraciones de zinc. Sin embargo, comparando los porcentajes de

FIGURA N° 2. - EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE IONES ZINC
SOBRE LA SINTESIS DE ACIDOS NUCLEICOS Y PROTEINAS
EN CELULAS BHK-21, CLON 13.

Células BHK-21 infectadas con el subtipo A₂₄ Cruzeiro del virus aftoso (moi = 50) y tratadas con actinomicina D (5 ug/ml), fueron crecidas en cultivos en suspensión (III.3.-). A los 60 min muestras por duplicado recibieron diferentes concentraciones de cloruro de zinc y se incubaron por otros 30 min adicionales. Luego de este tiempo, cada muestra fue marcada con leucina-³H o uridina-¹⁴C. A los 270 min p.i., 10⁶ células de cada muestra se precipitaron con TCA y se determinó la radioactividad TCA insoluble tal como se describió en la sección III.5.-.

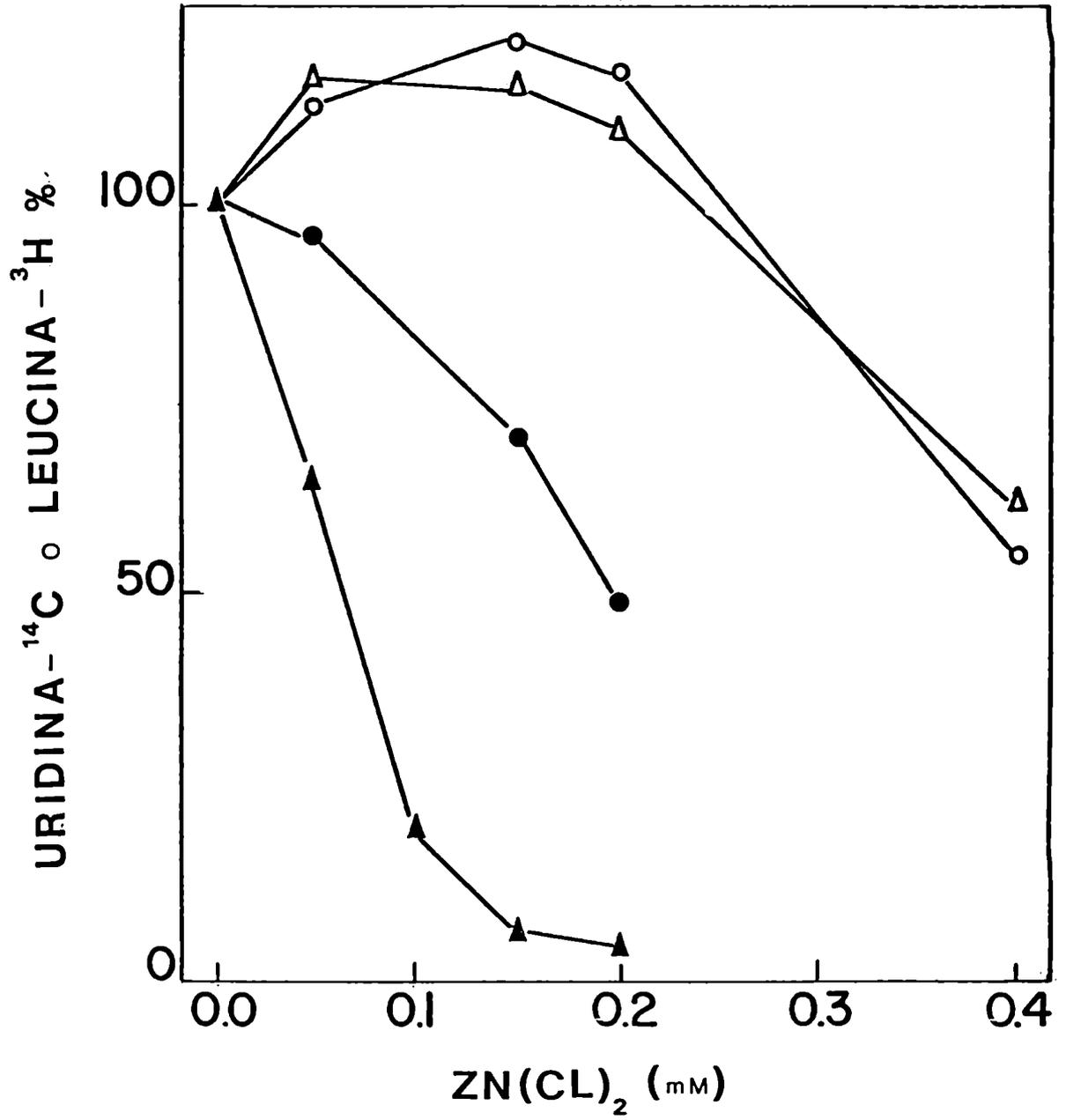
Los resultados son expresados como porcentajes respecto de un control (células no tratadas).

Las células no infectadas en ausencia de actinomicina D fueron tratadas bajo las mismas condiciones que las células infectadas.

- (o) porcentaje de incorporación de leucina-³H por células no infectadas.
- (Δ) porcentaje de incorporación de uridina-¹⁴C por células no infectadas.
- (●) porcentaje de incorporación de leucina-³H por células infectadas.
- (▲) porcentaje de incorporación de uridina-¹⁴C por células infectadas.

El grado de inhibición producido por los iones zinc sobre la replicación del virus aftoso en las condiciones de experimentación de este trabajo fueron altamente reproducibles. Sin embargo, la naturaleza de la forma activa del zinc no está clara. Probablemente, gran parte del ión añadido al medio de cultivo forma complejos con aminoácidos, fosfatos, proteínas y otros ligandos. En este sentido, se ha señalado que el agregado de suero afecta tanto la solubilidad como la actividad de los iones zinc (278).

FIGURA N° 2



inhibición, vemos un marcado efecto inhibitorio sobre la síntesis del ácido ribonucleico viral; con 0,15 mM de cloruro de zinc obtenemos un 90% de inhibición en la síntesis del ARN viral y solamente un 30% de inhibición en la síntesis de proteínas virales.

Esta diferencia aparente en el efecto de los iones zinc podría ser explicada considerando que, en presencia de actinomicina D, sólo el ARN viral era sintetizado mientras que la síntesis de proteínas celulares específicas, no afectada mayormente por los iones zinc, sólo estaba parcialmente inhibida en el momento del agregado de la leucina-³H. A diferencia de otros picornavirus (122,459), ciertas cepas del virus aftoso no inhiben rápidamente la síntesis de proteínas celulares y la síntesis de proteínas inducidas parece ser aproximadamente igual a la de células no infectadas (51,53).

En relación a las concentraciones no tóxicas de los iones zinc, varias líneas de evidencia habían sugerido que el efecto de los mismos sobre diferentes tipos de células dependía, notablemente, del tiempo de exposición al inhibidor. Por ejemplo, largos períodos de incubación con bajas concentraciones del metal (0,1 mM) llevan a la destrucción de la monocapa celular (62), mientras que, la misma concentración en otro sistema celular no causa efecto inhibitorio alguno (277). Para las experiencias llevadas a cabo en este trabajo de investigación, sólo se han tenido en cuenta períodos de exposición a la droga no mayores de 6 horas, los cuales no han mostrado ningún daño evidente al cultivo de células BHK-21, clon 13, en suspensión, medido en función de la incorporación de precursores radioactivos necesarios para la síntesis de proteínas o de ácidos nucleicos celulares (Figura 2).

IV.1.2.- Inhibición diferencial de virus y procápsides

Con el objeto de determinar el efecto que podrían tener los iones zinc sobre la síntesis de ARN y/o sobre la morfogénesis viral, células BHK-21 infectadas en las condiciones descriptas previamente, fueron tratadas a los 60 min p.i. con diferentes concentraciones de zinc y 30 min mas tarde se añadió leucina-³H al medio de incu-

bación. Cuando se observó efecto citopático total, los sobrenadantes y los extractos citoplasmáticos fueron procesados y analizados por centrifugación en gradientes de sacarosa, según se describió en Materiales y Métodos.

Por trabajos previos se conoce que la partícula infecciosa del virus aftoso sedimenta en centrifugación zonal en gradientes de densidad a 140S (o 146S, dependiendo del laboratorio) (16,20,64,173) mientras que la procápside lo hace a 70S (o 75S) (129,405). Los perfiles que se indican en la figura 3 muestran dos picos principales de sedimentación a 140S y 70S, los cuales fueron identificados por microscopía electrónica como virus y procápsides, respectivamente. Puesto que no fue observada la presencia de uridina-¹⁴C en el pico de 70S (Figura 5), se descartó la posibilidad de contaminación con procápsides artificiales, las cuales tienen el mismo coeficiente de sedimentación que las naturales (405).

Los resultados obtenidos muestran que, en un control que no ha recibido zinc (Figura 3 A) se obtienen dos picos principales, uno de 140S (virus) y otro de 70S (procápsides). A medida que se agregan concentraciones crecientes de cloruro de zinc (Figura 3, B y C) el pico de virus disminuye pero el de procápsides permanece constante. A concentraciones de $ZnCl_2$ de 0,15 mM (Figura 3 D) el efecto inhibitorio sobre la síntesis de ambos tipos de macromoléculas virales es total.

En la figura 4 se han graficado los resultados obtenidos por integración de las áreas bajo los picos de 140S y 70S de los perfiles de sedimentación de la figura 3. El punto inicial en ausencia de $ZnCl_2$ indica la cantidad de radioactividad asociada a virus y procápsides (Figura 3 A). A una concentración del inhibidor igual o menor de 0,01 mM no se observó efecto alguno en la síntesis de estas macromoléculas virales, mientras que hubo una inhibición de, aproximadamente, el 90% en ambas cuando se usaron concentraciones de 0,15 mM de iones zinc. Sin embargo, concentraciones de la droga entre 0,01 y 0,05 mM indujeron una inhibición del 60% sobre las partículas virales, sin afectar la producción de procápsides.

FIGURA N° 3.- PERFILES DE LOS GRADIENTES DE SEDIMENTACION EN SACAROSA DE VIRUS Y PARTICULAS VACIAS SINTETIZADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE IONES ZINC.

4×10^7 células BHK-21 fueron infectadas a una alta multiplicidad tal como se describió en Materiales y Métodos (III.3.-). Después del período de adsorción, la suspensión celular fue diluída tres veces con MEM-Leu⁻ conteniendo 5 ug/ml de actinomicina D. A los 60 min p.i. las células infectadas fueron divididas en cuatro muestras de 2 ml cada una, tres de las cuales recibieron diferentes concentraciones de cloruro de zinc, quedando la restante como control. Después de 30 min de incubación, cada muestra recibió Leucina-³H.

A los 270 min p.i. iguales porciones de sobrenadantes y extractos citoplasmáticos fueron procesados de cada muestra, tal como se describió en la sección III.4, analizándose en gradientes lineales de sacarosa 10-30% en solución NET pH 7,4 según se indicó en Materiales y Métodos (III.5). La radioactividad ácido insoluble fue medida en cada fracción tal como se señaló en III.5.-.

Las flechas indican las subunidades ribosomales 30S y 50S usadas como marcadores internos.

La zona de los picos virales comprendidas entre las barras fue tomada para representar en la figura 4 la radioactividad acumulada en virus y partículas vacías.

A) Control; B) $ZnCl_2$ 0,01 mM; C) $ZnCl_2$ 0,05 mM; D) $ZnCl_2$ 0,15 mM.

FIGURA N° 3

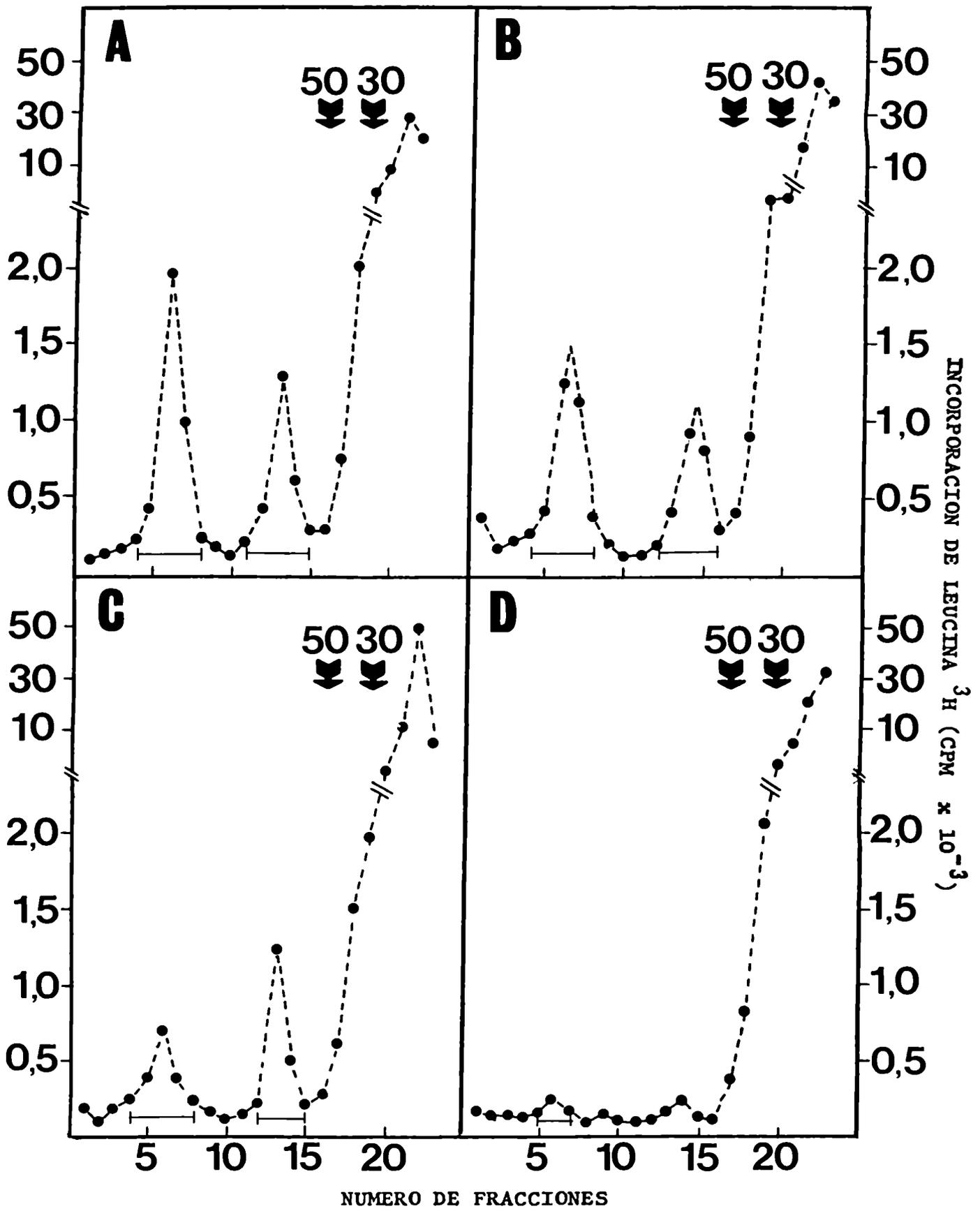
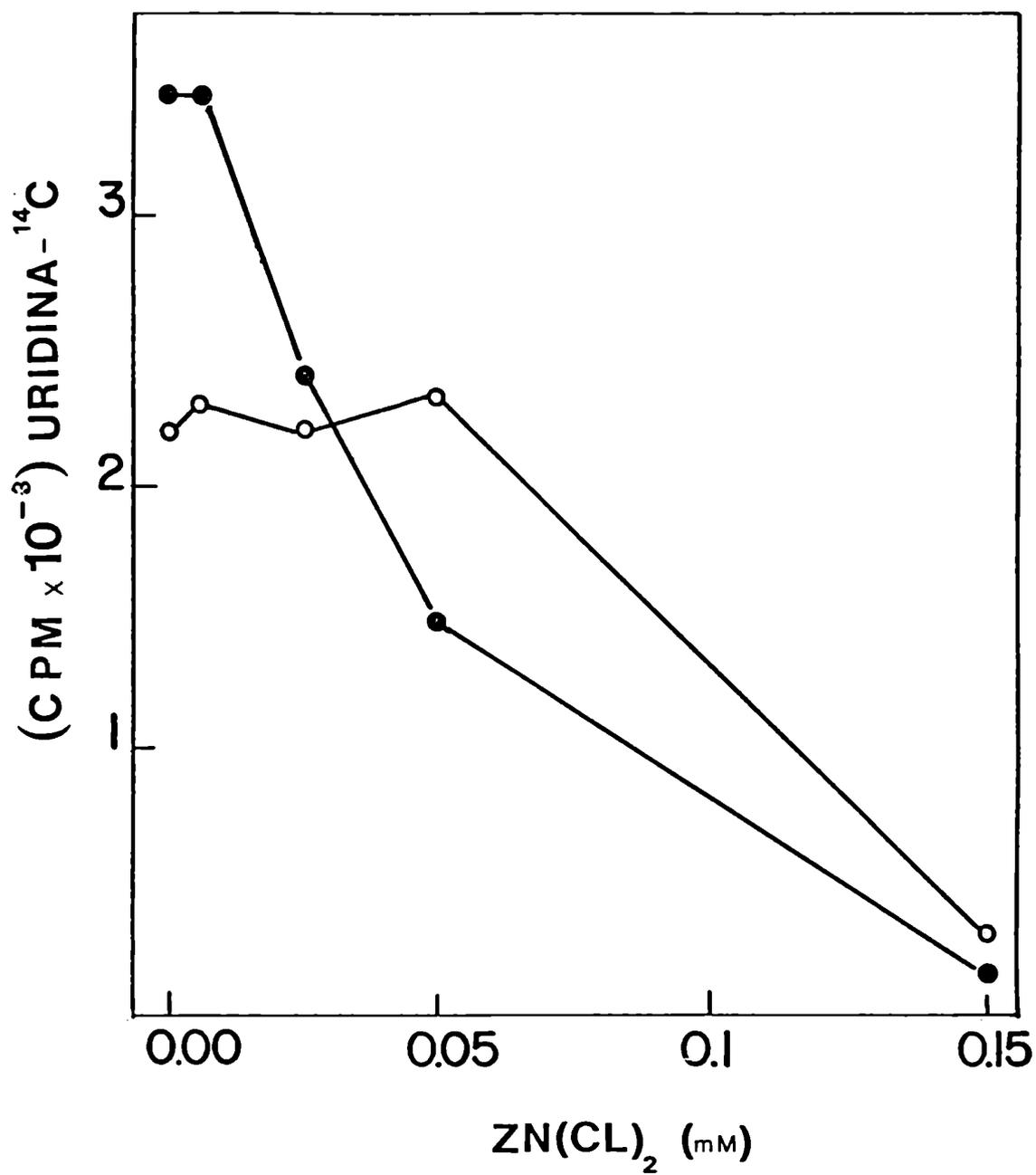


FIGURA N° 4. - INHIBICION DE LA SINTESIS DE VIRUS Y PROCAPSIDES
POR LOS IONES ZINC

Las condiciones experimentales fueron las ya descritas para la figura 3. La radioactividad total incorporada a partículas virales infecciosas (●) y a procápsides (○), fue calculada por integración de las áreas bajo los picos de 140S y 70S, respectivamente, de la figura 3.

FIGURA N° 4



En este experimento podemos notar un efecto de inhibición diferencial por el zinc sobre la síntesis de estas macromoléculas virales, en función de la concentración de inhibidor usada.

IV.1.3.- Efecto de 0,15 mM de $ZnCl_2$ en la síntesis de virus, procápsides y ARN viral a distintos tiempos p.i.

Puesto que una concentración de 0,15 mM de $ZnCl_2$ inhibía la multiplicación viral cuando se agregaba tempranamente en el ciclo infeccioso, se estudió su efecto en otras etapas del mismo. Para ello, células BHK-21 infectadas con el subtipo A₂₄ Cruzeiro del virus aftoso en las condiciones ya descritas (III.3.-), fueron divididas a los 80 min p.i. en dos alícuotas, recibiendo una de ellas leucina-³H y la otra uridina-¹⁴C. Ambas muestras fueron incubadas a 37°C por otros 190 min adicionales.

A los tiempos indicados en la leyenda de la figura respectiva, se tomó una muestra de cada una de las alícuotas a la que se le añadió $ZnCl_2$ hasta una concentración final de 0,15 mM. La síntesis de ARN viral fue medida en las células marcadas con uridina-¹⁴C como radioactividad TCA insoluble, mientras que las células marcadas con el aminoácido radioactivo fueron procesadas para la obtención de partículas virales infecciosas y procápsides, tal como se describió previamente (III.4.-). La radioactividad incorporada en las mismas como asimismo el análisis en gradientes de sacarosa se describió en la sección III.5.-.

Los resultados graficados en la figura 5 muestran que, cuando más tarde se agrega el zinc durante el ciclo infeccioso, menor es su efecto inhibitorio. Mas aún, cuando 0,15 mM de $ZnCl_2$ es agregado luego de los 210 min p.i., ni la producción de virus ni la síntesis de ARN viral es afectada, a pesar que la producción de procápsides es inhibida en un 50% respecto del control sin inhibidor.

La relación observada entre la inhibición de la producción de virus infeccioso y la síntesis de ARN viral por los iones zinc, apoyan la suposición acerca del efecto supresor de esta droga sobre la síntesis de partículas infecciosas como consecuencia de la inhibición provocada en la síntesis de ARN viral.

FIGURA N° 5. - EFECTO DEL $ZnCl_2$ EN LA SINTESIS DE VIRUS; PARTICU-
LAS VACIAS (PROCAPSIDES) Y ARN VIRAL A DISTINTOS
TIEMPOS P.I.

Células BHK-21, clon 13, crecidas en suspensión, fueron infectadas en las condiciones ya descriptas en la leyenda de la figura 3.

A los 80 min p.i. las células fueron divididas en dos muestras, recibiendo una de ellas leucina-³H y la otra uridina-¹⁴C. A los tiempos indicados en la figura, 6×10^6 células fueron tomadas de cada muestra añadiéndoseles $ZnCl_2$ hasta una concentración final de 0,15 mM.

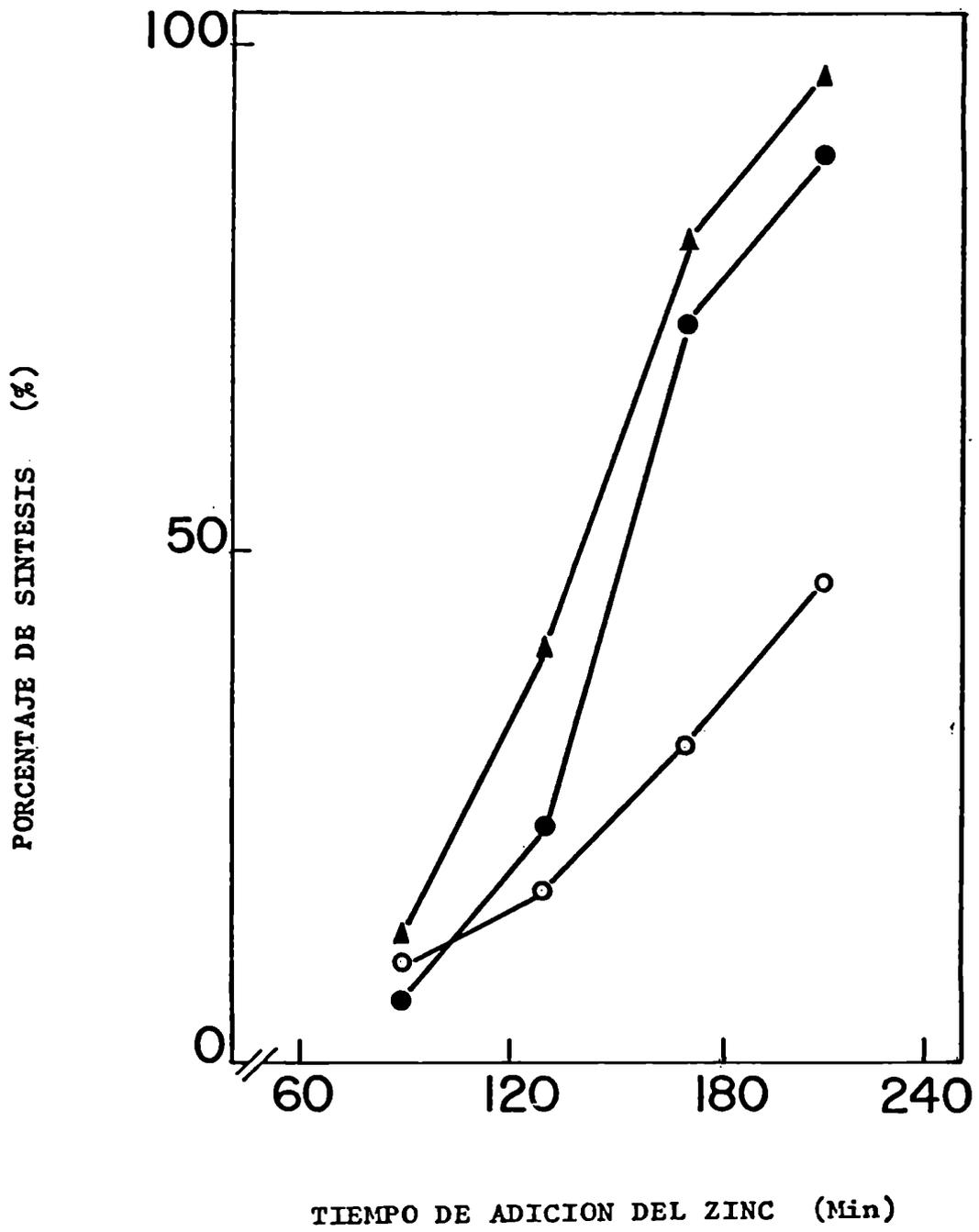
La incubación se prolongó durante 190 min al cabo del cual las células conteniendo la leucina-³H se procesaron tal como se describió en la leyenda de la figura 3, calculándose las cantidades de virus (●) y procápsides (○) sintetizadas por integración de las áreas bajo los picos de 140S y 70S, respectivamente.

Los resultados son expresados como porcentajes respecto de un control sin inhibidor marcado con leucina-³H.

Las células marcadas con uridina-¹⁴C fueron precipitadas con TCA y procesadas para determinar la cantidad de ARN viral acumulada según el procedimiento señalado en la sección III.5.- (▲). Estos resultados también fueron representados como porcentajes respecto de un control sin inhibidor marcado con uridina-¹⁴C.

Todos los valores fueron corregidos para la incorporación de células no infectadas tratadas con actinomicina D. Resultados idénticos a los graficados en la figura 5 fueron obtenidos cuando la concentración del inhibidor fue incrementada a 0,3 mM.

FIGURA N° 5



La falta de inhibición en la síntesis de virus o de ácidos nucleicos, cuando el zinc es añadido en las últimas etapas del ciclo infeccioso, puede ser debida a:

- 1 - Disminución de la permeabilidad celular que impediría la entrada de los iones zinc al interior de las células infectadas;
- 2 - Aumento del cociente sustrato/zinc, debido a la acumulación de precursores polipeptídicos virales hacia el final de la infección;
- 3 - Los iones zinc no actuarían inmediatamente luego de ser agregados al medio de incubación;
- 4 - La existencia de un reservorio de moléculas de ARN viral, las cuales se encapsidarían aún en la presencia de la droga y/o debido a la presencia de una actividad de replicasa remanente, la cual funciona normalmente en presencia de la droga;

Las dos primeras posibilidades fueron descartadas, puesto que los mismos resultados de la figura 5 se obtuvieron al usar altas concentraciones de zinc (mayores de 0,15 mM). Por otra parte, la primera de estas posibilidades también queda descartada por el efecto altamente inhibitorio sobre la síntesis de procápsides observado en estas etapas finales del ciclo infeccioso.

La tercera posibilidad fue excluída analizando la cinética de síntesis de virus y procápsides después de cortos tiempos de exposición a la droga, en diferentes momentos del ciclo infeccioso (Figura 6). En dicha figura puede observarse que, períodos de 50 min de exposición a una alta concentración del inhibidor en las últimas etapas del ciclo infeccioso, provoca una apreciable disminución en la síntesis de procápsides sin afectar, mayormente, la producción de partículas virales infecciosas. Esto indica una acción inmediata de los iones zinc una vez que los mismos son agregados al medio de incubación, corroborando, además, que el zinc actúa en las etapas tardías del ciclo.

FIGURA N° 6.- SINTESIS DE VIRUS Y PROCAPSIDES DURANTE EL CICLO
INFECCIOSO

6×10^7 células BHK-21, Clon 13, crecidas en suspensión e infectadas con el subtipo A₂₄ Cruzeiro del virus aftoso en las condiciones ya descritas (III.3.-), fueron marcadas a los 95 min p.i. con leucina-³H y divididas en seis alícuotas iguales.

Una de las alícuotas fue incubada hasta los 130 min p.i., al cabo de los cuales fue procesada para visualizar la presencia de virus y procápsides acumuladas hasta ese momento según el procedimiento ya descrito (III.5.-) (barra del histograma n° 1).

Otra de las muestras fue procesada a los 180 min p.i. en igual forma que la anterior (barra del histograma n° 2).

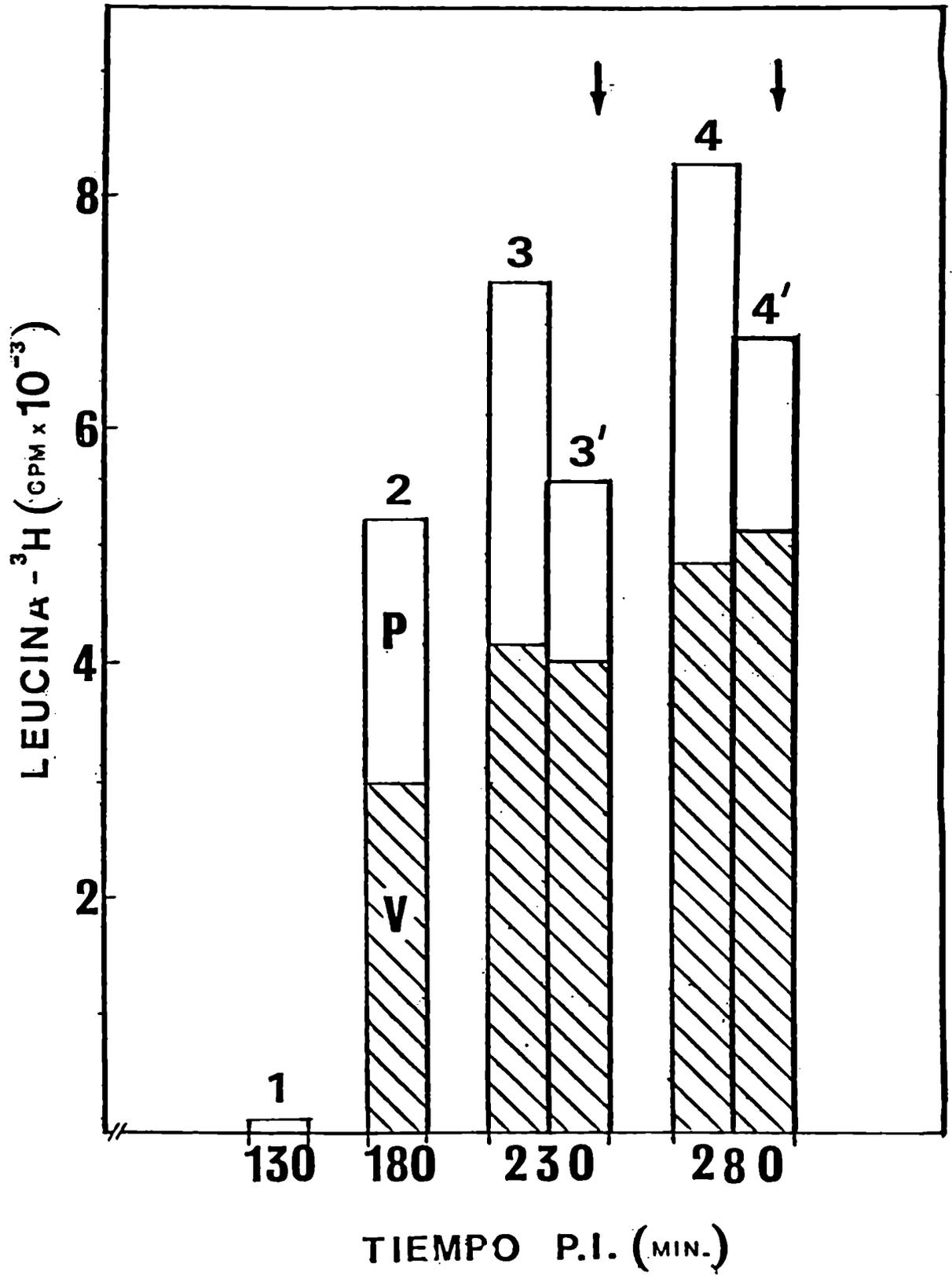
A los 180 min p.i., una de las cuatro alícuotas restantes recibió ZnCl₂ hasta una concentración final de 0,15 mM, continuando su incubación por 50 min adicionales, luego de los cuales fue procesada para visualizar la presencia de virus y procápsides tal como se se ñaló para las dos muestras anteriores (barra del histograma n° 3'). Una de las tres alícuotas restantes, procesada en la misma forma a los 230 min p.i., fue usada como control (barra del histograma n° 3).

A los 230 min p.i., una de las dos alícuotas restantes recibió ZnCl₂ hasta una concentración final de 0,15 mM. A los 280 min p.i. se procesaron ambas muestras (con y sin inhibidor) en la forma ya descrita para determinar la presencia de virus y procápsides (barras del histograma n°s. 4' y 4, respectivamente).

Las flechas en la figura indican cuál de las muestras recibió el inhibidor. Los resultados son expresados en forma de un histograma donde cada barra representa la síntesis de virus y procápsides acumuladas en cada muestra durante los tiempos de incubación señalados precedentemente. En la abcisa se indican los min p.i. a los cuales fue concluída la incubación.

P = procápsides ; V = virus.

FIGURA N° 6



Otro de los datos que pueden extraerse de la figura 6 es que el momento de máxima velocidad en la síntesis de virus y procápsides se halla entre los 150 y 200 min p.i., resultado que coincide con otros ya estimados para el virus aftoso (53,77).

La cuarta posibilidad fue investigada estudiando la cinética de inhibición de la síntesis del ARN viral por los iones zinc. Para ello, se usó una alta concentración del inhibidor (0,2 mM) agregada a distintos tiempos del ciclo infeccioso.

El experimento fue realizado de la siguiente manera: células BHK-21, clon 13, crecidas en suspensión e infectadas en las condiciones descritas en Materiales y Métodos, fueron marcadas con uridina-¹⁴C a los 80 min p.i.. Muestras conteniendo cantidades equivalentes de células fueron extraídas a los 90, 130, 170 y 210 min p.i. e incubadas en la presencia de 0,2 mM de ZnCl₂ hasta los 250 min p.i.. La incorporación de uridina-¹⁴C fue medida como radioactividad insoluble TCA precipitable acumulada al cabo de los 250 min de incubación.

Como puede verse en la figura 7, una concentración de 0,2 mM de ZnCl₂ añadida a diferentes tiempos durante el ciclo de infección, produce una inhibición de la síntesis del ARN viral similar a la ya mostrada en la figura 5. Por otra parte, cuando el zinc fue agregado después de los 90 min p.i., el efecto inhibitorio fue menos evidente, indicando que una considerable cantidad de ARN fue sintetizada, al menos hasta 50 min después de su adición.

Estos resultados apoyan la suposición que los iones zinc son incapaces de inhibir la replicación del ARN viral mientras una cierta cantidad de replicasa está aún presente. Puede también sugerirse que, en presencia de los iones zinc, la vida media de la replicasa del virus aftoso se incrementa, al menos, en 50-60 min si se la compara con la obtenida en ausencia de síntesis de proteínas (Figura 9) y con la informada para otros picornavirus (33).

Por lo tanto, puede concluirse que es posible detectar la presencia de una actividad de replicasa remanente, la cual funcionaría normalmente en presencia de la droga. Este efecto se estudia algo más en profundidad a continuación.

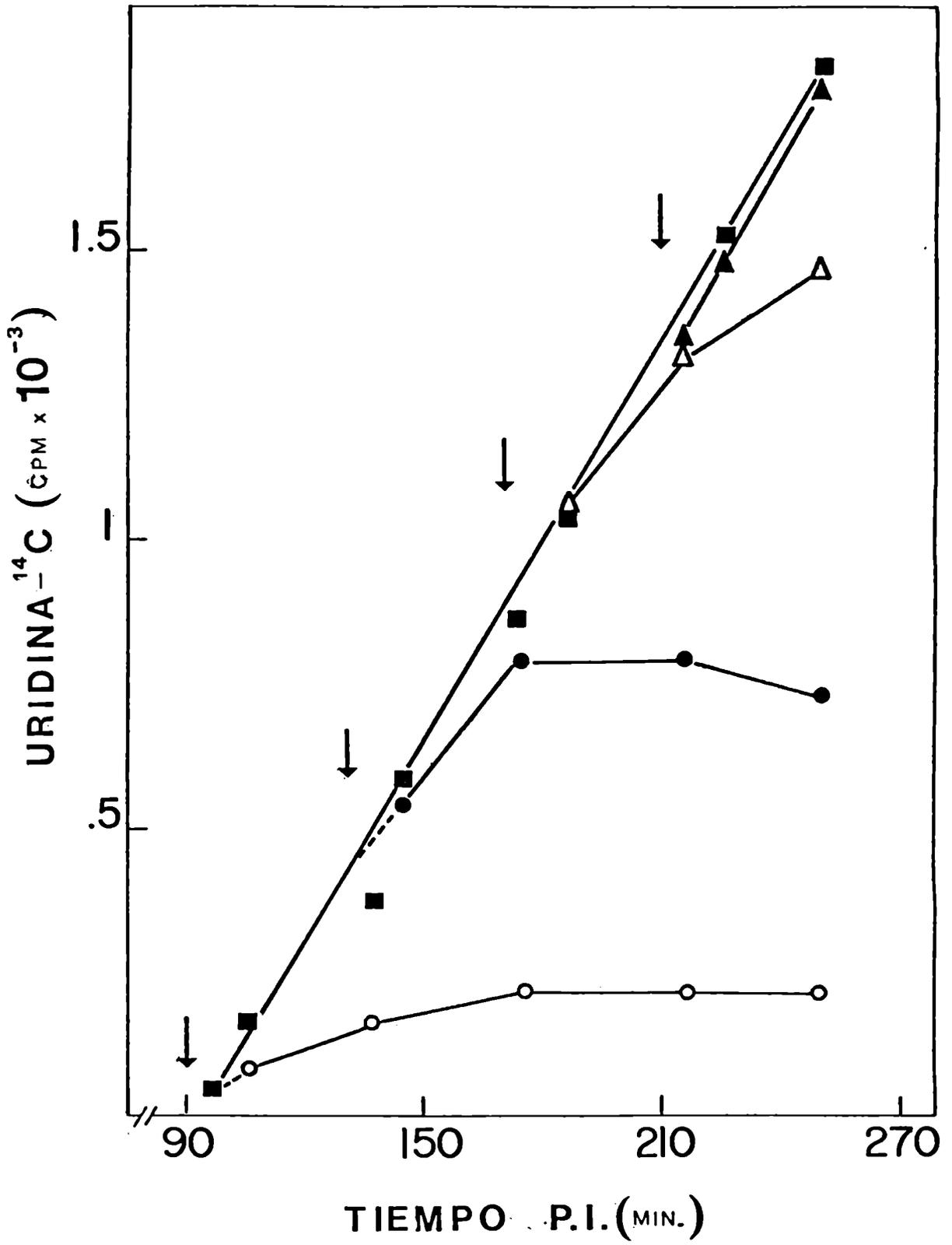
FIGURA N° 7.- EFECTO DE UNA CONCENTRACION DE 0,2 mM de $ZnCl_2$
SOBRE LA CINETICA DE SINTESIS DEL ARN VIRAL

4×10^7 células BHK-21, clon 13, crecidas en suspensión e infectadas en las condiciones ya descritas en la leyenda de la figura 3, fueron divididas en alícuotas iguales de 5×10^6 células/ml. A los 80 min p.i. las células recibieron uridina- ^{14}C (III.3.-). A los tiempos indicados en la figura, muestras conteniendo $7,5 \times 10^6$ células fueron incubadas con ZnCl_2 (concentración final 0,2 mM) hasta los 250 min p.i. (las flechas indican los tiempos p.i. en los cuales fue añadido el zinc a las muestras). De cada una de las muestras se extrajeron alícuotas a diferentes momentos del ciclo infeccioso y se precipitaron con TCA 5% frío para determinar la radioactividad ácido insoluble, según se ha descrito en Materiales y Métodos (III.5.-).

Los resultados fueron normalizados sustrayendo la incorporación obtenida en células no infectadas tratadas con actinomicina D.

(■) células infectadas no tratadas; 0,2 mM de zinc a los: (○) 90 min p.i., (●) 130 min p.i., (Δ) 170 min p.i. y (▲) 210 min p.i.

FIGURA N° 7



La existencia de un reservorio de moléculas de ARN virales que se encapsidan en presencia del ión no es incompatible con el resultado obtenido precedentemente. Sin embargo, no fue posible determinar si esta situación ocurría realmente y en qué medida influía en los datos observados.

IV. 1.4.- Efectos de los iones zinc en la actividad de la replicasa viral "in vivo"

En base a los datos graficados en las figuras 5 y 7 surge una acción diferencial de los iones zinc sobre la síntesis de ARN viral, dependiendo del momento del ciclo infeccioso en el cual se agregó el inhibidor. El efecto de la droga se hacía menos evidente hacia las etapas finales. Mas aún, si los iones zinc eran suministrados al medio de cultivo después de los 21 min p.i., ni la síntesis de virus o de ácidos nucleicos era afectada.

Entre las posibles explicaciones para la observación de este fenómeno fueron consideradas varias posibilidades, una de las cuales suponía la existencia de una actividad de replicasa remanente, la cual funcionaría normalmente en presencia de la droga. Con el objeto de estudiar mas a fondo este efecto, se determinó -previamente- cuál era el comportamiento de la replicasa viral durante el ciclo infeccioso del virus aftoso.

Para medir la actividad de la enzima se usó el siguiente procedimiento: alícuotas conteniendo iguales cantidades de células fueron extraídas a intervalos constantes a partir de los 110 min p. i. de un cultivo de células BHK-21 infectadas con el virus aftoso. Cada alícuota fue incubada durante 8 min en presencia de uridina-³H. La actividad enzimática fue medida en función de la incorporación de este precursor en el ácido ribonucleico viral, midiéndose la radioactividad acumulada durante dicho lapso de tiempo tal como se indicó en Materiales y Métodos (III.6.-).

Los resultados son graficados en la figura 8 en forma de histograma, representando cada barra la radioactividad acumulada en ácido ribonucleico precipitado al cabo de 8 min de incubación con uridina-³H.

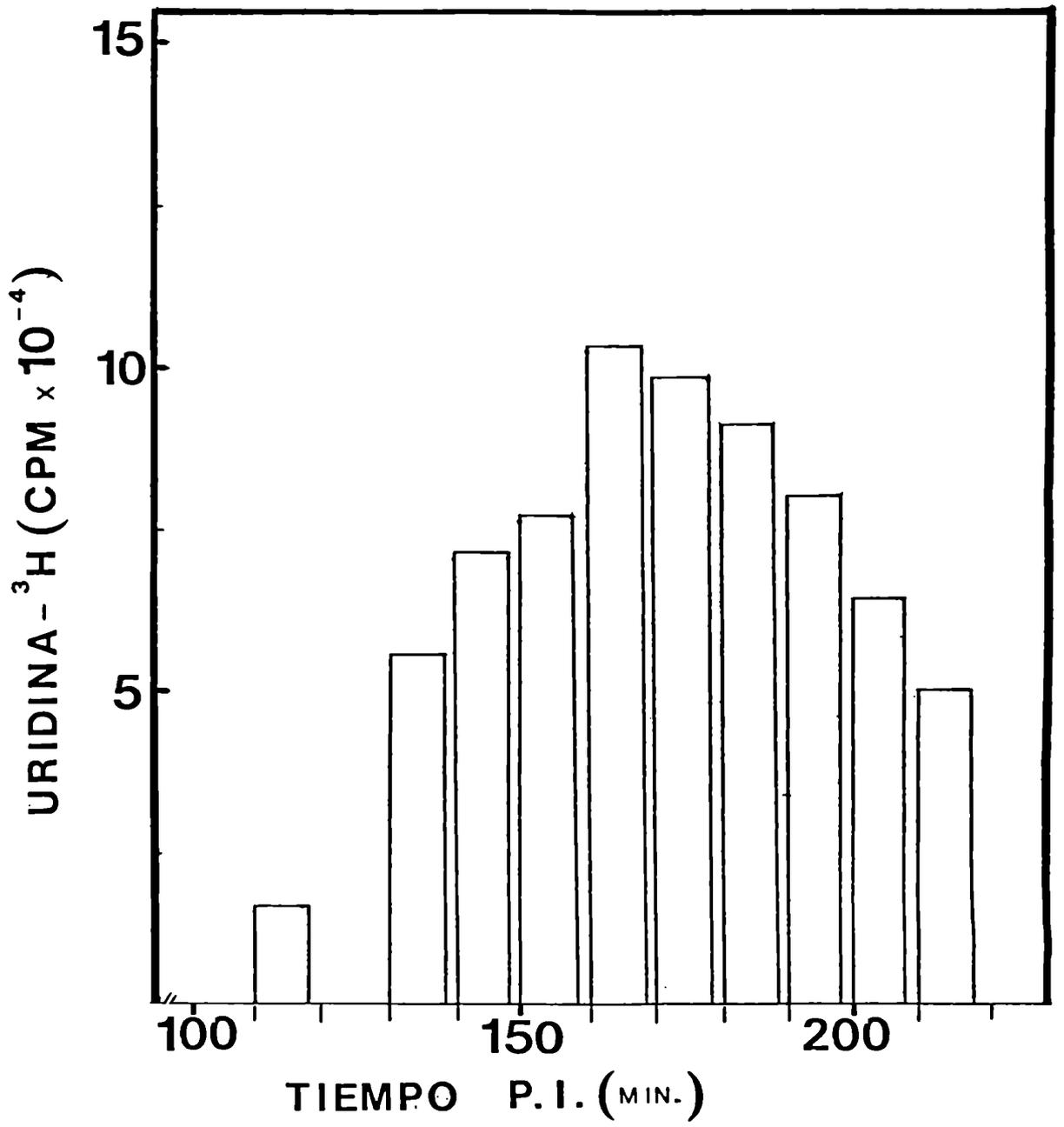
FIGURA N° 8. - ACTIVIDAD DE REPLICASA VIRAL

2×10^7 células BHK-21, clon 13, crecidas en suspensión, fueron infectadas en las condiciones indicadas en Materiales y Métodos (III.3.-). A los 110 min p.i. se extrae una alícuota de $1,5 \times 10^6$ células y se la incuba en presencia de uridina- ^3H (III.6.-).

Al cabo de este tiempo se para la reacción por el agregado de un volumen de TCA 15% frío. Muestras similares, procesadas en la forma ya señalada (III.6.-), se extraen a los distintos tiempos p.i. indicados en la figura. La radioactividad incorporada es de terminada según se indica en la sección III.6.-.

Cada barra del histograma representa la radioactividad acumulada durante los 8 min en que las células infectadas fueron expuestas al marcador radioactivo.

FIGURA N° 8



A partir de los 100 min p.i. se observa un rápido incremento en la actividad de la replicasa, llegando a un máximo entre los 160 y los 180 min p.i., momento a partir del cual la actividad comienza a decaer en forma constante. Este patrón de actividad ya fue señalado para la replicasa del virus de la polio multiplicado en células HeLa (273). Una posible explicación fue considerar la escisión de un polipéptido esencial para la actividad enzimática. Este proceso podría estar en relación directa con el aumento de la actividad proteolítica en tiempos tardíos del ciclo infeccioso en células infectadas con picornavirus (271). Sin embargo, no es posible descartar otras hipótesis tales como:

- a) Un mecanismo inhibitorio producido por el mismo virus para evitar una posible acumulación de ácidos nucleicos virales no utilizables (513);
- b) Desorganización de las estructuras celulares y/o daño de la maquinaria metabólica celular, imposibilitando la restauración del pool celular de nucleótidos o el abastecimiento de energía necesario para el funcionamiento continuo del proceso de replicación del ARN viral (368);
- c) Cese de nueva síntesis de precursores de la replicasa viral e inactivación de las moléculas de enzima aún presentes por estar afectada la síntesis de proteínas celulares. Como se demostrará mas adelante (Figuras 9 y 15), la enzima necesita de la síntesis continua de proteínas para la provisión constante de un factor proteico indispensable para mantener su actividad.

Puesto que la actividad de replicasa viral no se mantenía constante durante el ciclo infeccioso, se determinó la vida media de la enzima en diferentes momentos del ciclo infeccioso. Para ello se tomaron dos alícuotas de células infectadas: una a los 165 min p.i., cuando la actividad enzimática aún no entró en su fase de crecimiento exponencial (Ver inserto de la figura 9 A) y otra a los 180 min p.i. cuando se detecta máxima actividad enzimática (Ver inserto figura 9 B).

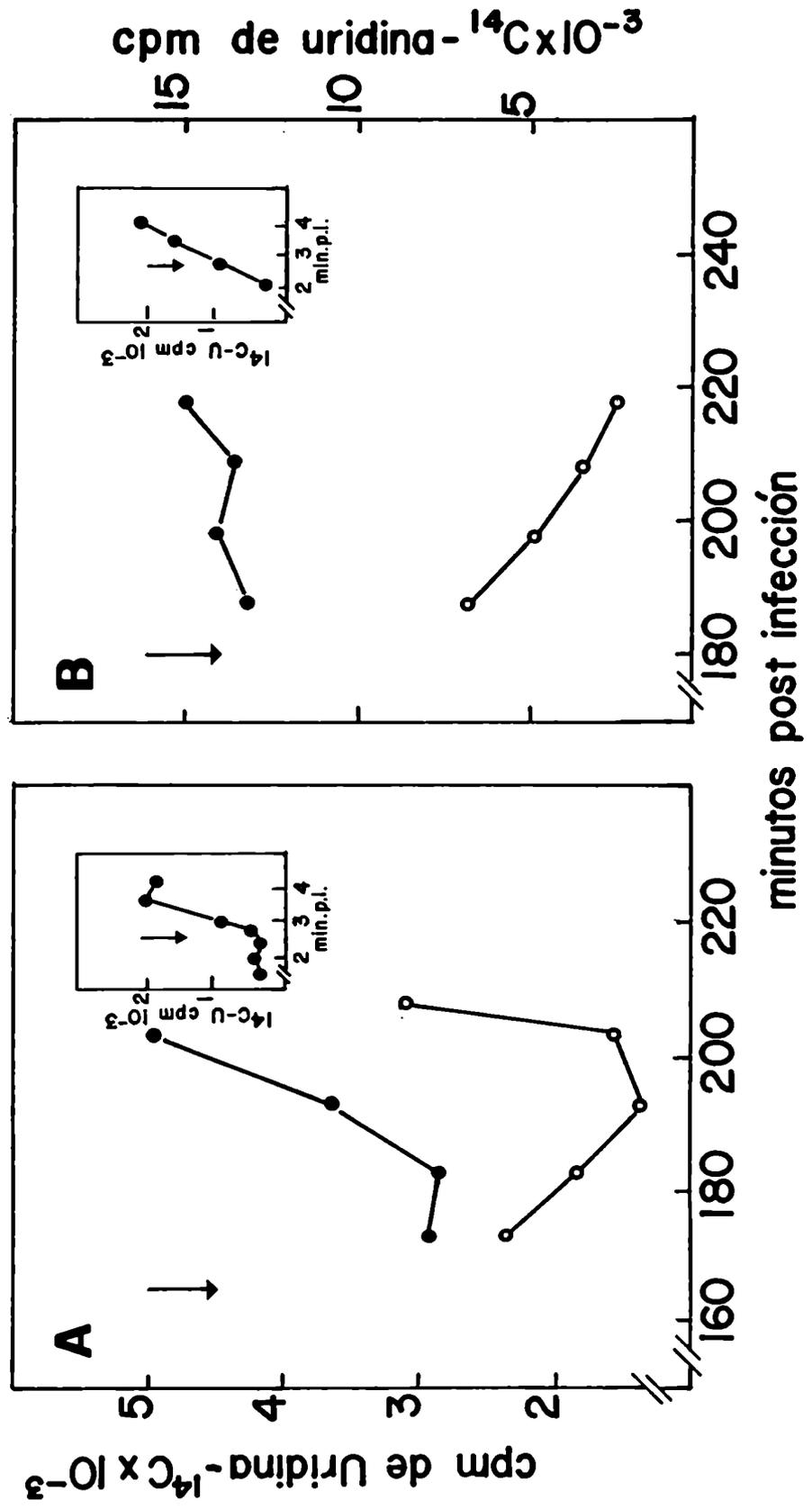
FIGURA N° 9.- DETERMINACION DE LA VIDA MEDIA DE LA REPLICASA
VIRAL

Las experiencias se hicieron usando 3×10^7 células infectadas en las condiciones señaladas en Materiales y Métodos (III.3.-). A los tiempos indicados por las flechas en la figura, se dividieron las células en dos alícuotas iguales, una de las cuales recibió 100 ug/ml de cicloheximida (o) mientras que la otra es utilizada como control (●). Muestras conteniendo 3×10^6 células son extraídas de estas alícuotas a los tiempos señalados y puestas en presencia de 1 uCi/ml de uridina- ^{14}C , durante 8 min. Al cabo de este período de tiempo se detiene la reacción por el agregado de TCA 15% frío, midiéndose la radioactividad incorporada tal como ya se expresara (III.6.-).

Las curvas de incorporación que aparecen en los insertos se determinaron separando 10^7 células de la suspensión celular original infectada y añadiendo a las mismas uridina- ^{14}C (III.3.-). A los tiempos señalados en las abcisas de los insertos, alícuotas de 10^6 células son extraídas del cultivo y precipitadas con TCA 15% frío, determinándose la radioactividad incorporada al igual como se indicó en la sección III.6.-.

- A) Estimación de la vida media de la replicasa del virus aftoso antes de los 170 min p.i.;
- B) Idem que en A) pero a partir de los 180 min p.i..

FIGURA N° 9



Para la estimación de la vida media de la enzima se usó cicloheximida (*), un inhibidor inmediato de la síntesis proteica. En ausencia de nuevos precursores de la enzima, la actividad observable en cada alícuota durante los 50 min siguientes al agregado del inhibidor muestra cuánto tarda la actividad enzimática presente originalmente en el tiempo $t=0$ (165 min y 180 min p.i.) en llegar a la mitad de su valor. En función de estos datos, se estableció que la vida media de la replicasa variaba entre 20 min (durante los primeros 170 min p.i.) a 7 min (después de los 180 min p.i.).

Cabe destacar que de los datos obtenidos en la figura 9 se deduce la necesidad de la síntesis continua de proteínas para tener actividad de replicasa. En ausencia de la misma, la actividad de la enzima decae al cabo de un corto tiempo.

Teniendo en cuenta los resultados señalados, se observó cuál era el efecto de una alta concentración de iones zinc sobre la vida media de la replicasa viral agregados en diferentes momentos del ciclo infeccioso. Se eligieron tres tiempos: 110, 140 y 170 min p.i.. Los resultados se muestran en la figura 10 en forma de histograma, donde cada barra del mismo representa la actividad enzimática acumulada durante 8 min.

De los datos graficados se deduce que la concentración del inhibidor usada afecta la síntesis de nuevas moléculas de la enzima, ya que las células infectadas tratadas con la droga, en ningún caso, recuperan la actividad del control. Por otra parte, los iones zinc son capaces de mantener actividad de replicasa constante al menos hasta 50 min después de agregado el inhibidor.

(*) La cicloheximida (actidiona) -un antibiótico del hongo Streptomyces griseus- inhibe la síntesis de proteínas "in vivo" en muchas levaduras, células animales y bacterias (165,262). Su mecanismo de acción es muy semejante a como lo hace el cloranfenicol, bloqueando la transferencia de aminoácidos activados en el ribosoma desde el ARN de transferencia a las cadenas polipeptídicas en crecimiento (166,319,441), estabilizando así a los poliribosomas a lo largo del ARN mensajero.

FIGURA N° 10.- ACTIVIDAD DE LA REPLICASA DEL VIRUS AFTOSO "IN VI-
VO" EN PRESENCIA DE 0,3 mM DE $ZnCl_2$

Parte I

4×10^7 células BHK-21, clon 13, crecidas en suspensión, fueron infectadas en las condiciones mencionadas en Materiales y Métodos. A los 110, 140 y 170 min p.i., se separaron sendas alícuotas de 6×10^6 células de la suspensión celular. Dichas alícuotas se procesaron de la siguiente forma: una de las alícuotas recibe ZnCl_2 hasta una concentración final de 0,3 mM, sirviendo la otra alícuota -sin inhibidor- como control. De ambas se extraen muestras de $1,5 \times 10^6$ células a los tiempos indicados en la figura, prosiguiendo la incubación en presencia de 1 uCi/ml de uridina- ^3H durante 8 min. Al cabo de este tiempo, se para la reacción y se mide la radioactividad incorporada tal como se señaló anteriormente (III.6.-).

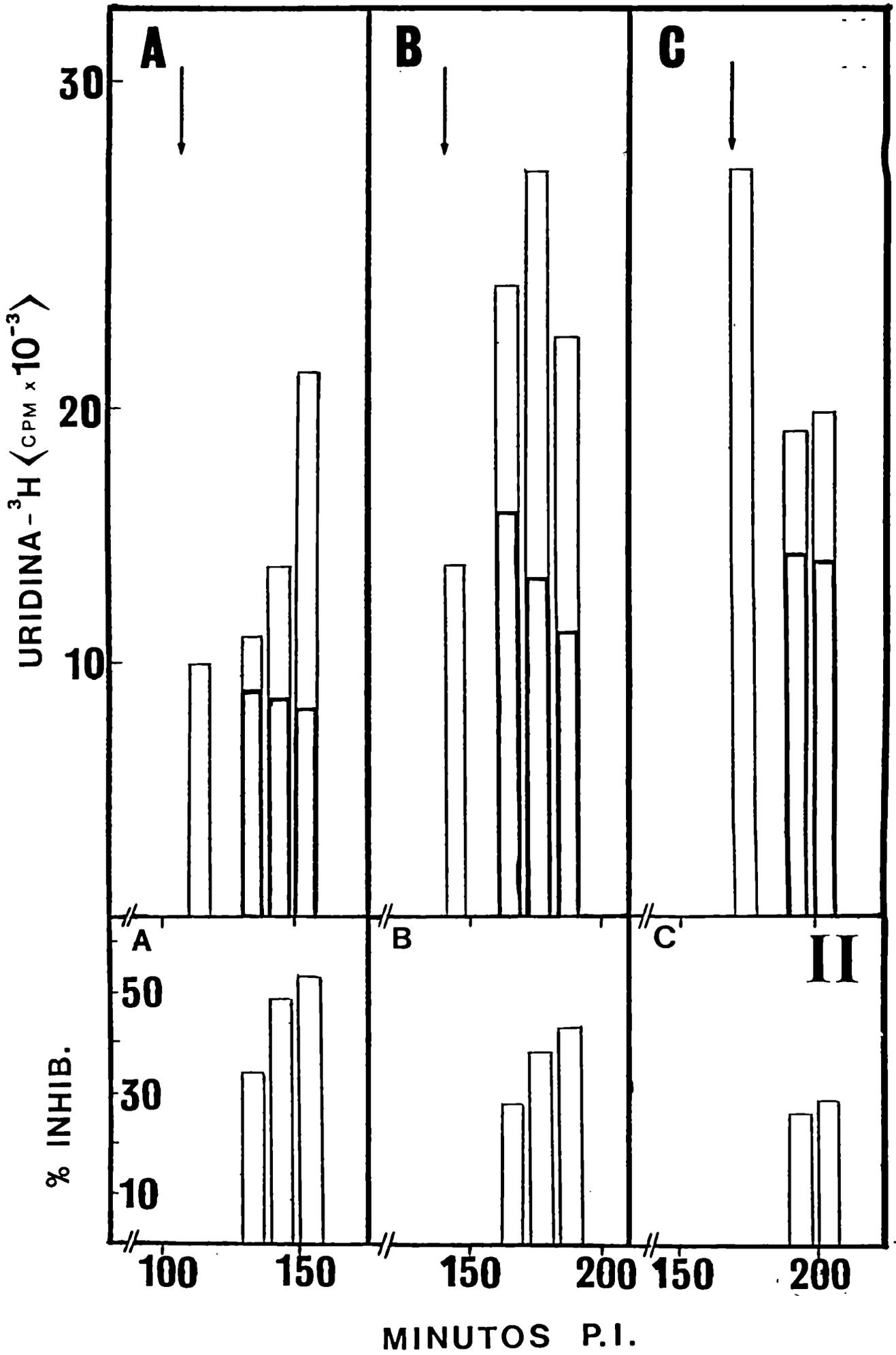
- A) Alícuotas extraídas a los 110 min; las barras del histograma representan la radioactividad acumulada de las muestras a los 110, 130, 140 y 150 min p.i.(I);
- B) Alícuotas extraídas a los 140 min; idem que en A) pero las muestras fueron extraídas a los 140, 160, 170 y 180 min p.i.(I);
- C) Alícuotas extraídas a los 170 min; idem que en A) pero las muestras fueron extraídas a los 190 y 200 min p.i.(I);

Cada barra del histograma indica la radioactividad acumulada durante los 8 min de exposición al marcador radioactivo. Las barras de trazo fino representan la incorporación del control mientras que, las barras de trazo grueso la incorporación de las muestras que recibieron el inhibidor. Las flechas verticales indican el momento de agregado del inhibidor a las alícuotas.

Parte II

Los porcentajes de inhibición se obtienen considerando la actividad del control para un período de 8 min como del 100% y, para ése mismo lapso de tiempo, cuánto representa la actividad obtenida en presencia de la droga. La diferencia entre ambos valores nos da el porcentaje de inhibición para cada intervalo de tiempo, el cual se grafica en la figura en forma de histograma.

- A) Datos de la parte I (A); B) Datos de la parte I (B); C) Datos de la parte I (C).



Asimismo, es posible inferir que, una determinada cantidad de iones zinc solamente protege (impide la inactivación) de una dada cantidad de sustrato (Figura 10, parte C). No pudieron ensayarse concentraciones mayores de 0,3 mM ya que las mismas afectaban el metabolismo de la célula huésped (Ver figura 2).

Añadida a los 170 min p.i., esta concentración de iones zinc produce un efecto inhibitor mucho menor, tal como se aprecia en el gráfico de los cálculos de porcentajes de inhibición de la figura 10, parte C. Este resultado coincide con el comportamiento observado anteriormente, al estudiar el efecto producido por esta concentración de la droga sobre la síntesis de viriones (Figura 5) y, en particular, sobre la síntesis de ARN viral (Figura 7). Asimismo, en base a estos datos de porcentajes de inhibición sobre la actividad de la replicasa, se confirma que el efecto inhibitor sobre la síntesis de ARN viral depende de la cantidad de moléculas de la enzima presentes al momento del agregado del inhibitor.

IV.1.5.- Reversibilidad de la inhibición por los iones zinc

El efecto antiviral de los iones zinc sobre la replicación del virus aftoso fue estudiado midiendo el grado de reversión de la acción de los mismos sobre la síntesis de ARN viral. Tanto la reversibilidad como la irreversibilidad de la acción del zinc fue señalada para varios sistemas virus-células (62,317,230,440), incluyendo el subtipo A₁₂ 119 del virus aftoso multiplicado en células de riñón bovino (BK) primario (381).

En este trabajo de tesis se midió la síntesis de ARN viral en células BHK-21, clon 13, usando el subtipo A₂₄ Cruzeiro del virus aftoso. La diferencia, en relación a los experimentos llevados a cabo con otra cepa del virus aftoso (381), tanto en la cepa de virus como en la línea celular usada, es significativa puesto que, dos cepas del virus Herpes Simplex -HSV 1 y HSV 2-, propagadas en presencia de iones zinc usando dos sistemas celulares distintos (células BSC 1 o células Vero, respectivamente), fueron inhibidas en su multiplicación de manera irreversible en el primer caso (192,317) y reversiblemente en el segundo (230).

Se llevaron a cabo ensayos tratando con 0,2 mM de $ZnCl_2$ muestras conteniendo iguales cantidades de células BHK-21 infectadas con virus aftoso, a distintos tiempos p.i.. Una vez añadido el inhibidor, la incubación se prolongó durante 55 min adicionales al cabo de los cuales se removi^ó el zinc de las muestras que lo contenían por centrifugación a baja velocidad, descartándose el sobrenadante. El pellet celular obtenido se resuspendió en un medio libre de zinc (previos lavados con el mismo medio) conteniendo igual cantidad de isótopo radioactivo. En todos los casos, la incubación se prolongó hasta los 320 min p.i. y la incorporación de uridina-¹⁴C en las células fue medida como radioactividad ácido precipitable, según el procedimiento ya descripto (III.6.-).

Los resultados se indican en la figura 11. Puede observarse que las células tratadas con el inhibidor muestran una casi completa reversibilidad de la síntesis de ARN después de la remoción de la droga. Cuando los iones zinc fueron añadidos entre los 90 y los 145 min p.i., solamente se obtuvo un 70% de recuperación en la síntesis de ARN viral.

Por otra parte, hay una fase de eclipse de, aproximadamente, 50 min durante la cual la síntesis de ARN viral permanece constante a partir del momento en que se lava la droga del medio de cultivo. Luego de este período, la síntesis de ARN viral se reasume llegando, en casi todos los casos, hasta los valores de actividad máximos del control sin inhibidor. Este período de eclipse es independiente del tiempo p.i. en el cual fue añadido el inhibidor y es casi idéntico al tiempo durante el cual las células fueron puestas en presencia del mismo (55 min).

En base a los resultados obtenidos puede decirse que la acción antiviral de los iones zinc sobre la multiplicación del virus aftoso es de tipo virustática antes que virucida, puesto que luego del lavado de los mismos del medio de cultivo, la replicación del virus se reasume hasta casi alcanzar los valores normales de actividad de los controles.

FIGURA N° 11.- REVERSION DE LA INHIBICION POR LOS IONES ZINC DE
LA SINTESIS DEL ARN VIRAL

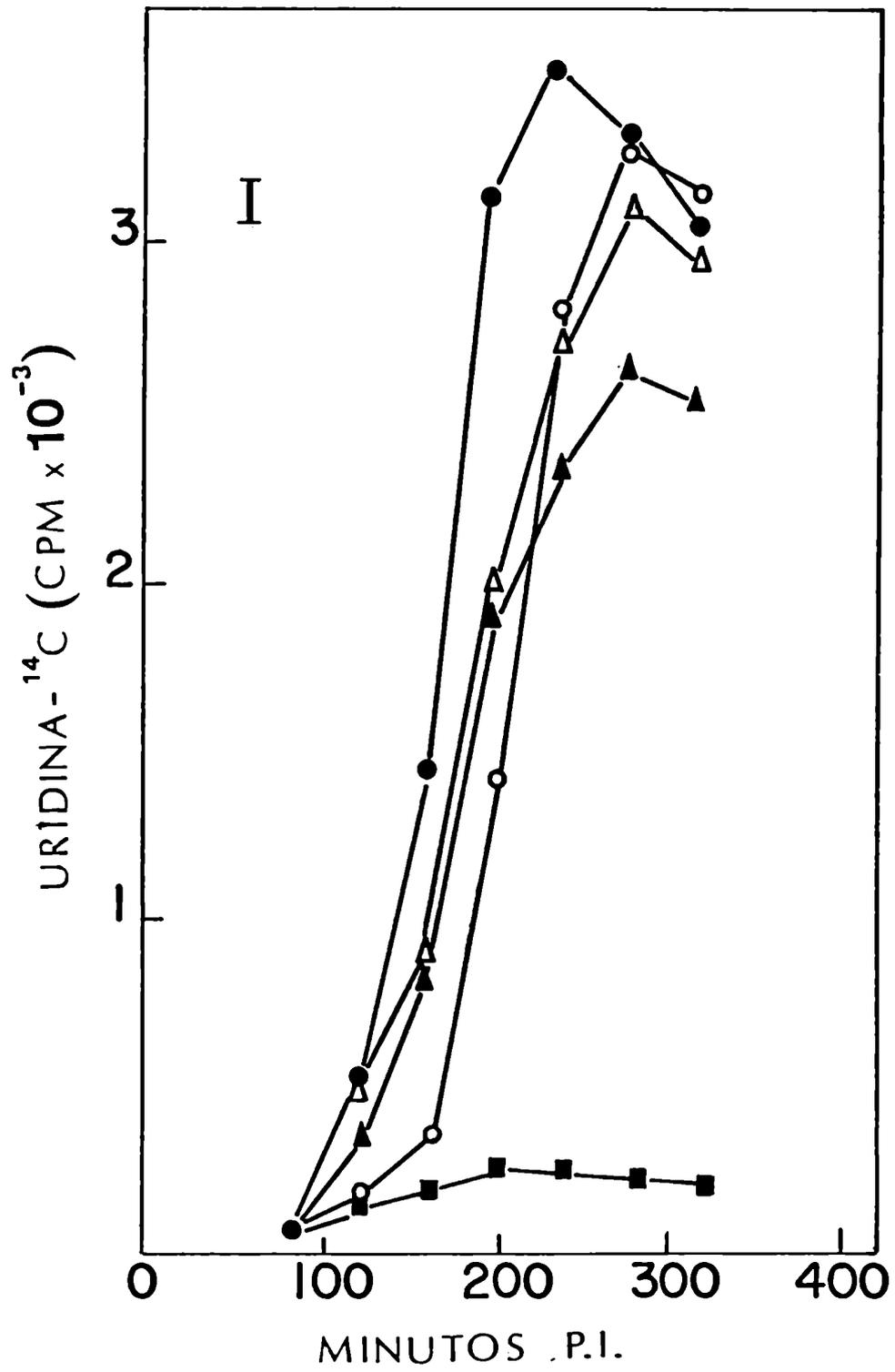
8×10^7 células BHK-21, clon 13, crecidas en suspensión, fueron infectadas a una multiplicidad igual a 50 e incubadas en las condiciones descritas en la sección III.3.-. La suspensión celular se diluyó dos veces con MEM conteniendo $10 \mu\text{g/ml}$ de actinomicina D y a los 50 min p.i. se añadió uridina- ^{14}C .

Muestras conteniendo $7,5 \times 10^6$ células fueron tomadas a los 50 (\blacktriangle), 90 (o) y 130 (\triangle) min p.i. e incubadas por 55 min en presencia de ZnCl_2 (concentración final $0,2 \text{ mM}$). Al cabo de este período de tiempo las células fueron sedimentadas por centrifugación a bajas revoluciones (600 rp) y resuspendidas en MEM conteniendo actinomicina D y uridina- ^{14}C ($0,5 \text{ uCi/ml}$). Muestras controles de células no tratadas con el inhibidor (\bullet) como también de células infectadas tratadas con la misma concentración de ZnCl_2 durante todo el período de incubación (\blacksquare), recibieron el mismo tratamiento que las muestras citadas al comienzo.

Las curvas representadas en la figura estan corregidas habiéndose seles restado el lapso de tiempo correspondiente al eclipse (50 min).

Los resultados fueron corregidos para la incorporación de células no infectadas tratadas con actinomicina D y la radioactividad ácido precipitable en el sobrenadante descartado durante la remoción del zinc. Los resultados graficados corresponde al promedio de tres experimentos diferentes. La barra indica la desviación estandar de cada valor graficado.

FIGURA N°11



IV.2.- INHIBIDORES PROTEOLITICOS

IV.2.1.- Efectos sobre la síntesis de macromoléculas celulares y virales

Compuestos tales como el TLCK y el TPCK tienen afinidad y son reconocidos como sustratos por proteasas con actividad tipo tripsina o quimiotripsina, respectivamente, a las cuales se unen covalentemente e inhiben el sitio activo (Ver revisión en referencia 435). Sin embargo, ya que estos inhibidores también suprimen la síntesis proteica en los sustratos celulares usados para el cultivo de los picornavirus (157,269,401,464) fue necesario determinar la molaridad a la cual estos compuestos actuaban, específicamente, como inhibidores de proteasas antes que como inhibidores de la traducción.

Puesto que la síntesis de proteínas en eucariontes está íntimamente relacionada con el abastecimiento continuo de moléculas de ARN mensajero y, siendo el genoma del virus aftoso una cadena de ARN que actúa, directamente, como mensajero (35), se midió el efecto de estos inhibidores sobre la síntesis de ARN celular. El objetivo era encontrar qué concentraciones de estos compuestos son capaces de alterar la síntesis de ARN viral sin afectar la maquinaria metabólica celular.

En la figura 12 se indican los resultados obtenidos usando distintas concentraciones de estos inhibidores y de la IAA sobre la cinética de incorporación de un precursor radioactivo -la uridina-¹⁴C- necesario para la síntesis de ARN.

En función de los datos graficados en la figura 12, se determinaron las siguientes concentraciones no tóxicas para los inhibidores proteolíticos: TLCK 0,1 mM; TPCK 0,1 mM; IAA 0,05mM.

En la figura 13 puede observarse el efecto de las concentraciones no tóxicas de cada uno de estos compuestos sobre la síntesis de ARN viral en células BHK-21, clon 13, infectadas con el virus aftoso. Teniendo en cuenta la importancia que representaba el tiempo p.i. sobre los efectos observables de los iones

FIGURA N° 12.- EFECTO DE LOS INHIBIDORES PROTEOLITICOS SOBRE LA
SINTESIS DE ACIDOS NUCLEICOS EN CELULAS BHK-21,
CLON 13

Células BHK-21 fueron puestas en presencia de 0,1 mCi/ml de uridina-¹⁴C. A los 10 min después de agregado el precursor radioactivo se dividió el cultivo en alícuotas iguales de 10⁷ células recibiendo, cada una de ellas, una concentración dada de inhibidor. Alícuotas conteniendo igual cantidad de células y de marcador radioactivo pero sin inhibidor, fueron usadas como controles (●). A los tiempos indicados en la abcisas de las figuras se extraen muestras de las alícuotas, las cuales se precipitan con TCA 15% frío y la radioactividad incorporada se mide tal como se mencionó en Materiales y Métodos (III.6.-).

IAA : (■) 0,001 mM; (o) 0,01 mM; (□) 0,05 mM; (▲) 0,1 mM.

TLCK: (o) 0,05 mM; (▲) 0,1 mM; (Δ) 0,5 mM.

TPCK: (▲) 0,1 mM; (Δ) 0,5 mM.

Las flechas señalan el momento del agregado de las distintas concentraciones de los inhibidores en las alícuotas, así como el valor inicial de incorporación de radioactividad en ausencia de inhibidor.

Se usaron soluciones stocks de los inhibidores (20 mM) preparadas disolviendo la cantidad de droga necesaria para obtener dicha molaridad en un volumen dado de agua tridestilada. La solubilidad en agua, tanto del TLCK como de la IAA fue óptima, mientras que, para el TPCK, fue necesario disolverlo previamente en un pequeño volumen de metanol (Carlo Erba, grado analítico) y luego llevar a volumen con agua tridestilada.

FIGURA N°12

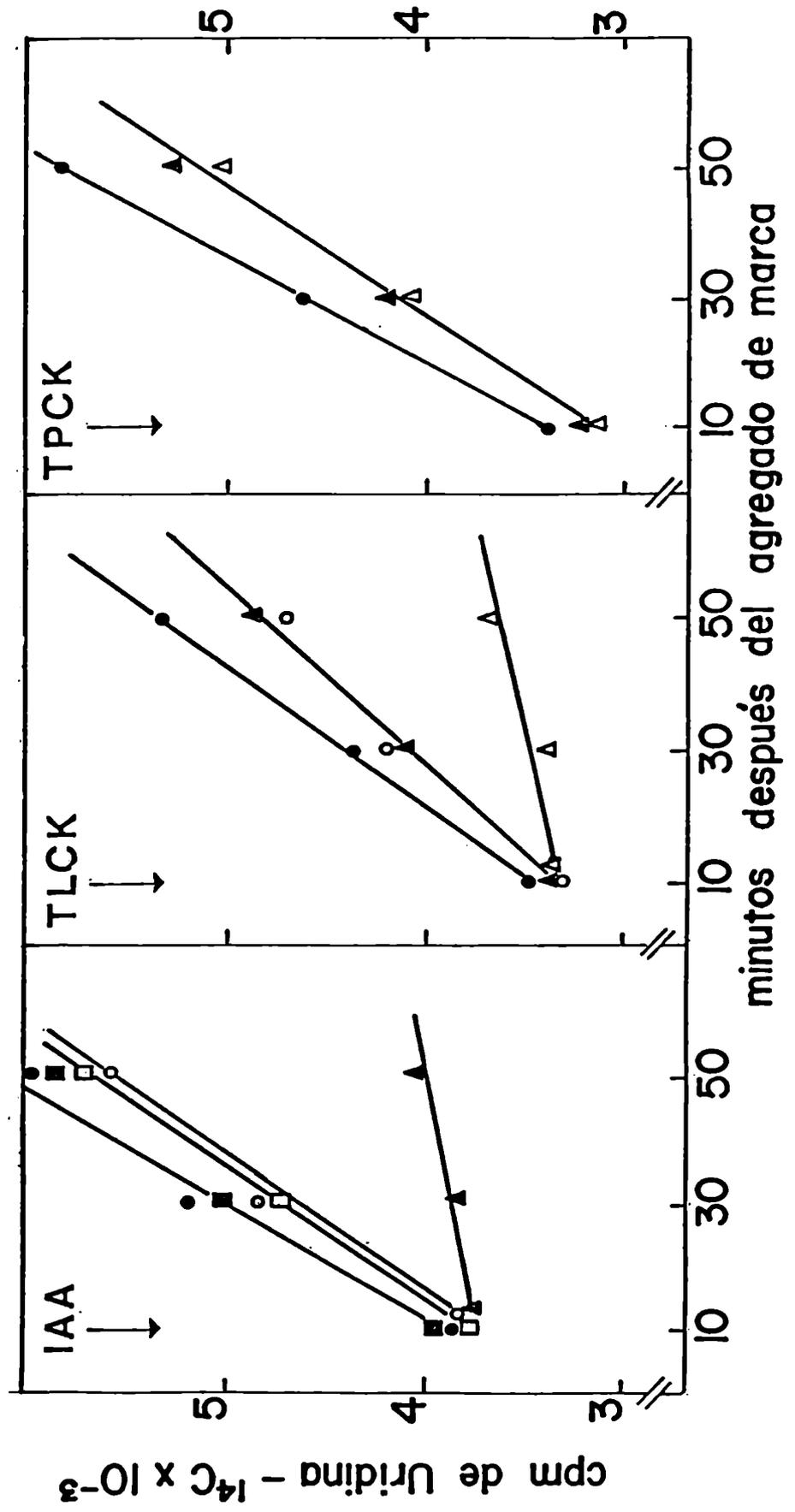


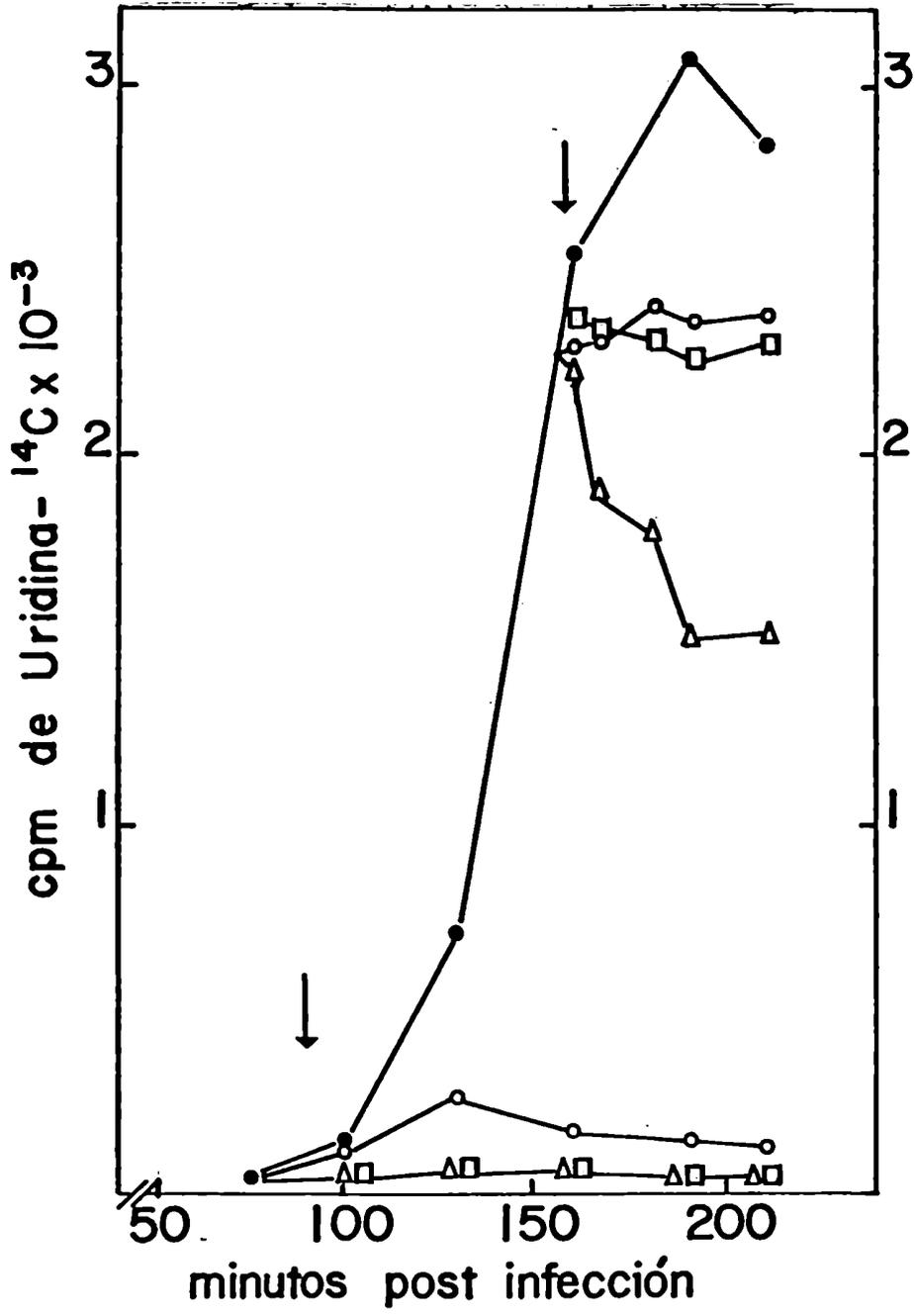
FIGURA N° 13.- EFECTO DEL TPCK, TLCK Y IAA SOBRE LA SINTESIS DE
ARN VIRAL

3×10^7 células BHK-21, clon 13, crecidas en suspensión, se infectaron en las condiciones ya descritas (III.3.-). A los 60 min p.i. se les agregó uridina-¹⁴C (III.3.-). Al cabo de 5 minutos fueron extraídas tres alícuotas iguales de 8×10^6 células del cultivo celular, las cuales recibieron la concentración no tóxica de cada inhibidor en estudio. La incubación continuó hasta los 210 min p.i., extrayéndose muestras a los tiempos indicados en las abscisas de la figura.

A los 155 min p.i., del cultivo celular infectado original se extrajeron otras tres alícuotas iguales, con la misma cantidad de células que las ya citadas, las cuales también fueron puestas en presencia de idénticas concentraciones de los inhibidores. La incubación también se prolongó hasta los 210 min p.i.. Los tiempos correspondientes a la extracción de muestras de las alícuotas se indica en las abscisas de los gráficos.

(o) TLCK 0,1 mM; (Δ) IAA: 0,05 mM; (Δ)TPCK: 0,1 mM; (\bullet) Control.

FIGURA N°13



zinc en la replicación de este virus, se eligieron dos etapas diferentes del ciclo infeccioso para el agregado de los inhibidores proteolíticos. Una al principio (65 min p.i.) y otra hacia el final (165 min p.i.).

De los resultados obtenidos se deduce que las concentraciones usadas de IAA y TLCK dan curvas de inhibición muy similares a las ya obtenidas con 0,15 mM de $ZnCl_2$ (Ver figura 7). Sin embargo, las curvas correspondientes al agregado de TPCK muestran un comportamiento diferente. Como puede apreciarse en la figura 13 concentraciones de 0,1 mM de TPCK inhiben inmediatamente la incorporación del precursor radioactivo y, por ende, la síntesis de ARN viral. Al estudiar el efecto de diferentes concentraciones de los inhibidores proteolíticos sobre la actividad de la replicasa viral se discute la importancia de este dato.

Al igual que con el ión zinc, el grado de inhibición sobre la síntesis del ARN viral provocado por el TLCK y la IAA depende del momento del ciclo infeccioso en el cual eran agregados. Este comportamiento de los inhibidores proteolíticos ya fue citado para el virus de la polio tipo 1 multiplicado en células HeLa. En este virus, tanto el TPCK como la IAA mostraron acción inhibidora sobre la síntesis del ARN viral en función del momenuto del ciclo infeccioso en el cual eran agregados, mientras que el TLCK no mostró efecto alguno sobre la misma (136,396).

En presencia de las concentraciones no tóxicas de TLCK y IAA es posible mantener constante la síntesis de ARN viral aún hasta 50 min después de ser agregados. Este efecto podría ser explicaudo teniendo en cuenta que estos inhibidores, si bien impiden la síntesis de nuevos precursores de la enzima -dado que en las células tratadas nunca se recupera la actividad del control-, tamubién afectarían a las proteasas responsables de llevar a una forma inactiva a la replicasa viral. Este efecto protector permitiría mantener las moléculas de enzima presentes al momento del agregado de los mismos funcionalmente activas, por lo menos, durante 50 min. Esta suposición se ve apoyada por los resultados obtenidos al estudiar el efecto de estas concentraciones de las drogas sobre la actividad de la enzima (IV.2.2.-).

El efecto provocado por las concentraciones no tóxicas de los compuestos TLCK y IAA mostró ser muy similar al observado con concentraciones de 0,15 mM de $ZnCl_2$. Sin embargo, con altas concentraciones de los inhibidores proteolíticos (0,5 mM) se inhibió la actividad de la enzima (Figura 14, partes B y C), mientras que, un aumento de la concentración de los iones zinc (hasta 0,3 mM) no afectó el comportamiento de los mismos (Ver figura 5).

Esta diferencia puede ser explicada teniendo en cuenta que, al utilizar concentraciones de los inhibidores proteolíticos mas altas que las no tóxicas, la síntesis de proteínas celulares se vería afectada y, de esta manera, la provisión de algún factor proteico necesario para mantener la actividad de la replicasa constante. Evidencias en favor de esta hipótesis se muestran en la figura 15 (Ver VI.2.2.).

IV.2.2.- Acción de los inhibidores proteolíticos sobre la actividad de la replicasa viral

Con el fin de establecer si las concentraciones no tóxicas de los inhibidores proteolíticos tenían acción protectora sobre la degradación de las moléculas de la replicasa viral, se estudió el efecto de dos concentraciones de los mismos en la actividad de la enzima. Los resultados son graficados en la figura 14.

Como ya había sido observado al analizar las curvas de inhibición del TPCK sobre la síntesis de ARN viral, esta droga no sólo afecta la síntesis de nuevos precursores de la enzima sino que, además, no permite obtener actividad de replicasa remanente (Figura 14, parte A). Teniendo en cuenta que concentraciones de 0,1 mM de IAA y de TLCK (Figura 14, partes B y C) sí permiten visualizar actividad de replicasa constante en las células infectadas, aún hasta 50 min después del agregado de las mismas, puede deducirse que el comportamiento diferencial de los inhibidores proteolíticos sería producido porque las proteasas que llevan a cabo el proceso de inactivación de la replicasa del virus aftoso muestran actividad de tipo tripsina, ya que su acción estaría inhibida en presencia de TLCK pero no de TPCK.

FIGURA N° 14.- ACTIVIDAD DE REPLICASA VIRAL EN PRESENCIA DE IN-
HIBIDORES PROTEOLITICOS

$2,1 \times 10^7$ células BHK-21, clon 13, crecidas en suspensión e infectadas tal como se indicó en III.3.-, fueron divididas en tres alícuotas iguales de 7×10^6 células. Dos de ellas fueron puestas en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor y la restante quedó como control (●).

Muestras de estas alícuotas se extraen a intervalos de 10 min y se las incuban en presencia de uridina- ^{14}C durante 8 min, según el procedimiento ya descrito en III.6.-.

Las flechas indican el tiempo p.i. en el cual se separaron las alícuotas de 7×10^6 células y se las puso en presencia de:

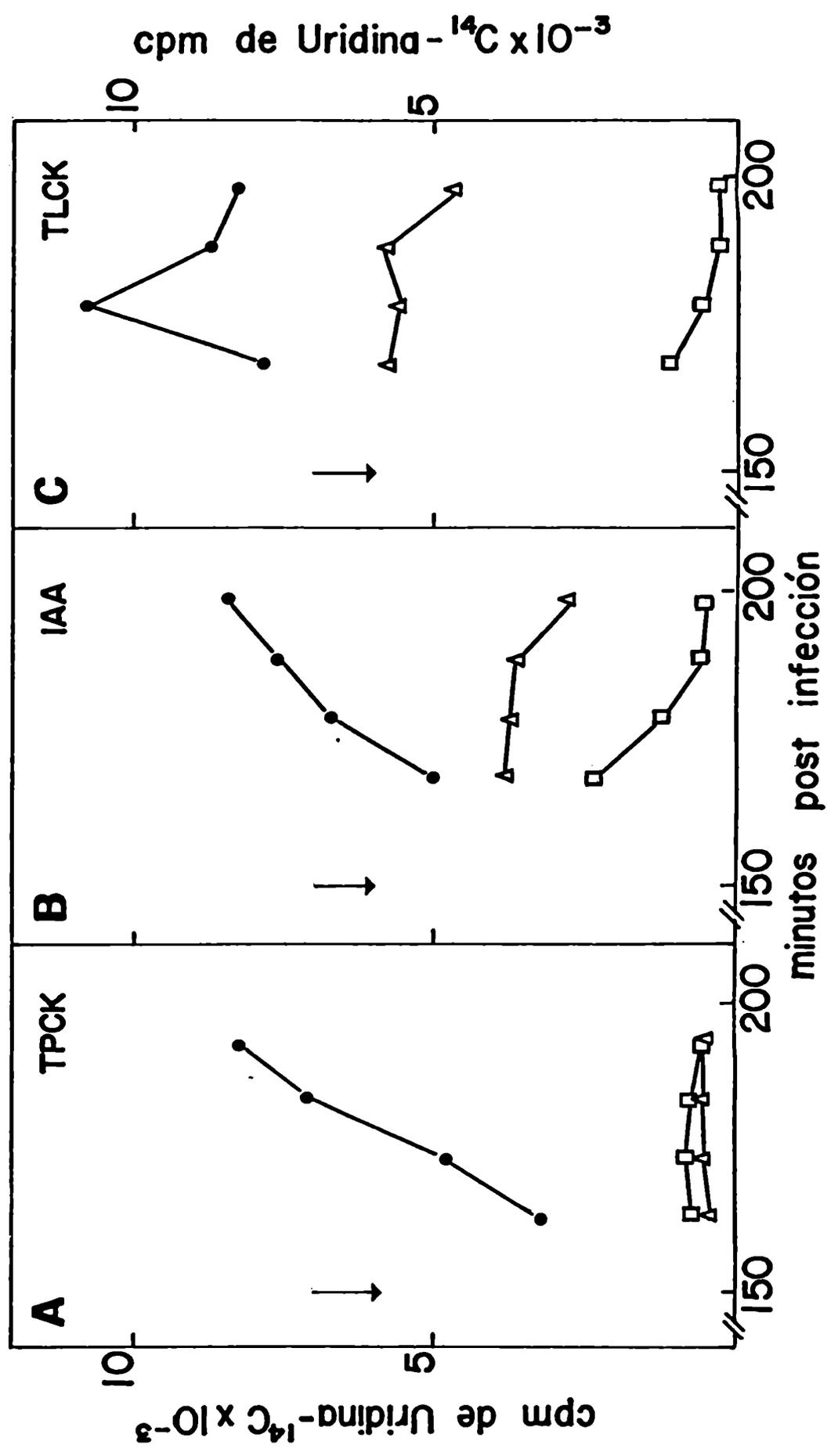
A) TPCK (Δ) 0,1 mM; (□) 0,5 mM;

B) IAA (Δ) 0,05mM; (□) 0,5 mM;

C) TLCK (Δ) 0,1 mM; (□) 0,5 mM;

Los tiempos indicados en las abcisas de los gráficos indican el momento del ciclo infeccioso durante el cual fueron tomadas las muestras ($1,5 \times 10^6$ células) y puestas en contacto con el precursor radioactivo.

FIGURA N° 14



En consecuencia, al no estar protegida de la inactivación las moléculas de replicasa sintetizadas hasta ese momento, las nucleasas presentes en el sistema de cultivo degradarían el ARN a acumulado en las células que recibieron TPCK. Simultáneamente, al estar inhibida la síntesis de nuevas moléculas de enzima, la curva de incorporación de la uridina radioactiva cae con el tiempo.

En cambio, en presencia de TLCK, si bien la síntesis de nuevas moléculas de replicasa también se halla suprimida, las proteasas que inactivan a la enzima viral estarían bloqueadas y, por ende, admitiendo un balance entre la síntesis y la degradación del ARN, puede explicarse el nivel constante de este ácido nucleico en las células que recibieron dicho inhibidor. La hipótesis del balance entre síntesis y degradación de las moléculas de ARN también puede aplicarse a los resultados obtenidos con los iones zinc (Ver figuras 7 y 10).

Con IAA, si bien se observa un efecto similar al provocado por el TLCK, no puede afirmarse cuál es el tipo de actividad inhibida por el mismo ya que su acción no es específica.

Otro dato que también surge de la figura 14 es que concentraciones de 0,5mM de los inhibidores produjeron una reducción en la actividad medible de la enzima. Este efecto se supone está relacionado con el grado de inhibición sobre la síntesis de proteínas celulares causada por estas concentraciones de los mismos, lo cual se discute

En función de los resultados obtenidos en las figuras 13 y 14 pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- 1 - Concentraciones de 0,1 mM de TPCK inhiben la síntesis de ARN ya que afectan sensiblemente la actividad de la replicasa viral. Dicho efecto se produciría por el efecto combinado de: a) inhibición de la síntesis de nuevas moléculas de la enzima; b) no inhibir las enzimas proteolíticas que inactivan a las moléculas de replicasa, Este mismo efecto se obtendría con cualquier concentración de TPCK.

- 2 - Concentraciones de 0,1 mM de TLCK y IAA inhiben la síntesis de nuevos precursores de la enzima, ya que en las células tratadas nunca se recupera la actividad de un control.
- 3 - En presencia de concentraciones de 0,1 mM de TLCK y de IAA se observa actividad de replicasa constante hasta casi 50 min después del agregado de los mismos. Este efecto se debería a que las proteasas encargadas del proceso de inactivación de la enzima se hallarían bloqueadas por este inhibidor.
- 4 - Concentraciones de 0,5 mM de TLCK y de IAA causan una reducción en los niveles de actividad de la replicasa. Este hecho se explicaría teniendo en cuenta que a estas concentraciones de los inhibidores proteolíticos podría estar afectada la maquinaria metabólica celular para la síntesis de proteínas, con lo cual se vería afectada la actividad de replicasa debido a la dependencia de la misma de un factor celular indispensable para mantener su actividad constante. Evidencias en favor de esta hipótesis se basan en lo siguiente:

Korant (269,271,274) estudiando el efecto de las clorometil cetonas y de la iodoacetamida en el virus de la polio, encontró que es posible tener actividad de replicasa constante después del agregado de cicloheximida si, previamente, las células son tratadas con un inhibidor de la actividad proteolítica. Con el objeto de determinar si el comportamiento de la replicasa del virus aftoso era similar a la del virus de la polio, se estudió la actividad de la misma "in vivo" en presencia de concentraciones de 0,1 mM y 0,05 mM de TLCK y IAA, respectivamente. Los resultados se expresan en la figura 15.

Ninguno de los inhibidores proteolíticos usados fueron capaces de mantener la actividad de la replicasa viral una vez agregado el inhibidor de síntesis proteica. Este mismo resultado también se obtuvo aún cuando se aumentaran las concentraciones de dichos inhibidores.

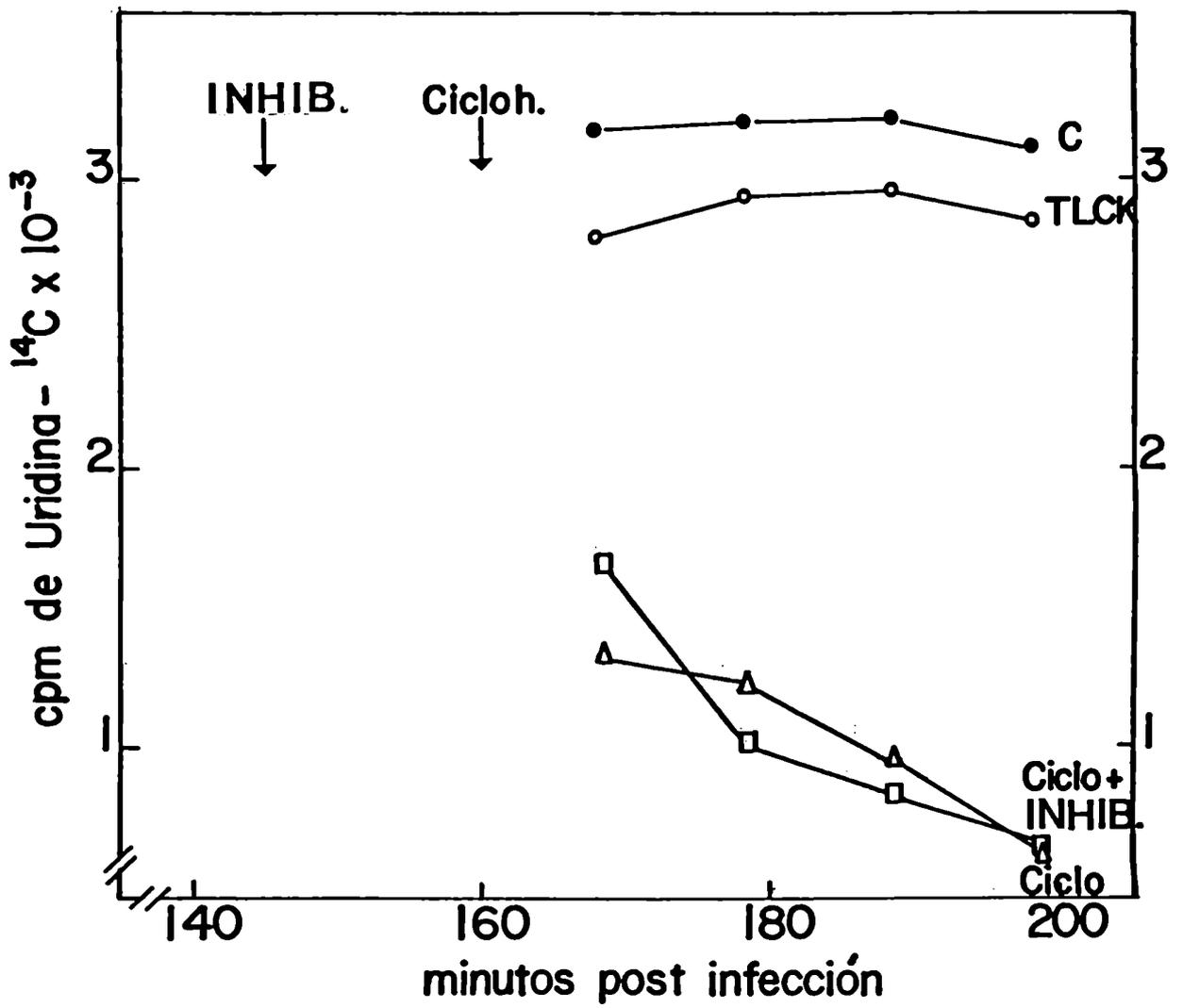
FIGURA N° 15. - EFECTO DEL TLCK EN LA ACTIVIDAD DE LA REPLICASA
VIRAL EN AUSENCIA DE SINTESIS PROTEICA

Células BHK-21 (4×10^7 células) fueron infectadas en las condiciones señaladas en la sección III.3.-. A los 145 min p.i. se las separa en cuatro alícuotas iguales de 10^7 células, dos de las cuales llevan TLCK hasta una concentración de 0,1 mM. Luego de 15 min de incubación, dos de las alícuotas -una de las cuales lleva el inhibidor- se les agrega cicloheximida hasta una concentración de 200 ug/ml. A partir de este momento, se extraen muestras de todas las alícuotas, las que son puestas en presencia de uridina- ^3H durante 8 min y procesadas para visualizar la radioactividad incorporada en cada muestra según se describe en la sección III.6.-.

Las flechas indican el momento del agregado de los inhibidores a las alícuotas.

- (●) Control; (○) TLCK 0,1 mM; (Δ) Cicloheximida 200 ug/ml;
- (□) TLCK y Cicloheximida 0,1 mM y 200 ug/ml, respectivamente.

FIGURA N°15



Por lo tanto, cabe concluir que, a diferencia de lo observado con el virus de la polio, la replicasa del virus aftoso requiere para su funcionamiento algún factor proteico que debe sintetizarse continuamente.

IV.2.3.- Producción de partículas virales en presencia de inhibidores proteolíticos

Puesto que las concentraciones no tóxicas de TLCK y IAA, añadidas después de los 120 min p.i., permiten mantener síntesis de ARN viral constante, se estudió el efecto de estas concentraciones sobre la producción de partículas virales. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 16.

Una conclusión importante de los datos graficados en dicha figura es que, si bien esta concentración de los inhibidores proteolíticos protege a las moléculas de replicasa de la inactivación por proteasas, por otra parte inhiben tanto la síntesis de virus como de procápsides. Este resultado era esperado ya que se había señalado que estas concentraciones de TLCK y de IAA afectan la síntesis de nuevas moléculas de replicasa. En consecuencia, teniendo en cuenta la existencia de un único sitio de iniciación para la síntesis de proteínas, cabía suponer una inhibición similar para el resto de los precursores proteicos del virus aftoso.

Sin embargo, no puede descartarse que la acción inhibidora de estos compuestos sobre la síntesis de partículas virales pueda ser debida, en realidad, a que inhiben el procesamiento proteolítico normal de los precursores proteicos virales, sin afectar por ello, la síntesis de los mismos.

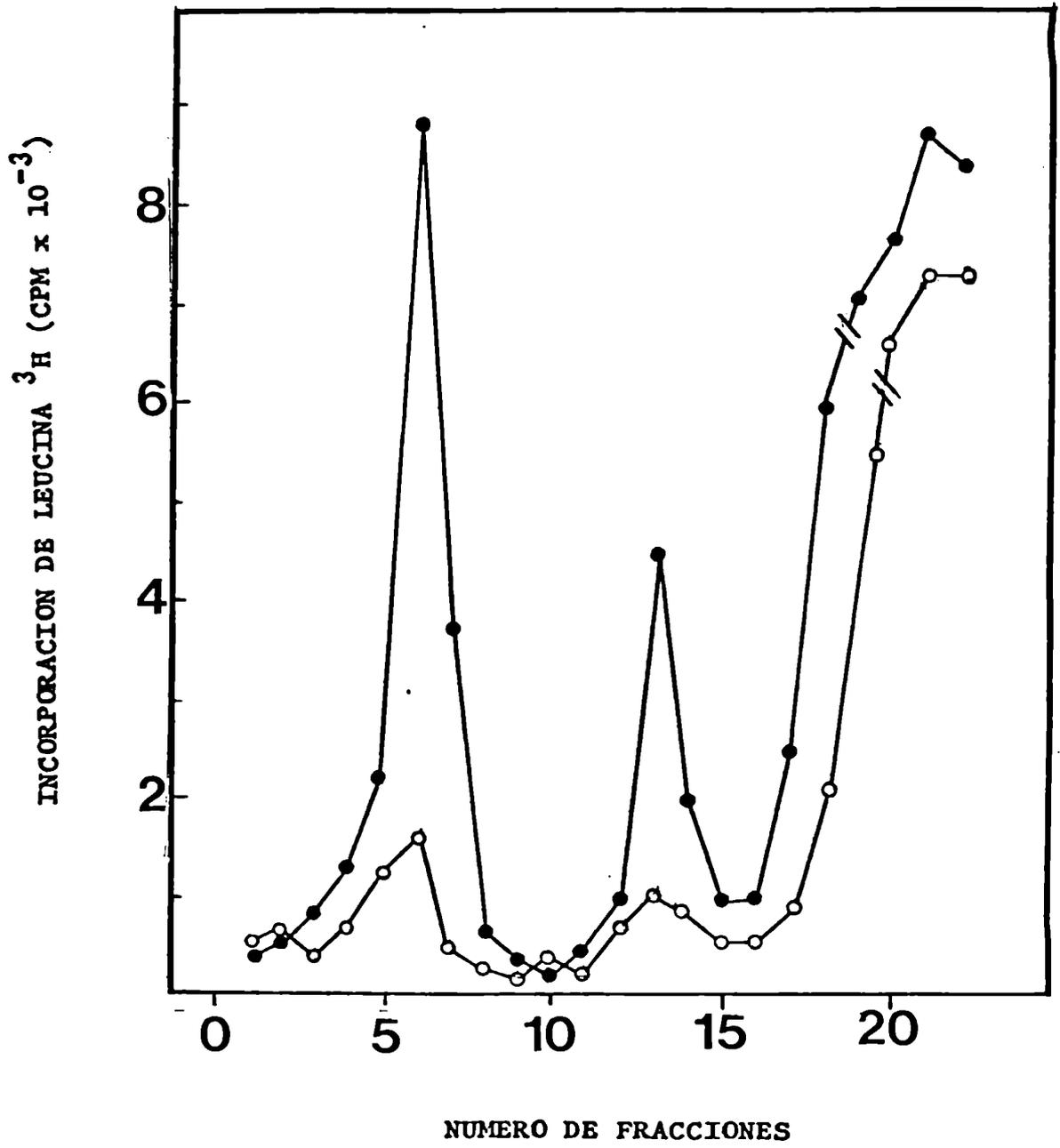
En la búsqueda de evidencias acerca de cuál era el tipo de acción producidas por estas concentraciones de TLCK y IAA sobre el procesamiento proteolítico del virus aftoso, se estudió el efecto de las mismas sobre la síntesis de proteínas, cuyos resultados se indican a continuación.

FIGURA N°16.- PRODUCCION DE PARTICULAS VIRALES EN PRESENCIA DE
TLCK Y IAA

3×10^7 células BHK-21, clon 13, fueron infectadas en las condiciones mencionadas en Materiales y Métodos (III.3.-). A los 175 min p.i. el cultivo celular fue dividido en tres alícuotas iguales, recibiendo dos de ellas las concentraciones no tóxicas de cada inhibidor: 0,1 mM de TLCK y 0,05 mM de IAA, quedando la restante como control.

A los 180 min p.i., se añadió leucina- ^3H por alícuota, continuándose la incubación hasta los 240 min p.i., al cabo de los cuales la suspensión celular fue centrifugada, procesándose el sobrenadante y los extractos citoplasmáticos para ver virus y procápsides, tal como se indica en la leyenda de la figura 3. Al ser el resultado obtenido por ambos inhibidores, prácticamente, el mismo, sólo se ha graficado uno de ellos (o) TLCK. (●) Control.

FIGURA N°16



IV.2.4.- Síntesis de proteínas intracelulares en presencia de inhibidores proteolíticos

El efecto del agregado de las concentraciones no tóxicas de TLCK o IAA sobre la síntesis de proteínas intracelulares producidas por el virus aftoso, fue analizado por medio de la electroforesis en geles de poliacrilamida 10% en SDS. El empleo del dodecil sulfato de sodio en las electroforesis en geles de poliacrilamida ha permitido separar los diferentes polipéptidos de los picornavirus en base a sus PM (312).

En principio, pueden plantearse las siguientes posibilidades respecto de la acción inhibidora de estos compuestos:

- 1) si afectaran la síntesis nascente de los precursores primarios del virus aftoso, el perfil de las proteínas intracelulares virales tendría que mostrar polipéptidos de muy alto PM, tal como aquellos que representaran la traducción completa del ARN mensajero del virus, o sea, la poliproteína;
- 2) si sólo afectara el procesamiento proteolítico normal, el perfil debería presentar polipéptidos de alto PM correspondiente a los precursores primarios no escindidos;
- 3) en cambio, si no afectara ninguno de estos procesos, el perfil de las proteínas intracelulares no debería modificarse respecto del obtenido en idénticas condiciones pero en ausencia de los inhibidores proteolíticos.

Como se demostrará mas adelante, la segunda de estas posibilidades es la que se produciría en las condiciones de experimentación de este trabajo.

Previo al examen de los extractos citoplasmáticos de células infectadas en presencia de los inhibidores proteolíticos, se estudió el perfil de las proteínas intracelulares virales producidas en ausencia de tales compuestos. Los resultados de este experimento se indican en la figura 17. En la misma puede observarse gran cantidad de picos de radioactividad correspondientes a polipéptidos de bajo PM, tal como era de esperarse en condiciones normales de infección. Los precursores primarios son rápidamente escindidos a sus productos mas estables, no detectándose ningún pico viral con PM mayor de 70.000 d.

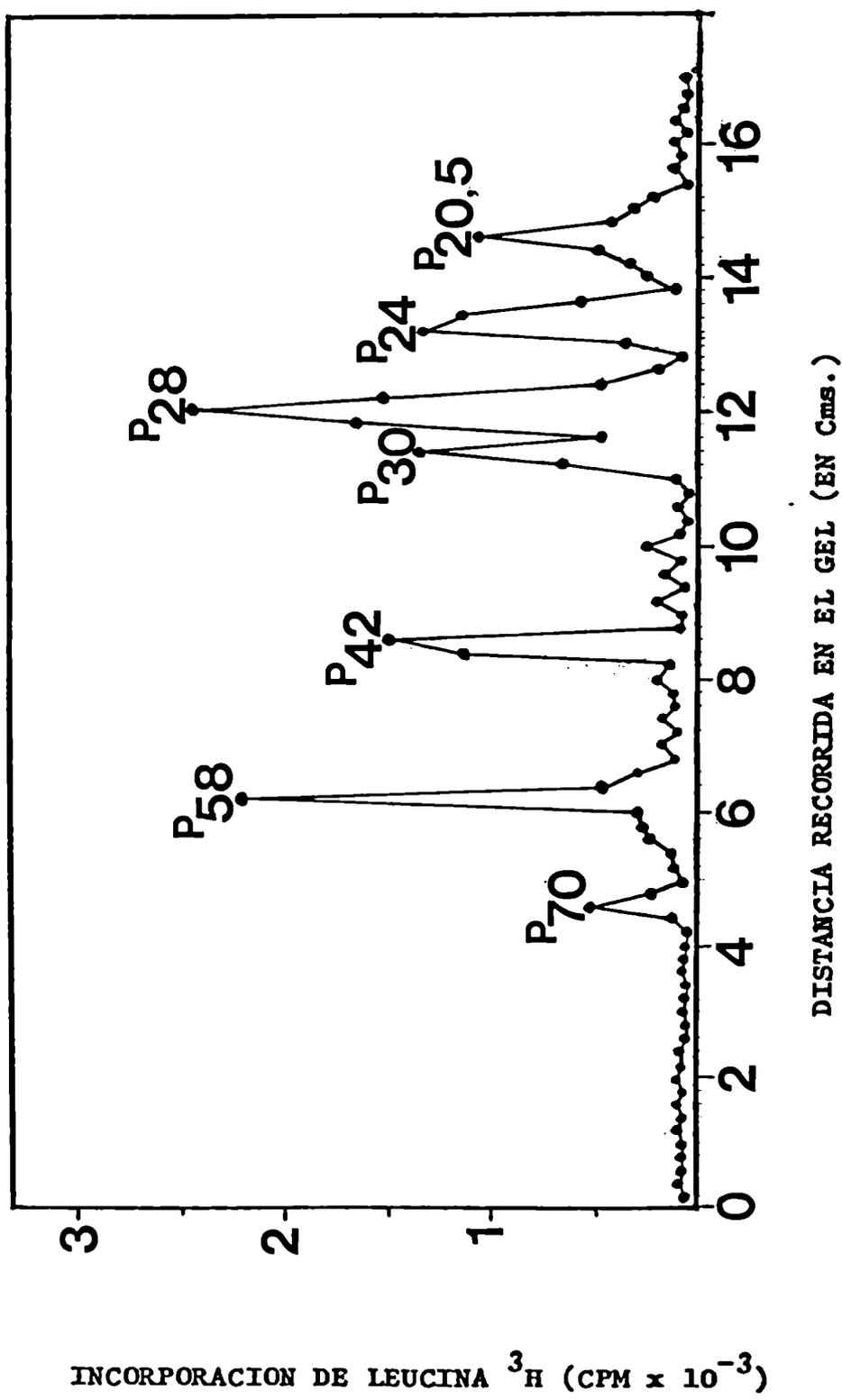
FIGURA N° 17.- PROTEINAS INTRACELULARES DEL VIRUS AFTOSO

Las condiciones de infección, marcación y procesamiento de los extractos citoplasmáticos de este experimento han sido descritos en Materiales y Métodos (III.7.-). La electroforesis en geles de poliacrilamida 10% en SDS en placa para la visualización de las proteínas virales, así como el procesamiento del gel luego de finalizada la corrida electroforética ya han sido descritos (III.8.-).

La nomenclatura usada para la identificación de los picos de proteínas virales ha sido citada en II.2.3.5.-

La determinación de los PM de cada uno de los picos de radioactividad se realizó en base a la metodología ya mencionada en la sección III.9.-.

FIGURA N° 17



Este perfil cambia notablemente cuando el ensayo se repite en presencia de las concentraciones no tóxicas de estos inhibidores. En la figura 18 se muestran los resultados obtenidos en estas condiciones. Puede verse que solamente se detectan tres picos de radioactividad cuyos PM estimados son: 95.500, 88.000 y 59.000 daltons.

Es posible asumir que, en función de la estrecha similitud entre los PM, los picos de radioactividad de 95.500 y 88.000 podrían representar a los precursores primarios p100 y p88 del virus aftoso. El pico de menor PM podría corresponder al precursor primario p52. La diferencia de pesos moleculares puede ser atribuible a las condiciones usadas como así también a las cepas virales y celulares. Esta situación se discute en detalle en la discusión.

En relación a la diferencia observada en la proporción relativa de cada uno de estos picos virales, puede suponerse que las mismas obedecen a una marcación diferencial debida al precursor radioactivo usado.

El uso de inhibidores de proteasas para demostrar la acumulación de especies proteicas de alto PM en células infectadas con picornavirus han dado resultados conflictivos. Por ejemplo, se demostró que en células HeLa infectadas con el virus de la polio tipo 2, el inhibidor de tripsina -TLCK- causaba una inhibición del proceso de escisión de las proteínas inducidas por el virus, pero el TPCK no tenía efecto alguno (269). Otros autores (396, 464) encontraron el resultado opuesto, vale decir, el TPCK pero no el TLCK inhibía la escisión de las proteínas virales en células HeLa infectadas con el virus de la polio tipo 1. En células ascíticas tumorales infectadas con el virus de la encefalomiocarditis ninguno de los dos inhibidores tenía efecto alguno sobre los mecanismos de escisión (157). No ha sido aún resuelto si los datos opuestos obtenidos en las células HeLa en los dos laboratorios fue debida a diferencias en las células, en el virus o en las técnicas experimentales.

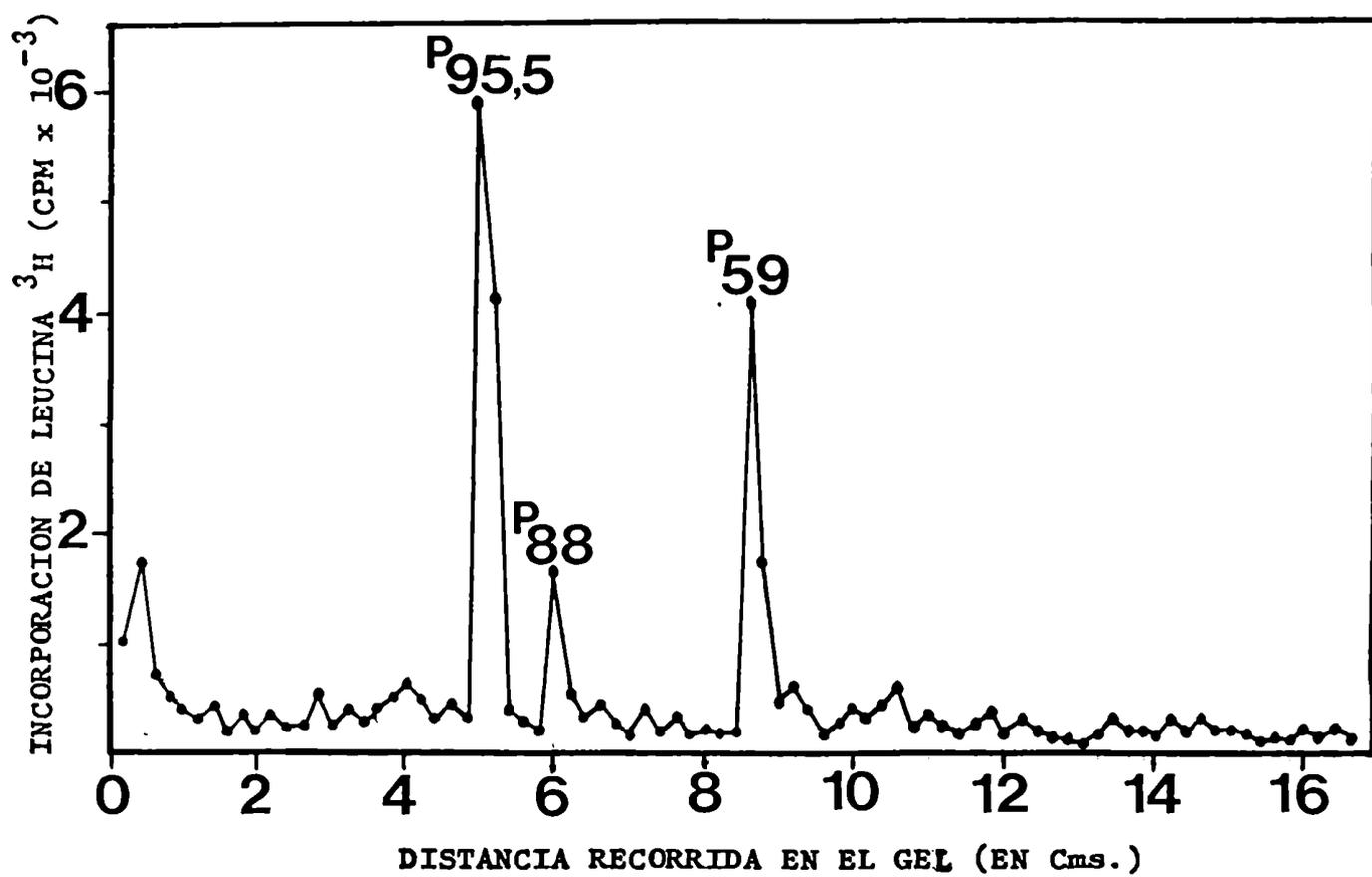
FIGURA N° 18.- PROTEINAS INTRACELULARES DEL VIRUS AFTOSO PRODU-
CIDAS EN PRESENCIA DE INHIBIDORES PROTEOLITICOS

Para este experimento se usaron extractos citoplasmáticos obtenidos en las condiciones ya descritas en la leyenda de la figura 17, con la salvedad del agregado a los 175 min p.i. de las concentraciones no tóxicas de TLCK y de IAA (0,1 mM y 0,05 mM, respectivamente).

El tiempo de corrida a 20 mA y a temperatura ambiente fue de 12 horas con el propósito de mejorar la separación entre los picos radioactivos.

La determinación de los PM de los picos radioactivos así como la nomenclatura usada para los mismos ya ha sido descrita en la leyenda de la figura 17.

FIGURA N°18



V.- DISCUSION

Las primeras hipótesis acerca de la síntesis proteica en picornavirus establecían que se asemejaría al de los bacteriófagos a ARN, tales como QB y R17. El ARN mensajero de estos bacteriófagos está dividido en tres cistrones que codifican para una proteína de maduración, una proteína de la cápside y una polimerasa. Cada uno de estos cistrones tiene sus propias señales de iniciación y terminación (señales de "puntuación" genéticas) y la velocidad de síntesis de cada proteína parece estar controlada por la accesibilidad del ribosoma a cada sitio de iniciación en el ARN viral (504).

Sin embargo, poco después se comprobó que el ARN mensajero de los picornavirus se comporta como el de la mayoría de los ARN mensajeros eucariontes, o sea, es monocistrónico. Es necesario hacer una aclaración al respecto: funcionalmente el ARN de los picornavirus es monocistrónico, ya que da origen a un sólo polipéptido -la poliproteína- pero, estructuralmente, es policistrónico pues lleva codificada la información de varias proteínas no superpuestas. Mas aún, fue propuesto un modelo bicistrónico para explicar la ausencia del polipéptido p31 en la secuencia del polipéptido p210 del virus de la polio (1).

No sólo en este aspecto los picornavirus mostraron diferencias en relación al resto de los organismos conocidos sino que, además, presentaban un mecanismo de procesamiento de sus proteínas muy particular: las proteínas de bajo PM son productos de escisión de precursores proteicos de mayor PM (Ver II.2.3.). Hasta tal punto es usado este proceso que los picornavirus representan uno de los mejores ejemplos de cómo es usada la escisión proteolítica para producir todas las proteínas virales.

A pesar de estas disimilitudes, el mecanismo de síntesis de las macromoléculas de los virus animales es muy similar a las de las células eucarióticas. Tanto la síntesis de proteínas como de los ácidos nucleicos del genoma de los picornavirus depende de la maquinaria metabólica de la célula huésped. Aparentemente, son requeridos los mismos factores de iniciación, elonga-

ción, terminación, ribosomas y metabolitos que utiliza la célula eucariótica para sus procesos biosintéticos.

Por lo tanto, era necesario conocer si la acción de determinadas drogas se llevaba a cabo específicamente, sobre el proceso de multiplicación viral. Dado que los inhibidores usados en este trabajo de tesis habían mostrado cierta toxicidad sobre diversos sistemas celulares, fue necesario determinar, en primer término, cuáles eran las concentraciones de los mismos a las cuales era posible observar una acción directa sobre los procesos en estudio y no un efecto inhibitorio generalizado sobre el metabolismo celular.

Por otra parte, la posibilidad de favorecer una acumulación de partículas vacías implicaba la elección de un agente capaz de impedir el acceso del ácido ribonucleico recién formado a la cápside viral madura (o procápside). Una de estas posibilidades se basaba en la inhibición selectiva de la última etapa del proceso morfogenético del virus aftoso, la escisión de VP0 para dar VP2 y VP4. Como se ha señalado en la introducción, esta etapa se halla asociada con el último de los pasos requeridos para la formación del virión infeccioso. O sea, tanto el procesamiento proteolítico normal hasta dar la partícula vacía, como la síntesis de nuevas moléculas de ARN necesarias para la síntesis de proteínas virales, no deberían estar mayormente afectadas en presencia de dicho agente. La acumulación de partículas vacías debía ser, entonces, una consecuencia inevitable.

La acción de una droga que bloquee el mecanismo de replicación del virus aftoso puede estar dirigida ya sea hacia su sustrato específico, modificándolo de manera tal de no ser reconocido por proteasas que lo escinden, o afectando la conformación tridimensional activa de las enzimas proteolíticas intervinientes. Para este trabajo de tesis se estudió el efecto provocado tanto por una droga del primer tipo -los iones zinc- como así también por inhibidores del segundo tipo -TPCK, TLCK y IAA-.

Para determinar el efecto específico del zinc o de los inhibidores proteolíticos sobre las proteínas virales, se usaron concentraciones de las drogas inocuas para la célula huésped. La no

toxicidad se probó en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Figuras 2 y 12). Una vez halladas estas concentraciones se estudió el efecto de las mismas sobre la síntesis de ARN del virus aftoso.

Los resultados de tales experimentos pronto evidenciaron una acción diferencial de los iones zinc: si bien la síntesis de ARN viral era afectada en gran medida a las concentraciones no tóxicas, la síntesis de proteínas no mostraba este mismo grado de inhibición (Figura 2). Asimismo, el grado de inhibición sobre la síntesis de ARN viral estaba en función de la concentración de inhibidor usada y del momento del ciclo infeccioso en el cual fueran añadidos (Figuras 2 y 7). Los inhibidores proteolíticos -TLCK, TPCK y IAA-, por otra parte, no mostraron acción diferencial como lo habían hecho los iones zinc pero, al igual que éstos, el grado de inhibición sobre la síntesis de ARN viral dependía de la concentración (Figura 12) y del tiempo p.i. en el cual fueran añadidos (Figura 13).

En función de los datos señalados precedentemente, se trató de caracterizar el mecanismo de inhibición producido por estas drogas. Para ello se tomó en cuenta: 1°) la relación entre el grado de inhibición de la multiplicación viral y la concentración de la droga; y 2°) el momento del agregado de la misma.

En relación a la concentración de inhibidor usada, se investigó, en primer término, la acción de diferentes concentraciones de iones zinc sobre la síntesis de partículas infecciosas y procápsides. Si bien concentraciones menores de 0,01 mM de zinc añadidas antes de los 120 min p.i. no mostraban efecto alguno sobre la síntesis de partículas virales, concentraciones entre 0,01 y 0,05 mM evidenciaron una acción diferencial: se inhibía la producción de virus pero no la síntesis de procápsides (Figura 3C). A concentraciones de 0,15 mM de $ZnCl_2$ se encontró acción inhibitoria completa sobre la producción de ambos tipos de partículas virales (Figura 3D).

La concentración de iones zinc requerida para la inhibición completa de la replicación del virus aftoso, es comparable con las concentraciones inhibitorias halladas para otros picornavirus

(87,278,381,416). Mas aún, el tiempo del ciclo infeccioso en el cual es posible encontrar el máximo efecto inhibitorio para esta concentración se aproxima estrechamente con el citado para otro subtipo de virus aftoso (381).

Es de destacar que concentraciones intermedias de iones zinc producen una inhibición selectiva sobre la síntesis de partículas infecciosas respecto de las procápsides.

La acción inhibidora de las concentraciones entre 0,01 y 0,05 mM de los iones zinc cuando se añaden antes de los 120 min p.i., puede ser debida a la alteración de procesos biológicos normales implicados en la replicación del virus. Por lo tanto, se puede considerar la acción de estas concentraciones de la droga tanto a nivel de la morfogénesis viral como de la síntesis de ARN viral.

En relación al primero de estos procesos puede decirse lo siguiente: la existencia natural de procápsides en infecciones del virus aftoso ha sido demostrada (129,405), como asimismo en casi todos los picornavirus (409), al igual que su papel en el proceso de ensamblado del virus (212,252,371-372,518). Puesto que su síntesis no se halla mayormente inhibida en presencia de estas bajas concentraciones de la droga, es de suponer que la síntesis y el procesamiento del precursor de los polipéptidos estructurales tampoco estará afectada.

Si la etapa del proceso morfogenético que lleva a la formación de procápsides no se halla alterada, quedaría por considerar que ocurre en el último paso del proceso de maduración del virus. Como se ha mencionado anteriormente (II.2.3.3.), este paso está mediado por la escisión del precursor VP0 para dar los polipéptidos estructurales estables: VP2 y VP4. Si concentraciones entre 0,01 y 0,05 mM de iones zinc suprimieran esta escisión del precursor, se favorecería la acumulación de procápsides inhibiéndose, en consecuencia, la formación de viriones infecciosos. Sin embargo, esta posibilidad queda descartada, ya que la síntesis de virus tiene lugar aún en presencia de altas concentraciones de iones zinc (Figura 5), resultado comparable con otros obtenidos anteriormente para el virus aftoso (212).

Por otra parte, el grado similar de inhibición entre la síntesis de ARN viral y la producción de viriones infeccioso (Figura 5), sugirió una estrecha relación entre ambos procesos, la cual estaría dada a través del siguiente mecanismo. Bajas concentraciones de iones zinc (entre 0,01 y 0,05 mM) inhiben la síntesis de nuevas moléculas de replicasa viral, lo cual disminuye el número de moléculas de ARN disponibles para ser encapsidadas. Si bien hay procápsides en exceso, éstas no pueden ser utilizadas debido a la escasez de moléculas de ácidos nucleicos disponibles para la encapsidación.

Asimismo, a estas bajas concentraciones de los iones zinc el procesamiento proteolítico normal del virus no se hallaría afectado. Esto es así ya que la formación de procápsides alcanza los niveles de un control sin tratar, lo cual es posible solamente si el procesamiento proteolítico no se halla afectado. Como se recordará (II.2.3.2. y Figura 1), la formación de las procápsides implica la escisión del precursor primario p88, el cual lleva las proteínas estructurales. Esta serie de pasos de escisión (escisiones secundarias, II.2.3.3.) estaría mediada por proteasas de origen viral.

Esta asociación del efecto inhibitorio de los iones zinc sobre la síntesis de ARN viral cuando son añadidos tempranamente en el ciclo infeccioso, guarda una estrecha relación con el tiempo en el cual es detectada actividad de ARN polimerasa viral en células infectadas con el virus aftoso. Una situación similar ya había sido observada al estudiar la cinética de síntesis de proteínas y ARN virales en presencia de otro inhibidor de la replicación del virus aftoso, la guanidina (385). La inhibición de la multiplicación del virus aftoso por la guanidina sólo era posible si el compuesto se hallaba presente entre los 30 y 90 min p.i. (77), o sea, sólo aquella parte del genoma viral que es expresada durante este intervalo de tiempo era sensible o reprimida por la guanidina. Puesto que lo primero que se detecta en las células infectadas es la actividad ARN polimerasa, la acción supresora sobre la replicación viral de la guanidina fue atribuída a que inhibía la síntesis de dicha enzima (52,77). Evidencias en este mismo sentido también fueron informadas para otros picornavirus (38,41,475).

Con el agregado de altas concentraciones de iones zinc (mayores de 0,15 mM) pudo observarse dos efectos (Figura 7): por una parte, se obtuvo actividad de replicasa constante durante, al menos, 50 min después de ser agregados al medio de cultivo y, por otra, la acción inhibidora sobre la síntesis de ARN viral disminuyó a medida que el añadido de la droga se realizó cada vez mas tarde en el ciclo infeccioso.

Al analizar el primero de estos efectos, cabe señalar que, la presencia de los iones zinc impide el proceso de inactivación de las moléculas de enzima ya presentes en el citoplasma de las células infectadas. Por tal motivo, se puede detectar actividad de replicasa constante luego de su agregado. Para corroborar este efecto, se determinó la cinética de actividad de esta enzima durante el ciclo normal de replicación viral (Figura 8), estimándose la vida media de la misma en etapas tempranas y tardías del ciclo infeccioso (Figura 9). Se obtuvo para el primer caso un valor aproximado de 20 min y para el segundo de 7 min. En presencia de los iones zinc este tiempo se incrementó hasta, por lo menos, 50 min (Figura 10). Este resultado confirma que los iones zinc inhiben el proceso de escisión que lleva a una forma inactiva a la replicasa, ya que la vida media de la misma se incrementó de 7 min a 50 min. Al hablar de este mismo efecto en presencia de los inhibidores proteolíticos, se discute la relación existente entre síntesis de proteínas y actividad de la replicasa. De dichas observaciones se deduce que la síntesis de proteínas no se halla afectada en presencia de esta alta concentración de iones zinc.

La acción protectora sobre la inactivación de las moléculas de enzima por los iones zinc, puede deberse a dos causas: o bien la droga inactiva a las proteasas que llevan a cabo el proceso de degradación de la replicasa viral o bien alteran la conformación espacial de la enzima impidiendo su reconocimiento por las proteasas. Esta última posibilidad ya fue señalada para los iones zinc en otros picornavirus. El ión se une a las proteínas modificándolas de manera tal de no ser reconocidas por las proteasas encargadas de llevar a cabo procesos de escisión sobre las mismas (269,278,341).

Asimismo, el hecho que los iones zinc son capaces de mantener actividad de replicasa viral constante es otra prueba mas de que su acción sobre la síntesis de ARN viral se debe a la inhibición de la síntesis de nuevas moléculas de la enzima antes que afectando su actividad. Esto se pudo confirmar teniendo en cuenta los resultados de igual actividad de replicasa frente a diferentes concentraciones de sustrato (Figura 10).

Otro de los efectos observados cuando altas concentraciones de iones zinc (mayores de 0,15 mM) son añadidas durante las últimas etapas del ciclo infeccioso es una reducción en casi el 50% de la cantidad de procápsides (Figura 5). Este resultado puede ser explicado en función de la acción citada para los iones zinc en el resto de los picornavirus, o sea, inhibiendo el procesamiento de los precursores primarios virales, en particular, el correspondiente al de las proteínas estructurales (87,278, 341). Resultados similares también fueron obtenidos para el virus herpes simplex, ya que una concentración 0,1 mM de iones zinc afectaba, principalmente, la síntesis de los polipéptidos virales (217,230) mientras que, concentraciones mayores de 0,2 mM inhibían tanto la producción de virus como la síntesis de ARN viral (440).

En cuanto al segundo de los efectos mencionados, es necesario destacar la importancia del tiempo p.i. en el cual son añadidos los iones zinc. Teniendo en cuenta los resultados graficados en las figuras 2 y 3, concentraciones de la droga mayores de 0,15 mM causan inhibición completa de la replicación del virus añadida antes de los 120 min p.i.. A medida que esta concentración es agregada cada vez mas tarde en el ciclo infeccioso, menor es su acción inhibidora hasta que, cuando se la añade después de los 210 min p.i., ni la síntesis de ARN viral ni la producción de virus es afectada (Figuras 5 y 7).

Este efecto de los iones zinc hacia las etapas finales del ciclo infeccioso también se observa en el porcentaje de inhibición de la actividad de la replicasa del virus aftoso (Figura 10, parte II). A medida que el añadido de la droga se efectúa cada vez mas tarde, el porcentaje de inhibición es menor. Teniendo en cuenta,

además, los datos graficados en la parte I de la misma figura, se deduce que el grado de inhibición de los iones zinc sobre la replicación del virus aftoso, se halla en relación directa con la cantidad de replicasa viral presente al momento del agregado de la misma.

Otras hipótesis que pueden llegar a explicar la falta de inhibición de los iones zinc sobre la síntesis de ARN viral y de partículas infecciosas en esta etapa del ciclo infeccioso son:

1.- En las etapas tardías del ciclo infeccioso podría haber un aumento de la relación sustrato/zinc, debido a la gran acumulación de precursores polipeptídicos. Asimismo, la célula infectada puede haber disminuído su permeabilidad al ión, siendo la concentración efectiva del mismo en el citoplasma celular menor respecto de la encontrada en las etapas tempranas del ciclo infeccioso. Sin embargo, el incremento de la concentración de zinc hasta 0,3 mM no modificó los resultados obtenidos (Figura 5). Concentraciones mas elevadas no pudieron ensayarse pues afectaban el metabolismo celular.

2.- Otra posibilidad a tener en cuenta es la rapidez con la cual los iones zinc actuarían inhibiendo la síntesis de ARN viral y las demás macromoléculas de origen viral. Si bien han sido citados varios trabajos señalando la rapidez del efecto inhi^uidor de esta droga una vez agregada al medio de cultivo (278, 381), fue estudiado el mismo en las condiciones de este trabajo. De los resultados graficados en la figura 6 surge que los iones zinc actúan en forma inmediata.

3.- Otra posibilidad a considerar es la actividad de replicasa remanente, la cual funciona normalmente en presencia de la droga. Como ya se ha mencionado, pudo detectarse actividad de replicasa viral hasta los 50-60 min después de ser agregada la droga (Figura 10).

4.- Para explicar que la síntesis de partículas infecciosas no se halla afectada puede suponerse la existencia de un reservorio de moléculas de ARN las cuales son encapsidadas aún en presencia de la droga. Los datos de las figuras 7 y 10 no descartan

ni afirman esta situación, aunque el hecho de observar actividad de replicasa constante en presencia de los iones zinc parecería señalar una aceptable vía de explicación para entender el resultado observado.

Finalmente, para completar las características sobre los mecanismos de acción de los iones zinc, fue investigado si el efecto inhibitor de altas concentraciones de la droga sobre la síntesis de ARN del virus aftoso era reversible o no. De acuerdo a los datos graficados en la figura 11, se ve que la acción de los mismos es de tipo virustática ya que la replicación del virus se reasume luego del lavado de los iones del medio de cultivo.

Al igual que altas concentraciones de iones zinc, el agregado de las concentraciones no tóxicas de los inhibidores proteolíticos durante las etapas tempranas del ciclo infeccioso (antes de los 120 min p.i.) provocan una inhibición total sobre la síntesis de ARN viral (Figura 13). En cambio, cuando estas mismas concentraciones se añaden al medio de cultivo hacia las etapas finales del ciclo infeccioso (165 min p.i.) el grado de inhibición causado por el TLCK y la IAA sobre la síntesis de ARN viral es menor. Por otra parte, el TPCK causa una inhibición total de la misma en cualquiera de estos momentos del ciclo infeccioso (Figura 13).

Comparando estos resultados se deduce que, al igual que para los iones zinc, los inhibidores proteolíticos afectan también la formación de nuevas moléculas de la replicasa viral. Cuando una cierta cantidad de la enzima ya se halla presente en el medio de cultivo -como es el caso a medida que nos acercamos a las etapas finales del ciclo infeccioso- la inhibición es menos evidente (Figura 13).

Un dato interesante que también surge del análisis de los datos graficados en dicha figura, es que tanto el TLCK como la IAA permiten mantener actividad de replicasa constante hasta casi 50 min después de ser agregados al medio de cultivo. En esta etapa de la infección viral el tiempo de vida media de la enzima fue estimado en, aproximadamente, 7 min (Figura 9). Este efecto

para el mismo intervalo del ciclo infeccioso, fue señalado para altas concentraciones de iones zinc. Sin embargo, en aquél caso no fue posible inferir nada acerca del tipo de actividad proteolítica involucrada en la inactivación de la replicasa viral.

Con los resultados obtenidos con TLCK puede decirse que la(s) proteasa(s) implicada en este proceso muestra una actividad de tipo tripsina. Esta suposición se ve corroborada por el hecho que el TPCK -inhibidor de enzimas con actividad de tipo quimiotripsina- no muestra efecto protector alguno sobre la actividad de la enzima (Figuras 13 y 14 A). La IAA, aunque no es un inhibidor proteolítico de la especificidad de las clorometil cetonas, también produce actividad de replicasa constante por un período similar al citado para el TLCK (Figura 13). Por lo tanto, la(s) proteasa(s) involucrada en este proceso presenta, además, grupos sulfidrilos expuestos en su sitio activo.

Un análisis mas profundo en relación a las concentraciones de TLCK y IAA necesarias para mantener actividad de replicasa constante, puso en evidencia que cuando se agregan altas concentraciones de estos inhibidores (0,5 mM) se observa un decaimiento en la actividad medible de la replicasa (Figura 14, B y C). Este resultado puede ser explicado por lo siguiente: elevadas concentraciones de estos compuestos causan inhibición en la síntesis de proteínas celulares (157,269,401,464). Puesto que la replicasa necesita de la síntesis continua de proteínas (Ver discusión de la figura 15 a continuación), la presencia de estas concentraciones de los inhibidores proteolíticos impiden el normal abastecimiento de algún factor proteico necesario para mantener la actividad de la misma.

La relación existente entre síntesis continua de proteínas y actividad de la replicasa del virus aftoso, se puso de manifiesto por el agregado de cicloheximida en células infectadas tratadas previamente con TLCK (Figura 15). No es posible obtener actividad de replicasa constante si se halla inhibida la síntesis de proteínas, aún cuando las proteasas que llevan a la forma inactiva de la enzima se hallan bloqueadas por la concentración no tóxica de TLCK.

Este resultado contrasta notoriamente con el obtenido por Korrant en el virus de la polio usando TPCK o IAA (269,271,274). En este virus, si las células infectadas son tratadas previamente con el inhibidor proteolítico antes del añadido de cicloheximida, la actividad de la replicasa se mantiene constante.

La dependencia de la actividad de la replicasa del virus aftoso de factores provistos por la síntesis de proteínas de la célula huésped es un fenómeno bien caracterizado para varios tipos de virus, como por ejemplo: las replicasas de los bacteriófagos a ARN (57,176,259,282) y de algunos picornavirus, tales como mengovirus (303), virus de la encefalomiocarditis (150,477), rinovirus (345) y el virus de la polio (138,140-141,344).

En el virus de la polio no era posible recuperar actividad de replicasa cuando la enzima se purificaba en forma exhaustiva (139,184,186). Si se le agregaba el medio de lavado de alto contenido salino de ribosomas procedentes de células HeLa no infectadas, se reconstituía completamente la actividad. Este factor parece tener un importante papel en la fase de iniciación de la reacción de copiado del ARN y no parece ser alguno de los factores conocidos de iniciación y elongación celulares (140).

Puesto que en presencia de las concentraciones no tóxicas de TLCK y la IAA, agregadas durante las etapas finales del ciclo infeccioso (Figura 13), se obtenía una cinética de síntesis de ARN viral constante, se estudió cuál era el efecto de las mismas sobre la síntesis de virus y procápsides. Los resultados mostraron una completa inhibición en la producción de ambas partículas virales (Figura 16). Puesto que estas concentraciones de los inhibidores habían mostrado un efecto supresor sobre la síntesis de nuevas moléculas de replicasa viral (Figuras 13 y 14), se investigó si las mismas concentraciones afectaban también el procesamiento proteolítico normal.

Los resultados (Figura 18) mostraron la acumulación de tres productos proteicos de alto PM, los cuales, en base a la estimación de sus pesos moleculares en estas condiciones de experimentación, serían los correspondientes al precursor de las proteínas estructurales del virus aftoso (p88) y al precursor que contiene a la replicasa viral (p100). Surge alguna dificultad en a-

signar el origen del tercer polipéptido (p59) ya que, de tratarse del precursor que corresponde a la región intermedia del ARN (Ver Figura 1), debería tener un PM cercano a los 52.000 d, según se deduce de los datos publicados.

Estos resultados confirman que el efecto de los compuestos proteolíticos es alterar los procesos de escisión secundarios de las proteínas del virus aftoso, lo cual concuerda con los obtenidos en el virus de la polio usando este mismo tipo de inhibidores (270).

Una de las hipótesis para explicar la discrepancia entre los pesos moleculares es considerar que el pico de 59.000 d estaría compuesto, en realidad, por dos picos superpuestos: uno correspondiente a 52.000 d y otro por un pico de 56.000 d correspondiente al antígeno VIA (la forma inactiva de la replicasa viral (343)). En las condiciones de corrida en geles de 10% de acrilamida usada para estos experimentos no ha podido ser resuelto en sus componentes. Otras hipótesis que pueden ser consideradas como probables son:

- a) p59 y p52 serían exactamente el mismo polipéptido y las diferencias en sus pesos moleculares se debería a las condiciones particulares de experimentación, a la cepa viral y/o a la línea celular usada (53,87,160,204,469,503);
- b) la presencia de los inhibidores proteolíticos podría provocar patrones de escisión alterados, lo cual llevaría a obtener precursores proteicos de pesos moleculares algo diferentes de los esperados (269);

Es interesante destacar que, si bien se acumulan precursores de alto PM en presencia de TLCK o de IAA, el procesamiento de los mismos se hallaría totalmente inhibido. Esta hipótesis se ve avalada por el hecho que no se observan productos proteicos de bajo PM (Figura 18). y se inhibe el proceso de maduración del virus (Figura 16). Este resultado contrasta con el informado por Black en 1975 (51), quien trabajando con una cepa tipo 0 del virus aftoso en células BHK-21, no pudo detectar inhibición del procesamiento de las proteínas inducidas por el virus, ya sea en presencia de TPCK o TLCK. Un resultado similar se obtuvo usando trasilol (aprotinina) otro inhibidor proteolítico (416).

La discusión de los resultados obtenidos permite concluir que: Si bien fue posible hallar una concentración de iones zinc capaz de concentrar procápsides no permitió, sin embargo, inhibir totalmente la producción de partículas infecciosas. Además, pequeñas diferencias en las concentraciones de la droga hacían cambiar notablemente los efectos observados. Con los inhibidores proteolíticos no hubo síntesis de partículas virales. En lo que se refiere a afectar en forma exclusiva la escisión de VP0, no fue posible con las concentraciones y tipo de inhibidores usados en este trabajo de tesis.

Hubo una inhibición de la replicación viral acentuada al comienzo del ciclo infeccioso, la cual disminuía hacia el final del mismo. Fue posible hallar una correlación entre inhibición de la replicación viral y la inhibición en la síntesis de ARN. Tanto los iones zinc como las concentraciones no tóxicas de TLCK y IAA y cualquier concentración de TPCK inhibían la síntesis de nuevas moléculas de replicasa viral. Cabe señalar que el efecto de las bajas concentraciones de iones zinc sobre la actividad de la replicasa viral en particular, no había sido señalado precedentemente para el virus aftoso.

En presencia de iones zinc y las concentraciones no tóxicas de TLCK y IAA la vida media de la replicasa del virus aftoso se incrementa apreciablemente. De acuerdo a los datos ya publicados y a los resultados obtenidos en este trabajo, los iones zinc se unirían a la enzima alterando la conformación de la misma impidiendo ser reconocida por las proteasas que llevan a su inactivación, mientras que los otros inhibidores actuarían bloqueando directamente a las enzimas proteolíticas, las cuales muestran actividad tipo tripsina.

Es necesaria la síntesis continua de proteínas para poder observar actividad de replicasa viral, aún en presencia de TLCK que inhibe la actividad proteolítica. Esto indica la necesidad del aprovisionamiento continuo de un factor celular para que la replicasa viral muestre actividad sintetizadora de ARN.

VI.- BIBLIOGRAFIA

- 1 - ABRAHAM, G. y P.D. Cooper (1975). Poliovirus polypeptides in more detail. J. gen. Virol. 29:199-213.
- 2 - ABRAHAM, G. y P.D. Cooper (1975). Relations between polio virus polypeptides as shown by tryptic peptide analysis. J. gen. Virol. 29:215-221.
- 3 - ABREU MARTINS, I. (1971). Vacunas antiaftosas hidróxisapoinadas inactivadas por el formol. Boletín Ctro. Panam. Fiebre Aftosa 1:1-20.
- 4 - ADAM, K.H. y K. Strohmaier (1974). Isolation of the coat proteins of FMDV and analysis of the composition of N-terminal and groups. Biochem. Biophys. Res. Commun. 61:185-192.
- 5 - ALIPERTI, G. y M.J. Schlesinger (1978). Evidence for an autoprotease activity of Sinbis virus capsid protein. Virol. 90:366-369.
- 6 - ALLFREY, V.G., R. Faulkner y A.E. Mirsky (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 51:786-794.
- 7 - ALONSO FERNANDEZ, A., P. Augé de Mello y K.E. Federer (1973). Diagnóstico y referencia en la fiebre aftosa. Boletín Ctro. Panam. Fiebre Aftosa 11:1-12.
- 8 - ANDERER, F.A. (1963). Preparation and properties of an artificial antigen immunologically related to tobacco mosaic virus. Biochim. Biophys. Acta 71:246-248.
- 9 - ARAMBULO, P.V. y H.H. Steele (1977). A review of the natural history of foot-and-mouth disease. Philippine J. Vet. Med. 16:128.
- 10 - ARLINGHAUS, R.B. y J. Polatnick (1967). Detergent-solubilized RNA polymerase from cells infected with foot-and-mouth disease virus. Science 158:1320-1322.
- 11 - ARLINGHAUS, R.B. y J. Polatnick (1969). The isolation of two enzyme-ribonucleic acid complexes involved in the synthesis of foot-and-mouth disease virus ribonucleic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 62:821-828.
- 12 - ARMSTRONG, J.A., M. Edmonds, H. Nakazato, B.S. Phillips y M.H. Vaughan (1972). Polyadenylic acid sequences in the virion RNA of poliovirus and Eastern equine encephalitis virus. Science 176:526-528.
- 13 - ARNON, R. (1975). Enzyme inhibition by antibodies en "Karolinska Symposium on Res. Meth. Reproduc. Endocr. 7th. Symp". Acta Endocrinol. 78, Supl. 194:133-153.
- 14 - ATA, F.A. (1982). Studies on the enzootic nature of foot-and-mouth disease in Kuwait. J. Egypt. vet. med. Assoc. 42:107-116.

- 15 - AUDIBERT, F., M. Jolivet, L. Chedid, J.E. Alouf, P. Boquet P. Rivaille y O. Siffert (1981). Active antitoxic immunization by a diphtheria toxin synthetic oligopeptide. *Nature* 289:593-594.
- 16 - BACHRACH, H.L. (1952). The determination of the sedimentation constant of a homogeneous component having the characteristics of the FMDV. *Am. J. Vet. Res.* 13:13-16.
- 17 - BACHRACH, H.L. (1968). Foot-and-Mouth Disease en "Annual Review of Microbiology", E.D. Clifton ed., vol. 22, págs. 201-244, Annual Reviews, Palo Alto, California.
- 18 - BACHRACH, H.L. (1977). Foot-and-mouth disease virus: properties, molecular biology and immunogenicity. *Virology in Agriculture, Proceedings of the Beltsville Symposium on Agricultural Research* 1:3-32.
- 19 - BACHRACH, H.L. y S.S. Breese, Jr. (1958). Purification and electron microscopy of foot-and-mouth disease virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 97:659-665.
- 20 - BACHRACH, H.L., R. Trautman y S.S. Breese, Jr. (1964). Chemical and physical properties of virtually pure FMDV. *Am. J. Vet. Res.* 25:333-342.
- 21 - BACHRACH, H.L., J.B. Swaney y G.F. Vande Woude (1973). Isolation of the structural polypeptides of foot-and-mouth disease virus and analysis of the C-terminal sequences. *Viol.* 52:520-528.
- 22 - BACHRACH, H.L. y L. Benchetrit (1974). Studies on phage internal proteins. II. Cleavage of a precursor of internal proteins during the morphogenesis of bacteriophage T4. *Viol.* 59:51-58.
- 23 - BACHRACH, H.L., D.M. Moore, P.D. McKercher y J. Polatnick (1975). Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus. *J. gen. Immunol.* 115:1636-1641.
- 24 - BACHRACH, H.L., D.M. Moore, P.D. McKercher y J. Polatnick (1978). An experimental protein vaccine for foot-and-mouth disease en "Perspectives in Virology", vol. 10, págs. 147-159, M. Pollard ed., Raven Press, New York.
- 25 - BACHRACH, H.L., D.O. Morgan y D.M. Moore (1979). Foot-and-mouth disease virus immunogenic capsid protein VPT:N-terminal sequences and immunogenic peptides obtained by CNBr and tryptic cleavages. *Interv.* 12:65-72.
- 26 - BACHRACH, H.L., D.O. Morgan, P.D. McKercher, D.M. Moore y B.H. Robertson (1982). Foot-and-mouth disease virus: immunogenicity and structure of fragments derived from capsid protein VP3 and of virus containing cleaved VP3. *Vet. Microb.* 7:85-96.
- 27 - BAHNEMANN, H.G. (1973). The inactivation of foot-and-mouth disease virus by ethyleneimine and propyleneimine. *Zentralblatt für Veterinarien und Medicin Bakteriologie* 20:356-360.

- 28 - BAHNEMANN, H.G. (1975). Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. Arch. Virol. 47:47-56.
- 29 - BAHNEMANN, H.G., P. Augé de Mello, D. Abaracón y I. Gomez (1974). Immunogenicity in cattle of foot-and-mouth disease vaccines inactivated with binary ethylenimine. Bull. Off. int. Epizoot. 81:1335-1343.
- 30 - BALLESTRINI, J., C. Bernal, J.M. Jimenes, A. Maldonado, J. M. Castañeda y G. Gómez (1976). Ultimas observaciones sobre el comportamiento de las vacunas a virus vivo contra la fiebre aftosa en Venezuela. Vet. Trop. 1:3-14.
- 31 - BALTIMORE, D. (1964). "In vitro" synthesis of viral RNA by the poliovirus RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 51:450-456.
- 32 - BALTIMORE, D. (1968). Structure of the poliovirus replicative intermediate RNA. J. Mol. Biol. 32:359-368.
- 33 - BALTIMORE, D. (1969). The replication of Picornaviruses en "The Biochemistry of Viruses", H.B. Levy ed., págs. 101-176, Marcel Dekker, New York.
- 34 - BALTIMORE, D. (1971). Viral genetic systems. Trans. New York Acad. Sci. 33:327-332.
- 35 - BALTIMORE, D. (1971). Expression of animal virus genomes. Bact. Rev. 35:235-241.
- 36 - BALTIMORE, D. (1971). Polio is not dead en "From molecules to man", Perspectives in Virology, vol. VII, págs.1-14 M. Pollard ed., Academic Press, New York.
- 37 - BALTIMORE, D. y R.M. Franklin (1962). Preliminary data on a virus-specific enzyme system responsible for the synthesis of viral RNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 9: 388-392.
- 38 - BALTIMORE, D., H.J. Eggers, R.M. Franklin y I. Tamm (1963). Poliovirus induced RNA polymerase and the effects of virus-specific inhibitors on its production. Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 49:843-849.
- 39 - BALTIMORE, D. y R.M. Franklin (1963). A new ribonucleic acid polymerasa appearing after mengovirus infection of L-cells. J. Biol. Chem. 238:3395-3400.
- 40 - BALTIMORE, D. y M. Girard (1966). An intermediate in the synthesis of poliovirus RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 56:741-748.
- 41 - BALTIMORE, D., M. Girard y J.E. Darnell (1966). Aspects of the synthesis of poliovirus RNA and the formation of virus particles. Virol. 29:179-189.
- 42 - BARTELING, S.J., R.H. Melen, F. Wagenaar y A.L.J. Giekens (1979). Isolation and characterization of trypsin-resistance O₁ variants of foot-and-mouth disease virus. J. gen.Virol. 43:383-393.

- 43 - BARTTLEY, H. y R. Chalkley (1970). Further studies on a thymus nucleohistone-associated protease. *J. Biol. Chem.* 245:4286-4292.
- 44 - BAUER, K. (1970). The inactivation of foot-and-mouth disease virus by ethylethyleneimine and the use of the inactivated virus in the preparation of vaccines. *Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitkde I* 213:285-297.
- 45 - BEACHEY, E.H., J.M. Seyer, J.B. Dale, W.A. Simpson y A.H. Kang (1981). Type-specific protective immunity evoked by synthetic peptide of *Streptococcus pyogenes* M protein. *Nature* 292:457-459.
- 46 - BEALE, J. (1982). Synthetic peptides as the basis for future vaccines. *Nature* 298:14-15.
- 47 - BERNARD, S., J. Wantyghem, J. Grosclaude y J. Laporte (1974). Chromatographic preparation of purified structural proteins from foot-and-mouth disease virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58:624-632.
- 48 - BERNARD, S., J. Grosclaude, Ph. Adamowicz y J. Guerche (1977). Comparaison des pouvoirs immunogenes de preparations purifiees de virus de la Fievre Aphteuse (type 0) a teneurs controlees en proteine externe VP1. *Ann. Rech. Vet.* 8:79-94.
- 49 - BISHOP, J.M., G. Koch, B. Evans y M. Merriman (1969). Poliovirus replicative intermediate structural basis of infectivity. *J. Mol. Biol.* 46:235-249.
- 50 - BITTLE, J.L., R.A. Houghten, H. Alexander, T.M. Shinnick, J.G. Sutcliffe y R.A. Lerner (1982). Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* 298:30-33.
- 51 - BLACK, D.N. (1975). Proteins induced in BHK cells by infection with foot-and-mouth disease virus. *J. gen. Virol.* 26:109-119.
- 52 - BLACK, D.N. y F. Brown (1969). Effect of actinomycin D and guanidine on the formation of a ribonucleic acid polymerase induced by foot-and-mouth disease virus and on the replication of virus and viral ribonucleic acid. *Biochem. J.* 112:317-322.
- 53 - BLACK, D.N. y B.O. Underwood (1970). Protein synthesis in BHK-21 cells infected with FMDV. *J. gen. Virol.* 5:553-556.
- 54 - BLACK, D.N., P. Stephenson, D.J. Rowlands y F. Brown (1979). Sequence and location of the poly C tract in aphto- and cardiovirus RNA. *Nucleic Acids Res.* 6:2381-2392.
- 55 - BLACKWELL, J.H. (1980). Internationalism and survival of foot-and-mouth disease virus in cattle and food products en "Symposium:International Challenges and perspectives". *J. Dairy Science* 63:1019-1030.

- 56 - BLONDEL, B. y R. Crainic (1981). Relations entre la structure et les propriétés antigéniques des Picornavirus. Bull. Inst. Pasteur 79:79-97.
- 57 - BLUMENTHAL, T. y G.G. Carmichael (1979). RNA replication: function and structure of QB-replicase. Ann. Rev. Biochem. 48:525-548.
- 58 - BOOTHROYD, J.C., P.E. Highfield, G.A.M. Cross, D.J. Rowlands, P.A. Lowe, F. Brown y T.J.R. Harris (1981). Molecular cloning of foot-and-mouth disease virus genome and nucleotide sequences in the structural protein genes. Nature 290:800-802.
- 59 - BOOTHROYD, J.C., T.J.R. Harris, D.J. Rowlands y P.A. Lowe (1982). The nucleotide sequence of cDNA coding for the structural proteins of foot-and-mouth disease virus. Gene 17:153-161.
- 60 - BORGHI, G., G. Galiardi y R. Zoletto (1965). Antigenicity of foot-and-mouth disease virus inactivated by blice-aldehyde. Atti. Soc. ital. Sci. vet. 19:754-757.
- 61 - BORSELLA, J. (1981). Influencia de la fiebre aftosa en el comercio mundial de carnes. Gac. Vet. 48:1006-1011.
- 62 - BRACHA, M. y M.J. Schlesinger (1976). Inhibition of Sinbdis virus replication by zinc ions. Virology 72:272-277.
- 63 - BRADISH, C.J., W.M. Henderson y J.B. Kerkham (1960). Concentration and electron microscopy of the characteristic particle of foot-and-mouth disease. J. gen. Microbiol. 22:379-391.
- 64 - BREESE, S.S. Jr., R. Trautman y H. Bachrach (1960). Analysis by electron microscopy and infectivity of FMDV in moving-boundary and zone ultracentrifugation. Arch. Biochem. Biophys. 87:1-8.
- 65 - BREINDL, M. (1971). VP₄, the D-reactive part of poliovirus. Virology 46:962-964.
- 66 - BROOKSBY, J.B. (1957). Variants and immunity. Definition for serological investigation. Int. Symp. Foot-and-Mouth disease, Lyon. Symp. Ser. Immunobio. Stand. Karger, Basel, vol. 8, págs. 1-10.
- 67 - BROOKSBY, J.B. (1958). The virus of foot-and-mouth disease. Advan. Virus Res. 5:1-37.
- 68 - BROOKSBY, J.B. (1967). Foot-and-Mouth Disease. A World problem. Nature 213:120-122.
- 69 - BROOKSBY, J.B. (1968). Immunobiological standardization. International Symposium on Foot-and-Mouth Disease: Variants and immunity. Institut Francais de la Fièvre Aftreuse (IFFA), Lyon, vol. 8, págs. 13-14 y 169-170.
- 70 - BROOKSBY, J.B. (1981). Tracing outbreaks of foot-and-mouth disease. Nature 293:431-432.
- 71 - BROWN, F. y J. Crick (1959). Application of agar-gel diffusion analysis to a study of the antigenic structure of inactivated vaccines prepared from the virus foot-and-mouth disease. J. Immunol. 82:444-447.

- 72 - BROWN, F. y B. Cartwright (1961). Dissociation of foot-and-mouth disease virus into its nucleic acid and protein components. *Nature* 192:1163.
- 73 - BROWN, F. y J.F.E. Newman (1963). "In vitro" measurements of the potency of inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg., (Camb.)* 61:345-351.
- 74 - BROWN, F., N.St. G. Hyslop, J. Crick y A.W. Morrow (1963). The use of acetyleneimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg., (Camb.)* 61:337-344.
- 75 - BROWN, F., B. Cartwright y D.L. Stewart (1963). The effect of various inactivating agents on the viral and the ribonucleic acid infectivities of foot-and-mouth disease virus and on its attachment to susceptible cells. *J. gen. Microb.* 31:179-186.
- 76 - BROWN, F. y B. Cartwright (1964). Virus specific ribonucleic acids in baby hamster kidney cells infected with foot-and-mouth disease virus. *Nature* 204:855.
- 77 - BROWN, F., S.J. Martin y B. Underwood (1966). A study of the kinetics of protein and RNA synthesis induced by foot-and-mouth disease virus. *Biochem. Biophys. Acta* 129:166-177.
- 78 - BROWN, F., J.F.E. Newman, J. Stott, A. Porter, D. Frisby, C. Newton, N. Carey y P. Fellner (1974). Poly C in animal virus RNAs. *Nature* 251:342-344.
- 79 - BURGER, M.M. (1969). A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 62:994-1001.
- 80 - BURGER, M.M. (1970). Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth. *Nature* 227:170-171.
- 81 - BURNES, A.T.M. (1970). Ribonucleic acid content of encephalomyocarditis virus. *J. gen. Virol.* 6:373-380.
- 82 - BURNES, A.T.M., I. Pardoe, E.M. Duffy, R.B. Bhalla y N. O. Goldstein (1977). The size and location of the poly (A) tract in EMC virus RNA. *J. gen. Virol.* 34:331-344.
- 83 - BURROUGHS, J.N., D.J. Rowlands, D.V. Sangar, P. Talbot y F. Brown (1971). Further evidence for multiple proteins in the foot-and-mouth disease virus particles. *J. gen. Virol.* 13:83-84.
- 84 - BUTTERWORTH, B.E. (1973). A comparison of the virus-specific polypeptides of encephalomyocarditis virus, human rhinovirus-IA and poliovirus. *Virol.* 56:439-453.
- 85 - BUTTERWORTH, B.W., L. Hall, C.M. Stoltzfus y R.R. Rueckert (1971). Virus-specific proteins synthesized in encephalomyocarditis virus-infected HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 68:3083-3087.
- 86 - BUTTERWORTH, B.W. y R.R. Rueckert (1972). Kinetics of synthesis and cleavage of encephalomyocarditis virus-specific proteins. *Virol.* 50:535-549.

- 87 - BUTTERWORTH, B.W. y B.D. Korant (1974). Characterization of the large Picornaviral polypeptides produced in the presence of zinc ion. *J. Virol.* 14:282-291.
- 88 - BUTTERWORTH, B.W., E.J. Shimshick y F.H. Yin (1976). Association of the polioviral RNA polymerase complex with phospholipid membranes. *J. Virol.* 19:457-466.
- 89 - CALIGUIRI, L.A. y I. Tamm (1969). Membrane structures associated with translation and transcription of poliovirus RNA. *Science* 166:885-886.
- 90 - CALIGUIRI, L.A. y I. Tamm (1970). The role of cytoplasmic membranes in poliovirus biosynthesis. *Virol.* 42:100-111.
- 91 - CALIGUIRI, L.A. y A.G. Mosser (1971). Proteins associated with the polio RNA replication complex. *Virol.* 46:375-386.
- 92 - CALLIS, J.J. (1974). Fiebre aftosa en bovinos. Algunas relaciones entre la patogenicidad y la epizootiología. *Boletín CPFA* 13-16:9-17.
- 93 - CALLIS, J.J. (1978). National and international foot-and-mouth disease control programmes in Panama, Central and North America. *Brit. Vet. J.* 134:10.
- 94 - CALLIS, J.J., P.D. McKercher y J.H. Graves (1959). Foot-and-mouth disease: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 153:1789.
- 95 - CAMPION, R.L. (1950). Receptividad del Chaetophactus vello-sus (peludo) al virus de la fiebre aftosa. *Gac. Vet.* 12:3-14.
- 96 - CANCEDDA, R. y M. Schlesinger (1974). Formation Sinbdis-virus capsid protein in mammalian cell-free extracts programmed with viral messenger RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 71:1843-1847.
- 97 - CAPEL-EDWARDS, M. (1967). Foot-and-Mouth disease in the Myocastor coypus. *J. Comp. Path.* 77:217-221.
- 98 - CAPEL-EDWARDS, M. (1970). Foot-and-Mouth disease in the brown rat. *J. Comp. Path.* 80:543-548.
- 99 - CAPEL-EDWARDS, M. (1971). The susceptibility of three British small mammals to foot-and-mouth disease. *J. Comp. Path.* 81:433-438.
- 100 - CAPEL-EDWARDS, M. (1971). The susceptibility of small mammals to foot-and-mouth disease virus. *Vet. Bull. (Weybridge)* 41:815-823.
- 101 - CAPSTICK, P.B., R.O. Telling, W.G. Chapman y D.L. Stewart (1962). Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot-and-mouth disease. *Nature* 195:1163-1164.
- 102 - CAPSTICK, P.B. y R.C. Telling (1966). Rept. Mtg. Res. Group Standing Tech. Comm. European Commis. Control foot-and-mouth disease, FAO, Roma, Italia, págs.108-113.

- 103 - CAPSTICK, P.B., A.J.M. Garland, W.G. Chapman y R.C. Master (1967). Factors affecting the production of FMDV in deeps suspension cultures of BHK 21 clone 13 cells. *J. Hyg. (Camb.)* 65:273-280.
- 104 - CARROLL, R.B. y A.E. Smith (1976). Monomer molecular weight of T antigen from simian virus 40-infected and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 73:2254-2258.
- 105 - CARTWRIGHT, B., D.J. Morrell y F. Brown (1982). Nature of the antibody response to the foot-and-mouth disease virus particle, its 12 S protein subunit and the isolated immunizing polypeptide VPl. *J. gen. Virol.* 63:375-381.
- 106 - CARTWRIGHT, B., W.G. Chapman y R.T. Sharpe (1982). Stimulation by heterotypic antigens of foot-and-mouth disease virus antibodies in vaccinated cattle. *Res. Vet. Sci.* 32:338-342.
- 107 - CASOLI, C., M. Manini y A. Pesce (1978). N4 virion RNA polymerase: a zinc metalloenzyme. *FEMS Letters* 4:167-170.
- 108 - CAVANAGH, D., D.V. Sangar, D.J. Rowlands y F. Brown (1977). Immunogenic and cell attachment sites of FMDV: further evidence for their location in a single capsid polypeptide. *J. gen. Virol.* 35:149-158.
- 109 - CHAKRABARTY, A.K., P.K. Dutta, B.R. Boro y P.N. Mahanta (1979). Seasonal prevalence of foot-and-mouth disease in Assam. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 11:115-116.
- 110 - CHARUTAMRA, U. (1960). Foot-and-mouth disease in South-East Asia. *Bull. Off. int. Epiz.* 54:50-60.
- 111 - CHATTERJEE, N.K., H.L. Bachrach y J. Polatnick (1976). Foot-and-mouth disease virus RNA: presence of 3'-terminal polyriboadenylic acid and absence of amino acid binding ability. *Virol.* 69:369-377.
- 112 - CHATTERJEE, N.K., J. Polatnick y H.L. Bachrach (1976). Cell-free translation of foot-and-mouth disease virus RNA into identifiable noncapsid and capsid proteins. *J. gen. Virol.* 32:383-394.
- 113 - CHOU, H., P. Black y R. Roblen (1974). Non-selective inhibition of transformed cell growth by a protease inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 71:1843.
- 114 - CELMA, M.L. y E. Ehrenfeld (1975). Translation of poliovirus RNA in vitro: Detection of two different initiation sites. *J. Mol. Biol.* 98:761-780.
- 115 - CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (1973). Manual de procedimientos para la atención de un predio donde ocurre fiebre aftosa. *Ser. Man. Téc.* 1.
- 116 - CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (1973). Lucha contra la fiebre aftosa en América del Sur (quinquenio 1967/1971). *Ser. Monog. Cient. Téc.* 1.
- 117 - COLEMAN, J.E. (1974). The role of Zn(II) in transcription by T7 RNA polymerase. *Biochem. Bioph. Res. Commun.* 60:641-648.

- 118 - COLLINS, F.D. y W.K. Roberts (1972). Mechanisms of Mengo virus induced cell injury in L-cells: use of inhibitors of protein synthesis to dissociate virus-specific events. *J. Virol.* 10:969-978.
- 119 - COLOMBO, B., L. Felicetti y C. Baglioni (1966). Inhibition of protein synthesis in reticulocytes by antibodies. I. Effects on polysomes. *Biochem. Bioph. Acta* 119:109-119.
- 120 - COOPER, P.D., B.B. Wentworth y D. McCahon (1970). Guanidine inhibition of poliovirus: a dependence of viral RNA synthesis on the configuration of structural protein. *Virol.* 40:486-493.
- 121 - COOPER, P.D., D. Summers y J.V. Maizel (1970). Evidence for ambiguity in the post-translational cleavage of poliovirus proteins. *Virol.* 44:408.
- 122 - COOPER, P.D., A. Steiner-Pryor y P.J. Wright (1973). A proposed regulator for poliovirus. *The equestron. Inter virol.* 1:1-10.
- 123 - COOPER, P.D., V.I. Agol, H.L. Bachrach, F. Brown, Y. Ghen don, A.J. Gibbs, J.H. Gillespie, K. Lonberg-Holm, B. Mandel, J.L. Melnick, S.B. Mohanty, R.C. Povey, R.R. Rueckert, F.C. Schafler y D.A.J. Tyrrell (1978). *Picornaviridae*: second report. *Interv.* 10:395-404.
- 124 - COTTRAL, C.E. (1975). Foot-and-Mouth disease en "Foreign Animal Disease", tercera ed., Committee of foreign animal diseases, U.S. Animal Health Ass., Richmond, Virginia.
- 125 - COTTRAL, G.E. (1969). Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. V. Antigenic variants of virus demonstrated by immune diffusion analysis with 19S but not 7S antibodies. *J. Experim. Med.* 129:333-350.
- 126 - COTTRAL, G.E., R.E. Patty, P. Gailiunas y F.W. Scott (1965). Sensitivity of cell cultures, cattle, mice and guinea pigs for detection of nineteen foot-and-mouth disease viruses. *Bull. Off. int. Epiz.* 63:1607-1625.
- 127 - COUDERT, M., M. Fedida, J. Blancou, L. Andral y L. Silva Crispim (1981). Etude cinétique des réactions humorales chez des bovins vaccinés contre la rage et la fièvre aphteuse. *Rec. Med. Vet.* 157:717-723.
- 128 - COWAN, K.M. y J.H. Graves (1966). A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. *Virol.* 30:528-540.
- 129 - COWAN, K.M., J.H. Graves y R. Trautman (1968). Immunochemical studies of FMDV. II. Characterization of RNA-free virus-like particles. *Virol.* 34:269-274.
- 130 - CROWTHER, J.R. (1977). Examination of differences between foot-and-mouth disease strain using a radioimmuno-assay technique. *Internat. Symp. FMDV, Lyon 1976. Develop. in Biological Stand.* 35:185-193.

- 131 - CUNLIFFE, H.R. (1973). Inactivation of foot-and-mouth disease virus with wthylenimine. *Appl. Microbio.* 26:747-750.
- 132 - CUNLIFFE, H.R. y J.H. Graves (1963). Formalin-treated foot-and-mouth disease virus: comparison of two adjuvants in cattle. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 27:193-197.
- 133 - DALSGAARD, K. (1978). A study of the isolation and characterization of the saponin Quil A. Evaluation of its adjuvant activity with special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease. *Acta Vet. Scand.* 19, Supl. 69:7-40.
- 134 - DANØ, K. y E. Reich (1975). En "Proteases and Biological Control", E. Reich, D.B. Rifkin y E. Shaw ed., págs. 357-366, Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 135 - DARNELL, J.E., M. Girard, D. Baltimore, D.F. Summers y J. V. Maizel Jr. (1963). The synthesis and translation of poliovirus RNA en "The Molecular Biology of Viruses", J. S. Colter y W. Parachych ed., págs. 375-401, Academic Press, New York.
- 136 - DARZYNKIEWICZ, Z. y B.G.W. Arnason (1974). Suppresion of RNA synthesis in lymphocytes by inhibitors of proteolytic enzymes. *Experim. Cell Res.* 85:95-104.
- 137 - DARZYNKIEWICZ, Z., E. Chelmicka-Szorc y B.G.W. Arnason (1974). Suppressive effect of protease inhibitors on heterokaryons containing chick erythrocyte nuclei. *Experim. Cell Res.* 87:333-345.
- 138 - DARZYNKIEWICZ, Z., P. Zabel y D. Baltimore (1980). Dependence of the activity of the poliovirus replicase on a host cell protein. *Cell* 19:423-429.
- 139 - DASGUPTA, A., M.H. Baron y D. Baltimore (1979). Poliovirus replicase: a soluble enzyme able to initiate copying of poliovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76:2679-2683.
- 140 - DASGUPTA, A., P. Zabel y D. Baltimore (1980). Dependence of the activity of the poliovirus replicase on a host cell protein. *Cell* 19:423-429.
- 141 - DASGUPTA, A., P. Hollingshead y D. Baltimore (1982). Antibody to a host protein prevents initiation by the poliovirus replicase. *J. Virol.* 42:1114-1117.
- 142 - DAVIE, J. (1964). A complement fixation techniques for the quantitative measurement of antigenic differences between strains of the virus of FMD. *J. Hyg. (London)* 62:401-411.
- 143 - DAVIES, G. y G. Stark (1970). Use of dimethyl suberimida-te, a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 66:651.

- 144 - de las CARRERAS, A. (1978). Foot-and-mouth disease and the world meat trade. En "Proceedings of the eleventh inter-american meeting at the ministerial level on foot and mouth disease and zoonoses control. Pan American Health Organization, Washington, D.C..
- 145 - DENOYA, C.D., E.A. Scodeller, C. Vásquez y J.L. La Torre (1978). Ribonuclease activities associated with purified foot-and-mouth disease virus. Arch. Virol. 57:153-159.
- 146 - DEWYS, W., W.J. Pories, M.C. Richter y W.H. Strain (1970). Inhibition of Walker 256 carcinosarcoma growth by dietary zinc deficiency. Proc. Soc. Experim. Biol. Med. 135:17-22.
- 147 - DIETZSCHOLD, B. y R. Ahl (1970). Characterization of foot and mouth disease virus ribonucleic acid synthesized "in vitro". J. gen. Virol. 8:73-76.
- 148 - DIETZSCHOLD, B., O.R. Kaaden, T. Tokni y H.O. Böhm (1971). Polynucleotide sequence homologies among the RNAs of foot-and-mouth disease virus types A,C and O. J. gen. Virol. 13:1-7.
- 149 - DIETZSCHOLD, B., O.R. Kaaden y R. Ahl (1972). Hybridization studies with subtypes and mutants of foot-and-mouth disease virus type O. J. gen. Virol. 15:171-174.
- 150 - DIMITRIEVA, T.M., M.V. Sheheglova y V. Agol (1979). Inhibition of activity of EMC virus-induced RNA polymerase by antibodies against cellular components. Virol. 92: 271-277.
- 151 - DOEL, T.R., D.V. Sangar, D.J. Rowlands y F. Brown (1978). A re-appraisal of the biochemical map of foot-and-mouth disease virus RNA. J. gen. Virol. 41:395-404.
- 152 - DOEL, T.R. y P.J. Baccarini (1981). Thermal stability of foot-and-mouth disease virus. Arch. Virol. 70:21-32.
- 153 - DOEL, T.R., B.W. Fletton y R.F. Staple (1981). Further developments in the quantification of small RNA viruses by U.V. photometry of sucrose density gradients. Joint ESACT/IABS. Meeting on the use of heteroploid and other cell substrates for the production of biologicals, Heidelberg, Germany, 1981. Develop. biol. Stand. 50:209-219 (S. Karger, Basel, 1982).
- 154 - DOEL, T.R. y W.K.T. Chong (1982). Comparative immunogenicity of 146S, 75S and 12S particles of foot-and-mouth disease virus. Arch. of Virol. 73:185-191.
- 155 - DOEL, T.R. y T. Collen (1982). Qualitative assesment of 146S particles of foot-and-mouth disease virus in preparations destined for vaccines. J. biol. Stand. 10:69-81.
- 156 - DONALDSON, A.I. (1979). Foot-and-mouth disease: epidemiology of the disease and implications for the UK of an increase in trade of animals and animal products within the EEC. Proc. Pig. Vet. Soc. 5:49-58.

- 157 - DUBOS, P. Y E.M. Martin (1972). Virus-specific polypeptides in ascetes cells infected with encephalomyocarditis virus. *J. gen. Virol.* 7:267-272.
- 158 - DORNER, A.J., L.F. Dorner, G.R. Larsen, E. Wimmer y C.W. Anderson (1982). Identification of the initiation site of poliovirus polyprotein synthesis. *J. Virol.* 42:1017-1028.
- 159 - DULBECCO, R., M. Vogt y A.G. Strickland (1956). A study of the basic aspects of neutralization of two animal viruses, western equine encephalitis virus and poliomyelitis virus. *Virol.* 2:162-205.
- 160 - DUNKER, A.K. y R.R. Rueckert (1969). Observation on molecular weight determinations on polyacrylamide gels. *J. Biol. Chem.* 244:5074-5080.
- 161 - EGGEN, K. y A. Shatkin (1972) "In vitro" translation of cardiovirus ribonucleic acid by mammalian cell-free extracts. *J. Virol.* 9:636-645.
- 162 - EGGERS, H.J., N. Ikegami y I. Tamm (1965). Comparative studies with selective inhibitors of picornavirus reproduction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 130:267-281.
- 163 - EHRENFELD, E. (1979). On "In vitro" translation of picornavirus RNA, en "The Molecular Biology of Picornaviruses", R. Pérez-Bercoff ed., págs. 223-238, Plenum Press, New York.
- 164 - EHRENFELD, E., J.V. Maizel y D.F. Summers (1970). Soluble RNA-polimerase. Complex from poliovirus-infected HeLa cells. *Virol.* 40:840-846.
- 165 - ENNIS, H.L. y M. Lubin (1964). Cycloheximide:aspects of inhibition of protein synthesis in mammalian cells. *Science* 146:1474-1476.
- 166 - ENNIS, H.L. y L. Lubin (1964). Cycloheximide and acetoxy cloheximide: inhibitors of transfer of amino acid from aminoacyl-s-RNA to polypeptide in mammalian cells. *Federat. Proceed.* 23:269.
- 167 - ESPINET, R.G. (1951). Nouveau vaccin atiafphteux a complex glucoviral. *Gac. Vet.* 13:268.
- 168 - ESTEBAN, M. y I.M. Kerr (1974) The synthesis of encephalomyocarditis virus polypeptides in infected L-cells and cell-free systems. *Eur. J. Biochem.* 45:567-576.
- 169 - ETCHISON, J., M. Doyle, E. Penhoet y J. Holland (1971). Synthesis and cleavage of influenza virus proteins. *J. Virol.* 7:155-167.
- 170 - FAVRE, H. (1978). Mesure par ultracentrifugation de la concentration en virus aphteux. Report Ses. Res. Group Stand. Tech. Comm. of the European Comm. for the control of FMD. Uccle, Belgica, págs. 10-29.
- 171 - FAYET, M.T. (1967). Use of beta-propiolactone as an inactivating agent in the preparation of anti foot-and-mouth disease vaccines. *Annl. Inst. Pasteur* 112:65-76.

- 172 - FAYET, M.T., H.G. Peterman, J. Fontaine, J. Terre y M. Roumiantzeff (1967). Inactivation of foot-and-mouth disease virus with beta-propiolactone, comparison with other inactivating agents. *Annl. Inst. Pasteur* 112:145-152.
- 173 - FAYET, M.T., D. Fargeaud, P. Louisot, C. Stellmann y M. Roumiantzeff (1971). Physico-chemical measurement of 140 S particles of foot-and-mouth disease virus. *Annl. Inst. Pasteur* 121:107-118.
- 174 - FEDERER, K.E. (1969). Susceptibility of the agouti (Dasy procta aguti) to foot-and-mouth disease. *Zentralblatt für Veterinarien und Medicinie* B-16:847-854.
- 175 - FEDERER, K.E. y A. Alonso Fernández (1968). Development d'un nouveau sous-type du virus de la fièvre aphteuse par passages en series sur bovins partiellement immuns. *Int. Symp. on FMDV variants and immunity, Lyon, 1967. Symp. Series Imm. Stand.* 8:65-72, Karber, New York.
- 176 - FEDEROFF, N. (1975). Replicase of the phage f2, en "RNA Phages", N. Zinder ed., págs. 235-258, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 177 - FEDIDA, M., M. Coudert, M. Lombard, A. Brun, H. Favre, G. Durand, M. Giraud y L. Dhennin (1978). Serological and immunological study of the foot-and-mouth disease virus which appeared in Morocco in 1977. *Rev. Med. Vet.* 129:1305-1328.
- 178 - FENNER, F., B.R. McAuslan, C.A. Mims, J. Sambrook y D.O. White (1974). *The Biology of Animal Viruses*, Academic Press, New York.
- 179 - FENWICK, M.L. (1963). The influence of poliovirus infection on RNA synthesis in mammalian cells. *Virol.* 19:241-249.
- 180 - FERNANDEZ, M.V. (1972). Ultimos avances contra la fiebre aftosa. XI Reunión del Comité Asesor sobre Investigaciones Médicas. 19-23 de junio, 1972, OPS, Washington, D. C.
- 181 - FIERS, W. (1975). En *RNA Phages*, N.D. Lurder ed., págs. 353-396, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 182 - FIRPO, E.J. y E.L. Palma (1979). Inhibition of foot and mouth disease virus and procapsid synthesis by zinc ions. *Arch. Virol.* 61:175-181.
- 183 - FLANAGAN, J.F. (1966). Hydrolytic enzymes in KB cells infected with poliovirus and herpes simplex virus. *J. Bact.* 91:789-797.
- 184 - FLANEGAN, J.B. y D. Baltimore (1977). Poliovirus-specific primer-dependent RNA polymerase able to copy poly (A). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 74:3677-3680.

- 185 - FLANEGAN, J.B. y D. Baltimore (1977). Poliovirus-specific primer-dependent RNA polymerase able to copy poly(A). Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74:3677-3680.
- 186 - FLANEGAN, J.B. y D. Baltimore (1979). Poliovirus polyuridylic acid polymerase and RNA replicase have the same viral polypeptide. J. Virol. 29:352-360.
- 187 - FORMAN, A.J. (1974). Studies with foot-and-mouth disease virus in British deer-red, fallow and roe. II. Recovery of virus and serological response. J. Comp. Path. 84:221-229.
- 188 - FRACASTORIUS, H. (1546). De Contagione et Contagiosis Morbis et Curatione. BK 1, Chap. 12, Venezia.
- 189 - FRENKEL, H.S. (1947). La culture du virus de la fièvre aphteuse sur l'epithelium de la langue des bovidés. Bull. Off. int. Epiz. 28:155-162.
- 190 - FRENKEL, H.S. (1950). Research on foot-and-mouth disease. II. Cultivation of the virus in explanted epithelium of bovine animals. Am. J. Vet. Res. 11:371-373.
- 191 - FRENKEL, H.S. (1951). Reserch on foot-and-mouth disease. III. The inactivation of the virus on a practical scale in explantations of bovine tongue epithelium. Am. J. Vet. Res. 12:187-190.
- 192 - FRIDLENDER, B., N. Chejanovsky y Y. Becker (1978). Selective inhibition of herpes simplex virus type-1 DNA polymerase by zinc ions. Virol. 84:551-554.
- 193 - FRIEDMAN, R.M. (1969). Primary gene products of an arbovirus. Biochem. Bioph. Res. Commun. 37:369-373.
- 194 - FRISBY, D.P., C. Newton, N.H. Carey, P. Fellner, J.F.E. Newman, T.J.R. Harris y F. Brown (1976). Oligonucleotide mapping of picornavirus RNAs by two-dimensional electrophoresis. Virol. 71:379-388.
- 195 - FURLAN, M., M. Jericijo y A. Suhar (1968). Purification and properties of a neutral protease from calf thymus nucleic. Biochim. Biophys. Acta 167:154-160.
- 196 - FUJIOKA, M. y Lieberman (1964). A Zn⁺⁺ requirement for synthesis of deoxyribonucleic acid by rat liver. J. Biol. Chem. 239:1164-1167.
- 197 - FUWA, K., W.E.C. Wacker, R. Druyan, A.F. Bartholomay y B. L. Valle (1960). Nucleic acids and metals. II. Transition metals as determinants of the conformation of ribonucleic acids. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 46:1298-1307.
- 198 - GALEA, M. y H. Tzortzakis (1932). Essai d'immunisation antiaphteuse du cobaye á l'aide du virus saponiné. Comptes rendus des séances de la Societé de biologie. (Paris) 1:21-23.
- 199 - GALLOWAY, I.A. (1962). Results of the use of two live attenuated strain vaccines, Rho 1 (SAT 2 type) and RV 11 (SAT 1 type) in controlling outbreaks of foot-and-mouth disease. Bull. Off. int. Epiz. 57:748-788.

- 200 - GARFINKLE, B.D. y D.R. Tershak (1971). Effect of temperature on the cleavage of polypeptides during growth of LSc poliovirus. *J. Mol. Biol.* 59:537-541.
- 201 - GARFINKLE, B.D. y D.R. Tershak (1972). Degradation of poliovirus polypeptides "in vivo". *Nature, New Biology* 238:206-208.
- 202 - GARRELS, J.I., S.C.R. Elgin y J. Bonner (1972). A histone protease of rat liver chromatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46:545-551.
- 203 - GOETZ, I.E., C. Weinstein y E. Roberts (1972). Effects of protease inhibitors on growth of hamster tumor cells in culture. *Cancer Res.* 32:2469-2474.
- 204 - GHABRIAL, S.A. y R.M. Lister (1973). Anomalies in molecular weight-determinations of tobacco rattle virus protein by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Viol.* 51:485-488.
- 205 - GILLESPIE, J.H. (1954). The propagation and effects of type A foot-and-mouth disease virus in the day old chick. *Cornell Vet.* 44:425-433.
- 206 - GINSBERG, H.S. (1975). En "Viral Immunology and Immunopathology", A.L. Notkins ed., pág. 317, Academic Press, New York.
- 207 - GIRARD, M., D. Baltimore y J.E. Darnell (1967). The poliovirus replication complex: site for synthesis of poliovirus RNA. *J. Mol. Biol.* 24:59-74.
- 208 - GLOSTER, J. (1982). Risk of airborne spread of foot-and-mouth disease from the continent to England. *Vet. Rec.* 111:290-295.
- 209 - GOEBEL, W.F. (1939). Immunity to experimental pneumococcus infection with an artificial antigen. *Nature* 143:77-78.
- 210 - GOIC, R. (1963). Campana antiaftosa con vacuna de virus vivo modificado en Venezuela. *Boletín Centro de Salud Pecuaria* 3:31-34.
- 211 - GOLINI, F., A. Nomoto y E. Wimmer (1978). The genome-linked protein of picornaviruses. IV. Differences in the VPg's of encephalomyocarditis virus and poliovirus as evidence that the genome-linked proteins are virus coded. *Viol.* 89:112-118
- 212 - GOMEZ YAFAL, A. y E.L. Palma (1979). Morphogenesis of FMDV. I. Role of procapsids as virion precursors. *J. Virol.* 30:643-649.
- 213 - GOLDSTEIN, J. y S. Champe (1974). T4-induced activity required for specific cleavage of a bacteriophage protein "in vitro". *J. Virol.* 13:419-427.
- 214 - GOLDSTEIN, N.O., I.V. Pardoe y A.T.H. Burness (1976). Requirement for the infectivity of encephalomyocarditis virus RNA. *J. gen. Virol.* 31:271-276.

- 215 - GORBALEYNA, A.E., Y.V. Svitkin, Y.A. Kazachkov y V.I. Agol (1979). Encephalomyocarditis virus-specific polypeptide p22 is involved in the processing of the viral precursor polypeptides. *FEBS Lett.* 108:1-5.
- 216 - GORBALEYNA, A.E., I.V. Pardoe y V.I. Agol (1981). Proteolytic activity of the nonstructural polypeptide p22 of encephalomyocarditis virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98:952-960.
- 217 - GORDON, Y.J., Y. Asher y Y. Becker (1975). Irreversible inhibition of herpes simplex virus replication in BSC-1 cells by zinc ions. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 8:377-380.
- 218 - GRAVES, J.H. (1963). Formaldehyde inactivation of foot-and-mouth disease virus as applied to vaccine production. *Am. J. Vet. Res.* 24:1131-1136.
- 219 - GRAVES, J.H. (1979). Foot-and-mouth disease. A constant threat to U.S. livestock. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 174:174-176.
- 220 - GRAVES, J.H., K.M. Cowan and R. Trautman (1968). Immunological studies of foot-and-mouth disease. II. Characterization of RNA-free virus like particle. *Virology*. 34:269-374.
- 221 - GRAVES, J.H., P.D. McKercher, H.E. Farris, Jr., y K.M. Cowan (1968). Early response of cattle and swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Res. Vet. Sci.* 9:35-40.
- 222 - GRAVES, J.H. y R.B. Arlinghaus (1968). Acetyleneimine in the preparation of inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Proc. Matg. U.S. Livestock Sanit. Ass.* 71:396-403, 1967.
- 223 - GROSSMAN, A., J. Elster, W. Troll y M. Levvy (1969). The effect of inhibitors of proteolysis on sea urchin embryogenesis. Papers presented at Marin. Biol. Lab.. *Biol. Bull.* 137:401-402.
- 224 - GRUBMAN, M.J. (1980). The 5' end of foot-and-mouth disease virion RNA contains a protein covalently linked to the nucleotide pUp. *Arch. Virology*. 63:311-315.
- 225 - GRUBMAN, M.J. (1982). Further characterization of a protein kinase from foot-and-mouth disease virus. *J. Virology*. 44:1102-1105.
- 226 - GRUBMAN, M.J., B. Baxt y H.L. Bachrach (1979). Foot-and-mouth disease virion RNA: studies on the relation between the length of its 3'-poly(A) segment and infectivity. *Virology*. 97:22-31.
- 227 - GRUBMAN, M.J. y H.L. Bachrach (1979). Isolation of foot-and-mouth disease messenger RNA from membrane-bound polyribosomes and characterization of its 5' and 3' termini. *Virology*. 98:466-470.

- 228 - GRUBMAN, M.J., B. Baxt, J.L. La Torre y H.L. Bachrach (1981). Identification of a protein kinase activity in purified foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 39: 455-462.
- 229 - GRUBMAN, M.J. y B. Baxt (1982). Translation of foot-and-mouth disease virion RNA and processing of the primary cleavage products in a rabbit reticulocyte lysate. *Virol.* 116:19-30.
- 230 - GUPTA, P. y F. Rapp (1976). Effect of zinc ions on synthesis of herpes simplex virus type 2-induced polypeptides. *Proc. Soc. for Exp. Biol. and Med.* 152:455-458.
- 231 - HARRIS, T.J.R. y F. Brown (1976). The location of the poly(C) tract in the RNA of FMDV. *J. gen. Virol.* 33:493-501.
- 232 - HASELKORN, R. (1964). Actinomycin D as a probe for nucleic acid secondary structure. *Science* 143:682-684.
- 233 - HECHT, T.T. y D.F. Summers (1970). The effect of phleomycin on poliovirus RNA replication. *Virol.* 40:441-447.
- 234 - HENDERSON, W.M. (1952). Significance of tests for non-infectivity of foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg. (London)* 50:195-208.
- 235 - HIRSCHHORN, R., J. Grossman, W. Troll y G. Weissman (1971). Effect of epsilon amino caproic acid and other inhibitors of proteolysis upon the response of human peripheral blood lymphocytes to phytohemagglutinin. *J. Clin. Invest.* 50:1205-1217.
- 236 - HOFFMAN, D.J. y S.K. Niyogi (1977). Metal mutagens and carcinogens affect RNA synthesis rates in a distinct manner. *Science* 198:513-514.
- 237 - HOFSCHEIDER, P.H., E. Bürgelt, M. Kauzmann, M. Mussgay, R. Franze, R. Ahl, H. Böhm, K. Strohmaier, H. Küpper y B. Otto (1971). 10.- Studies on the antigenicity and immunogenicity of the foot-and-mouth disease viral protein VP1 expressed in *E. coli*, en "Prospective Biological products for viral disease: 6th. Munich Symp. on Microb., P.A. Bachmann ed., Taylor and Francis, London
- 238 - HOLLAND, J.J. (1963). Depression of host-controlled RNA synthesis in human cells during poliovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 49:23-27.
- 239 - HOLLAND, J.J. (1968). Virus-directed protein synthesis in different animal and human cells. *Science* 160:1346-1348.
- 240 - HOLLAND, J.J. y E.D. Kielm (1968). Specific cleavage of viral protein as steps in the synthesis and maturation of enteroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 60:1015-1022.
- 241 - HOLLAND, J.J., M. Doyle, J. Perrault, D. Kingsbury y J. Etchison (1972). Proteinase activity in purified animal virions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46:634-639.

- 242 - HOMMA, M. (1971). Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. I. Restoration to the infectivity for L cells by direct action of trypsin on L cell-borne Sendai virus. *J. Virol.* 8:619-629.
- 243 - HOMMA, M. y J. Ohuchi (1973). Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. III. Structural difference of Sendai viruses grown in eggs and tissue culture cells. *J. Virol.* 12:1457-1465.
- 244 - HRUBY, D.E. y W.K. Roberts (1976). Encephalomyocarditis virus RNA:variations in polyadenylic acid content and biological activity. *J. Virol.* 19:325-330.
- 245 - HUMMEL, B.C.W. (1959). A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:1393-1399.
- 246 - HUMPHRIES, S., F. Knauert y E. Ehrenfeld (1979). Capsid protein precursor is one of two initiated products of translation of poliovirus RNA "in vitro". *J. Virol.* 30:481-488.
- 247 - HYSLOP, N. St. G. (1965). Isolation of variant strains from foot-and-mouth disease virus propagated in cell cultures containing antiviral sera. *J. gen. Microbiol.* 41:135-142.
- 248 - HYSLOP, N. St. G. (1972). La epizootiología y epidemiología de la fiebre aftosa. *Boletín CPFA* 5:1-48.
- 249 - HYSLOP, N. St. G. y R.H. Fagg (1965). Isolation of variants during passage of strain of foot-and-mouth disease virus in partly immunized cattle. *J. Hyg. (Camb.)* 63:357-368.
- 250 - INBAR, M. y L. Sachs (1969). Structural difference in sites on the surface membrane of normal and transformed cells. *Nature* 223:710-712.
- 251 - JACOBSON, M.F. y D. Baltimore (1968). Polypeptide cleavages in the formation of poliovirus proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 61:77-98.
- 252 - JACOBSON, M.F. y D. Baltimore (1968). Morphogenesis of poliovirus. I. Association of the viral RNA with coat proteins. *J. Mol. Biol.* 33:369-378.
- 253 - JACOBSON, M.F., J. Asso y D. Baltimore (1970). Further evidence on the formation of poliovirus proteins. *J. Mol. Biol.* 49:657-669.
- 254 - JENSE, H., F. Knauert y E. Ehrenfeld (1978). Two initiation sites for translation of poliovirus "in vitro": comparison of LSc and Mahoney strains. *J. Virol.* 28:387-394.
- 255 - JANSSEN, E.F., M.D.F. Fellows Nutting, R. Jang y A.K. Balls (1949). Inhibition of the proteinase and esterase activities of trypsin and chymotrypsin by diisopropyl fluorophosphate: crystallization of inhibited chymotrypsin. *J. Biol. Chem.* 179:189-199.

- 256 - JONAK, J., J. Sedlacik y I. Rychlik (1973). Mode of action of N-tosyl-L-phenylalanyl-chloromethane on the elongation protein-synthesizing S3 factor from Bacillus stearothermophilus. Biochem. Biophys. Acta 294: 322-328.
- 257 - KAADEN, O.R. y B. Dietzschold (1974). Alterations of the immunological specificity of plasma membranes from cells infected with Marek's disease and turkey herpes viruses. J. gen. Virol. 25:1-10.
- 258 - KAADEN, O.R., K.H. Adam y K. Strohmaiers (1977). Induction of neutralising antibodies and immunity in vaccinated guinea pigs by cyanogen bromide peptides of VP3 of foot-and-mouth disease virus. J. gen. Virol. 34:397-400.
- 259 - KAMEN, R.I. (1975). Structure and function of QB replica se en "RNA Phages", N. Zinder ed., págs. 203-234, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 260 - KARSTAD, L., J.G. Grootenhuis y E.Z. Mushi (1978). Research on wildlife diseases in Kenya 1967-1978. Kenya Veterinarina 2:29-32.
- 261 - KATZ, D. y B. Moss (1970). Formation of a vaccinia virus structural polypeptide from a higher molecular weight precursor:inhibition by rifampicin. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 66:677-684.
- 262 - KERRIDGE, D. (1958). The effect of actidione and other antifungal agents on nucleic acid and protein synthesis in Saccharomyces carlsbergensis. J. gen. Microb. 19:497-506.
- 263 - KEMRON, A. (1961). Field observations on the use of modified live foot-and-mouth disease virus for the control of an epizootic caused by type Asia 1. Refuah Vet. 18: 215-223.
- 264 - KHAN, A.S. y J.R. Stephenson (1979). Feline sarcoma virus-coded polyprotein:enzimatic cleavage by a type C virus-coded structural protein. J. Virol. 29:649-656.
- 265 - KIEHN, E.D. y J.J. Holland (1970). Synthesis and cleavage of enterovirus polypeptides in mammalian cells. J. Virol. 5:358-367.
- 266 - KING, A.M., D.V. Sangar, T.J.R. Harris y F. Brown (1980). Heterogeneity of the genome-linked protein of foot-and-mouth disease virus. J. Virol. 34:627-634.
- 267 - KING, A.M., B.O. Underwood, D. McCahon, J.W.I. Newman y F. Brown (1981). Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of FMDV in the U.K.. Nature 293: 479-480.
- 268 - KLEID, D.G., D. Yansura, B. Small, D. Dowbenko, D.M. Moore, M.J. Grubman, P.D. McKercher, D.O. Morgan, B.H. Robertson y H.L. Bachrach (1981). Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. Science 214:1125-1129.

- 269 - KORANT, B.D. (1972). Cleavage of viral precursor proteins "in vivo" and "in vitro". *J. Virol.* 10:751-759.
- 270 - KORANT, B.D. (1973). Cleavage of poliovirus specific polypeptide aggregates. *J. Virol.* 12:556-563.
- 271 - KORANT, B.D. (1975). Regulation of animal virus replication by protein cleavage en "Proteases and Biological control", pág. 621-644, E. Reich, D. Rifkin y E. Shaw eds., Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 272 - KORANT, B.D. (1975). "In Vitro" transcription and translation of viral genomes, A. Haenni y G. Beaud eds., pág. 273, Ediciones INSERM (Paris).
- 273 - KORANT, B.D. (1977). Protease activity associated with HeLa cells ribosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74: 926-933.
- 274 - KORANT, B.D. (1977). Protein cleavage in virus-infected cells en "Proceedings of the third international symposium in intracellular protein catabolism", *Acta Biol. Med. Germ.* 36:1565-1573.
- 275 - KORANT, B.D. (1979). Role of cellular and viral protease in the processing of picornavirus proteins, en "The Molecular Biology of Picornavirus", págs. 149-173, R. Pérez-Bercoff ed., Plenum Press, New York.
- 276 - KORANT, B.D., K. Lonberg-Holm, J. Noble y J.T. Stasny (1972). Naturally occurring and artificially produced components of three rhinoviruses. *Virol.* 48:71-86.
- 277 - KORANT, B.D., J.C. Kayer y B.E. Butterworth (1974). Zinc ions inhibit replication of rhinoviruses. *Nature* 248: 588-590.
- 278 - KORANT, B.D. y B.E. Butterworth (1976). Inhibition by zinc of rhinovirus protein cleavage: interaction of zinc with capsid polypeptides. *J. Virol.* 18:298-306.
- 279 - KORANT, B.D., N. Chow, M. Lively y J. Powers (1979). Virus-specified protease in poliovirus infected HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76:2992-2995.
- 280 - KOZAK, M. (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes and organelles. *Microb. Rev.* 47:1-43.
- 281 - KOZLOFF, L.M. y J. Zorzopulos (1978). Zinc uptake and incorporation into proteins in T4 D bacteriophage-infected *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 253:5548-5550.
- 282 - KUO, C.H., L. Eoyang y J.T. August (1975). Protein factor required for the replication of phage QB RNA "in vitro" en "RNA Phages", N. Zinder ed., págs. 259-277, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 283 - KUPPER, H., W. Kiler, C. Kürz, S. Förss, H. Schaller, R. Franze, K. Strohmaier, O. Marquardt, V.G. Zaslavsky y P. H. Hofschneider (1981). Cloning of cDNA of major antigen of foot-and-mouth disease virus and expression in *E. coli*. *Nature* 289:555-559.

- 284 - KURZ, C., S. Förss, H. Küpper, K. Strohmaiers y H. Schaller (1981). Nucleotide sequence and corresponding amino acid sequence of gene for the major antigen of foot-and-mouth disease virus. *Nuc. Acid. Res.* 9:1919-1931.
- 285 - LAEMMLI, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- 286 - LALL, J.M. (1972). Epizootiology of foot and mouth disease in India and its effects on control measures. *Bull. Off. int. Epiz.* 77:587-593.
- 287 - LAPORTE, J. y Lenoir, G. (1972). Inhibition des synthèses des acides ribonucléiques et des protéines cellulaires par le virus de la fièvre aphteuse. *Ann. Rech. Vet.* 3:163-174.
- 288 - LAPORTE, J. y G. Lenoir (1973). Structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *J. gen. Virol.* 20:161-168.
- 289 - LAPORTE, J., J. Grosclaude, J. Wantyghem, B. Serge y P. Rouze (1973). Neutralization in culture cellulaire du pouvoir infectieux du virus de la fièvre aphteuse par des sérums provenant de porcs immunisés a l'aide d'une protéine virale purifiée. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie de Sciences, Series D (Paris)* 276:3399-3401.
- 290 - LASKEY, R.S., J.B. Gurdon y L.V. Crawford (1972). Translation of encephalomyocarditis viral RNA in oocytes of *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 69:3665-3669.
- 291 - LAWRENCE, C. y R.E. Thach (1975). Identification of a viral protein involved in post-translational maturation of the encephalomyocarditis virus capsid precursor. *J. Virol.* 15:918-928.
- 292 - LAZAROWITZ, S., R. Compans y P. Chopin (1971). Influenza virus structural and non-structural proteins in infected cells and their plasma membranes. *Virol.* 46:830.
- 293 - LAZARUS, L.H. y R. Barzilai (1974). Association of foot-and-mouth disease virus replicase with RNA template and cytoplasmic membranes. *J. gen. Virol.* 23:213-218.
- 294 - LEE, Y.F., A. Nomoto, B.M. Detjen y E. Wimmer (1977). A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 74:59-63.
- 295 - LEIBOWITZ, R. y S. Penman (1971). Regulation of protein synthesis in HeLa cells. III. Inhibition during poliovirus infection. *J. Virol.* 8:661-668.
- 296 - LERNER, R.A. (1982). Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity. *Nature* 299:392-396.
- 297 - LEUNEN, J., R. Strobbe y M. Mammerickx (1962). Notice technique sur un appareil á rouler des flacons pour cultures de cellules rénales. *Bull. Off. int. Epiz.* 57:615-617.

- 298 - LEVINTOW, L. (1974). The reproduction of Picornavirus en "Comprehensive Virology", vol 2, págs. 109-169, H. Fraenkel-Conrat y R.R. Wagner ed., Academic Press, New York.
- 299 - LEWENTON-KRISS, S. y B. Nandel (1972) Studies on the non neutralizable fraction of poliovirus. *Viol.* 48:666-678.
- 300 - LIEBERMANN, H.T. y P. Schulze (1971). Struktur des Maul- und Kalvenseuchevirus. I. Mitteilung: Zum aufbau der proteinhülle. *Archiv. für Experim. Veterin.* 25:171-183.
- 301 - LIEBERMANN, H.T. (1972) Ultraviolet irradiation of foot-and-mouth disease virus. I. Inactivation in relation to the concentration and purity of the virus and quantum yield at 2537 Å. *Archiv. für Experim. Veterin.* 26: 835-846.
- 302 - LOEFFLER, F. y P. Frosch (1897). Summarischer Bericht über die Ergebnisse der untersuchungen der Kommission zur erforschung der Maul-und Kalvenseuche beim Institut für Infektionskrankheiten in Berlin. *Dt. med. Wschr.* 98:80-84.
- 303 - LOESCH, W.T., Jr. y R.B. Arlinghaus (1975). Stable polypeptides associated with the 250S mengovirus-induced RNA polymerase structure. *Arch. Virol.* 47:201-215.
- 304 - LOMBARD, M., J. Ravin, R. Dufour, C. Roulet, A. Senelonge y D. Dupasquier (1982). Appreciation des virus de la fièvre aphteuse par des methods biochimiques et serologiques, en "XVI Mtg. OIE, FMD Commun. (París), 14-17/Set.
- 305 - LOWE, P.A. y F. Brown (1981) Isolation of a soluble and template-dependent foot-and-mouth disease virus RNA polymerase. *Viol.* 111:23-32.
- 306 - LUCAS-LENARD, J. (1974). Cleavage of mengovirus polyproteins "in vivo". *J. Virol.* 19:261-269.
- 307 - LUNDQUIST, R.E., E. Ehrenfeld y J.V. Maizel (1974). Isolation of a viral polypeptide associated with poliovirus RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 71: 4773-4777.
- 308 - LUNDQUIST, R.E. y J.V. Maizel, Jr. (1978) Structural studies of the RNA component of the poliovirus replication complex. I. Purification and biochemical characterization. *Viol.* 85:434-444.
- 309 - LWOFF, A. (1962). The thermosensitive critical event of the viral cycle. *Cold Spring Harbor Symposium on Quant. Biol.* 27:159-172.
- 310 - MACKOWIACK, C., J. Fontaine y M. Roumiantzeff (1967). Types, sous-types et variants du virus aphteux. 19th Symp. Int. Section Permanente de Standardisation Microbiologique, Lyon, Juillet 1967. Karger, Basel, vol. 8, págs. 13-64.

- 311 - MACPHERSON, I. y M. Stocker (1962). Polyoma transformation of hamster cell clones - an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16:147-151.
- 312 - MAIZEL, J.V. (1964). Preparative electrophoresis of proteins in acrylamide gels. N.Y. Acad. Symp. Gel Electroph. 121:382-390.
- 313 - MAIZEL, J.V. (1966). Mechanical fractionation of acrylamide gel electropherograms:radioactive adenovirus proteins. *Science* 151:988-990.
- 314 - MAIZEL, J.V. y D.F. Summers (1968). Evidence for differences in size and composition of the poliovirus specific polypeptides in infected HeLa cells. *Virol.* 36:48-54.
- 315 - MAIZEL, J.V., Jr., D.F. Summers y M.D. Scharff (1970). SDS-acrylamide gel electrophoresis and its application to the proteins of poliovirus and adenovirus-infected human cells. *J. Cell Physiol.* 76:273-288.
- 316 - MATHEKA, H.D., A. Mayr y K. Boegel (1962). Die Trypsin-resistenzprüfung zur differenziernung kleiner chloroform-stabiler Virusarten. *Zentralblatt für bakteriologie, parasitenkunde, Infektionskrankheiten und hygiene, abteilung I.* 187:137-143.
- 317 - MATHEKA, H.D. y H.L. Bachrach (1975). N-terminal amino acid sequences in the mayor proteins of foot-and-mouth disease virus types A, O and C. *J. Virol.* 16:1248-1253.
- 318 - MATTHEWS, R.E.F. (1979). Taxonomy of viruses. Third report of the international committee on taxonomy of viruses. *Interv.* 12:129-296.
- 319 - McCARTY, M. (1978). Infecciones bacterianas y micóticas, en "Tratado de Microbiología", cap. 4, págs. 699-987, Davis, B.D. y colab. ed., Salvat Ed., España.
- 320 - McCAULEY, E.H., N.A. Anlaqui, W.B. Lundquist, I.C. New y W.N. Miller (1977). A study of the potential economic impact of foot-and-mouth disease in the U.S. *Proc. U. S. Anim. Health Assoc. 81st. Ann. Meeting*, pág. 286.
- 321 - McKERCHER, P.D. y A.R. Giordano (1967). Foot-and-mouth disease in swine. I. Immune response of swine to chemically treated and non treated foot and mouth disease virus. *Arch. Ges. Virusforsch.* 20:190-197.
- 322 - McLAUHLAN, J.D. y W.M. Henderson (1947). The occurrence of foot-and-mouth disease in the hedghog under natural conditions. *J. Hyg. (Camb.)* 45:474-479.
- 323 - McLEAN, C., T.J. Matthews y R.R. Rueckert (1976). Evidence of ambiguous processing and selective degradation in the noncapsid proteins of rhinovirus 1A. *J. Virol.* 19:903-914.
- 324 - McVICAR, J.W. y P. Sutmoller (1969). The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. 2. The carrier status of cattle exposed to foot-and-mouth disease following vaccination with an oil adjuvant inactivated virus vaccine. *Arch. ges. Virusforsch.* 26:217.

- 325 - McVICAR, J.W., P. Sutmoller, D.H. Ferris y C.H. Campbell (1974). Foot-and-mouth disease in white-tailed deer; clinical signs and transmission in the laboratory. Proc. U.S. Animal Health Assoc. 78 th. Annual Meeting, págs. 169-180.
- 326 - MEDAPPA, K.C., C. McLean y R.R. Rueckert (1971) On the structure of rhinovirus 1A. Virol. 44:259-270.
- 327 - MELNICK, J.L. (1980) Taxonomy of viruses. Prog. med. Virol. 26:214-232.
- 328 - MELOEN, R.H. (1976). Localization on foot-and-mouth disease virus (FMDV) of an antigenic deficiency induced by passage in BHK cells. Arch. of Virol. 51:299-306.
- 329 - MELOEN, R.H., D.J. Rowlands y F. Brown (1979). Comparison of the antibodies elicited by the individual structural polypeptides of foot-and-mouth disease and polioviruses. J. gen. Virol. 45:761-763.
- 330 - MESSER, M.J.N. (1963). Foot-and-mouth disease in game animals with special reference to the impala (Aepyceros melampus). Vet. Bull. 33:1164.
- 331 - MEYER, J., R.E. Lundquist y J.V. Maizel, Jr. (1978). Structural studies of the RNA component of the poliovirus replication complex. II. Characterization by electron microscopy and autoradiography. Virol. 85:445-455.
- 332 - MOORE, D.M. y K.M. Cowan (1978). Effect of trypsin and chymotrypsin on the polypeptides of large and small plaque variants of foot-and-mouth disease virus relationship to specific antigenicity and infectivity. J. gen. Virol. 41:549-562.
- 333 - MORCH, M.D., W. Azgorski y A.L. Haenni (1982). Proteolytic maturation of the turnip-yellow-mosaic-virus polyprotein coded "in vitro" occurs by internal catalysis. Eur. J. Biochem. 416:1-27.
- 334 - MOREAU, Y., F. Perrenot, G. Chappuis, J. Terré y J. Fontaine (1971). Etudes sérologiques et immunologiques des sous-types du virus aphteus. Influence de la vaccination de rappel. Bull. Off. int. Epiz. 75:99-114.
- 335 - MORSER, M.J. y D.C. Burke (1974). Cleavage of virus-specified polypeptides in cells infected with Semliki forest virus. J. gen. Virol. 22:395-409.
- 336 - MOVICAR, J. y P. Sutmoller (1970). Foot and mouth disease the agar cell diffusion precipitation test for antibody to virus infection associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. Am. J. Epid. 92:273-278.
- 337 - MOWAT, G.N. y W.G. Chapman (1962). Growth of foot and mouth disease virus in a fibroblastic cell line derived from haster kidneys. Nature 194:253-255.
- 338 - MOWAT, G.N. y J. Prydie (1962). Observations in East African cattle of the innocuity and immunogenicity of a modified strain of foot and mouth disease virus type SAT 2. Res. Vet. Sci. 3:368-381.

- 339 - MOWAT, G.N., J. B. Brooksby y T.W.F. Pay (1962). Use of BHK-21 cells in the preparation of mouse attenuated live foot-and-mouth disease vaccines for the immunization of cattle. *Nature* 196:655.
- 340 - MOWAT, G.N., R.C. Masters y M. Prince (1973). Enhancement of immunizaing potency of a foot-and-mouth disease vaccine for cattle by treatment of the antigen with formaldehyde. *Arch. ges. Virusforsch.* 41:365-370.
- 341 - NAKAI, K. y J. Lucas-Lenard (1976). Processing of mengovirus precursor polypeptides in the presence of zinc ions and sulphhydryl compounds. *J. Virol.* 18:918-925.
- 342 - NEWMAN, J.F.W. y F. Brown (1976). Absence of poly(A) from the infective RNA of Nodamura virus. *J. gen Virol.* 30:137-140.
- 343 - NEWMAN, F.D.E., B. Cartwright, T.R. Doel y F. Brown (1979). Purification and identification of the RNA-dependent RNA polymerase of foot-and-mouth disease virus. *J. gen. Virol.* 45:497-507.
- 344 - NOBLE, J. y L. Levintow (1970). Dynamics of poliovirus-specific RNA synthesis and the affects of inhibitors of virus replication. *Virol.* 40:634-642.
- 345 - NOBLE, J. y K. Lomberg-Holm (1973). Interactions of components of human rhinovirus type A with HeLa cells. *Virol.* 51:270-278.
- 346 - NOMOTO, A., B. Detjen, R. Pozatti y E. Wimmer (1977). The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implications for RNA synthesis. *Nature* 268:208-213.
- 347 - NORRIS, K.P. y G.J. Harper (1970). Wind-borne dispersal of foot-and-mouth virus. *Nature* 225:98-99.
- 348 - NURSE, P. (1983). Coordinating histone transcription and DNA replication. *Nature* 302:378.
- 349 - OBERG, B. y L. Philipson (1971). Replicative structure of poliovirus RNA "in vivo". *J. Mol. Biol.* 58:725-737.
- 350 - OBERG, B.F. y A.J. Shatkin (1972). Initiation of picorna virus protein synthesis in ascites cell extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 69:3589-3593.
- 351 - ONG, E.B., E. Shaw y G. Shoellmann (1965). The identification of the histidine residues at the active center of chymotrypsin. *J. Biol. Chem.* 240:694-698.
- 352 - PALACIOS, C.A. (1967). Rept. Metg. Res. Group Standi Techn. Comm., European Commis. control FMDV, FAO, Roma, Italia, trabajo n° 8.
- 353 - PALACIOS, C.A. (1968). Estudios sobre vacunas de virus vivos contra la fiebre aftosa. *Rev. Vet. Venez.* 24:240-277.
- 354 - PALACIOS, C.A. (1970). Estudios sobre vacunas de virus vivo contra la fiebre aftosa en "III Reunión Interamericana sobre el control de la fiebre aftosa y otras zoonosis", pub. cient. n° 218, OPS/OSM.

- 355 - PALLANSCH, M.A., O.M. Kew, A.C. Palmemberg, F. Golini, E. Wimmer y R.R. Rueckert (1980). Picornaviral VPg sequences are contained in the replicase precursor. *J. Virol.* 35: 414-419.
- 356 - PALMA, E.E. y S. Rivenson (1955). La vacuna antiaftosa. En la producción de epitelio para la elaboración industrial de la vacuna antiaftosa, pág. 15-20, Inst. Nac. de la fiebre aftosa, Minist. de Agric. y Ganad. de la Nación, Buenos Aires.
- 357 - PALMENBERG, A.C., M.A. Pallansch y R.R. Rueckert (1979). Protease required for processing picornaviral coat protein resides in the viral replicase gene. *J. Virol.* 32: 770-778.
- 358 - PALMENBERG, A.C. y R.R. Rueckert (1982). Evidence for intramolecular self-cleavage of picornaviral replicase precursors. *J. Virol.* 41:244-249.
- 359 - PAN AMERICAN FOOT-AND-MOUTH DISEASE CENTER (Pan American Health Organization) (1974). The production of vaccines against foot-and-mouth disease in South America. *Bull. Off. int. Epiz.* 81:1255-1259.
- 360 - PATTY, R.E. (1971). Factors affecting susceptibility of primary cultures of bovine kidney cells to infection with foot-and-mouth disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 32: 719-725.
- 361 - PATTY, R.E. (1971). Methods for increasing the susceptibility of primary cultures of porcine kidney-cells to infection with foot-and-mouth disease virus. *Arch. ges. Virusforsch.* 33:356-363.
- 362 - PAUCHA, E., J. Seehafer y J.S. Colter (1974). Synthesis of viral-specific polypeptides in mengo virus-infected L cells:evidence for asymmetric translation of the viral genome. *Virol.* 61:315-326.
- 363 - PAUCHA, E. y J.S. Colter (1975). Evidence for control of translation of the viral genome during replication of mengo virus and poliovirus. *Virol.* 67:300-305.
- 364 - PELHAM, H.R.B. (1978). Translation of encephalomyocarditis virus RNA "in vitro" yields an active proteolytic processing enzyme. *Eur. J. Biochem.* 85:457-462.
- 365 - PELHAM, H.R.B. (1979). Translation of fragmented viral RNA "in vitro" initiation at multiples sites. *FEBS Letters* 100:195-199.
- 366 - PENMAN, S., Y. Becker y J.E. Darnell (1964). A cytoplasmic structure involved in the synthesis and assembly of poliovirus components. *J. Mol. Biol.* 8:545-555.
- 367 - PEREIRA, H.G. (1977). Subtyping of foot-and-mouth disease. Reports by the permanent commission approved at the XLIVth. general session of the committee of the O.I.E., mayo 1976, París.

- 368 - PEREZ-BERCOFF, R. (1979). The mechanism of replication of picornavirus RNA en "The Molecular Biology of Picornavirus", R. Pérez-Bercoff ed., págs. 293-318, Plenum Press, New York.
- 369 - PETRA, P.H., W. Cohen y E. Shaw (1965). Isolation and characterization of the alkylated histidine from TLCK inhibited trypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21: 612-618.
- 370 - PFEFFERKORN, E. y M. Boyle (1972). Selective inhibition of the synthesis of Sinbis virion proteins by an inhibitor of chymotrypsin. *J. Virol.* 9:187-188.
- 371 - PHILLIPS, B.A. (1969). "In vitro" assembly of poliovirus. I. Kinetics of the assembly of empty capsids and the role of extracts from infected cells. *Virol.* 39:811-821.
- 372 - PHILLIPS, B.A., D.F. Summers y J.V. Maizel, Jr. (1968). "In vitro" assembly of poliovirus related particles. *Virol.* 35:216-226.
- 373 - POIESZ, B.J., G. Seal y L.A. Loeb (1974). Reverse transcriptase-correlation of zinc content with activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 71:4892-4896.
- 374 - POLACINO, P.S., G. Kaplan y E.L. Palma (1983). Homologous interference by a foot and mouth disease virus strain attenuated for cattle. *J. Virol.* (in press).
- 375 - POLACINO, P.S., A. Gomez Yafal y E.L. Palma (1983). Biochemical characterization of a foot-and-mouth disease strain attenuated for cattle. *Arch. Virol.* (in press).
- 376 - POLATNICK, J. (1980). Isolation of a foot-and-mouth disease polyuridylic acid polymerase and its inhibition by an antibody. *J. Virol.* 33:774-779.
- 377 - POLATNICK, J. y H.L. Bachrach (1964). Production and purification of milligram amounts of foot-and-mouth disease virus from baby hamster kidney cell cultures. *Appl. Microb.* 12:368-373.
- 378 - POLATNICK, J. y R.B. Arlinghaus (1967). Foot-and-mouth disease virus-induced ribonucleic acid polymerase in baby hamster kidney cells. *Virol.* 31:601-608.
- 379 - POLATNICK, J., G.F. Vande Woude y R.B. Arlinghaus (1968). Changes in protein and nucleic acid metabolism in baby hamster kidney cells infected with foot-and-mouth disease virus. *Archiv. ges. Virusforsch.* 23:218-226.
- 380 - POLATNICK, J. y R.B. Arlinghaus (1970). Effect of foot-and-mouth disease virus on protein synthesis and ribonucleic acid polymerase activity at various temperatures. *Proc. Soc. Exp. Biol. (New York)* 134:5-8.
- 381 - POLATNICK, J. y H.L. Bachrach (1978). Effect of zinc and other chemical agents on foot-and-mouth disease virus replication. *Antim. Ag. Chemot.* 13:731-734.

- 382 - POLATNICK, J. y S.H. Wool (1982). Localization of foot-and-mouth disease-RNA synthesis on newly formed cellular smooth membranous vacuoles. *Arch. Virol.* 71:207-215.
- 383 - PONG, S.S., D.L. Nuss y G. Koch (1975). Inhibition of initiation of protein synthesis in mammalian tissue culture cells by L-1-tosylamino-2-phenylethyl chloromethyl ketone. *J. Biol. Chem.* 250:240-245.
- 384 - PORTER, A., N.H. Carey y P. Fellner (1974). Presence of large poly(C) tract within the RNA of encephalomyocarditis virus. *Nature* 248:675-678.
- 385 - PRINGLE, C.R. (1964). Inhibition of multiplication of foot-and-mouth disease virus by guanidine hydrochloride. *Nature* 204:1012-1013.
- 386 - PROUTY, W.F. y A.L. Goldberg (1972). Effects of protease inhibitors on protein breakdown in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 247:3341-3352.
- 387 - RABUSSAY, D. (1982). Changes in *E. coli* RNA polimerase after bacteriophage T4 infection. *ASM News* 48:398-403.
- 388 - RANDRUP, A. (1954). On the stability of bovine foot-and-mouth disease virus dependent on pH. Investigations on the complement-fixing and the immunising antigen as well as on the infective agent. *Acta path. Microb. Scand.* 35:388.
- 389 - RECZKO, E. y K. Strohmaier (1970). Electron microscopy of the RNA of foot-and-mouth disease virus. *J. gen. Virol.* 7:65-69.
- 390 - REICH, E. (1964). Actinomycin: correlation of structure and function of its complexes with purines and DNA. *Science* 143:684-689.
- 391 - REICH, E., R.M. Franklin, A.S. Shatkin y E.L. Tatum (1961). Effect of Actinomycin D on cellular nucleic acid synthesis and virus production. *Science* 134:556-557.
- 392 - RESEARCH INSTITUTE (1954). Report for the years 1937-1953. W. Heffer Sons Ltd. ed., Camb., Research Institute, Pirbright, Surrey, Inglaterra.
- 393 - RESEARCH INSTITUTE (1956). Report for the years 1954-1955. W. Heffer Sons Ltd. ed., Camb., Research Institute, Pirbright, Surrey, Inglaterra.
- 394 - RIVENSON, S. y M. Segura (1963). Multiplicación del virus aftoso en cultivos en frascos rotantes de la línea celular BHK-21 de riñón de hamster. *Rev. Inv. Ganad.* 18:293-299.
- 395 - RIVENSON, S., O. Ibarra, O.P. Gaggino, O. Laporte, H. García Ollano, J.C. Pizzi y L. Marangunich (1972). Estudio comparativo con un nuevo tipo de vacuna antiaftosa oleosa en bovinos. *Rev. Inv. Agrop.* IX:53-80.

- 396 - RODER, A. y K. Koschel (1974). Reversible inhibition of poliovirus RNA synthesis "in vivo" and "in vitro" by viral products. *J. Virol.* 14:846-852.
- 397 - ROSENBERG, F.J. (1975). El conocimiento de la epidemiología de la fiebre aftosa con particular referencia a Sudamérica. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, serie Monog. Cient. Téc. n° 5.
- 398 - ROSENBERG, F.J. y R. Goic (1973). Programas de control y prevención de la fiebre aftosa en las Américas. *Boletín CPFA* 12:1-22.
- 399 - ROSENBERG, F.J. y P. Augé de Mello (1974). Portadores de virus aftoso. Proceso terminal de la infección o eslabón intermedio en la cadena epidemiológica de la enfermedad. *Boletín CPFA* 13-16:50-60.
- 400 - ROSENBERG, F.J. y I. Gomez (1977). Susceptibilidad del carpincho o capiba (Hydrochoerus hydrochoeris hydrochoeris) al virus de la fiebre aftosa. *Boletín CPFA* 27-28:35-41.
- 401 - ROSSMAN, T., C. Norris y W. Troll (1974). Inhibition of macromolecular synthesis in Escherichia coli by protease inhibitors. Specific reversal by glutathione of the effects of chloromethyl ketones. *J. Biol. Chem.* 249:3412-3417.
- 402 - ROUMIANTZEFF, M.D., D.F. Summers y J.V. Maizel (1971). "In vitro" protein synthetic activity of membrane-bound poliovirus polysomes. *Virol.* 44:249-258.
- 403 - ROWLANDS, D.J., D.V. Sangar y F. Brown (1971). Relationship of the antigenic structure of foot-and-mouth disease virus to the process of infection. *J. gen. Virol.* 13:85-93.
- 404 - ROWLANDS, D.J., D. Sangar y F. Brown (1972). Stabilizing the immunizing antigen of foot-and-mouth disease virus by fixation with formaldehyde. *Arch. ges. Virusforsch.* 39:274-283.
- 405 - ROWLANDS, D.J., D. Sangar y F. Brown (1975). A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of FMDV. *J. gen. Virol.* 26:227-238.
- 408 - ROWLANDS, D.J., T.J.R. Harris y F. Brown (1978). More precise location of the polycytidilic acid tract in foot-and-mouth disease RNA. *J. Virol.* 26:335-343.
- 409 - ROWLANDS, D.J., T.J.R. Harris, P.A. Lowe, F. Brown, J.B. Boothroyd, P. Highfield y G.A.M. Cross (1981). Cloning the genome of foot-and-mouth disease virus en "Biological Products for Viral Diseases", P.A. Bachmann ed., págs. 101-103, Taylor y Francis Ltd., Londres.
- 410 - RWEYEMAMU, M.M. (1978). The selection of vaccine strains of foot-and-mouth disease virus. *Br. vet. J.* 134:63-67.
- 411 - RWEYEMAMU, M.M., J.C. Booth, N. Parry y T.W. Pay (1977). Neutralization kinetics studies with type SAT 2 foot-and-mouth disease virus strains: antigenic differentiation of vaccine strains. *J. Hyg. (Camb.)* 78:429.

- 412 - RWEYEMAMU, M.M., G. Terrey y T.W.F. Paez (1979). Stability and immunogenicity of empty particles of foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.* 59:69-74.
- 413 - SALZMAN, N.P., R.Z. Lockart y E.D. Sebring (1959). Alterations in HeLa cell metabolism resulting from poliovirus infection. *Virol.* 9:244-259.
- 414 - SANGAR, D.V. (1979). A review of Picornavirus. *J. gen. Virol.* 45:1-13.
- 415 - SANGAR, D.V., D.J. Rowlands, D. Cavanagh y F. Brown (1976). Characterization of the minor polypeptides in the foot-and-mouth disease particles. *J. gen. Virol.* 31:35-46.
- 416 - SANGAR, D.V., D.N. Black, D.J. Rowlands y F. Brown (1977). Biochemical mapping of the foot-and-mouth disease virus genome. *J. gen. Virol.* 35:281-297.
- 417 - SANGAR, D.V., D.J. Rowlands, T.J.R. Harris y F. Brown (1977). A protein covalently linked to foot-and-mouth disease virus RNA. *Nature* 268:648-650.
- 418 - SANGAR, D.V., D.N. Black, D.J. Rowlands, T.J.R. Harris y F. Brown (1980). Location of the initiation site for protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA by "in vitro" translation of defined fragments of the RNA. *J. Virol.* 33:59-68.
- 419 - SAUNDERS, K. y A.M.Q. King (1982). Guanidine-resistant mutants of aphthovirus induce the synthesis of an altered nonstructural polypeptide, P34. *J. Virol.* 42:389-394.
- 420 - SCHAFFER, F.L. (1962). Physical and chemical properties and infectivity of RNA from animal viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27:89-99.
- 421 - SCHARFF, M.D., M.M. Thorén, N.F. McElvain y L. Levintow (1963). Interruption of poliovirus RNA synthesis by p-fluorophenylalanine and puromycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 10:127-132.
- 422 - SCHEELE, C. y E. Pfefferkorn (1970). Virus-specific proteins synthesized in cells infected with RNA + temperature-sensitive mutants of Sindbis virus. *J. Virol.* 5:329-337.
- 423 - SCHEID, A. y P. Choppin (1974). Identification of biological activities of paramyxovirus glycoprotein. Activation of cell fusion, hemolysis and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virol.* 57:475-490.
- 424 - SCHMIDT, S., J.H. Schmidt y A. Hansen (1936). The use of a cetyleneimine in the production of inactivated foot and mouth disease vaccines. *Rev. d'Immun.* 2:359-368.
- 425 - SCHNEBLI, H.P. y M. Burger (1972). Selective inhibition of growth of transformed cells by protease inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 69:3825-3827.

- 426 - SCHNEBLI, H.P. y G. Haemmerli (1974). Protease inhibitors do not block transformed cells in the G1 phase of the cell cycle. *Nature* 248:150-151.
- 427 - SCHOELLMANN, G. y E. Shaw (1962). A new method for labeling the active center of chymotrypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7:36-40.
- 428 - SCHOELLMANN, G. y E. Shaw (1963). Direct evidence for the presence of histidine in the active center of chymotrypsin. *Biochem.* 2:252-255.
- 429 - SCRUTTON, M.C., C.W. Wu y D.A. Goldthwati (1971). The presence and possible role of zinc in RNA polymerase obtained from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 68:2497-2501.
- 430 - SEFTON, B.M. y H. Rubin (1970). Release from density dependent growth inhibition by proteolytic enzymes. *Nature* 227:843-845.
- 431 - SELA, M., B. Schechter, I. Schechter y F. Borek (1967). Antibodies to sequential and conformational determinants. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 32:537-545.
- 432 - SELLERS, R.F. (1970). Inhalation, persistence and dispersal of foot-and-mouth disease virus by man. *J. Hyg. (Camb.)* 68:565-573.
- 433 - SHAW, W. (1967). Site-specific reagents for chymotrypsin and trypsin en "Methods in Enzymology", vol. 11, págs. 677-686, S.P. Colowick y N.O. Kaplan ed., Academic Press, New York.
- 434 - SHAW, E. (1970). Selective chemical modification of proteins. *Phys. Rev.* 60:244-296.
- 435 - SHAW, E. (1975). Synthetic protease inhibitors actin by affinity labeling en "Proteases and Biological Control", E. Reich, D.B. Rifkin y E. Shaw ed., págs. 455-465, Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation, Cold Spring Harbor Laboratoris, New York.
- 436 - SHAW, W., M. Mares-Guia y W. Cohen (1965). Evidence for an active-center histidine in trypsin through use of a specific reagent, 1-chloro-3-tosylamide-7-amina-2-heptanone, the chloromethylketone derived from N-alfa-tosyl-L lysine. *Biochem.* 4:2219-2224.
- 437 - SHAW, W. y J. Ruscica (1971) The reactivity of His-57 in chymotrypsin to alkylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 145:485-489.
- 438 - SHIH, D.S., C.T. Shih, O. Kew, M. Pallansch, R.R. Rueckert y P. Kaesberg (1978). Cell-free synthesis and processing of the proteins of poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 75:5807-5811.
- 439 - SHIH, D.S., C.T. Shih, D. Zimmern, R.R. Rueckert y P. Kaesberg (1979). Translation of encephalomyocarditis virus RNA in reticulocyte lysates: kinetic analysis of the formation of virion proteins and a protein required for processing. *J. Virol.* 30:472-480.

- 440 - SHLOMAI, J., Y. Asher, Y.J. Gordon, U. Olshevsky y M. Becker (1975). Effect of zinc ions on the synthesis of herpes simplex virus DNA in infected BSC-1 cells. *Virology* 66:330-335.
- 441 - SIEGEL, M.R. y H.D. Sisler (1963). Inhibition of protein synthesis "in vitro" by cycloheximide. *Nature* 200:675-676.
- 442 - SIMMS, M.J. (1970). Production of foot-and-mouth disease virus on baby hamster kidney cell culture: a review and bibliography. *FMDV Bull. Wellcome*, Supl. 3.
- 443 - SIROVER, M.A. y L.A. Loeb (1976). Infidelity of DNA synthesis "in vitro": screening for potential metal, mutagens or carcinogens. *Science* 194:1434-1439.
- 444 - SKINNER, H.H. (1951). Propagation of strains of foot-and-mouth disease virus in unweaned white mice. *Proc. Roy. Soc. Med.* 44:1041-1044.
- 445 - SLATER, J.P., H.S. Mildvan y L.A. Loeb (1971). Zinc in DNA polymerases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44:37-43.
- 446 - SMITH, A.E. (1973). The initiation of protein synthesis directed by the RNA from encephalomyocarditis virus. *Eur. J. Biochem.* 33:301-313.
- 447 - SNYDER, H. y T. Sreevalsan (1973). Proteins specified by Sindbis virus in chick embryo fibroblast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54:24.
- 448 - SOLYOM, F., A. Makár, A. Fazekas, J. Roith y F. Czellig (1980). Immunogenicity studies of foot-and-mouth disease vaccines at different concentrations of antigen and saponin. *Ann. Rech. Vet.* 11:35-44.
- 449 - SPECTOR, D.H. y D. Baltimore (1974). Requirement of 3'-terminal poly(adenylic acid) for the infectivity of poliovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 71:2983-2987.
- 450 - SPRINGATE, C.F., A.S. Mildvan, R. Abramson, J.L. Engle y L.A. Loeb (1973). *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid polymerase I, a zinc metalloenzyme. *J. Biol. Chem.* 248:5987-5993.
- 451 - STAPLE, R.F. y T.R. Doel (1982). Interactions between saponin and 146S particles of foot-and-mouth disease virus. *J. Biol. Stand.* 10:147-156.
- 452 - STELLMANN, C., Y. Moreau y M. Roumiantzeff (1972). Biostatistical system of relationship and dominance for the classification of foot-and-mouth disease strains. *Arch. ges. Virusforsch.* 37:357-364.
- 453 - STOKER, M. y I. Mac Pherson (1964). Syrian Hamster fibroblast cell line BHK 21 and its derivatives. *Nature* 203:1355-1357.

- 454 - STRAUSS, J.H., Jr., B.W. Burge y J.E. Darnell (1971). Aurintricarboxylic acid:inhibitor of initiation of protein synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 68:97-101.
- 455 - STROHMAIER, K. y M. Mussgay (1959). Density gradient centrifugation with infectious ribonucleic acid of foot-and-mouth disease virus. Science 130:217.
- 456 - STROHMAIER, K. y K.H. Adams (1974). Comparative electrophoresis studies of foot-and-mouth disease virus proteins. J. gen. Virol. 22:105-114.
- 457 - STROHMAIER, K., K.B. Wittmann-Liebold y A.W. Geissler (1978). The N-terminal sequence of three coat proteins of foot-and-mouth disease virus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 85:1640-1645.
- 458 - STROHMAIER, K., R. Franze y K.H. Adam (1982). Location and characterization of the antigenic portion of the foot-and-mouth disease virus immunizing protein. J. gen. Virol. 59:295-306.
- 459 - SUMMERS, D.F., J.V. Maizel y J. Darnell (1965). Evidence for virus specific noncapsid proteins in poliovirus-infected HeLa cells. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 54:505-513.
- 460 - SUMMERS, D.F., J.V. Maizel, Jr. y J.E. Darnell (1967). The decrease in size and synthetic activity of poliovirus polysomes late in the infectious cycle. Virol. 31:427-435.
- 461 - SUMMERS, D.F. y J.V. Maizel, Jr. (1968). Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 59:966-974.
- 462 - SUMMERS, D.F. y J.V. Maizel, Jr. (1971). Determination of the gene sequence of poliovirus with pactamycin. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 68:2852-2856.
- 463 - SUMMERS, D.F., M. Roumiantzeff y J.V. Maizel (1971). The translation and processing of poliovirus proteins en "Ciba foundation symp. on strategy of the viral genome", G. Wolstenholme y M. O'Connors eds., pág. 111, Churchill-Livingstone, Londres.
- 464 - SUMMERS, D.F., E.N. Shaw, M.L. Stewart y J.V. Maizel (1972). Inhibition of cleavage of large poliovirus-specific precursor proteins in infected HeLa cells by inhibition of proteolytic enzymes. J. Virol. 10:880-884.
- 465 - SUTMOLLER, P. y C.A. Gaggero (1965). Foot-and-mouth disease carriers. Vet. Rec. 77:968-969.
- 466 - SUTMOLLER, P. y G.E. Cottral (1967). Improved techniques for the detection of foot-and-mouth disease virus in carrier cattle. Arch. ges. Virusforsch. 21:170-177.
- 467 - SUTMOLLER, P. y J.W. McVicar (1972). The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. III. Exposure of pigs to bovine carriers. Arch. ges. Virusforsch. 31:78-84.

- 468 - SVITKIN, Y.V., A.E. Gorbalenya, Y.A. Kazachkov y V.I. Agol (1979). Encephalomyocarditis virus polypeptide p22 possessing a proteolytic activity. FEBS Lett. 108:6-9.
- 469 - SWANEY, J.B., G.F. Vande Woude y H.L. Bachrach (1974). Sodium dodecyl-sulfate-dependent anomalies in gel electrophoresis:alterations in the banding patterns of foot and mouth disease virus polypeptides. Anal. Biochem. 58:337-346.
- 470 - SWENERTON, H., R. Shrader y L.S. Hurley (1969). Zinc-deficient embryos:reduced thymidine incorporation. Science 166:1014-1015.
- 471 - TABER, R., D. Rekwser y D. Baltimore (1971). Effect of pactamycin on synthesis of poliovirus proteins: A method for genetics mapping. J. Virol. 8:395-401.
- 472 - TABER, R., R. Wertheimer y J. Gobrlick (1973). Effect of an inhibitor of proteolysis on the size of newly-synthesized protein in HeLa cells. J. Mol. Biol. 80:367-372.
- 473 - TALBOT, P. y F. Brown (1972). A model for foot and mouth disease virus. J. gen. Virol. 15:163-170.
- 474 - TALBOT, P., D.J. Rowlands, N.J. Burroughs, D.U. Sangar y F. Brown (1973). Evidence for a group protein in foot and mouth disease virus particle. J. gen. Virol. 19:369-380.
- 475 - TAMM, I. y H.J. Eggers (1963). Specific inhibition of animal viruses. Science 142:24-33.
- 476 - THACH, S.S., D. Dobertin, C. Lawrence, F. Gollini y R.E. Thach (1974). The mechanism of viral replication. Structure of replication complexes of encephalomyocarditis virus. Proc.Natl. Acad. Sci. (USA) 71:2549-2553.
- 477 - TRAUB, A., B. Diskin, H. Rosenberg y E. Kalmar (1976). Isolation and properties of the replicase of encephalomyocarditis virus. J. Virol. 18:375-382.
- 478 - TRAUM, J. (1948). Foot-and-mouth disease with special reference to its communicability to man. Bol. Off. Sanit. Panam. 27:356.
- 479 - TRAUTMAN, R., M. Savan y S.S. Breese, Jr. (1959). Partition by zone ultracentrifugation of the two complement-fixing particles in the foot-and-mouth disease virus system. J. Am. Chem. Soc. 81:4040-4044.
- 480 - TROLL, W., A. Klassen y A. Janoff (1970). Tumorigenesis in mouse skin:inhibition by synthetic inhibitors of proteases. Science 169:1211-1213.
- 481 - UBERTINI, B., L. Nardelly, A. del Prato, G. Panina y G. Santero (1963). Large scale cultivation of foot-and-mouth disease virus on calf kidney cell monolayers in rolling bottles. Zentr. Veterinar. Med. B 10:93-101.

- 482 - UBERTINI, B., L. Nardelly, A. del Prato, G. Panina y G. Santero (1964). Subtype of FMD disease virus and vaccination. *Wien. tierärztl. Monatschrift* 51:99-110.
- 483 - UBERTINI, B., L. Nardelly, A. del Prato, G. Panina y S. Bairei (1967). BHK-21 cell cultures for the large-scale production of foot-and-mouth disease virus. *Zentr. Veterinär med.* 14:432-441.
- 484 - VALLEE, H. y H. Carré (1922). Sur la pluralité des virus aphteux. *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)* 174:1498-1500.
- 485 - VALLEE, H., H. Carré y P. Rinjard (1926). Immunization against foot and mouth disease by formalised virus. *Rev. gen. Med. Vet.* 35:129-134.
- 486 - VAN BEKKUM, J.G. (1978). Factors affecting the quality of foot and mouth disease vaccines. *Br. Vet. J.* 134:134-144.
- 487 - VAN BEKKUM, J.G., H.S. Frenkel, H.H.J. Frederiks y S. Frenkel (1959). Observations on the carriers state of cattle exposed to foot-and mouth disease virus. *Tijdschr. Diergemeesk.* 84:1159-1164.
- 488 - VAN BEKKUM, J.G., P.J. Straver, P.H. Bool y S. Frenkel (1966). Further information on the persistence of infective foot-and-mouth disease virus in cattle exposed to virulent virus strains. *Bull. Off. int. Epiz.* 65:1949-1965.
- 489 - VAN DYKE, T.A. y J.B. Flanagan (1980). Identification of poliovirus polypeptide p63 as a soluble RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* 35:732-740.
- 490 - VANDE WOUDE, G.F. y H.L. Bachrach (1968). Evidence for a single structured polypeptide in foot-and-mouth disease virus. *Arch. ges. Virusforsch.* 23:353-361.
- 491 - VANDE WOUDE, G.F., J.B. Swarrey y H.L. Bachrach (1972). Chemical and physical properties of foot-and-mouth disease virus: an comparison with mouse Elberfeld virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48:1222-1219.
- 492 - VANDE WOUDE, G.F. y R. Ascione (1974). Translation products of foot-and-mouth disease virus-infected baby hamster kidney cells. *Arch. ges. Virusforsch.* 45:259-271.
- 493 - VASQUEZ, C., C.D. Denoya, J.L. La Torre y E.L. Palma (1979). Structure of foot-and-mouth disease virus capsid. *Virol.* 97:195-200.
- 494 - VILJOEN, J.H.B. (1964). The successful use of attenuated acid inactivated foot-and-mouth disease vaccine in mayor epizootic. The story of the 1961-1962 SAT outbreak in South West Africa. *Bull. Off. int. Epiz.* 61:1463-1513.
- 495 - VILLA-KOMAROFF, L.N.D. Guttman, H.L. Bachrach y F. Lodish (1975). Complete translation of poliovirus RNA in a eukaryotic cell free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 72:4147-4161.

- 496 - VOGT, V.M., R. Eisenman y H. Diggelmann (1975). Generation of avian myeloblastosis virus cleavage of a precursor polypeptide. *J. Mol. Biol.* 96:471-493.
- 497 - WACKER, W.E.C. y B.L. Vallee (1959). Nucleic acids and metals. I. Chromium, manganese, nickel, iron and other metals in ribonucleic acid from diverse biological sources. *J. Biol. Chem.* 234:3257-3262.
- 498 - WALDMANN, O. y G. Pyl (1937). Active immunization of cattle against foot and mouth disease with formolised virus. *Zent. Bakt. ParasitK* 138:401-412.
- 499 - WALDMANN, O. y K. Kobe (1938). Die aktive immunisierung des Rindes gegen Maul-und Klauenseuche. Berlin. tierärztl. Wochschr. 22:317-320.
- 500 - WALDMANN, O, B. Pyl, K.O. Hobohm y H. Möhlmann (1941). Development of the Riems foot-and-mouth disease adsorbate vaccine and its preparation. *Zentbl. Bakt. Parasitkde* 148:1-15.
- 501 - WALSH, K.A., D.L. Kauffman, K.S.V. Sampath Kumar y H. Neurath (1964). On the structure and function of bovine trypsinogen and trypsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 51:301-308.
- 502 - WATSON, J. (1978). The control of foot-and-mouth disease in Great Britain. *Vet. Rec.* 102:187-190.
- 503 - WEBER, K. y M. Osborn (1969). The reliability of molecular weight determination by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244:4406-4412.
- 504 - WEISSMANN, C. (1974). The making of a phage. *FEBS Lett.* 40:10-18.
- 505 - WESSLEN, T. y Z. Dinter (1957). The inactivation of foot-and-mouth disease virus by formalin. *Arch. ges. Virusforsch.* 7:394-402.
- 506 - WESTAWAY, E.G. (1973). Proteins specified by group B Togaviruses in mammalian cells during productive infections. *Virol.* 51:454-465.
- 507 - WETTSTEIN, F.O., H. Nall y S. Penman (1964). Effect of cycloheximide on ribosomal aggregates engaged in protein synthesis "in vitro". *Biochem. Biophys. Acta* 87:525-528.
- 508 - WHITAKER, J.R. y J. Pérez-Villaseñor (1968). Chemical modification of papain. I. Reaction with the chloromethyl ketones of phenylalanine and lysine and with phenylmethylsulfonil fluoride. *Arch. Biochem. Biophys.* 124:70-78.
- 509 - WILD, T.F. y F. Brown (1967). Nature of the inactivating action of trypsin on foot-and-mouth disease virus. *J. gen. Virol.* 1:247-250.
- 510 - WILD, T.F. y F. Brown (1968). A study of the physical properties of foot-and-mouth disease and the effect of various inactivating agents on its structure. *Arch.ges. Virusforsch.* 24:86-103.

- 511 - WILD, T.F., J.N. Burroughs y F. Brown (1969). Surface structure of foot-and-mouth disease virus. *J. gen. Virol.* 4: 313-320.
- 512 - WILD, T.F. y F. Brown (1970). Replication of foot-and-mouth disease virus ribonucleic acid. *J. gen. Virol.* 7:1-11.
- 513 - WIMMER, E. (1979). The genome-linked protein of Picornaviruses: discovery, properties and possible functions en "The Molecular Biology of Picornaviruses", R. Pérez-Bercoff ed., págs. 175-190, Plenum Press, New York.
- 514 - WOOL, S.H., J. Polatnick y R. Knudsen (1981). Scanning, transmission and immuno electron microscopy of tissues from guinea pigs infected with foot-and-mouth disease virus. *Vet. Microb.* 7:391-400.
- 515 - WU, C.W. y D.A. Goldthwait (1969). Studies of nucleotide binding to ribonucleic acid polymerase by a fluorescence technique. *Biochem.* 8:4450-4458.
- 516 - WU, C.W. y D.A. Goldthwait (1969). Studies of nucleotide binding to ribonucleic acid polymerase by equilibrium dialysis. *Biochem.* 8:4458-4464.
- 517 - YARRIS, L.C. (1977). Don't forget the zinc. *Agric. Res. (Washington)* 25:19.
- 518 - YIN, F.H. (1977). Involvement of viral procapsid in the RNA synthesis and maturation of poliovirus. *Virol.* 82: 299-207.
- 519 - YOGO, Y. y E. Wimmer (1973). Poly(A) and Poly(U) in poliovirus double stranded RNA. *Nature New Biology* 242:171-174.
- 520 - YOSHINAKA, I. y R.B. Luftig (1977). Partial characterization of P70 proteolytic factor that is present in purified virions of rausher leukemia virus (RLU). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76:54-63.
- 521 - ZASLAVSKY, V (1979). Inhibition of vaccinia virus growth by zinc ions: effect on early RNA and thymidine kinase synthesis. *J. Virol.* 29:405-408.
- 522 - ZIMMERMAN, E.F., M. Heeter y J.E. Darnell (1963). RNA synthesis in poliovirus infected cells. *Virol.* 19:400-408.
- 523 - ZIOLA, B.R y O.G. Scraba (1974). Structure of the Mengo virion. I. Polypeptide and ribonucleate components of the virus particle. *Virol.* 57:531-542.
- 524 - ZITTLE, C.A. (1946). Ribonuclease. III. The behavior of copper and calcium in the purification of nucleic acids and the effect of these and other reagents in the activity of ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 163:111-117.
- 525 - ZORZOPULOS, J. y H.M. Kosloff (1978). Identification of T4 D bacteriophage gene product 12 as the baseplate zinc metalloprotein. *J. Biol. Chem.* 253:5543-5547.

- 526 - ZWEERINK, H.J. y W.K. Joklik (1970). Studies on the intracellular synthesis of reovirus-specified proteins. *Virology* 41:501-518.
- 527 - ZUCKERMAN, A.J. (1982). Developing synthetic vaccines. *Nature* 295:98-99.