

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

**BIOQUIMICA DE VIRUS - ESTRUCTURA DE LA
ENVOLTURA DEL VIRUS JUNIN**

TESIS
María Flora Rosas
1984

El presente trabajo de tesis para
optar al grado de
Doctor en Ciencias Bioquímicas
ha sido realizado
en el Laboratorio de Química Biológica
de la Facultad de Ciencias Exactas,
bajo la dirección
del Profesor Doctor Oscar Grau.

Mi reconocimiento

a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas por las becas otorgadas oportunamente que permitieron mi iniciación en la investigación,

a la Facultad de Ciencias Exactas por haberme incorporado a sus claustros como docente y por los recursos insumidos en la realización de este trabajo.

Mi agradecimiento

al Dr. Rodolfo R. Brenner por el aporte de ideas a la resolución de problemas vinculados a la identificación de fosfolípidos y muy especialmente por la hospitalidad recibida en su laboratorio donde se realizaron los primeros ensayos de separación de fosfolípidos,

al Dr. Raul Peluffo por su asesoramiento y a la Lic. Susana González por su ayuda inestimables durante el período de puesta a punto de las técnicas mencionadas,

al Sr. Alberto Giorgetti por su desinteresada colaboración y preocupación en la preparación y el armado del equipo de alta presión utilizado en este trabajo,

a los Dres. Ricardo Maronna y Carlos del Santo por su asesoramiento en el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos.

Reflexiones sobre estos cuatro años de trabajo

Los años durante los cuales se desarrolló este trabajo me han permitido no sólo comenzar mi formación científica sino también ir madurando como ser humano. Ninguna de estas cosas hubiera sido posible sin la ayuda de las personas que a lo largo de este tiempo fueron compartiendo las frustraciones y alegrías de la nueva experiencia. A ellas deseo expresar mi gratitud y mi cariño.

Al Dr. Oscar Grau por brindarme la posibilidad de iniciarme en la investigación científica, por su dirección y permanente apoyo en los planos científico y personal durante el desarrollo del presente trabajo, pero por sobre todo por el modo en que lo hizo, acompañándome para que yo fuera encontrando mis propias verdades.

Al Dr. Gabriel Favelukes porque desinteresadamente ha revisado parte del borrador de este trabajo, por su permanente disposición al intercambio de ideas, por su calidez y comprensión.

A la Dra. María Mercedes Lojo por los comentarios y las críticas enriquecedoras al borrador del presente trabajo, pero fundamentalmente por su constante preocupación, por el cariño recibido y su amistad.

A la Srta. Silvia A. Moya por la paciencia y afecto con que dactilografio este trabajo y por su permanente preocupación en la culminación feliz de todas las tareas que he iniciado.

A mis compañeros de Cátedra y Grupo de Trabajo: Graciela Zanassi, Alberto Sarachu, Cristina Añón, Víctor Romanowski, Nora Baro, Stella M. Rustici, Héctor Pilone, Pedro Borgini, Julio C. Ludueña, quienes me brindaron su estímulo constante y han cargado con muchas de las responsabilidades que la culminación de este trabajo me obligó a descuidar. A Patricia Remorini, quien además me brindó su permanente comprensión y me apuntaló en los momentos más difíciles, los del comienzo de la tarea.

A mis alumnos que me ayudaron a aprehender mucho de lo que hoy sé.

A mis compañeros del laboratorio de Química Biológica: Gustavo Caetano, Graciela De Antoni, Luis Wall, Antonio Lagares, Mario Aguilar, Alberto Lejarraga, Alberto Fosatti, por su constante apoyo y colaboración. A Nora Martínez, en quien siempre encontré una mano tendida. A la Dra. Delia Sorgentini que innumerables veces me ayudó en el plano científico con su gran calidez humana.

A Felipe Trimboli que con cariño se ocupó de revisar la redacción y presentación de este trabajo.

A mis compañeros y amigos del Coro Universitario, que me brindaron su comprensión y el estímulo necesarios para seguir adelante.

A mi hermano que dedicó fines de semana y veladas a la realización de los gráficos del trabajo. A él, a Mari, Gisela y Valeria, que en muchas oportunidades ocuparon mi lugar en la familia para que yo pudiera continuar con el trabajo.

A Mónica Adler, Estela Rodríguez Giles y Rubén Spinelli, que me dedicaron tiempo de sus ocupaciones o descanso para simplemente estar conmigo cuando los necesitaba.

a mamá y papá

INDICE

	Página
Indice de tablas y figuras	i
Abreviaturas y símbolos.	iv

INTRODUCCION

I.1. VIRUS JUNIN: AGENTE ETIOLOGICO DE LA FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA	1
I.2. VIRUS JUNIN: MIEMBRO DE LA FAMILIA ARENAVIRIDAE	3
I.2.1. Morfología	4
I.2.2. Componentes bioquímicos	7
I.2.3. Ciclo replicativo y morfogénesis viral	8
I.3. MEMBRANAS VIRALES: CONDICIONANTES DE LA INFECCION Y MADURACION VIRAL	11
I.3.1. Bunyavirus	12
I.3.2. Coronavirus	12
I.3.3. Herpesvirus	13
I.3.4. Myxovirus	15
I.3.5. Paramixovirus	17
I.3.6. Poxvirus	20
I.3.7. Rhabdovirus	23
I.3.8. Retrovirus	27
I.3.9. Togavirus	29
I.3.10. Iridovirus	32
I.3.11. Virus no envueltos: Necesidad de una envol- tura a lo largo del ciclo replicativo	33
OBJETIVOS Y PRESENTACION DEL TRABAJO	36

MATERIALES Y METODOS

M.1. Productos químicos	38
M.2. Animales	39
M.3. Células	39

	Página
M.4. Virus	39
M.5. Medios y soluciones para el cultivo de células . . .	40
M.5.1. PBS	40
M.5.2. Hank's	40
M.5.3. Tripsina-EDTA 0,25%	40
M.5.4. Medio de cultivo para células BHK (MEM-BHK)	41
M.5.5. Medio Vero (MEM-Vero)	41
M.6. PRODUCCION DE ARENAVIRUS	42
M.6.1. Propagación de los virus en animales	42
M.6.2. Crecimiento de los virus en cultivos celulares. . .	43
M.6.2.1. Cultivo de células BHK	43
M.6.2.2. Cultivo de virus	44
M.6.3. Titulación del virus	45
M.6.3.1. Cultivo de células Vero	45
M.6.3.2. Título de los virus	46
M.7. MARCACION RADIATIVA DE VIRUS Y CELULAS CON ³² P . . .	47
M.8. CONCENTRACION DE CELULAS ENTERAS	48
M.9. PURIFICACION DE LOS VIRUS	48
M.10. RUPTURA DE CELULAS CON HOMOGEGINIZADOR	50
M.11. AISLAMIENTO DE MEMBRANAS CELULARES	50
M.11.1. Cosecha y homogeinización celular	51
M.11.2. Purificación de membrana plasmática y retículo endoplásmico	52
M.11.3. Caracterización de las membranas aisladas	54
M.11.3.1. ATPasa activada por sodio y potasio	54
M.11.3.2. Glucosa-6-fosfatasa	55
M.11.3.3. Fosfatasa ácida	55
M.11.3.4. Succinato deshidrogenasa	56
M.12. ANALISIS DE LOS FOSFOLIPIDOS	57
M.12.1. Obtención de los extractos lipídicos	57
M.12.2. Separación de las distintas especies fosfoli- pídicas por cromatografía bidimensional en capa fina. Puesta a punto del método	57
M.12.2.1. Separación de los fosfolípidos virales y de las diferentes fracciones celulares	59
M.12.3. Técnicas para el revelado de los fosfolípi- dos cromatografiados	60
- Revelado con I ₂	60
- Carbonización	60
- Ninhidrina	61
- Dragendorff	61

	Página
M.12.3.1. Reconocimiento de las manchas correspondientes a esfingomielina y fosfatidilinositol y lisofosfatidiletanolamina por cromatografía unidireccional en capa fina	61
M.12.3.2. Autorradiografía (puesta a punto)	62

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO I: SEPARACION E IDENTIFICACION DE FOSFOLIPIDOS

R.1.1. CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL EN CAPA FINA	63
R.1.2. DETECCION DE FOSFOLIPIDOS POR AUTORRADIOGRAFIA	65
R.1.3. IDENTIFICACION DE FOSFOLIPIDOS	66

CAPITULO II: ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPORCIONES RELATIVAS DE LOS FOSFOLIPIDOS DE LOS ARENAVIRUS Y SUS CELULAS HUESPEDES

R.2.1. ASPECTOS PRELIMINARES	69
R.2.1.1. Separación e identificación de fosfolípidos celulares	69
R.2.1.2. Purificación del virus Junín y otros arenavirus	73
R.2.1.3. Separación de fosfolípidos virales	77
R.2.2. CUANTIFICACION DE FOSFOLIPIDOS DE VIRUS Y CELULAS ENTERAS	78
R.2.2.1. Elección de las técnicas estadísticas adecuadas a las características del sistema experimental utilizado	78
R.2.2.2. Relación entre la proporción relativa de los fosfolípidos de los distintos arenavirus, las distintas células y los distintos arenavirus con las distintas células	87
- Fosfatidilcolina	99
- Fosfatidiletanolamina	99
- Fosfatidilserina	100
- Esfingomielina	100
- Lisofosfatidiletanolamina	101
- Fosfatidilinositol	101
- Lisofosfatidilcolina	101
- Acido fosfatídico	102
- Cardiolipina	102

	Página
- Sumatoria de los fosfolípidos desconocidos (D)	102
- Todos los arenavirus poseerían la misma composición fosfolipídica y no alterarían la proporción de los fosfolípidos de las células huéspedes	103
R.2.2.3. Composición fosfolipídica de las células BHK-21(C-13) infectadas con arenavirus y falsamente infectadas	104
R.2.2.3.1. Proporción de los distintos fosfolípidos en la célula huésped	107
R.2.2.3.2. Comparación con los datos bibliográficos	110
R.2.2.4. Composición fosfolipídica de los arenavirus	112
R.2.2.4.1. Relación con la composición fosfolipídica de otros virus	114
R.2.2.5. Interpretación de los resultados obtenidos y programación de nuevos experimentos	114

CAPITULO III: ELECCION Y OPTIMIZACION DE LOS METODOS DE SEPARACION
Y CARACTERIZACION DE MEMBRANAS CELULARES

R.3.1. AISLAMIENTO DE MEMBRANAS CELULARES	116
R.3.2. PUREZA DE LAS MEMBRANAS AISLADAS	119
R.3.2.1. Determinación de proteínas	120
R.3.2.2. Determinación de fósforo inorgánico	121
R.3.2.3. Enzimas marcadoras de la membrana plasmática	122
R.3.2.4. Enzimas marcadoras del retículo endoplásmico	123
R.3.2.5. Enzimas marcadoras de lisosomas	125
R.3.2.6. Enzimas marcadoras de mitocondrias	125

CAPITULO IV: SEPARACION Y CARACTERIZACION DE LAS MEMBRANAS PLASMÁTICA
Y DE RETICULO ENDOPLASMICO DE CELULAS BHK-21(C-13) IN-
FECTADAS CON EL VIRUS JUNIN Y DE LOS CONTROLES NO INFE-
TADOS

R.4.1. CULTIVO Y HOMOGENIZACION DE CELULAS	128
R.4.2. SEPARACION DE LA FRACCION MICROSOMAL	130
R.4.3. RESOLUCION DEL MATERIAL MICROSOMAL	135
R.4.4. CARACTERIZACION DE LAS FRACCIONES AISLADAS	137
R.4.4.1. Células no infectadas	137

	Página
R.4.4.2. Células infectadas	141
R.4.4.3. Influencia de la infección viral sobre la actividad de las enzimas marcadoras de las membranas celulares	142
CAPITULO V: PROPORCION RELATIVA DE LOS FOSFOLIPIDOS DE LAS MEMBRANAS DE CELULAS BHK-21(C-13) INFECTADAS CON EL VIRUS JUNIN Y CELULAS NO INFECTADAS, SU RELACION CON LA PROPORCION RELATIVA DE LOS FOSFOLIPIDOS DEL VIRUS JUNIN	
R.5.1. COMPOSICION FOSFOLIPIDICA DE LAS MEMBRANAS CELULARES	147
R.5.1.1. Composición fosfolipídica de la membrana plasmática y el retículo endoplásmico en células no infectadas	149
R.5.1.1.1. Relación entre la proporción de los fosfolípidos de la membrana plasmática y del retículo endoplásmico de células no infectadas	152
R.5.1.2. Composición fosfolipídica de la membrana plasmática y del retículo endoplásmico de células infectadas con virus Junín. Relación entre ambas	154
R.5.1.3. Relación entre la composición fosfolipídica de las membranas de células infectadas y de las de células no infectadas	156
R.5.2. RELACION ENTRE LA COMPOSICION FOSFOLIPIDICA DEL VIRUS JUNIN CON LAS MEMBRANAS DE LAS CELULAS HUESPEDES Y DE LOS CONTROLES NO INFECTADOS	158
COMENTARIOS E INTERPRETACION	161
CONCLUSIONES	168
BIBLIOGRAFIA	170

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Tabla I: Proporción de las distintas especies fosfolipídicas en las cromatoplasmas sembradas con extractos lipídicos virales o celulares	81
Tabla II: Comparación de las proporciones de cada especie fosfolipídica entre las distintas preparaciones de fosfolípidos de células BHK-21(C-13) enteras falsamente infectadas	84
Tabla IIIA: Comparación de la proporción de PC entre los distintos virus y células enteras	88
Tabla IIIB: Comparación de la proporción de PE entre los distintos virus y células enteras	89
Tabla IIIC: Comparación de la proporción de PS entre los distintos virus y células enteras	90
Tabla IIID: Comparación de la proporción de Sph entre los distintos virus y células enteras	91
Tabla IIIE: Comparación de la proporción de LPE entre los distintos virus y células enteras	92
Tabla IIIF: Comparación de la proporción de PI entre los distintos virus y células enteras	93
Tabla IIIG: Comparación de la proporción de LPC entre los distintos virus y células enteras	94
Tabla IIIH: Comparación de la proporción de PA entre los distintos virus y células enteras	95
Tabla III I: Comparación de la proporción de C entre los distintos virus y células enteras	96
Tabla IIIJ: Comparación de la proporción de D entre los distintos virus y células enteras	97
Tabla IV: Proporción de las especies fosfolipídicas de células BHK-21(C-13).111
Tabla V : Proporción de las distintas especies fosfolipídicas en las cromatoplasmas sembradas con extractos lipídicos de membranas celulares148

	Página
Figura 1: Cromatografía bidimensional en capa fina de fosfolípidos patrones	64
Figura 2: Cromatografía unidireccional en capa fina del material sembrado en una cromatografía bidimensional	67
Figura 3: Esquema experimental de la marcación y extracción de fosfolípidos virales y celulares	70
Figura 4: Fosfolípidos celulares	72
Figura 5: Purificación de la cepa MC ₂ del virus Junín. Lavado en glicerol-tartrato	75
Figura 6: Purificación de la cepa MC ₂ del virus Junín por centrifugación isopícnica en ClCs	76
Figura 7: Fosfolípidos virales	79
Figura 8: Composición fosfolipídica de células BHK-21(C-13).108
Figura 9: Composición fosfolipídica de arnavirus113
Figura 10: Actividad de la succinato deshidrogenasa. Cinética de la reducción del DCFI por acción de la enzima126
Figura 11: Esquema experimental del aislamiento de las membranas plasmáticas y de retículo endoplásmico de células BHK-21(C-13).129
Figura 12: Purificación de la membrana plasmática y retículo endoplásmico de células BHK-21(C-13) no infectadas131
Figura 13: Purificación de la membrana plasmática y de retículo endoplásmico de células BHK-21(C-13) infectadas con la cepa MC ₂ de virus Junín133
Figura 14: Enzimas marcadoras de membranas en distintas fracciones de células BHK-21(C-13).138
Figura 15: Composición fosfolipídica de las distintas fracciones de las células BHK-21(C-13).150
Figura 16: Composición fosfolipídica de las distintas fracciones de las células	

	Página
BHK-21(C-13) infectadas con la cepa MC ₂ del virus Junín	155
Figura 17: Interpretación del mecanismo proba- blemente utilizado por el virus Ju- nín al surgir de los cultivos celu- lares	166

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

- α (como subíndice de t) : niveles de probabilidad
- atm : atmósfera
- ATPasa : adenosina trifosfatasa
- B.D. : bidestilada
- BHK : células fibroblásticas de riñón de hamster lactante
- C : cardiolipina
- cpm : cuentas por minuto
- csp : cantidad suficiente para
- D : total de fosfolípidos desconocidos
- DCF1 : diclorofenolindofenol
- $\Delta\epsilon_{mM}$: variación del coeficiente de extinción milimolar
- DL₅₀ : dosis letal 50
- DNA : ácido desóxidorrribonucleico
- DO : densidad óptica
- EC (seguida de números) : Comisión de enzimas, los números siguientes indican la clasificación formal de la enzima
- EDTA : ácido etilendiaminotetracético
- FALS: falsamente
- FHA: fiebre hemorrágica argentina
- FHB: fiebre hemorrágica boliviana
- FPV : poxvirus de la viruela aviar
- g : aceleración de la gravedad
- μg : microgramos
- h : hora
- HEPES : ácido 4-(2-hidróximetil)-1-piperazimetanosulfónico
- HOMOG : homogenado
- INF : infectadas
- λ : longitud de onda

LCM : coriomeningitis linfocitaria
Leu : leucina
LPC : lisofosfatidilcolina
LPE : lisofosfatidiletanolamina
mCi : mili Curie
m.d.i. : multiplicidad de infección
MEM : medio mínimo esencial
MICR. : fracción microsomal
MIT. : fracción mitocondrial
M.PLASM. : membrana plasmática (en gráficos puede figurar MP)
MSF : metasulfato de fenazina
Na-ATP : 2'-dexósiadenosina-5'-trifosfato sódico
NADH : nicotinamida-adenín dinucleotido reducida
 n_e : grados de libertad
P : grado de significación
P/P : peso en peso
PA : ácido fosfatídico
PBS : solución salina con buffer $PO_4H^-/PO_4H_2^-$
PC : fosfatidilcolina
PE : fosfatidiletanolamina
PI : fosfatidilinositol
PM : peso molecular
PS : fosfatidilserina
P/V : peso en volumen
RET.END. : retículo endoplásmico (en gráficos puede figurar RE)
RNA : ácido ribonucleico
RNAs : ácidos ribonucleicos
rpm : revoluciones por minuto
rRNA : ácido ribonucleico ribosomal
S : unidad Svedberg

s^2 : varianza de la población
 S^2 : varianza combinada de poblaciones
SFV : virus Semliki Forest
Sph : esfingomielina (en gráficos puede estar como S)
SV 40 : poliomavirus de simios
t : razón t
TCA : ácido tricloroacético
TE : solución salina con Tris y EDTA
Tm : temperatura de fusión
TPB : caldo triptosa fosfato
Tris : tris(hidroximetil)-aminometano
ts : mutantes sensible a la temperatura
TSE : solución salina con tris, Na^+ y EDTA
u : unidad
UFP : unidad formadora de placa
Vero : células de riñón de mono verde africano
 V_0 : velocidad inicial
VSV : virus de la estomatitis vesicular
 \bar{x} : media aritmética

INTRODUCCION

I.1.VIRUS JUNIN: AGENTE ETIOLOGICO DE LA FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA

El virus Junín es el agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) comúnmente conocida como "mal de los rastrojos". Esta enfermedad es endemo-epidémica y se circunscribe a la zona geográfica central de la República Argentina.

Entre las manifestaciones clínicas de la enfermedad se describen un síndrome febril, con alteraciones hematológicas, cardiovasculares, renales, digestivas, neurológicas con una larga convalecencia. La severidad de las afecciones es variable; en la mayoría de los casos los pacientes se recuperan, pero en algunos otros, la enfermedad sigue un curso fatal.

Esta enfermedad se reconoce como "una nueva forma nosológica", en el año 1955 cuando Arribalzaga, basándose en casos observados en las epidemias ocurridas en 1953 y 1954, en la zona de Bragado, la describe como "Una nueva enfermedad epidemiológica y de germen desconocido" (Arribalzaga, 1955). Estas no parecen ser las primeras epidemias, ya que Martínez Pintos cita referencias que indicarían la existencia de brotes en la zona en el año 1943 (Martínez Pintos, 1962). Sin embargo, la etiología viral de la enfermedad no se estableció hasta que en 1958, al producirse un nuevo brote, Parodi por un lado y Pirosky por otro, aislaron el virus a partir de sangre y órganos de pacientes internados en el hospital regional de Junín, de donde deriva el nombre del mismo (Parodi y col., 1958; Piroski y col., 1959).

La mayoría de los pacientes son trabajadores del campo, empleados en la cosecha del maíz, girasol o sorgo. La época de

tales cosechas coincide con los picos epidémicos de la enfermedad, entre los meses de abril y julio, fecha que coincide también con el crecimiento numérico de los roedores, especialmente del género *Calomys*, en zonas rurales (Sabattini, 1966). Estudios de campo en las zonas endémicas han establecido que diversos roedores, cricétidos silvestres, actúan como reservorios naturales del virus Junín (Parodi y col., 1959a; Sabattini y col., 1977), siendo el *Calomys musculinus*, aparentemente, el que tiene el papel epidemiológico más importante (Sabattini y col., 1977). Estos roedores difícilmente invaden zonas urbanas, lo cual explica la mayor prevalencia de la enfermedad en la zona rural (Weissenbacher y Damonte, 1983).

La infección experimental del *Calomys musculinus* con una cepa patógena del virus Junín provoca una infección permanente, con excreción de virus por orina y saliva, y con un alto título de virus en glándulas salivales, lo cual indica el importante rol que estos órganos juegan en la replicación, excreción y diseminación del virus (Martínez Peralta y col., 1979a, 1979b).

La región endémica representa un 3 a 4% de la superficie total del país. Sin embargo, en los últimos 20 años existió una creciente extensión territorial de la enfermedad (Maiztegui y Sabattini, 1977). Esto originó que el número de habitantes potencialmente expuesto a la infección con el virus Junín haya ascendido de 250.000 en 1958, a más de un millón en la actualidad.

1.2. VIRUS JUNIN: MIEMBRO DE LA FAMILIA ARENAVIRIDAE

En 1963, Mettler encontró que el virus Junín, aislado en 1958 por Parodi, y el virus Tacaribe, aislado en Trinidad en 1956-1958 (Downs y col., 1963), estaban emparentados serológicamente (Mettler y col., 1963). Ninguno de estos virus parecía tener relación alguna con cualesquiera de los otros arbovirus conocidos hasta la fecha (Mettler y col., 1963) pese a que en un comienzo se había clasificado tentativamente al virus Junín como arbovirus, por el hecho de haberse podido aislar a partir de ácaros y roedores (Parodi y col., 1959a, 1959b). Sin embargo, al no poder demostrarse experimentalmente la necesidad de un artrópodo como vector para transmitir el virus, esta clasificación debió ser reconsiderada.

En el año 1965 Johnson encontró que el virus de la Fiebre Hemorrágica Boliviana (FHB) o virus Machupo está relacionado antigénicamente con el virus Junín y el virus Tacaribe (Johnson y col., 1965). Este y otros hallazgos, que indicaban relaciones antigénicas y similitud morfológica y biológica entre estos y otros agentes virales hicieron que se propusiera la definición de un nuevo grupo de virus (Rowe y col., 1970; Pfau y col., 1974). El mismo fue oficialmente aceptado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus al instituirse la familia Arenaviridae, clasificación que se corroboró en la última reunión de dicho Comité (Matthews, 1982). Esta incluye, además de los tres virus ya citados, al virus tempranamente conocido de la coriomeningitis linfocitaria (LCM) (Armstrong y Lillie, 1934); otros aislados e identificados posteriormente al descubrimiento del virus Machupo: Amapari (Pinheiro y col., 1966), Paraná (Webb y col., 1970), Tamiami (Calisher y col.,

1970), Pichindé (Trapido y Sanmartín, 1971), Latino (Johnson y col., 1973), Lassa (Buckley y Casals, 1970) y Mozambique (Wulff y col., 1978) y actualmente se consideran como miembros probables a los virus Flexal y BeAN (293022) (Matthews, 1982).

Por inmunofluorescencia indirecta (Wulff y col., 1978) y por fijación de complemento (Casals y col., 1975) se pudieron establecer dos grandes grupos dentro de la familia; el de los virus del Viejo Mundo que comprende al virus LCM, diseminado universalmente y los virus Lassa y Mozambique originarios del Africa Occidental, y el grupo de los virus del Nuevo Mundo o Complejo Tacaribe, integrado por los 8 virus restantes que se ubican en distintos lugares del continente americano.

Son patógenos para el hombre sólo los virus Junín (FHA), virus Machupo (FHB, clínicamente similar a la FHA), el virus Lassa, que produce en el hombre una enfermedad febril con alta tasa de mortalidad, y el virus LCM, que habitualmente le produce al ser humano infecciones leves o inaparentes (Buchmeier y col., 1980).

1.2.1. Morfología

La característica fundamental que comparten todos estos virus es su peculiar morfología que es la que da origen al nombre de la familia. El término arenavirus deriva del latín "arenosus" y refleja la presencia de gránulos característicos que se observan en el interior de los viriones al microscopio electrónico. Así, el interior de los viriones está constituido por una matriz amorfa, electrón-lúcida, que

contiene un número variable (2-10/virión) de gránulos electro-densos de 20 a 25 nm de diámetro, morfológica y bioquímicamente indistinguibles de los ribosomas celulares (Murphy y col., 1969, 1970; Ofodile y col., 1973; Lascano y Berría, 1969, 1977; Johnson y col., 1965; Abelson y col., 1969; Howard y Simpson, 1980). A partir del virus Pichindé pudieron aislarse los ribosomas 80 S y sus subunidades 60 S y 40 S (Farber y Rawls, 1975), y a partir de las subunidades se aislaron los correspondientes rRNA, cuyas características son indistinguibles de las del rRNA celular (Carter y col., 1973). También se demostró que pueden ser incorporados al virión ribosomas celulares preexistentes a la infección viral (Pedersen, 1973; Carter y col., 1973). Trabajos realizados con el virus Pichindé descartan la participación de estos ribosomas en la replicación viral (Howard y Simpson, 1980) y la necesidad de los mismos para que se establezca la infección viral (Leung y col., 1977).

Aparentemente, la variabilidad en el número de ribosomas incluidos depende del clon viral y el tipo de células huéspedes (Veza y col., 1977, 1978).

Por observaciones en el microscopio electrónico, los viriones han sido descriptos como partículas redondas, ovales o pleomórficas con un diámetro promedio de 110-130 nm, pero con amplias variaciones individuales que oscilan desde 50 a 280 nm. Por técnicas de filtración a través de membranas se encontraron resultados similares (Buckley y Casals, 1970; Coto y col., 1972; Johnson y col., 1965; Mifune y col., 1971). Para el virus Junín, específicamente, mediante dichas técnicas se encontraron variaciones de tamaño de acuerdo con la fuente de virus empleada. Así, el tamaño estimado de la partícula infecciosa del virus Junín replicado en cerebro de ratón fue de 40-70 nm

de diámetro, en tanto que para el virus proveniente de células Vero la infectividad era retenida por membranas de 100 nm (Coto y col., 1972). En tejidos obtenidos a partir de pacientes con FHA se halló una gran proporción de partículas pequeñas, de tamaño uniforme de 60 nm de diámetro, con matriz densa, además de las clásicas partículas pleomórficas de mayor tamaño y con gránulos ribosomales (Maiztegui, 1975).

El genoma de los arenavirus está fragmentado. Cuando se trata a los viriones con detergentes no iónicos se observan en el microscopio electrónico filamentos circulares, cerrados, en forma de un collar de cuentas (Palmer y col., 1977; Vezza y col., 1977; Howard y Simpson, 1980).

La partícula viral se observa en el microscopio electrónico rodeada por una envoltura; los distintos autores la describen como una estructura membranosa, espesada, a partir de la cual se resuelven proyecciones superficiales de 5-10 nm de longitud, regularmente espaciadas entre sí, llamadas espículas (Murphy y col., 1970; 1975). Otros investigadores afirman que en cortes seleccionados por su extrema delgadez, las partículas del virus Junín no presentan ni proyecciones superficiales, ni espesamiento de la envoltura, e interpretan que ambos elementos serían artefactos resultantes de la observación de cortes gruesos (Lascano y col., 1977; 1979). A pesar de esta discrepancia la presencia de espículas en la envoltura es actualmente considerada una característica estructural taxonómica de todos los arenavirus (Matthews, 1982).

Por observaciones en el microscopio electrónico también se describe la envoltura viral como una membrana unitaria de características semejantes a la membrana plasmática celular y de aparente constitución lipoproteica.

1.2.2. Componentes bioquímicos

El genoma del virus Junín, así como el de los otros arenavirus, está constituido por RNA. Esto se determinó indirectamente al observar que los inhibidores de síntesis de DNA no afectaban el crecimiento viral (Martínez Segovia y Grazioli, 1969). Mediante el análisis directo por electroforesis en geles de poliacrilamida se ha comprobado que los arenavirus, además de los RNAs ribosómicos 28 S, 18 S y 4-6 S, poseen 2 o quizás 3 RNAs virales; 33-31 S llamado L (large) y 25-22 S llamado S (small) y quizás uno de 15 S (Abelson, 1969; Añón y col., 1976; Carter y col., 1973; Farber y col., 1975; Grau, 1977; Pedersen, 1970, 1973; Vezza y col., 1977, 1978).

Estudios realizados con el virus Pichindé parecían demostrar que el mismo posee RNA de cadena negativa (Carter, 1974; Leung, 1977, 1978, 1979; Vezza, 1977). Sin embargo, experimentos recientes demuestran que una porción de la cadena S es positiva y otra negativa (Auperin y col., 1984).

El peso molecular de la cadena L se estimó en $2,1 - 3,1 \times 10^6$ (Pedersen, 1973) y el de la cadena S como $1,1 - 1,6 \times 10^6$ (Dutko y col., 1981).

Se demostró que en el virus Pichindé la cadena S codifica para las glipoproteínas G1 y G2 y para la nucleoproteína N (Leung y col., 1981; Vezza y col., 1980).

Se hallaron relaciones molares variables entre los RNAs S y L (Añón y col., 1976; Grau, 1977; Farber y col., 1975). Además, se describió la obtención de virus LCM diploides respecto de uno de los segmentos de RNA (Romanowski y Bishop, 1983).

Los arenavirus poseen un polipéptido mayoritario de PM

63-72 K, no glicosilado asociado a la nucleocápside y una glicoproteína asociada a la envoltura viral de PM = 34-44 K (Buchmeier y col., 1978; Gard y col., 1977; Grau y col., 1981; Kiley y col., 1980; Martínez Segovia y De Mitri, 1977; Ramos y col., 1972; Romanowski, 1981; Vezza y col., 1977). Buchmeier demostró la existencia de otro glicopéptido para el virus LCM y Ramos para el virus Pichindé. Martínez Segovia describe otras cuatro proteínas para el virus Junín, una de ellas una glicoproteína de PM = 58 K.

La presencia de lípidos en la partícula viral se deduce de la sensibilidad que los arenavirus presentan frente a solventes orgánicos (Buckley y col., 1970; Calisher y col., 1970; Coto y col., 1972; Downs y col., 1963; Johnson y col., 1965; Mettler y col., 1961; Mifune y col., 1971; Pfau, 1974; Webb y col., 1967).

1.2.3. Ciclo replicativo y morfogénesis viral

No existe información detallada sobre la secuencia de eventos moleculares que ocurren dentro de la célula infectada durante la infección y replicación viral.

La infección viral no altera la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos de las células BHK-21 (Coto y col., 1970), pero sí la de las células Vero, sobre las que ejerce efecto citopático (Franze-Fernández, 1984). La presencia de la RNA polimerasa II celular parece ser necesaria para la replicación viral (Mersich y col., 1981).

Para los virus Junín, Tacaribe y Pichindé se determinó que el tiempo de generación viral es de 5 a 6 horas en la

fase estacionaria de crecimiento; y con el empleo de actinomicina D como inhibidor se halló que no es necesaria la transcripción celular simultánea para la producción viral (López y col., 1983).

Utilizando inhibidores de la glicosilación se evidenció la importancia biológica del componente glicosídico de la glicoproteína asociada a la envoltura viral como determinante de la capacidad infectiva del virión (Daelli y Coto, 1982; Padula y Martínez Segovia, 1983).

Por experimentos de "pulse chase" se demuestra la existencia en los extractos de células infectadas con virus Junín de una glicoproteína de PM = 58 K que sería la precursora de la proteína viral madura de PM = 30-32 K (Rustici y col., 1982). Esto hace pensar que la glicoproteína de PM = 58 K descrita por Martínez Segovia como viral y no hallada por Romanowski, sería en realidad el precursor de la de PM = 30-32 K que podría a veces no ser procesada o ser arrastrada por los viriones y no eliminarse debido a una purificación insuficiente.

Por el hecho de observar a la actina, producto genético celular, firmemente asociada al virus se piensa que se debe reconsiderar la función del citoesqueleto en la maduración viral (Pasian y col., 1983).

Pese a todo lo expuesto, la secuencia de pasos que conducen a la maduración del virus es aún desconocida.

Estudios realizados por microscopía electrónica tendientes a esclarecer la morfogénesis viral en células en cultivo de tejido, sugieren que el virus completa su maduración liberándose al medio externo por un proceso de brotación a través de la membrana plasmática celular; muy rara

vez se ven partículas virales brotando de membranas intracitoplasmáticas (Murphy y col., 1975; Lascano y Berría, 1977). De estas observaciones los distintos autores infieren que la envoltura viral se origina a partir de la membrana plasmática celular.

1.3. MEMBRANAS VIRALES: CONDICIONANTES DE LA INFECCION Y MADURACION VIRAL

Muchos virus animales, así como también algunos virus de plantas y de bacterias, poseen una envoltura lipoproteica que rodea a su nucleocápside.

Algunos de estos virus surgen de los cultivos celulares por un proceso de brotación a través de la membrana plasmática celular, mediante el cual arrastrarían los componentes lipídicos pero no los proteicos de esta membrana, por un mecanismo aún no bien conocido. Sin embargo, pese a ser éste el procedimiento más utilizado por los virus para adquirir su envoltura, no es el único. Así, existen virus que forman su envoltura introduciendo componentes de membranas internas y aún otros parecen tener una composición propia y definida diferente de la de cualquier estructura celular, con una síntesis "a novo" de sus componentes.

En el caso de los virus animales, que son los que nos ocupan, y de los cuales se tienen más datos acerca de su envoltura, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus reconoce 11 familias de virus envueltos; ellas son: arenaviridae, báculoviridae, bunyaviridae, coronaviridae, herpesviridae, orthomyxoviridae (o mixovirus), paramixoviridae, poxviridae, rhabdoviridae, retroviridae, togaviridae, y eventualmente algunos de los miembros de la familia iridoviridae que presentarían envolturas.

De la familia arenaviridae ya nos hemos ocupado y hemos dicho que es muy poco lo que se conoce acerca de la envoltura de los virus que la integran. En tanto, de la familia báculoviridae sólo se sabe que sus miembros poseen membrana que

contiene lípidos, pues son sensibles a los solventes orgánicos, pero se desconoce el origen de la misma (Matthews, 1982).

Trataremos seguidamente en detalle las demás familias de virus envueltos.

I.3.1. Bunyavirus

Son virus con RNA monocatenario, fragmentado, como genoma. Entre sus miembros más destacados se encuentran el agente etiológico de la fiebre hemorrágica de Crimea - Congo y los Uukuvirus.

La multiplicación viral parece realizarse en el citoplasma y la maduración, por gemación, a través de la membrana del complejo de Golgi, donde el virus se acumularía (Murphy y col., 1973; Matthews, 1979). Sin embargo, los fosfolípidos del virus Uukuniemi se muestran virtualmente idénticos a los del Semliki Forest Virus (SFV) cuando ambos son cultivados en células BHK-21. La proporción de las distintas especies fosfolipídicas es semejante, a su vez, a la de la membrana plasmática de dichas células (Renkonen y col., 1972b). Así, Renkonen sugiere que este virus adquiere su envoltura por brotación a través de la membrana plasmática celular, aunque no descarta que pueda ocurrir por otra vía, como proponen otros autores (Von Bonsdorff y col., 1970).

I.3.2. Coronavirus

El genoma de estos virus está constituido por un RNA

monocatenario no segmentado; el virus tipo de esta familia es el de la bronquitis infecciosa aviar.

Estudios de microscopía electrónica de células infectadas con coronavirus indican que el ensamblaje de los componentes virales ocurre de manera tal que éstos brotan a través de las membranas intracitoplasmáticas, incluyendo el complejo Golgi y el retículo endoplásmico (David Ferreyra y Manaker, 1965; Oshiro, 1973). Los viriones se acumularían en gran cantidad dentro de las vacuolas y serían liberados cuando la membrana vacuolar se fusiona con la membrana plasmática celular. En etapas posteriores se verían grandes zonas de la membrana plasmática celular con virus adheridos, pero esto no significaría que el virus brote a través de ella (Oshiro, 1973).

1.3.3. Herpesvirus

El genoma de estos virus es un DNA bicatenario; los miembros más destacados de esta familia son los herpes humanos.

En los herpesvirus se observa una interesante unión covalente entre las proteínas glicosiladas o no glicosiladas de la envoltura viral y los lípidos (Abodeely y col., 1971; Perdué y col., 1974). Aparentemente, los lípidos se acomodan en una bicapa, formando una membrana unitaria. La composición lipídica de los herpesvirus es semejante a la de la membrana nuclear interna, a través de la cual se observa a los virus brotando, y es diferente de la de la membrana nuclear externa y de la de otras membranas intracitoplasmá-

ticas (Ben Porat y Kaplan, 1972; Darlington y Moss, 1969; Epstein, 1962; Fong y col., 1973; Schwartz y Roizman, 1969). Aún cuando la mayoría de los lípidos virales parecen ser sintetizados antes de la infección viral, los fosfolípidos marcados con ^{32}P , sintetizados después de la infección, parecen ser preferencialmente incorporados desde la membrana nuclear al virión (Ben Porat y Kaplan, 1971). Así, la incorporación de lípidos no sería un proceso al azar.

La membrana nuclear interna aparece engrosada en las regiones donde se ve el virus brotando, presumiblemente debido a la presencia de la glicoproteína viral (Bibor y col., 1982). En las células infectadas se vieron nucleocápsides virales en el nucleoplasma y prolongaciones extrañas en la membrana nuclear; las zonas de la membrana nuclear que estaban distorsionadas, no presentaban poros (Haines y Baerwald, 1976). Se han observado partículas de virus envueltos, maduros, en vacuolas o canales citoplasmáticos, los que prepararían la salida del virus desde la membrana nuclear hasta la superficie celular (Morgan y col., 1959; Darlington y Moss, 1969; Schwartz y Roizman, 1969). El aparato de Golgi sería importante no solo para el egreso del virus sino también para la maduración de la glicoproteína viral de envoltura (Johnson y Spear, 1982).

El rol esencial de los lípidos de la envoltura viral para la infectividad del virus fue demostrado mediante la inactivación del mismo con fosfolipasa C (Spring y Roizman, 1968). Aparentemente, la infección viral comienza cuando la envoltura vírica se adsorbe a receptores de la membrana plasmática celular, se funde con ella y finalmente

libera la cápside en el citoplasma de la célula (Matthews, 1979).

1.3.4. Myxovirus

El genoma de estos virus es un RNA monocatenario, fragmentado. Los virus más característicos de esta familia son los de la influenza (gripe).

En la envoltura de estos virus existen dos tipos de glicoproteínas: las hemoaglutininas y las neuroaminidasas, responsables ambas de las espículas (Laver y Valentine, 1969; Webster y Darlington, 1969; Rott y col., 1970). Estudios de microscopía electrónica mostraban que probablemente la envoltura del virus de la influenza se adquiriera por brotación, a través de la membrana plasmática celular (Murphy y Bang, 1952), y que existiría una continuidad entre la membrana unitaria de la superficie celular y la de la partícula de virus emergente (Bächi y col., 1969; Compans y Dimmock, 1969). Se piensa que la envoltura viral adquiere los lípidos de la membrana plasmática celular, y parecería que el ordenamiento de los lípidos en una y otra membrana es semejante. Los primeros estudios demostraban que los lípidos celulares premarcados eran incorporados dentro del virus y que la composición de los lípidos virales reflejaba la de los celulares (Wecker y col., 1957; Kates y col., 1961). Sin embargo, estudios más recientes indicarían que una parte de los lípidos virales podría sintetizarse "a novo" luego de la infección viral (Blough, 1974).

Se han encontrado diferencias en la composición de ácidos grasos de varias cepas del virus de la influenza, cultivados en huevo (Tiffany y Blough, 1969; Blough y Tiffany, 1973). Debido a estas diferencias se ha propuesto que son las proteínas de la envoltura viral las que de terminan la composición lipídica por asociación con lípidos específicos. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados indican que la composición lipídica refleja la de la membrana plasmática celular, y que ella puede ser variada por las proteínas virales sólo dentro de un estrecho margen. Se ha determinado que la proteína de la matriz (M) del virus de la influenza, que es el componente estructural predominante, está firmemente unida a los lípidos de la envoltura viral; sólo una porción específica de la molécula proteica tiene una alta afinidad por la bi capa lipídica, pero esta última puede ser de distintos orígenes (Gregoriades, 1980). Así, los virus obtenidos a partir de diferentes células huéspedes poseen la misma composición proteica, pero distinta composición en lípidos, la cual es siempre semejante a la de la membrana plas mática de la célula huésped (Compans y Klenk, 1979). Esta diferencia en la composición parece estar relacionada con la diferencia de fluidez observada con resonancia de spin electrónico. Así, los virus de la influenza cultivados en células MDBK poseen una bicapa lipídica más rígida que los cultivados en células BHK-21 (Landsberger y col., 1973) de la misma forma en que la membrana plasmática de las cé lulas MBDK es más rígida que la de las células BHK-21. Por otro lado, se sabe que la distribución de lípidos entre las capas interna y externa de la membrana viral es

asimétrica (Tsai y Lenard, 1975; Rothman y col., 1976), característica que también presenta la membrana plasmática celular.

En cuanto a la forma en que el virus adquiere su envoltura, se ha insistido mucho en la importancia que tiene el citoesqueleto celular para transportar los elementos constitutivos de los viriones hasta la superficie de la célula. Sin embargo, recientemente se ha demostrado, para el virus de la influenza, que la producción viral no se ve afectada con la ruptura del citoesqueleto cuando no se altera el transporte de hexosas (lo que normalmente ocurriría como un efecto secundario de la ruptura del citoesqueleto). Esto marca la gran importancia que tiene la porción glucídica en la maduración del virus (Griffin y col., 1983).

Las glicoproteínas también jugarían un rol importante en la infección viral. La penetración de la nucleocápside del virus de la influenza dentro de la célula huésped se haría por un mecanismo de fusión, para el cual se necesitaría el concurso de las glicoproteínas virales (Huang y col., 1980; Hosaka y col., 1983).

1.3.5. Paramixovirus

Estos virus poseen un RNA genómico monocatenario. Los miembros más característicos de la familia son los virus de la parainfluenza, que producen enfermedades respiratorias en hombres y mujeres, el de la enfermedad de Newcastle y el virus Sendai.

La envoltura de estos virus posee glicoproteínas con

funciones de hemoaglutininas y neuroaminidasas, que serían responsables de las espículas del virus.

En el proceso de maduración estos virus adquieren los lípidos de la membrana plasmática celular (Klenk y Chopin, 1969). Todas las especies lipídicas observadas en la membrana plasmática celular se encuentran en la misma proporción en la envoltura viral, con la excepción de los gangliósidos, los que debido a la acción de las neuraminidasas no son incorporados al virión (Klenk y Chopin, 1969).

Se sabe que para la maduración del virus es necesario el concurso del citoesqueleto celular (Bohn y col., 1983) y para la formación de la envoltura viral se postulan como precursores zonas discretas de la membrana plasmática celular o "parches". La idea de la formación de "parches" deriva de estudios de microscopía electrónica que muestran, por un lado, una capa con proyecciones (espículas) cubriendo la partícula viral naciente, pero ausente en la superficie adyacente (Compans y col., 1966). Por otro lado, los anticuerpos virales marcados con ferritina se unen a la zona de la superficie celular, de donde se ve al virión brotando pero no las zonas adyacentes (Chopin y col., 1971). Además, se conoce cuál es la estructura de las proteínas virales en la membrana plasmática de las células infectadas (Brown y col., 1981), y por inmunofluorescencia se determinó que las cadenas de nucleoproteínas del virus Sendai se unían a la cara interna de la membrana plasmática de células infectadas (Büechli y Bach, 1982). Reforzando la idea de los "parches", se han observado restos de ácido neuramínico sólo en las zonas de la membrana plasmática celular no alterada, pero ausente en las zonas donde se ve la partícula viral brotando (Klenk

y Choppin, 1970).

Experimentos recientes muestran que las glicoproteínas virales formadoras de las espículas, poseen movilidad rotacional dentro de la envoltura viral. El grado de movilidad depende de la temperatura y se correlaciona con la capacidad de fusión del virus, pero no con la capacidad de hemaglutinación (Lee y col., 1983).

Estudios con métodos de resonancia de spin electrónico han revelado modificaciones en la fluidez de la membrana plasmática celular durante la fusión virus-célula (Lyles y Landsberger, 1977). Por otro lado, en células de embrión de pollo infectadas con cepas virulentas del virus de la enfermedad de Newcastle se detectó un gran aumento en el total de los ácidos grasos no saturados. Este incremento no se observó en las células infectadas con virus avirulentos de la enfermedad de Newcastle, Sendai o influenza A. El virión de la cepa virulenta cosechado de la cavidad corioalantoidea, también tiene un alto contenido de ácidos grasos no saturados. El aumento de ácidos grasos no saturados en células infectadas con la cepa virulenta se correlaciona con el dato de la modificación de la permeabilidad y fluidez de la membrana plasmática celular e indirectamente con la inhibición de la síntesis de proteínas y RNA que sufren estas células (Blenkharn y Apostolov, 1981). Todo esto hablaría de una gran dinámica dentro de la membrana plasmática celular y, por lo tanto, de la posibilidad de aceptación de la hipótesis actualmente considerada, que propone que los "parches" no constituirían como se había pensado en un primer momento, estructuras rígidas.

La importancia de la envoltura viral en la penetración

de la nucleocápside dentro de la célula huésped queda demostrada por el hecho que el virus Epstein Bar puede unirse a las células con receptor Epstein Bar negativo mediante la modificación que sobre estas células puede causar la envoltura aislada del virus Sendai (Ridha y Menezes, 1983).

1.3.6. Poxvirus

El genoma de estos virus es un DNA bicatenario. Entre los miembros más destacados de la familia se encuentran los virus de la viruela humana y la de otros animales, el vaccinia virus (virus de la vacuna).

El virus vaccinia posee una membrana estructuralmente semejante a la membrana plasmática celular, sin embargo, los lípidos de la misma no parecen derivar de la membrana plasmática celular; muy probablemente exista un proceso de autoensamblaje a través de "factores virales" citoplasmáticos (Dales y Mosbach, 1968). Como consecuencia de ello la composición lipídica del virus no se asemeja a la de la membrana plasmática celular (Stern y Dales, 1974). Según demuestra estos autores, en el virus entrarían fosfolípidos preformados y nacientes. El pasaje de fosfolípidos de liposomas al virus se demostró "in vitro", lo que podría indicar una transferencia "in vivo" de fosfolípidos del retículo endoplásmico al virus (Stern y Dales, 1974).

Existen evidencias de que la infección viral afecta el metabolismo de los lípidos de la célula huésped. Así, se observan cambios en los glicolípidos celulares (Anderson y Dales, 1978).

Por otro lado, después de la infección con el poxvirus de la viruela avian (FPV), el epitelio del pollo contiene niveles altos de colesterol, ésteres del colesterol y escualeno (White y col., 1968), mientras que en la membrana corioalantoidea el FPV provoca una acumulación de ésteres del colesterol y un incremento de la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (Lyles y col., 1975). Esta enzima catalizaría el paso límite de la biosíntesis del colesterol (Brown y Goldstein, 1980). Así, la acumulación de colesterol puede resultar de la colesterogénesis inducida. Esto es de considerable interés porque en algunos animales las lesiones arteriales, observadas después de la infección viral, se asemejan a las de la aterosclerosis (Fabricant y col., 1973, 1978). Cuando se estudia el efecto de la infección viral en cultivos de tejido no se observa acumulación de escualeno en las células infectadas, de esto se deduce que el virus no necesita esos lípidos inusuales para formar su membrana. Además, se observa que el FPV puede afectar el metabolismo de los lípidos de la célula huésped de varias maneras, dependiendo del sistema hospedador (Buttke y Gafford, 1982).

Se han observado modificaciones en los núcleos de las células infectadas con el virus Orf o con el de la estomatitis pustular, tanto "in vivo" como "in vitro". Sin embargo, mediante el empleo de anticuerpos fluorescentes, se determinó que sólo existen antígenos específicos del poxvirus en el citoplasma celular (Pospischil y Bachmann, 1980).

La forma extracelular, envuelta del virus de la vacuna es generalmente una forma infecciosa activa, en tanto que la forma intracelular aún desnuda consiste fundamentalmente

en virus no infecciosos. El virus envuelto parece ser el responsable de la diseminación en los sistemas "in vitro", lo cual hace sospechar que cumple un rol muy importante en la diseminación "in vivo" (Payne, 1980).

Se sabe que durante la diseminación el virus entra en contacto con las membranas de las vesículas de Golgi y con la cara protoplasmática de la membrana plasmática celular. Esto sugeriría que el virus extracelular debería su infectividad a la interacción con estas membranas. Hoy se sabe que inhibidores de la glicosilación, a nivel del complejo de Golgi, afectan la liberación del virus envuelto (Payne y Krisbensson, 1982). Además, se han podido activar virus no infecciosos mediante la incubación de los mismos con membranas plasmáticas celulares purificadas (Ichihashi y Oie, 1982). Esta activación estaría mediada por componentes de la membrana, estables al calor (Ichihashi y Oie, 1982). Una suspensión de liposomas que contengan los lípidos extraídos de las membranas plasmáticas celulares, activa los virus no infecciosos de la misma manera en que lo hacen las membranas plasmáticas celulares, purificadas y expuestas al calor. Los fosfolípidos, pero no los lípidos neutros ni los glicolípidos, tienen la habilidad de activar estos virus. Los liposomas constituídos por fosfatidilserina (PS) activan los virus no infecciosos, mientras que la fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina (Sph) no tienen efecto sobre la infectividad viral. La lisofosfatidilcolina (LPC) reduciría la infectividad. El tratamiento con membrana plasmática purificada o con liposomas aumenta ligeramente la hidrofobicidad del virus pero no altera su densidad.

El análisis de los virus activados y purificados muestra que todas las especies fosfolípídicas contenidas en la membrana plasmática o liposomas de la incubación son transferidas al virus. El proceso es una transferencia neta y no una reacción de intercambio, y se produce rápidamente a 37°C llegando a la saturación dentro de la hora de incubación. Cuando la mezcla se incuba a 8°C no se produce la activación ni la transferencia de lípidos. De todo esto se deduce que el virus tiene una alta habilidad para extraer fosfolípidos de las membranas con bicapa lipídica, con las cuales se incuba y que la asociación con PS le otorga al virus una alta infectividad (Chihashi y Oie, 1983). Con esto queda en evidencia el rol de los fosfolípidos en la infectividad del virus ya que no sólo son un escenario inerte donde se asientan las proteínas sino que juegan un importante papel en la interacción virus-célula.

1.3.7. Rhabdovirus

El genoma de estos virus es un RNA monocatenario. El miembro más prominente de la familia por su peligrosidad para el hombre y para los animales es el de la rabia; otro miembro muy conocido y estudiado es el virus de la estomatitis vesicular (VSV).

La composición lipídica del VSV es semejante aunque no estrictamente igual a la de la membrana plasmática de la célula huésped. Cuando se analizan los lípidos de dos cepas distintas del VSV se observa que ambas poseen la misma composición cuando son cultivados en la misma línea

celular. Esta composición es semejante a su vez, a la de la membrana plasmática celular sugiriendo esto que los virus adquieren su envoltura a partir de la misma (Mc Sharry y Wagner, 1971).

Sin embargo, pese a tener aparentemente una morfogénesis muy diferente, los virus intra y extracelulares de la rabia poseen la misma composición lipídica, de lo que se deduce que la nucleocápside viral es capaz de dirigir la formación de su propia membrana sin el concurso de las membranas celulares, utilizando los fosfolípidos celulares y proteínas específicas del virus (Schlesinger y col., 1973).

Otros autores encuentran que la composición lipídica del virus de la rabia es intermedia entre la encontrada para la membrana plasmática y el retículo endoplásmico de la célula huésped. Con este dato y con observaciones hechas en el microscopio electrónico proponen que la formación de la envoltura viral es un evento intracelular que no requiere de las membranas celulares. Así sugieren que el total de las partículas virales sería sintetizado "a novo" (Bloug y col., 1977).

Según otros autores, aparentemente la glicoproteína no es específica para la maduración del virus, pues la cápside puede brotar a través de la membrana plasmática celular con glicoproteínas de otros virus; pero lo que sí representa un requisito esencial para que se produzca la maduración del virus es que la relación entre la cantidad de proteínas de la matriz viral (M) y la nucleoproteína (N) sea constante, no así la relación de éstas con la glicoproteína (Lodish y Porte, 1980). Por otro lado, las células en cultivo infectadas con el VSV muestran una morfología

similar a la observada en las células tratadas con citocalacina B. Sin embargo, los mutantes ts afectados en la maduración de la proteína de envoltura no inducen estos cambios morfológicos a temperatura no permisiva. Estos hallazgos indicarían que debe replantearse la hipótesis que sentaba la posibilidad de que el citoesqueleto interviniera en la reproducción del VSV (Genty y Bussenau, 1980).

Diversos estudios permitieron conocer la estructura de la envoltura viral. Se ha demostrado que la glicoproteína atraviesa la membrana viral en tanto que la proteína M estaría asociada a la membrana pero no la atravesaría profundamente (Zakowski y Wagner, 1980). Utilizando reactivos que reaccionan solamente con componentes superficiales de la membrana se determinó que en el VSV el 36% de la PE de la membrana viral se encuentra en la cara externa y el 64% restante en la interna (Fong y col., 1976). Como se indicó (I.3.4.), se sabe desde hace tiempo que este tipo de asimetría también existe en las membranas plasmáticas celulares. Si a la membrana viral se le quitan las proteínas igualmente se mantiene la distribución anterior, pero si se sonicaciona reacciona el 100% de la PE, lo que demostraría que la glicoproteína no sería la responsable de mantener la simetría entre ambas capas de la membrana viral (Fong y col., 1976).

Sin embargo, se ha probado que existe una estrecha relación entre la glicoproteína y los lípidos de la envoltura viral. Cuando se ponen en contacto la glicoproteína (G) del VSV con vesículas de PC obtenidas a partir de huevo se observa que la relación de cantidades glicoproteína G/lípido, en una vesícula reconstituida, es similar a la de la

envoltura de los virus intactos, y que además, al igual que los virus intactos, estas vesículas provocan aglutinación de los glóbulos rojos y pegado a células BHK. Se observó también que la introducción de la glicoproteína G provoca un incremento en la rigidez de la membrana, lo que también hace pensar que la porción hidrofóbica de la glicoproteína interacciona con la bicapa lipídica (Altstiel y Landsberger, 1981a). En este sentido, cuando se rompe la partícula viral por sonicación o por congelamientos y descongelamientos sucesivos y se separan los componentes subvirales por centrifugación isopícnica, se ha visto que en una de las fracciones de más baja densidad se encuentran los lípidos virales y la glicoproteína G. La purificación exhaustiva de dicho material demuestra que el mismo consiste en vesículas que contienen sólo la proteína G y la misma proporción de los distintos fosfolípidos que el virión intacto; además, en dichas vesículas se pueden observar las espículas características de la estructura viral (Taube y Rothfield, 1978).

Los lípidos de la estructura viral parecen jugar un papel muy importante en la interacción célula-virus cuando se produce la infección de la célula por el virus. El pegado del VSV a la membrana plasmática de las células BHK causa un incremento de la rigidez de la bicapa lipídica. Apparently, al pegarse el virus produciría una redistribución lateral de los receptores específicos para él en la membrana plasmática celular (Altstiel y Landsberger, 1981b).

Se ha observado que la presencia de colesterol en la envoltura viral es esencial para la infectividad. Cuando se mezclan partículas virales infectivas con vesículas

sintéticas de PC y se dejan interactuar, se observa que existe un fuerte descenso en la cantidad de colesterol y un aumento en la fluidez en la membrana viral, lo que causa una fuerte pérdida de la infectividad (Moore y col., 1978).

1.3.8. Retrovirus

Estos virus poseen un RNA monocatenario como genoma. Los virus más destacados de estas familias son los del sarcoma de Rous y otros virus que son agentes tumorales.

En su envoltura poseen por lo menos dos glicoproteínas y lípidos. La composición en lípidos de estos virus es semejante a la de la membrana plasmática de la célula huésped. Además, se halló semejanza entre la envoltura de los miembros del grupo al ser cultivados en las mismas células huéspedes (Rao y col., 1966; Quigley y col., 1971). Sin embargo, el contenido de PC fue más bajo y el de PE y Sph más alto que el de la membrana plasmática (Quigley y col., 1972b). Esto sugiere que la diferencia de composición lipídica puede deberse a la brotación preferencial del virus a través de sitios específicos de la membrana plasmática celular.

Se han detectado glicoproteínas maduras en la membrana plasmática celular pero no los precursores de la misma. Estos fueron detectados en regiones intracitoplasmáticas (Witte y col., 1977). Se cree que el agregado postraducional de ácidos grasos es el mecanismo por el cual la proteína viral se asocia a la membrana plasmática celular.

Esta asociación jugaría un papel muy importante en la brotación (Gallick y Arlinghaus, 1984).

La membrana plasmática de las células infectadas tiene la misma proporción de los distintos fosfolípidos que la de las células no infectadas; sin embargo, el contenido de ácidos grasos no saturados y la fluidez de una y otra son diferentes. El cambio de fluidez se debería tanto a la variación de fosfolípidos como de proteínas (Maldonado y Blough, 1980).

Actualmente se sabe que los lípidos juegan un papel muy importante en las infecciones virales. La infección de una línea permisiva con un retrovirus no defectivo produce una línea celular que es productora crónica del virus y es resistente a la infección posterior con virus relacionados (interferencia). Estudios llevados a cabo con el virus de la leucocis aviar y virus de sarcomas (Rubin, 1960; Steck y Rubin, 1966a, 1966b; Vogt e Ishizaki, 1966) así como también en un gran número de retrovirus de mamíferos (Sarma y col., 1967; Sarma y Log, 1971; Henderson y col., 1974) han indicado que una proteína viral de producción endógena se pega a la superficie celular donde se hallan los receptores virales causando la interferencia (De Larco y Todaro, 1976; Steck y Rubin, 1966a, 1966b). Se intentaron muchas técnicas para salvar este bloqueo a la superinfección. Se infectó con un seudotipo no relacionado o con virus producidos en presencia de inhibidores de la glicosilación, o se les transfirió una copia del DNA viral a las células. Se vio que una alternativa más simple consiste en poner en contacto paquetes de los viriones en cuestión dentro de vesículas lipídicas sintéticas. La fusión posterior de estas

vesículas con las células resistentes puede producir una infección eficiente. Se vio que el sistema introducía mejor a los viriones dentro de las células infectadas que dentro de las no infectadas (Douglas y Baltimore, 1984).

1.3.9. Togavirus

Estos virus poseen un genoma consistente en un RNA monocatenario. Entre los miembros más destacados se hallan el Semliki Forest virus (SFV) y el virus Sindbis.

Estos virus también poseen glicoproteínas y lípidos en su envoltura. Los lípidos derivan de la célula huésped (Pfefferkorn y Hunter, 1963) y se asemejan a los de la membrana plasmática celular (Renkonen y col., 1971, 1972c; Hirschberg y Robbins, 1974) cuando son cultivados en células de mamíferos. Por otro lado, cuando algunos de estos virus son cultivados en células de insectos (mosquitos) la maduración parece ocurrir a través de membranas intracelulares con brotación dentro de vacuolas, a partir de las cuales la partícula viral se libera al medio por fusión con la membrana plasmática celular (Whitfiel y col., 1971; Gliedman y col., 1975).

La dependencia de la composición lipídica con la célula huésped se pone en evidencia al comparar los lípidos del SFV crecidos en células BHK-21 con los crecidos en células de mosquitos (Luukkonen y col., 1976). Por otro lado, la mayor o menor estabilidad del virión parece depender de la composición lipídica del mismo (Sly y col., 1976).

La bicapa lipídica de la envoltura viral muestra una

marcada asimetría. El tratamiento del SFV cultivado en células de mosquito con reactivos de superficie, demuestra que la capa externa de la envoltura viral posee más ceramida y fosfoetanolamina y menos PE que la cara interna (Luukkonen y col., 1976).

La membrana viral parece tener menos fluidez que la membrana plasmática celular. Sin embargo, esta diferencia no parece ser causada por los lípidos de la membrana viral sino por la alteración que en la bicapa lipídica provocan las proteínas virales. Los lípidos aislados extraídos del virus con cloroformo/metanol presentan más fluidez que los de la membrana plasmática celular. Además, la membrana viral se hace más fluida cuando se le provoca una digestión proteolítica (Sefton y Gaffney, 1974).

Algunos autores han propuesto que el proceso de formación de la envoltura viral en células de mamífero se produciría mediante la incorporación de las proteínas del virus a la población no específica de fosfo y glicolípidos de la membrana plasmática celular (Hirschberg y Robbins, 1974). Sin embargo, ellos encuentran que el virus Sindbis siempre posee menor cantidad de PC y mayor de Sph y PS que la membrana plasmática celular (Hirschberg y Robbins, 1974); lo mismo ocurriría con el SFV (Renkonen y col., 1971). Esto hablaría de una migración diferencial de la proteína viral hacia zonas específicas de la membrana plasmática celular. Se ha propuesto que existe una interacción transmembrana entre las glicoproteínas (formadoras de espículas) y ciertas zonas de la membrana plasmática celular en las que habría una remoción de las proteínas celulares que provocaría la formación de "parches" (Renkonen y col., 1971; Garoff y col., 1974).

Con experimentos de "pulso chase" se vio que las proteínas virales marcadas con ^3H -Leu se forman en el retículo endoplásmico; luego de 4 horas posinfección se ubican en la membrana plasmática celular y a las 11 posinfección ya desaparecen en el virus libre (Richardson y Vance, 1976). En células BHK-21 infectadas con el SFV tratadas con tripsina no se produce ningún efecto detectable; en cambio, cuando son infectadas con el virus Sindbis se observa un bloqueo irreversible en la producción de la progenie viral, aparentemente la tripsina no afecta la síntesis de proteínas ni el transporte de las mismas hacia la membrana plasmática celular pero sí el clivaje de una de las proteínas de la envoltura viral (Adams y Brown, 1982).

No se sabe cuál puede ser la función que cumpla el núcleo celular en la morfogénesis viral. Se observó que el virus Sindbis puede ser cultivado en células de mamíferos anucleadas pero no en células de insectos anucleadas, en tanto que el VSV puede ser cultivado satisfactoriamente en ambas (Erwin y Brown, 1983).

En relación con la entrada del virus a la célula huésped, trabajos realizados con el SFV demuestran que el mismo entraría por endocitosis, quedando el virus secuestrado dentro de vacuolas y lisosomas celulares que podrían cumplir un importante papel en la liberación de la nucleocápside (Helenius y col., 1980). Sin embargo, la endocitosis no parece ser esencial para que se produzca la infección de un cultivo celular con el virus Sindbis (Coombs y col., 1981).

1.3.10. Iridoviridae

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus describe a los miembros de esta familia como virus de genoma DNA bicatenario, con una simetría aparentemente icosaédrica, sin envoltura. Sin embargo, esta familia incluye virus de insectos y vertebrados con una estructura interna compleja rodeada de una membrana unitaria (Carrascosa y col., 1984). Los iridovirus que afectan vertebrados poseen una envoltura externa que aparentemente adquieren por brotación a través de la membrana plasmática (Breese y De Boer, 1966; Kelly, 1975) o del retículo endoplásmico (Matthews, 1982).

Uno de los miembros más estudiados del grupo es el de la peste porcina africana (ASF). El virus extracelular parece estar constituido por una serie de membranas. Una membrana externa que posee las características de la típica "membrana unitaria" con que se describe a la membrana plasmática celular. Esta membrana puede ser removida del virión por shock osmótico o detergentes no iónicos, lo que sugiere que estaría constituida por lípidos. La capa siguiente es más densa que la externa y presenta estriaciones radiales, se considera que esta capa es la cápside proteica del virus. Debajo de la cápside se observa otra membrana de características semejantes a la externa, que se supone posee lípidos. Por último, la estructura más interna correspondería al núcleo viral (Carrascosa y col., 1984). Esta estructura no sería exclusiva del ASF, pues otros virus tales como el virus extracelular de la rana 3, aparentemente también la posee. Se desconocen las funciones que cumplen dichas membranas, descartándose la posibilidad de que la externa cumpla

un rol importante en la infectividad de estos virus (Matthews, 1982).

I.3.11. Virus no envueltos: Necesidad de una envoltura a lo largo del ciclo replicativo

Los reovirus, virus con un RNA bicatenario como genoma, son considerados "virus desnudos" por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus.

Los reovirus se encuentran normalmente en los tractos entérico y respiratorio de los vertebrados. Originariamente se catalogaron como no patógenos para el hombre; sin embargo, en 1973 se descubrió que los miembros de un nuevo grupo de reovirus, el de los rotavirus, son los agentes causales más importantes de las enteritis infantiles.

Por la resistencia de los viriones al éter y al cloroformo se infirió que los rotavirus al igual que los demás miembros de la familia, carecían de envoltura lipídica (Estes y col., 1979). Pero en lisados de células infectadas con el rotavirus de mono SA-11 se han encontrado partículas virales envueltas (Els y Lecatsas, 1972). Experimentos de diversos tipos realizados en los laboratorios de Espejo demuestran que la envoltura adquirida por los rotavirus en su estadio intracelular podría tener gran importancia en la morfogénesis viral. Por microscopía electrónica han demostrado que la mayoría de las partículas virales están asociadas a membranas en el homogenado de células infectadas y en el citoplasma de las células enteras se han observado virus totalmente envueltos. Por experimentos de "pulso chase" establecieron que la glicoproteína viral se asocia rápidamente

a la membrana plasmática celular, mientras que la mayoría de las proteínas estructurales aparecen en la fracción soluble inmediatamente después del pulso de marcación. La inhibición de la glicosilación no afecta la asociación de las glicoproteínas con las membranas. Además, las membranas plasmáticas aisladas de células infectadas poseen antígenos virales. A partir de estos datos los autores han sugerido que la cápside externa del virión puede derivar de la envoltura en que a veces se lo observa inserto (Soler y col., 1982).

El virus oncogénico SV40 es un papovavirus, por lo tanto se lo describe como no envuelto (Matthews, 1982). Sin embargo, se lo ha encontrado rodeado de envoltura dentro de la célula huésped. Al analizar la ultraestructura de las células infectadas con el SV40 se hallaron partículas virales envueltas en el citoplasma, retículo endoplásmico rugoso, envoltura nuclear, lisosomas y mitocondrias. Aparentemente, al entrar a la célula el virión obtiene de la membrana plasmática celular una envoltura cerrada. La partícula viral sería liberada de la envoltura o introducida dentro de especializaciones tubulares que forman las membranas, antes de fusionarse con otras membranas celulares. La reconstrucción morfológica de secuencias y el hallazgo de virus en los distintos organelos celulares sugieren que la entrada del mismo en los diversos compartimientos y eventualmente dentro de los sitios donde se produce la replicación propiamente dicha, está facilitada por su capacidad para ser envuelto por diferentes tipos de membranas (especialmente por la plasmática y la nuclear) y por la secuencial fusión y fisión de las mismas (Maul y

col., 1978).

El virus del polioma también es un papovavirus, por lo tanto se considera no envuelto (Matthews, 1982). Sin embargo, mediante gradientes de densidad de sacarosa se han separado vesículas membranosas que contenían partículas virales, a partir del citoplasma de células infectadas. Dando enzimas marcadoras se ha determinado que las vesículas derivan de la membrana plasmática celular. El virus marcado con ^{125}I encerrado en la vesícula sedimenta mucho más lentamente en un gradiente de sacarosa que el virus extracelular. El tratamiento de las vesículas que contienen a los viriones con detergentes provoca la liberación de aquéllos. Los virus liberados poseen las mismas propiedades de sedimentación y las mismas proteínas que el virus extracelular purificado. El estudio de las vesículas que contienen viriones representa un paso futuro muy importante en la elucidación de los eventos tempranos de la infección con el virus del polioma (Griffith y Consigli, 1984).

OBJETIVOS Y PRESENTACION DEL TRABAJO

Los estudios sobre el virus Junín y los demás miembros de la familia Arenaviridae han permitido dilucidar distintos aspectos de la composición, estructura, capacidad antigénica e infectiva de los mismos.

Así, como antes se expresara, desde el punto de vista de su composición bioquímica se han estudiado y se siguen estudiando distintas características de las proteínas y ácidos nucleicos virales. Sin embargo, hasta la fecha de comenzarse este trabajo no se había encarado el estudio de los componentes lipídicos de los viriones, no obstante existir evidencias que indican que los mismos juegan un rol importante en el establecimiento de las infecciones virales.

En este sentido, de la revisión bibliográfica precedente se desprende que en muchos casos al estudiar la composición lipídica de los virus en comparación con la composición lipídica de las diferentes fracciones celulares se pudo llegar a determinar el modo en que algunos viriones adquieren su envoltura. Con estos conocimientos comenzaron a tener explicación algunas de las etapas implicadas en la morfogénesis de los mismos.

Por estas razones hemos encarado el estudio de los componentes fosfolipídicos de los arenavirus y de las diferentes fracciones de las células huéspedes.

Tratando de hacer un aporte útil a los conocimientos sobre fiebre hemorrágica argentina comenzamos estudiando particularmente a la cepa patógena MC₂ del virus Junín, pero luego ante los resultados obtenidos y la ausencia de datos para los demás miembros de la familia, los estudios se extendieron a la

cepa atenuada XJCl₃ del virus Junín y a los virus Tacaribe y Pichindé.

Los resultados obtenidos y las características de los sistemas utilizados se analizan a lo largo de cinco capítulos. En el primero se exponen las razones que llevaron a la elección de las técnicas de cromatografía mono y bidireccional en capa fina y la técnica de autorradiografía necesarias para el análisis de los fosfolípidos virales y celulares. Se describen además, las características que presentan al aplicarlas al presente sistema de estudio.

En el segundo capítulo se analizan estadísticamente los resultados logrados al estudiar comparativamente los fosfolípidos de los arenavirus mencionados y las células huéspedes enteras, infectadas con ellos o falsamente infectadas, indicándose cómo y por qué se aplica la metodología estadística elegida.

El tercer capítulo se discute la puesta a punto y la elección de las distintas técnicas destinadas a separar y caracterizar membrana plasmática de retículo endoplásmico.

En el cuarto capítulo se analizan los resultados obtenidos al separar y caracterizar membrana plasmática y retículo endoplásmico de células infectadas con el virus Junín y de las células no infectadas.

En el quinto capítulo se analizan estadísticamente los resultados obtenidos al estudiar la composición fosfolipídica de la membrana plasmática y de retículo endoplásmico de las células infectadas con el virus Junín y de las células control no infectadas. Se analiza también la relación que existe entre los fosfolípidos virales y los de las distintas fracciones celulares.

Finalmente se presenta una interpretación de los resultados obtenidos.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

M A T E R I A L E S

M.1. Productos químicos

En todos los casos se usaron drogas de BDH (Poole, Inglaterra), Fluka (Buchs, Suiza), Merck (Darmstadt, República Federal Alemana), Pharmacia (Uppsala, Suecia), Sigma (St. Louis, USA), Carlo Erba (Milán, Italia), pro análisis.

El $^{32}\text{PO}_4^{\equiv}$ "carrier free" fue obtenido de New England Nuclear (NEN) (Boston, M.A., USA) o en The Radiochemical Center (Amersham, Inglaterra).

Omnifluor: fue obtenido de NEN.

El tolueno grado nitración fue gentilmente donado por Petroquímica General Mosconi

Para las técnicas de cromatografía se utilizaron las siguientes drogas especiales: sílica gel H y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, Merck; cloroformo, BDH-Merck; ácido acético glacial, metanol, NH_4OH y CaCl_2 anhidro, Mallinkrod (New York, USA); acetona, Carlo Erba; florisil, Sigma.

Para los cultivos celulares y las titulaciones virales se utilizaron además:

TPB (Tryptose Phosphate Broth): Difco (Detroit, USA).

Agarosa: Seakem (Rockland, M.E., USA).

Suero bovino fetal controlado para virus y micoplasma: Gibco (Grand Island, New York, USA).

Medio de cultivo para células Vero: 410-1500 Gibco.

Para la técnica de autorradiografía se utilizaron placas mamográficas Min-R y revelador y fijador para placas dentales de la firma Kodak (Rochester, New York, USA).

M.2. Animales

Se utilizaron ratones albinos que fueron gentilmente donados por Laboratorios Bagó y la Comisión Nacional de Energía Atómica.

M.3. Células

Se utilizaron las líneas BHK-21(C-13), fibroblastos de riñón de hamster lactante (Stoker y Mac Pherson, 1961) donadas por los laboratorios Pfizer y cuyo origen es Laboratorios Flow (USA) y la línea Vero, fibroblastos de riñón de mono verde africano cercopithecus (Yasumura y Kawatica, 1963) adquiridas en la American Type Culture Collection.

M.4. Virus

Se utilizaron las cepas MC₂ y XJCl₃ del virus Junín, el virus Tacaribe y el virus Pichindé. Ambas cepas del virus Junín fueron provistas por el Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán". La cepa MC₂ fue aislada de un roedor de la zona Monez Cazón (Vilches y col., 1965) y en el momento de recibirla había sufrido 3 pasajes en cerebro de ratón. La denominada XJCl₃ es una cepa atenuada y proviene de la cepa prototipo XJ, aislada en 1958 de un enfermo de FHA (Parodi y col., 1958). En el momento en que la cepa XJ había sufrido 2 pasajes por cobayo y 11 por ratón fue clonada en una línea celular heterodiploide de riñón de conejo, MA111; uno de los clones obtenidos dio origen a la cepa XJCl₃ (Guerrero y col., 1969).

El virus Tacaribe cepa TRL.V 11573 pasaje L21 MKK3 L2,

fue provisto por la Dra. M.C. Weissenbacher de la Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

El virus Pichindé fue suministrado por el Dr. D.H.L. Bishop (Department of Microbiology, University of Alabama in Birmingham), el inóculo original proveniente de C. Pfau (Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, N.Y.) fue clonado y plaqueado en células Vero.

M.5. Medios y soluciones para el cultivo de células

M.5.1. PBS

NaCl	6,40 g	KH ₂ PO ₄	0,16 g
KCl	0,16 g	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,013 g
NaHPO ₄	0,92 g	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,010 g
		H ₂ O B.D. csp.	1 litro

M.5.2. Hank's

NaCl	8,0 g	SO ₄ Mg.2H ₂ O	0,200 g
ClK	0,4 g	Glucosa	1,0 g
PO ₄ HNa.2H ₂ O	0,06 g	Rojo fenol	0,01 g
PO ₄ H ₂ K	0,06 g	CO ₃ HNa	0,3 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,205 g	H ₂ O B.D. csp.	1 litro

M.5.3. Tripsina-EDTA 0,25%

Tripsina	2,5 g	EDTA	0,2 g
NaCl	6,4 g	Na ₂ HPO ₄	0,92 g
KCl	0,16 g	KH ₂ PO ₄	0,16 g
		H ₂ O B.D. csp.	1 litro

M.5.4. Medio de cultivo para células BHK (MEM-BHK) *

a. Para frascos

	mg/l		mg/l
Cl ₂ Ca ₂ anh.	200	L-treonina	48
PO ₄ H ₂ K	400	L-triptofano	10
SO ₄ Mg anh.	97,67	L-tirosina (sal disódica)	51,9
NaCl	6800	L-valina	46
PO ₄ H ₂ Na.H ₂ O	140	D-Ca pantotenato	1
D-glucosa	1000	Cloruro de colina	1
R rojo fenol	10	Acido fólico	1
L-arginina	126	i-inositol	2
L-cistina.2HCl	31,29	Nicotinamida	1
L-glutamina	292	Piridoxal HCl	1
L-histidina HCl H ₂ O	42	Riboflavina	0,1
L-isoleucina	52	Tiamina-HCl	1
L-leucina	52	TPB (caldo triptosa fosfato)	3000
L-licina	72,5	CO ₃ HNa	350
L-metionina	15	Penicilina 200 u/ml	1 ml
L-fenilalanina	32	Estreptomina 200 u/ml	1 ml

b. Para cajas: Idem a (M.5.4.a) más el agregado de 2050 mg/l de CO₃HNa y 10 ml de HEPES 2,5 M.

M.5.5. Medio Vero (MEM-Vero) *

a. Para frascos: Idem a MEM-BHK-frascos más el agregado de:

	mg/l		mg/l
L-alanina	8,9	Glicina	7,5
L-asparagina	15	L-prolina	11,5
L-ácido aspártico	13,30	L-serina	10,5

b. Para cajas: Idem a (M.5.5.a.) más el agregado de 2050 mg/l de CO₃HNa y 10 ml de HEPES 2,5 M.

* Mac Pherson y Stoker (1962); Catálogo de Gibco (Grand Island Biological Company); Eagle, H. (1959).

M E T O D O S

M.6. PRODUCCION DE ARENAVIRUSM.6.1. Propagación de los virus en animales

Los ratones lactantes son muy susceptibles a la infección con el virus Junín (Weissenbacher y col., 1975) o a la producida por los otros miembros del complejo Tacaribe (Matthews, 1979). Por ello, el mantenimiento de las cepas utilizadas en el presente trabajo se efectuó a través de pasajes de las mismas en ratones de 24 a 72 horas de edad, no destetados. La inoculación se efectuó por vía intracerebral, que es la que permite el mayor crecimiento viral.

Los animales inoculados con el virus Tacaribe recibieron 4×10^4 DL₅₀ del inóculo original, los inoculados con cualquiera de las otras cepas en estudio recibieron aproximadamente 4×10^4 UFP* del inóculo original correspondiente.

Entre los 7 y 10 días posinoculación, tiempo al que se produce el pico de máxima producción viral (Weissenbacher y col., 1975), se extrajeron los cerebros y se homogeneizaron en 5 veces su volumen de solución de Hank's suplementada con 5% de suero bovino inactivado, por calentamiento a 57°C durante 30 minutos. Para ello se utilizó un homogeneizador Omnimixer. Sondas suspensiones obtenidas se clarificaron a 1000 g durante 30 minutos en centrífuga refrigerada. Los sobrenadantes se fraccionaron y congelaron a -80°C para ser utilizados posteriormente como inóculos.

Todas estas operaciones se realizaron en condiciones de esterilidad.

Los homogenados así obtenidos presentaron los siguientes títulos* :

* Ver "Título de virus" (M.6.3.2)

Virus Junín - cepa MC₂ = $5,2 \times 10^7$ UFP/ml

Virus Junín - cepa XJCl₃ = $1-1,4 \times 10^8$ UFP/ml

Virus Tacaribe = $2,4 \times 10^7$ UFP/ml

Virus Pichindé = $1-3 \times 10^7$ UFP/ml

En forma paralela se prepararon homogenados de cerebros de ratones no inoculados, para ser utilizados como control, en los que no se detectaron UFP (< 10 UFP/ml).

1.6.2. Crecimiento de los virus en cultivos celulares

Para la producción de grandes cantidades de virus con una mayor pureza que el obtenido a partir del huésped ratón y para la marcación radiactiva de los mismos en forma eficaz y controlada, se utilizó la técnica de crecimiento viral en cultivo de tejido.

Los títulos de virus Junín alcanzados en diferentes células indican que las BHK son las más indicadas para ser utilizadas como fuente de virus (Martínez Segovia y Grazioli, 1967). Esta línea celular también es la más empleada para el estudio de los restantes arénavirus (Pedersen, 1979).

M.6.2.1. Cultivo de células BHK

Las células BHK-21(C-13) en cultivo de tejido se crecieron en superficie en medio mínimo esencial de Eagle, suplementado con TPB, con antibióticos (MEM-BHK) y con el agregado de 10% de suero bovino inactivado.

El mantenimiento de la línea celular se realizó en frascos de plástico.

En los casos en que se necesitó producir grandes cantidades de material —virus o células— los cultivos se desarrollaron en frascos de vidrio para sistema rotatorio, Rollers.

Los repiques se realizaron lavando las monocapas con solución salina isotónica PBS, desprendiendo las células que las formaban con solución de tripsina y resuspendiéndolas en MEM-BHK suplementado con un 10% de suero bovino inactivado, cada 48 horas, haciendo una dilución 1:6.

M.6.2.2. Cultivo de virus

Se efectuó siguiendo los procedimientos que aseguran el mejor desarrollo viral (Martínez Segovia y col., 1974).

Monocapas de células BHK-21(C-13) con una saturación de 10^5 células/cm² se lavaron con PBS y se cubrieron con homogenados de cerebros de ratones inoculados con la cepa MC₂ o la cepa XJCl₃ del virus Junín, con el virus Tacaribe o con el virus Pichindé diluidos en solución salina de Hank's de manera tal que la infección se produjera con una multiplicidad de 1-4 UFP/célula; multiplicidades comprendidas entre 1 y 10 UFP/célula son las que permiten obtener mayores títulos (Remorini, comunicación personal; Vezza y col., 1977).

En forma similar y paralelamente, otras monocapas se cubrieron con homogenado de cerebro de ratones no inoculados, como controles no infectados.

Las células así tratadas se incubaron durante 2 horas a 37°C para permitir la adsorción del virus. Luego se les retiró el homogenado, se lavaron con solución PBS, se cubrieron con MEM-BHK suplementado con 1% de suero bovino inactivado y se dejaron incubar a 37°C para permitir el desarrollo del virus.

El medio sobrenadante de los cultivos se cambió diariamente. Para el estudio de los virus Tacaribe y Pichindé se utilizaron los medios sobrenadantes recogidos el segundo, tercero y cuarto día posinfección; para ambas cepas del virus Junín los de los tercero, cuarto y quinto día posinfección, de acuerdo con los datos que arrojan las curvas de crecimiento viral en células BHK (Remorini, comunicación personal; Vezza y col., 1977).

M.6.3. Titulación del virus

El método más exacto y reproducible de titulación de estos virus se basa en su capacidad para producir la lisis y muerte de las células Vero, formando placas en las monocapas desarrolladas bajo agar nutritivo (Damonte y Coto, 1974).

M.6.3.1. Cultivo de células Vero

La línea Vero se cultivó en monocapa en medio mínimo esencial de Eagle suplementado con aminoácidos no esenciales y antibióticos (MEM-Vero) con el agregado de 5% de suero fetal bovino inactivado.

El mantenimiento de la línea celular se realizó en frascos. Para la titulación de los virus las células se cultivaron en cajas de Petri incubadas en estufa con corriente de CO₂ utilizándose en este caso el medio MEM-Vero para cajas.

Los pasajes se efectuaron lavando las monocapas con PBS y desprendiendo las células con tripsina 0,25%. Estas se resuspendieron con el MEM-Vero, suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado. Luego de 4 a 6 días de incubación a 37°C el número de células se triplicaba.

M.6.3.2. Título de los virus

El método empleado se fundamenta en el tradicionalmente conocido Método Dulbecco (Dulbecco y Vogt, 1954).

Cuando las monocapas de las células Vero crecidas en cajas de Petri alcanzaron la confluencia, se les retiró el medio y se les agregó el material a titular diluido convenientemente para obtener un número de placas susceptibles de ser contadas, en solución de Hank's suplementado con HEPES 10 mM y 2% de suero bovino fetal inactivado. Se las incubó a 37°C en atmósfera de CO₂ durante una hora y se las cubrió con la solución que formaría la primer capa de agarosa nutritiva preparada de la siguiente manera:

Se fundió 1 g de agarosa Seakem M.E. en 50 ml de agua bidestilada a la que se le agregó 50 ml de la siguiente mezcla, 46 ml de MEM-Vero x 2 (Idem MEM-Vero para cajas, pero volumen final 500 ml en vez de 1 litro), 0,4 ml de Hepes 2,5 M y 1 ml de penicilina-estreptomicina 200u c/u / ml. Se agitó bien y se esperó unos minutos a que la temperatura fuera de 40-45°C, justo antes de que la agarosa solidificara.

Luego de 5 días se les agregó la solución que formaría la segunda capa de agarosa nutritiva, para lo cual se fundió 1 g de agarosa Seakem M.E. en 50 ml de agua bidestilada y se mezcló con una solución que contenía: 44 ml de MEM-Vero x 2, 0,4 ml de Hepes 2,5 M, 4 ml de rojo neutro 1/3000 y 1 ml de penicilina-estreptomicina 200u c/u / ml.

Al cabo de 24-48 horas se determinaron las unidades formadoras de placas (UFP) contando el número de huecos

producidos en las monocapas por efecto citopático de los virus.

M.7. MARCACION RADIATIVA DE VIRUS Y CELULAS CON ^{32}P

En los casos en que se pretendió obtener virus o células marcadas radiactivamente, los cultivos se efectuaron en cajas de Petri bajo atmósfera de CO_2 , debido a que por su baja relación volumen de medio sobrenadante del cultivo/superficie de desarrollo de la monocapa, se logra marcar con una alta actividad específica.

Las monocapas de las células BHK-21(C-13) se infectaron con cualesquiera de los arenavirus estudiados o se sometieron a una falsa infección en la forma indicada en (M.6.2.2). A las 24 horas de la infección con los virus Tacaribe o Pichindé y a las 36-38 horas de la infección con las cepas MC_2 o XJCl_3 del virus Junín o de la falsa infección, teniendo en cuenta los datos de las curvas de crecimiento viral, se comenzó la marcación con ^{32}P . Para ello, las células fueron lavadas con MEM-BHK para cajas carente de $\text{PO}_4^{\bar{3}}$ y luego se cubrieron con dicho medio más el agregado de 0,2 mCi/ml de $^{32}\text{PO}_4$ (^{32}P) libre de fosfatos no radiactivos (MEM-BHK- ^{32}P), suplementado con 1% de suero bovino inactivado. La marcación se continuó durante tres días con cambio diario de medio. Los medios sobrenadantes de los cultivos recogidos en cada cambio se clarificaron y se congelaron a -80°C hasta el momento de la purificación.

Para el estudio de los fosfolípidos de las células Vero falsamente infectadas se procedió de la forma arriba

indicada pero utilizando MEM-Vero-³²P suplementado con 1% de suero bovino inactivado.

M.8. CONCENTRACION DE CELULAS ENTERAS

Una vez efectuada la última cosecha del medio sobrenadante de los cultivos celulares infectados o falsamente infectados marcados radiactivamente o no según se indica en el párrafo anterior o en (M.6.2.2) respectivamente, las monocapas se lavaron con PBS y se levantaron con ayuda de un polí-ceman. Luego se resuspendieron en PBS y se concentraron por centrifugación a 2000 g durante 3 minutos en centrífuga refrigerada. Se desecharon los sobrenadantes y los sedimentos se lavaron con solución PBS, la suspensión se volvió a centrifugar a 2000 g durante 3 minutos en frío. Las células así lavadas y concentradas se congelaron a -80°C hasta el momento en que se les extrajeran los lípidos.

M.9. PURIFICACION DE LOS VIRUS

Los flúidos sobrenadantes de los cultivos BHK-21 infectados o falsamente infectados se descongelaron y se clarificaron a baja velocidad. Los sobrenadantes de esta centrifugación se recogieron en tubos del rotor 30 de Spinco sobre un colchón de 5 ml de sacarosa al 20% en buffer borato 0,05 M, pH = 7,2; o en tubos del rotor 50 de Spinco con 2,5 ml de la misma solución. Se centrifugaron a 27.000 rpm durante tres horas en caso de usar el rotor 30 o a 45.000 rpm durante 70

minutos al usar el rotor 50. Los precipitados se resuspendieron con solución TE (EDTA 1 mM - Tris HCl pH 7,2 10mM) y se sonicaron sumergiendo los tubos durante 30 segundos en un recipiente lavado ultrasónico de Heat Systems. Luego se clarificaron por centrifugación a baja velocidad y los sobrenadantes se sembraron en un doble colchón de 2 ml glicerol 10% + + tartrato de K⁺ 10%, en TE y 0,9 ml sacarosa 65% en TE en tubos del rotor SW 60 Ti de Spinco. Se centrifugaron a 50.000 rpm durante 55 minutos.

Los gradientes se fraccionaron por punción de los fondos de los tubos. La posición del virus se estimó midiendo la radiactividad precipitable con TCA en cada fracción en un contador de centelleo líquido y por medida de su absorbencia a $\lambda = 280$ nm. Las fracciones conteniendo una determinada cepa viral se reunieron y después de ser diluídas convenientemente con solución de TSE (EDTA 0,003 M ClNa 0,15 M, Tris HCl 0,05 M, pH 7,2) se sembraron en gradientes preformados por capas de 0,6 ml de soluciones de ClCs en TSE, de densidades extremas 1,1 - 1,4 g/cm³, en tubos del rotor SW 60 Ti de Spinco. Paralelamente, algunos gradientes se sembraron con el diluyente (TSE). Todos ellos se sometieron a una centrifugación isopícnica de 55.000 rpm durante 3 horas. El fraccionamiento y el establecimiento de la posición de los virus se realizaron de la misma manera que en los gradientes anteriores. La densidad se determinó midiendo el índice de refracción de cada fracción del gradiente testigo, sembrado con TSE. Las fracciones conteniendo los virus se dejaron dializando durante 8 horas frente a un buffer borato 0,05M, pH 7,2. Al cabo de ese tiempo, este material se retiró de las bolsitas de diálisis y se sometió a los procedimientos

destinados a estudiar sus fosfolípidos.

M.10. RUPTURA DE CELULAS CON HOMOGEINIZADOR

Se efectuó según la técnica descrita por Eylar (Eylar y Hagopian, 1971).

Las células provenientes de monocapas confluentes se levantaron con ayuda de un policeman y se resuspendieron en 5 volúmenes de Tris HCl 50 mM, pH 7,4. Se tomó una alícuota de la suspensión y se coloreó con azul de Tripán para determinar el número de células viables en cámara de Neubauer. El resto de las células en suspensión se rompieron en un homogenizador Dounce. Cada 5 golpes de émbolo se tomaron alícuotas para establecer el número de células viables, repitiendo la operación hasta que el mismo fue de un 5 a un 10% del número original. El homogenado así obtenido se guardó a -80°C hasta su uso.

M.11. AISLAMIENTO DE MEMBRANAS CELULARES

Por las razones que se expondrán en el Capítulo III de Resultados y Discusión, el aislamiento de las membranas de las células BHK-21(C-13) se efectuó por el método de Graham (1972).

M.11.1. Cosecha y homogeinización celular

Se partió de células infectadas con la cepa MC₂ del virus Junín o células no infectadas cultivadas en 20 frascos Roller de la manera indicada en (M.6.2.2.2.). Al quinto día posinfección o al haber llegado al 100% de saturación las células no infectadas, se retiró el medio sobrenadante de cultivo y se levantaron las monocapas.

En los casos en que se estudiaron los fosfolípidos de estas membranas celulares, paralelamente al cultivo de las células en frascos Roller, se prepararon células marcadas con ³²P. Para ello las células infectadas o no infectadas se cultivaron en cinco cajas de Petri de la manera indicada en (M.7.). Al tercer día de marcación, las monocapas se levantaron.

La cosecha de las células marcadas y no marcadas se hizo en forma conjunta. Para ello las monocapas se lavaron con buffer PO_4^{\equiv} 0,01 M y ClNa 0,15 M, pH = 7,4, operando a 0°C, se levantaron con ayuda de un policeman y se resuspendieron en el buffer anterior.

La suspensión se centrifugó a 1300 rpm durante 15 minutos en un rotor SS34 de Sorvall. El sedimento se resuspendió en 40 ml de buffer (sacarosa 0,25 M, Tris-HCl 5 mM y SO_4Mg 0,2 mM, pH = 7,4) tomándose una alícuota para conteo celular. El resto se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos en un rotor SS34 de Sorvall. Esta operación se repitió dos veces más. El sedimento de la última centrifugación se resuspendió en 30 ml del buffer anterior y nuevamente se tomaron alícuotas para efectuar el conteo de células viables. La ruptura celular se efectuó en el material restante, colocando la suspensión de células bajo una presión de nitrógeno de 58 atm, en un reactor para hidrogenación, con

agitación permanente y siempre en baño de hielo. A los 20 minutos se llevó a cabo una descompresión rápida. El contenido del reactor se volcó en un vaso de precipitado de boca ancha conteniendo EDTA para llegar a concentración final 1 mM. Se agitó suavemente para eliminar la espuma. Se tomaron alícuotas de este homogenado para dosar las distintas enzimas y además para verificar el grado de ruptura.

El número de células viables se determinó tratando las células con Azul de Tripán y contándolas en cámara de Newbauer. En todos los casos se comprobó una ruptura celular eficiente, lo que permitió continuar con la purificación.

M.11.2. Purificación de membrana plasmática y retículo endoplásmico

Separación de los núcleos: Los núcleos se eliminaron del homogenado celular por centrifugación a 4600 rpm durante 5 minutos en rotor SS34 de Sorvall. El sedimento se lavó con 10 ml de buffer sacarosa 0,25 M, Tris-HCl 5 mM, EDTA 1 mM, pH = 7,4.

Los sobrenadantes combinados fueron llamados sobrenadante citoplasmático.

Separación de mitocondrias: El sobrenadante citoplasmático fue sembrado en tres gradientes preformados en tubos de rotor SW-25,2 de Spinco. Los gradientes estaban constituidos por una zona de variación de la concentración de sacarosa desde 60% P/P a 30% P/P; un colchón de sacarosa 30% P/P y otra zona de variación de la concentración de sacarosa desde 30% P/P a 10% P/P. Todas las soluciones de sacarosa estaban en buffer Tris-HCl 5 mM, EDTA 1 mM, pH = 7,4.

Una vez sembrados los gradientes, se centrifugaron en

el rotor SW-25,2 de Spinco a 22000 rpm durante 2 horas.

La concentración de proteínas a lo largo de cada gradiente se determinó por lectura de la absorbencia a $\lambda = 280$ nm de cada fracción y la radiactividad de las mismas mediante el método de Cherenkof en un contador de centelleo líquido.

Las fracciones correspondientes a mitocondrias y a proteínas solubles se congelaron a -80°C . El material microsomal se diluyó con un volumen igual al propio en buffer Tris-HCl 5 mM, pH = 7,4 y se centrifugó a 36500 rpm durante 90 minutos en rotor 50 de Spinco.

Resolución de material microsomal: El sedimento de la centrifugación anterior se resuspendió en 10 ml de buffer Tris-HCl 10 mM, pH = 8,6 y se centrifugó a 41000 rpm durante 30 minutos en rotor 50 de Spinco.

A este sedimento se lo resuspendió en 10 ml de buffer Tris-HCl 1 mM, pH = 8,6 y se lo centrifugó a 41000 rpm durante 30 minutos en rotor 50 de Spinco.

Se desechó el sobrenadante y el sedimento se tomó con 1,5 ml de buffer (Tris-HCl 1 mM, SO_4Mg 2 mM, pH = 8,6) y se dejó dializando durante 90 minutos contra el mismo buffer.

El material dializado se sembró sobre un gradiente preformado por capas de dextrán de 25% P/P a 5% P/P, en el mismo buffer. El gradiente se centrifugó a 26000 rpm durante 16 horas en rotor SW-41 de Spinco y se fraccionó perforando el fondo del tubo. La concentración de proteínas en cada fracción se determinó por lectura de la absorbencia a $\lambda = 280\text{nm}$ y la radiactividad mediante el método de Cherenkof.

Se unieron las fracciones de cada pico, se diluyeron con 20 volúmenes del último buffer y se centrifugaron a 41000 rpm en rotor 50 de Spinco durante 90 minutos. El sedimento de la centrifugación se tomó con 1 ml del mismo buffer y allí se dosaron las distintas enzimas y fosfolípidos.

M.11.3. Caracterización de las membranas aisladas

Se efectuó dosando las enzimas marcadoras de las distintas membranas. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951) adaptado a un volumen final de 200 μ l.

El fósforo inorgánico (Pi) se dosó por el método de Fiske y Subarow (1925) adaptado a volúmenes finales de 200 μ l.

M.11.3.1. ATPasa activada por sodio y potasio

Se determinó siguiendo el método de Wallach y Kamat (1966). Se incubaron en paralelo 2 series conteniendo, una: ClNa 0,25 M, SO_4Mg 1,38 mM, Na-ATP 1,25 mM, en buffer Tris-HCl 6,25 mM, pH = 8,6 con EDTA 0,312 mM; y la otra tenía además, ClK 12,5 mM. El volumen final fue de 80 μ l y la reacción comenzó con el agregado de la muestra problema conteniendo entre 35-70 μ g de proteína del homogenado o el equivalente de las otras fracciones, en base a la estimación de la actividad de la enzima en ellas. La incubación se realizó a 37°C durante una hora. La reacción se detuvo por el agregado de TCA al 30%. El Pi liberado se determinó por el método arriba indicado.

La actividad enzimática se estableció hallando la diferencia entre la cantidad de Pi liberado por mg de proteína por hora a 37°C en presencia de K^+ con respecto a la producida en su ausencia.

M.11.3.2. Glucosa-6-fosfatasa

Se siguió la técnica usada por Moré (1971). Se incubaron durante 15 minutos a 37°C series conteniendo distintas cantidades de proteínas celulares de acuerdo a la actividad esperada. El medio de incubación contenía glucosa-6-fosfato 11 mM en buffer Tris-HCl 55 mM, pH 6,6, con β -mercaptoetanol 11 mM y tartrato de sodio y potasio 11 mM. Además, para inhibir a la fosfatasa alcalina se le introdujo EDTA 4 mM (Brotherus y Renkonen, 1977; Swanson, 1955). El volumen final de la reacción fue de 80 μ l y comenzó con el agregado de la muestra problema en la misma forma que para la ATPasa (Na^+ - K^+). La reacción se detuvo por el agregado de TCA al 30%. El Pi liberado se dosó por el método arriba descrito.

La actividad enzimática se expresó como la cantidad de Pi liberado en 1 hora a 37°C por miligramo de proteína.

M.11.3.3. Fosfatasa ácida

Fue dosada por el método de Gianetto y de Duve (1955).

Por el método ya descrito medimos la cantidad de Pi liberado por la enzima a partir de β -glicerol fosfato 50 mM en acetato de sodio 50 mM, Tritón X-100 0,1%, pH = 5. El volumen final de la reacción fue de 80 μ l; la misma comenzó con la muestra problema que contenía de 35 a 70 μ g de proteína de homogenado o su equivalente en las demás fracciones. Se incubó a 37°C durante 10 minutos.

También aquí la actividad enzimática se expresó

como la cantidad de Pi liberado en una hora a 37°C por miligramo de proteína.

M.11.3.4. Succinato deshidrogenasa

Se determinó por el método de Arrigoni y Singer (1962), según la modificación hecha por Boveris (Boveris y col., 1976).

La mezcla de reacción contenía 0,52 mM de metasulfato de fenazina (MSF), 55 µM de 2-6-diclorofenolindofenol (DCFI), 1 mM de KCN, 7 mM de succinato de sodio en buffer fosfato 1 mM, pH = 7,4.

La reacción se inició con el agregado de 50 µg de proteína de homogenado o su equivalente en las otras fracciones celulares. El volumen final fue de 300 µl y la temperatura 30°C.

La reducción del DCFI se siguió mediante la lectura de la absorbencia a $\lambda = 600$ nm; en los accesorios T_m (temperatura de desnaturalización del DNA) de un espectrofotómetro DU-8 de Beckman.

Cada punto de la curva surge como el resultado de la absorbencia medida en las condiciones descriptas a la que se le resta la absorbencia medida en las mismas condiciones en una mezcla que no poseía DCFI. El sistema fue programado para efectuar en forma simultánea ambas medidas.

$$\text{El } \Delta\epsilon_{\text{mM}} = 20,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

La actividad enzimática se expresó como la cantidad de sustrato transformado a 30°C por miligramo de proteína por hora.

M.12. ANALISIS DE LOS FOSFOLIPIDOS

M.12.1. Obtención de los extractos lipídicos

Los lípidos de los virus purificados, las células enteras y las distintas fracciones celulares aisladas se extrajeron por el método de Folch con cloroformo/metanol (2:1). La extracción se realizó en tres pasos y según las indicaciones de los autores del método los extractos crudos fueron lavados con 1/5 de su volumen de agua bidestilada.

Los extractos orgánicos lavados fueron puestos a secar bajo corriente de N_2 y los lípidos redisueltos en cloroformo/metanol (2:1).

M.12.2. Separación de las distintas especies fosfolipídicas por cromatografía bidimensional en capa fina. Puesta a punto del método

Debido a que las distintas especies que integran esta clase de lípidos poseen propiedades químicas y físicas semejantes, las mejores separaciones se logran utilizando las técnicas de cromatografías bidireccionales en capa fina. La sílica gel H carente de fraguante es el adsorbente elegido para la separación de fosfolípidos. Sin embargo, el agregado de un 10% de silicato de magnesio (florisil) permite obtener manchas más compactas y bien definidas, en particular para los fosfolípidos ácidos (Rouser y col., 1966).

En la literatura se describe una gran variedad de combinaciones de sistemas de solventes. Los mejores resultados se obtienen cuando se utilizan mezclas contrastantes, por

ejemplo, una mezcla ácida en la primera dirección seguida de una básica y/o que contenga acetona en la segunda, para retardar la migración de los fosfolípidos respecto de los glicolípidos. El sistema predilecto es el de Rouser (Christie, 1973).

El análisis mediante este sistema de una mezcla de fosfolípidos patrones (comerciales) mostraba, en un principio, una buena resolución entre las especies PC, PE y C. En cambio, entre Sph, PI, PS y LPC no existía una buena separación.

Un lisoderivado de PE, designado como LPE, se ubica cercano a Sph, PI y LPC, estableciendo una especie de "puente" entre estos compuestos en este sistema cromatográfico.

Se trató de determinar cuál era la causa de la baja resolución y para ello se cromatografiaron bidimensionalmente, en forma individual, cada uno de los patrones. Sph, PI, LPC, PC y C daban una sola mancha en la placa cromatográfica, pero PS y PE se resolvían en dos manchas cada uno, lo que indicaba la existencia de otros componentes (posibles lisoderivados).

Cuando se cromatografiaron bidireccionalmente nuevos patrones recientemente preparados, se encontró que cada uno se presentaba como un solo compuesto. Por lo tanto, no poseían lisoderivados ni ningún otro contaminante. La cromatografía bidireccional en capa fina de la mezcla completa mostraba separadas todas y cada una de las especies sembradas.

Sin embargo, esto no era suficiente, pues al analizar los fosfolípidos de los materiales en estudio que seguramente tendrían LPE, se volvería a presentar el mismo problema. Por ello fue necesario optimizar las condiciones para obtener cromatografías bien resolutivas aún al analizar muestras

que contenían lisoderivados.

Después de muchas experiencias en las que se efectuaron una serie de modificaciones, algunas de ellas indicadas en la literatura destinadas a la técnica de cromatografía (Browning, 1971; Christie, 1973; Randerath, 1970) y otras que surgieron de la observación de los resultados obtenidos, se lograron buenas resoluciones. Por una parte, mejoró la calidad de las placas de sílica gel al utilizar soportes de vidrio cortados a partir de una sola tira. Por otra parte, se optimizaron las condiciones de desarrollo del cromatograma; se controló la temperatura de las cubas durante el desarrollo del cromatograma, la calidad, las proporciones y, fundamentalmente, el grado de hidratación de los solventes, las cantidades y tipo de material a sembrar y el tratamiento de las placas entre ambas corridas.

M.12.2.1. Separación de los fosfolípidos virales y de las diferentes fracciones celulares

Los extractos conteniendo los lípidos marcados con $^{32}\text{PO}_4^{\ominus}$ fueron analizados por cromatografía bidimensional sobre placas de sílica gel H + 10 de silicato de Mg (Florisil) de 0,25 mm de espesor, preparadas en el laboratorio, con un extensor Desaga de acuerdo a Christie (1973). Estas placas, activadas durante 1 hora a 120°C, se dejaron enfriar dentro de un desecador. Una vez frías se sembraron con el material marcado unido o no a cantidades determinadas de portadores no marcados radiactivamente.

El desarrollo del cromatograma se hizo en forma

ascendente, en las dos direcciones. Para la primera dirección la mezcla de solventes fue: $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (13:7:5) y el tiempo empleado: 80 minutos.

La segunda dirección se resuelve en aproximadamente 45 minutos con el siguiente sistema de solventes: $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{Acetona}/\text{MeOH}/\text{AcH}/\text{H}_2\text{O}$ (25:10:5:5:2).

Entre ambas corridas las placas fueron secadas durante 20 minutos con una pistola secadora. Las zonas conteniendo los distintos fosfolípidos fueron reveladas por exposición de las placas a vapores de yodo y/o por carbonización de la materia orgánica y/o por coloración con ninhidrina o por la técnica de Dragendorff y en la mayoría de los casos por autorradiografía.

Las manchas que impresionaron la película radiográfica fueron levantadas cuidadosamente, puestas en viales conteniendo 10 ml de Tolueno + 4% de omnifluor y contadas en un contador de centelleo líquido.

M.12.3. Técnicas para el revelado de los fosfolípidos cromatografiados

Revelado con I_2 : Las placas se expusieron a los vapores de I_2 bisublimado, apareciendo manchas pardas o amarillas según la cantidad de lípido presente.

Carbonización: Según Christie (1973), se disolvió $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ en SO_4H_2 (1:1) y se aplicó en forma de aerosol sobre la cromatografía. Se colocó luego la placa a 180°C durante 1 hora. Las zonas de la placa conteniendo compuestos orgánicos aparecieron negras por la carbonización de los mismos.

Ninhidrina: Según Randerath (1970) se disolvió el colorante ninhidrina al 0,2% en butanol saturado con agua y se rociaron las placas con esta solución. Luego se llevaron a una estufa a 100-105°C en atmósfera saturada en agua. Los lípidos con grupos aminos libres dieron color violáceo.

Dragendorff: (modificación de Murnier y Macheboeuf, según Randerath, 1970).

Solución 1: 1,7 g de nitrato básico de bismuto en 100 ml de ácido acético 20%.

Solución 2: 40 g de KI en 100 ml de H₂O.

Se tomaron 20 ml de solución 1 y 5 ml de solución 2, más 70 ml de H₂O. Se aplicó la mezcla en la placa en forma de aerosol y aparecieron anaranjadas las zonas conteniendo PC, LPC y Sph.

12.3.1. Reconocimiento de las manchas correspondientes a esfingomielina y fosfatidilinositol y lisofosfatidiletanolamina por cromatografía unidireccional en capa fina

Las manchas correspondientes a las especies Sph, PI y LPE se levantaron de las cromatografías bidimensionales. Los lípidos que contenían se extrajeron de la sílica gel con metanol y luego con solventes de Folch, cloroformo/metanol (2:1). Los extractos orgánicos se llevaron a sequedad bajo corriente de N₂ y los lípidos se redisolviéron en solvente de Folch. Luego se sembraron en una placa cromatográfica preparada de acuerdo a Christie (1973), con sílica gel H + 0,04% de SO₄(NH₄)₂ activadas a 120°C y

enfriadas en desecador. Como patrones se usaron fosfolípidos comerciales no marcados. El cromatograma se desarrolló en forma ascendente en la siguiente mezcla de solventes: $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{MeOH}/\text{AcH}/\text{N}_2\text{O}$ (50:25:8:1).

Las placas obtenidas se revelaron por autorradiografía y por exposición a vapores de I_2 .

M.12.3.2. Autorradiografía (puesta a punto)

El sistema pudo usarse satisfactoriamente merced a varios ensayos que permitieron encontrar:

- la manera de fijar la sílica gel al vidrio soporte para que no se desprendiera al apoyar la placa autorradiográfica. Entre las distintas sustancias usadas se encontró que la más conveniente es el fijador para cabellos aplicado en forma de aerosol.
- El tipo de placa radiográfica, pantalla intensificadora más conveniente que es la que se cita en (M.1.)
- El tiempo y cantidad de radiactividad necesarios para impresionar convenientemente la placa autorradiográfica. Las placas sembradas con 100.000 cpm pueden ser reveladas a las 72-96 horas de exposición.

R E S U L T A D O S

Y

D I S C U S I O N

CAPITULO I: SEPARACION E IDENTIFICACION DE FOSFOLIPIDOS

R.1.1. CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL EN CAPA FINA

Las envolturas virales poseen como componentes lipídicos mayoritarios a los fosfolípidos.

El estudio cuali y cuantitativo de los lípidos de un sistema biológico obliga a la separación e identificación de las diferentes especies individuales que componen a la mezcla compleja. Para poder cumplir con estos requisitos, al analizar los fosfolípidos de los arenavirus y sus células huéspedes, se utilizó la técnica de cromatografía bidimensional en capa fina. La puesta a punto de dicha técnica se realizó utilizando fosfolípidos patrones comerciales y los detalles de la misma se describen en (M.12.2.).

Una vez que se encontraron las condiciones adecuadas se obtuvieron placas como la que se muestra en la Figura 1. En ella se puede observar una buena resolución entre todas las especies sembradas, aún entre PI, Sph y LPE que normalmente no se separan en forma correcta (Renkonen y col., 1971, 1972a). En la placa de la Figura 1, entre LPE y Sph aparece una mancha muy tenue que la fotografía no puede captar y que como se demostrará en (R.1.3.) corresponde a LPE. Esta especie no fue agregada a la mezcla de fosfolípidos con que se sembró la cromatoplaaca sino que surge como producto de degradación, de allí que su masa sea muy pequeña. Cuando se halla en mayor proporción, no solo se visualiza mejor sino que también se separa mejor de Sph, como veremos más adelante (figuras 4 y 7).

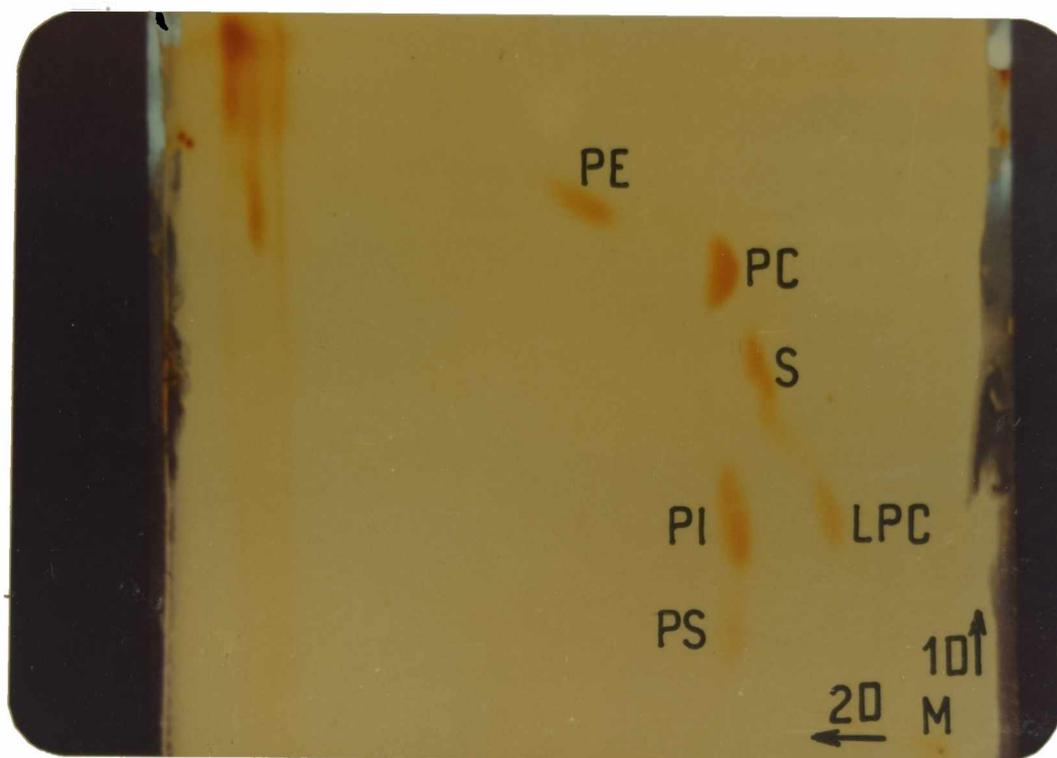


Figura 1: Cromatografía bidimensional en capa fina de fosfolípidos patrones

En la placa fueron sembrados los siguientes patrones comerciales: 30 μg de LPC, PI y S y 40 μg de PS, PE y PC.

La cromatoplaca fue revelada por exposición a los vapores de I_2 .

1D: primera dirección del desarrollo del cromatograma

2D: segunda dirección del desarrollo del cromatograma

M : punto de siembra

R.1.2. DETECCION DE FOSFOLIPIDOS POR AUTORADIOGRAFIA

La posición de cada especie en la placa cromatográfica normalmente se revela mediante la exposición de la misma a los vapores de I_2 o por carbonización de la materia orgánica contenida en cada mancha.

Este método es más sensible, ya que permite revelar fácilmente 10 μg de cada especie y extremando los cuidados hasta 1 μg de las mismas (Christie, 1973).

Para algunos virus de envoltura se halló que la relación en masa entre fosfolípidos y proteínas es de 0,24/1 (Pfefferkorn y Hunter, 1963; Renkonen y col., 1971). Si los arenavirus se comportaran en forma similar a estos virus, se esperaría tener aproximadamente 48 μg de fosfolípidos virales a partir de los 900 ml del medio sobrenadante que se recolecta en tres días del cultivo de células infectadas en 10 frascos roller ya que dicho medio sobrenadante contiene 0,2 mg de proteína viral. Esta masa de fosfolípidos se repartiría en por lo menos 10 especies diferentes, pero al no hallarse todas en la misma proporción, los lípidos minoritarios no se podrían detectar ni aún por el método de carbonización.

Dada la dificultad de tener cantidades de arenavirus adecuadas para el análisis de sus fosfolípidos por métodos que detectan la masa de los mismos, fue necesario utilizar otros más sensibles. Así se empleó la técnica de autoradiografía aplicada a la cromatografía. Los detalles de la puesta a punto de la misma se describen en (M.12.3.2.).

El sistema pudo usarse satisfactoriamente y así se detectaron fosfolípidos que están en una proporción menor que el 1% del total, a partir de la masa de virus contenida en

sólo 40 ml de medio sobrenadante del cultivo de células infectadas, lo que implica haber detectado correctamente, como se mostrará en las figuras 4 y 7, fosfolípidos cuya masa en la cromatoplaça se calcula sería inferior a 0,02 μ g.

R.1.3. IDENTIFICACION DE FOSFOLIPIDOS

La identificación de las manchas obtenidas en los cromatogramas se efectuó por las técnicas que habitualmente se utilizan y que se detallan en (M.12.3.).

En los casos en que quedaban dudas se cromatografiaron los extractos de los fosfolípidos marcados con 32 P de células o de virus, con el agregado del patrón fosfolipídico en cuestión como portador frío. De esta manera, se establecieron por autorradiografía las posiciones de todas las especies fosfolipídicas que componían al extracto, en tanto que por exposición a los vapores de I_2 sólo se reveló la posición de la especie considerada.

Para asegurarnos la identificación de Sph, LPE y PI se desarrollaron cromatografías bidimensionales en capa fina de muestras intencionalmente degradadas, en las que la concentración de LPE estaba aumentada respecto a los controles sembrados con material no degradado.

Por otra parte, se recromatografiaron individualmente en una dimensión los fosfolípidos contenidos en cada una de las manchas correspondientes a estas tres especies en la cromatografía bidimensional. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 2. En la misma se observa que la mancha que en la cromatografía bidimensional se ubica por encima de

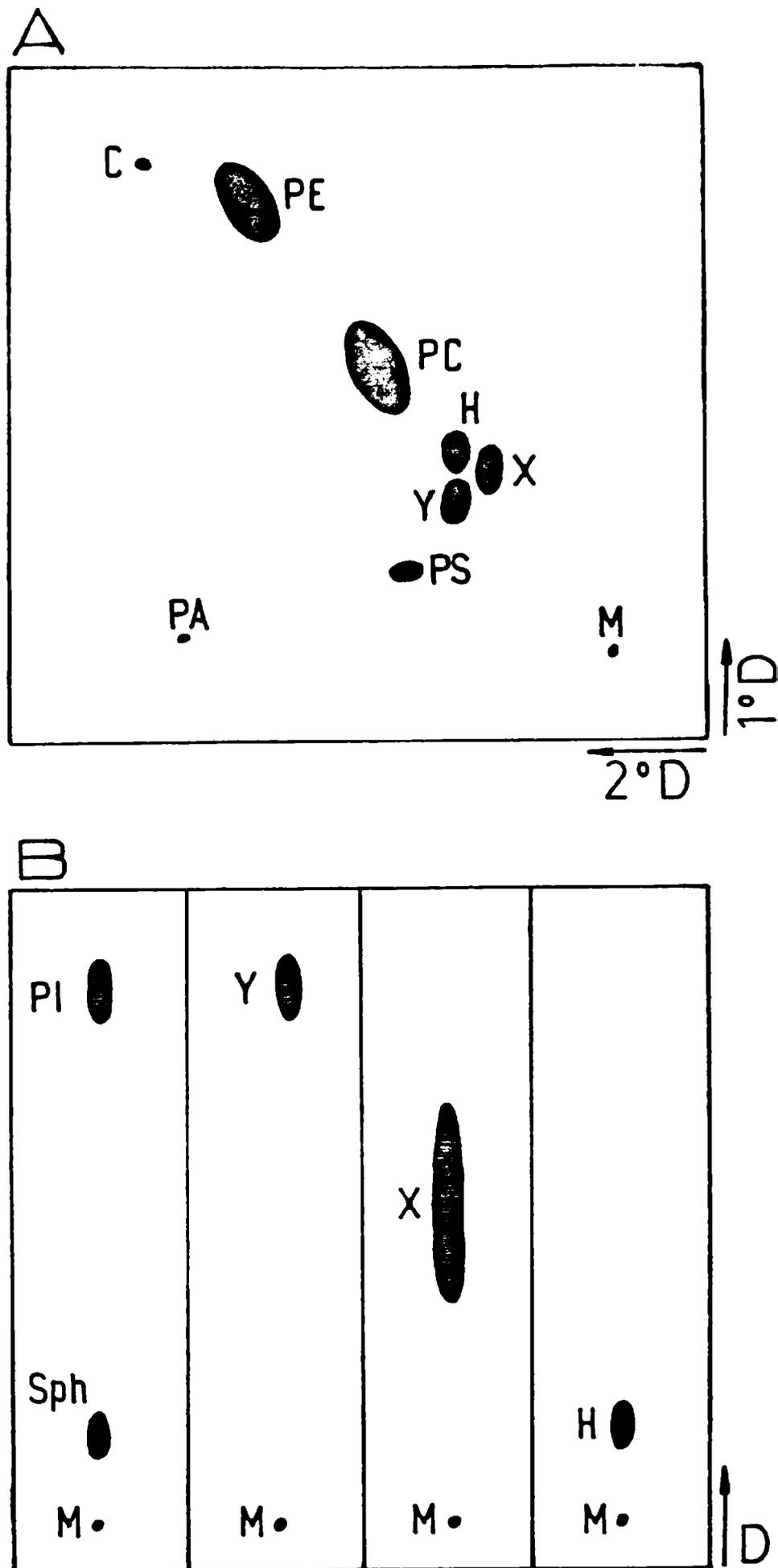


Figura 2: Cromatografía unidireccional en capa fina del material separado en una cromatografía bidimensional

El sector A representa la distribución de los distintos fosfolípidos virales en una cromatografía bidimensional en capa fina y revelada por autorradiografía. En el sector B se esquematiza la cromatografía unidireccional sembrada de izquierda a derecha con 30 ug de Sph y 30 ug de PI el primer canal; el segundo con el material extraído de la mancha Y, el tercero con el de la mancha X y el cuarto con el de la mancha H de la primer cromatografía. La placa fue revelada por autorradiografía.

M: punto de siembra

D: dirección de desarrollo del cromatograma

las otras dos coincide en movilidad con Sph y la inferior con PI, en este sistema unidireccional que las separa mejor, quedando entre ellas, lo que se presume correspondería a LPE. Estos resultados coincidirían con las observaciones anteriores. Por ello se concluye que quedaron bien separadas e identificadas todas las especies fosfolipídicas estudiadas.

CAPITULO II: ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPORCIONES RELATIVAS
DE LOS FOSFOLIPIDOS DE LOS ARENAVIRUS Y SUS CELU-
LAS HUESPEDES

R.2.1. ASPECTOS PRELIMINARES

R.2.1.1. Separación e identificación de fosfolípidos celulares

De acuerdo con lo expresado en el capítulo precedente (R.1.2.), la escasa masa de virus producida en cultivos celulares hace que sea imprescindible el empleo de isótopos radiactivos para estudiar la proporción relativa de las distintas especies fosfolipídicas de los arenavirus. En tanto que la masa de fosfolípidos proveniente de las células de aquellos cultivos es suficientemente grande para que las distintas especies que los constituyen puedan ser identificadas y dosadas por métodos químicos (Brotherus y Renkonen, 1977; Gallaher y Blough, 1975; Klenk y Choppin, 1969; Renkonen y col., 1972a; Schlesinger y col., 1973). Sin embargo, al pretender estudiar en forma comparativa la proporción relativa de los distintos fosfolípidos virales y celulares resulta conveniente emplear también la marcación con ^{32}P para el análisis de los últimos.

Las células infectadas por los arenavirus o las falsamente infectadas se marcaron con ^{32}P y fueron procesadas de acuerdo con el esquema de la Figura 3; a continuación los extractos lipídicos obtenidos fueron analizados por cromatografía bidimensional en capa fina. En un comienzo las placas cromatográficas fueron sembradas con extractos lipídicos celulares unidos a una mezcla de fosfolípidos patrones. Esta técnica permitiría tener la cantidad de material necesaria para revelar y establecer correctamente mediante distintos reactivos químicos, la identidad de cada mancha cromatográfica. Esto último se logró porque los mapas obtenidos por autorradiografía se superponían perfectamente con

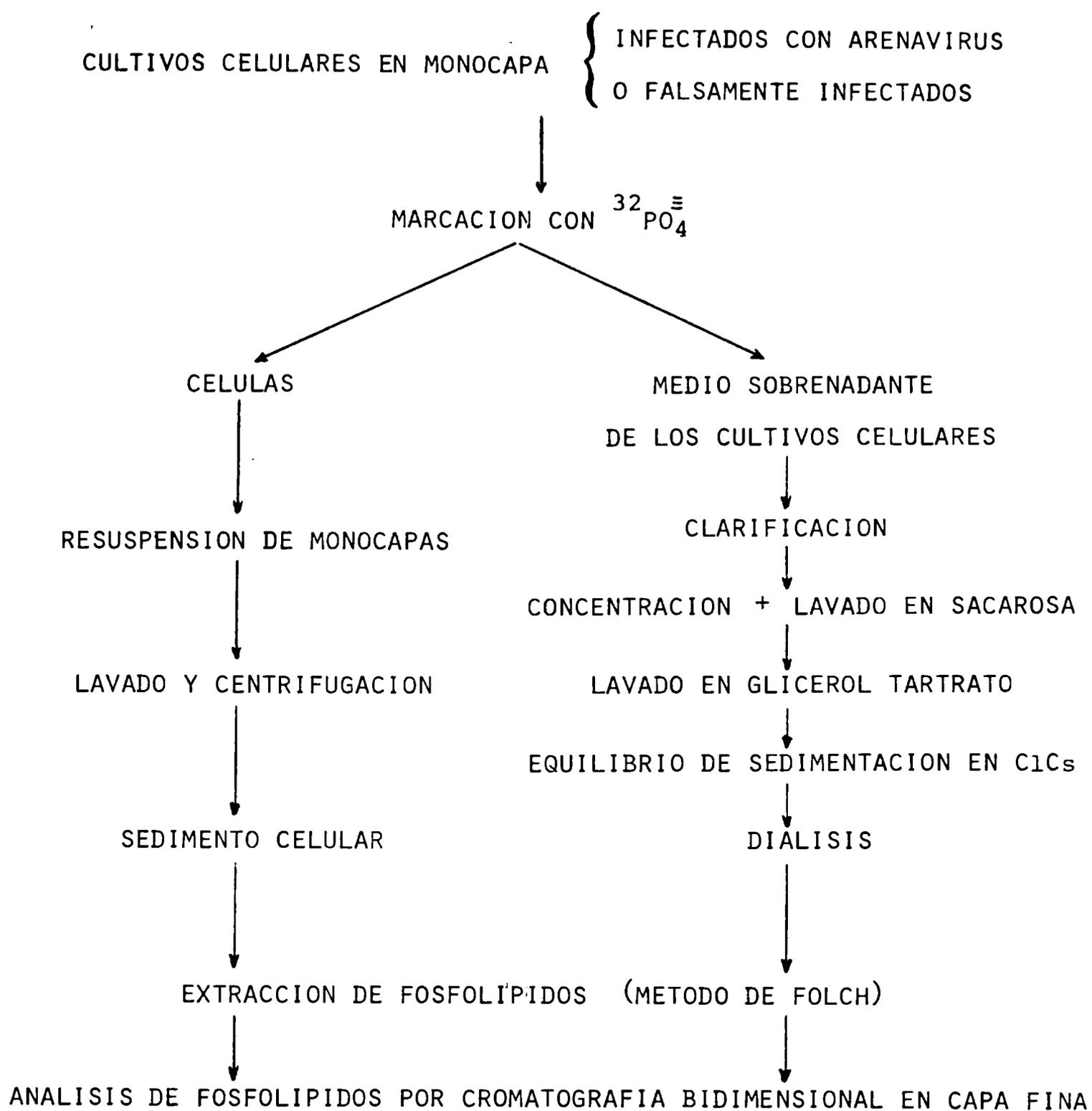


Figura 3: Esquema experimental de la marcación y extracción de fosfolípidos virales y celulares.

aquéllos alcanzados por revelado químico. Por otro lado, debido a que la cuantificación se realizó dosando la cantidad de ^{32}P contenida en cada mancha, la presencia de los portadores fríos no interfirió con las determinaciones.

Las proporciones relativas de los distintos fosfolípidos en cada placa se estableció calculando el porcentaje de ^{32}P de la mancha correspondiente respecto del total de cuentas recuperadas.

Los resultados así obtenidos han permitido establecer cuáles son las especies fosfolipídicas mayoritarias y minoritarias y qué porcentaje aproximado de las primeras existe.

Luego de numerosos ensayos en los cuales se fueron haciendo distintas modificaciones tendentes a mejorar el método, se observó que las manchas eran más compactas, y que por lo tanto se separaban mejor, cuando los extractos lipídicos celulares eran cromatografiados sin el agregado de portadores fríos. Al introducir esta modificación, se lograron cromatografías tales como las mostradas en la Figura 4 con manchas bien definidas y bordes nítidos.

Además, con la repetición de los ensayos, se fue adquiriendo una mayor habilidad manual para levantar las zonas del cromatograma que contenían las distintas especies fosfolipídicas. Los porcentajes de recuperación de la radiactividad sembrada fueron del 71% al 97%. En estas condiciones se obtuvieron resultados que se analizarán más adelante.

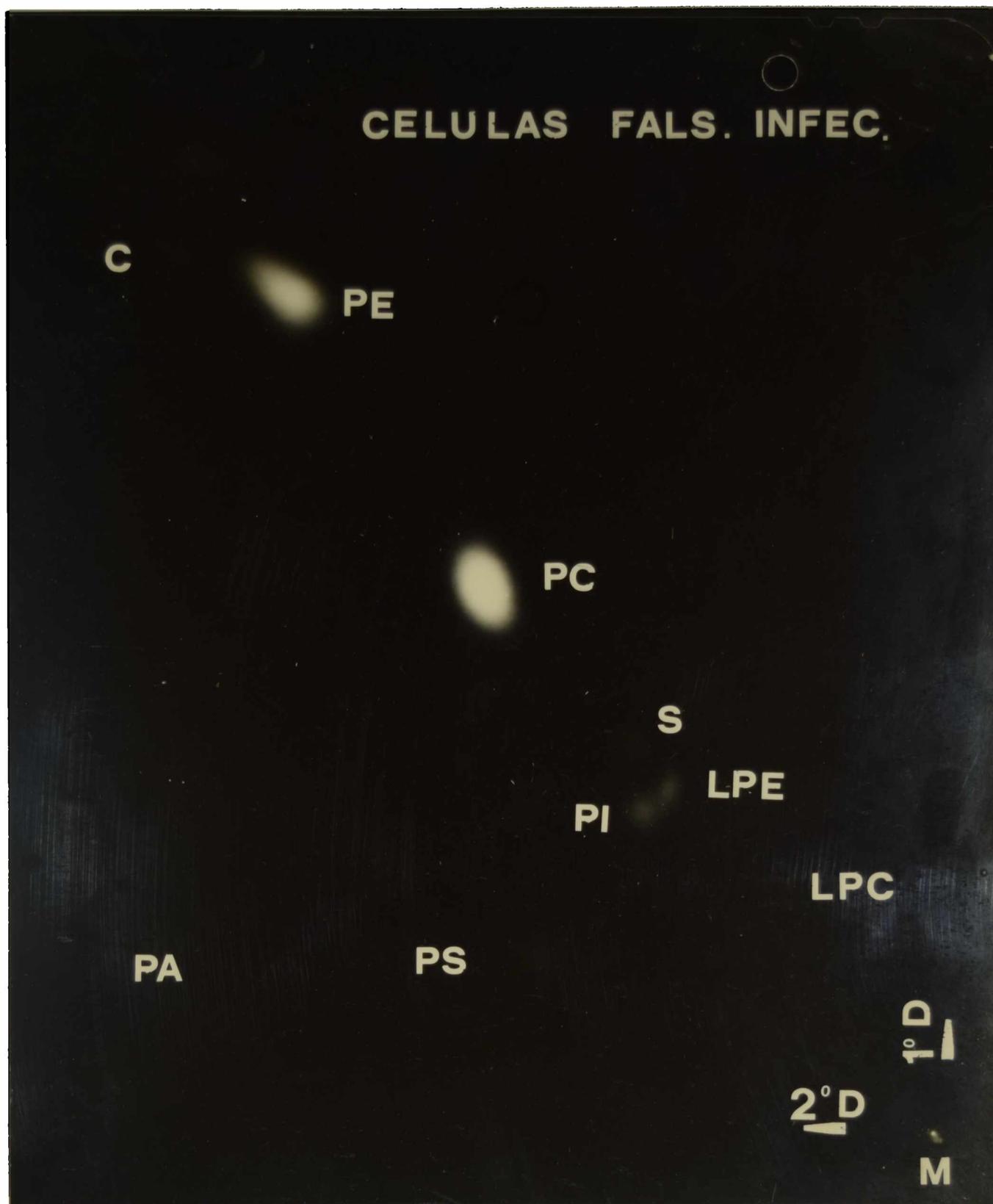


Figura 4: Fosfolípidos celulares

Autorradiografía de una cromatografía bidimensional en capa fina del extracto lipídico de células BHK-21(C-13) falsamente infectadas. Se analizaron, como se indica en *Materiales y Métodos*, 100.000 cpm de ^{32}P . El tiempo de exposición de la placa radiográfica fue de 96 horas. Las manchas correspondientes a LPC y PA se observan en la autorradiografía pero, por ser muy tenues, no se registraron en la copia en papel. Las manchas que no tienen identificación son las que se computan como fosfolípidos desconocidos.

R.2.1.2. Purificación del virus Junín y otros arenavirus

El estudio bioquímico de los agentes virales requiere que los análisis correspondientes se realicen sobre virus altamente purificados.

En la literatura específica aparecen muchos sistemas referidos a la purificación del virus Junín. Los primeros que se utilizaron están basados en la separación mediante un sistema bifásico (Martínez Segovia y Díaz, 1968), la precipitación con sulfato de protamina (Coto y Parodi, 1968) o con sulfato de amonio (Help y col., 1970). Estos sistemas, que logran una muy buena recuperación de la infectividad, sirven en realidad, más para concentrar que para purificar el virus. Posteriormente, al estudiar los componentes estructurales del mismo, los métodos de purificación se basaron en centrifugaciones a través de gradientes de sacarosa (Añón y col., 1976; Coto y col., 1972; Martínez Segovia y De Mitri, 1977). Este sistema permitía obtener material con un alto grado de pureza para el análisis de los ácidos nucleicos virales (Añón y col., 1976); sin embargo, no lograba eliminar totalmente las proteínas contaminantes (Romanowski, 1981).

La técnica esquematizada en la Figura 3, que se basa en la centrifugación a través de soluciones de sacarosa, glicerol-tartrato y ClCs brindaba la posibilidad de obtener virus libres de proteínas contaminantes (Romanowski, 1981).

Las experiencias que se describen a continuación tienen por objeto estudiar si mediante la aplicación de esta última técnica se podrían obtener virus que cumplieran con las condiciones de no contener fosfolípidos marcados de

origen no viral y de mantener su viabilidad.

Los medios sobrenadantes de los cultivos de células infectadas o falsamente infectadas fueron centrifugados a baja velocidad para separar los restos celulares o células desprendidas de la monocapa, y luego la operación fue repetida a alta velocidad para sedimentar el material particulado pasándolo a través de una solución de sacarosa. Se obtuvo así un precipitado cuyos componentes, que debían poseer un alto coeficiente de sedimentación, habían sido lavados por la solución de sacarosa. Seguidamente se efectuó un lavado del material sedimentado pasándolo a través de una solución de alta fuerza iónica (glicerol-tartrato) y se lo recogió sobre una capa de sacarosa de alta densidad.

La Figura 5 muestra la distribución de la radiactividad del ^{32}P proveniente del medio sobrenadante de un cultivo infectado y de un control falsamente infectado, ambos sometidos a los procedimientos descritos en el párrafo anterior. Puede observarse que es muy poco el material marcado proveniente del cultivo no infectado que sedimentó en la interfase de sacarosa/glicerol-tartrato, mientras que la mayor parte de la radiactividad proveniente del cultivo infectado se encontró sobre el colchón de sacarosa, posición en la que se encuentran los virus (Romanowski, 1981). En cambio, se verificó la ausencia de material marcado en la parte superior del tubo, lugar en el que podrían hallarse los compuestos de bajo peso molecular.

El material depositado en la interfase fue sometido a una centrifugación isopícnica en ClCs. Se separaron así de los viriones los materiales de distinta densidad. En la Figura 6 se puede observar que la mayor parte del ^{32}P se

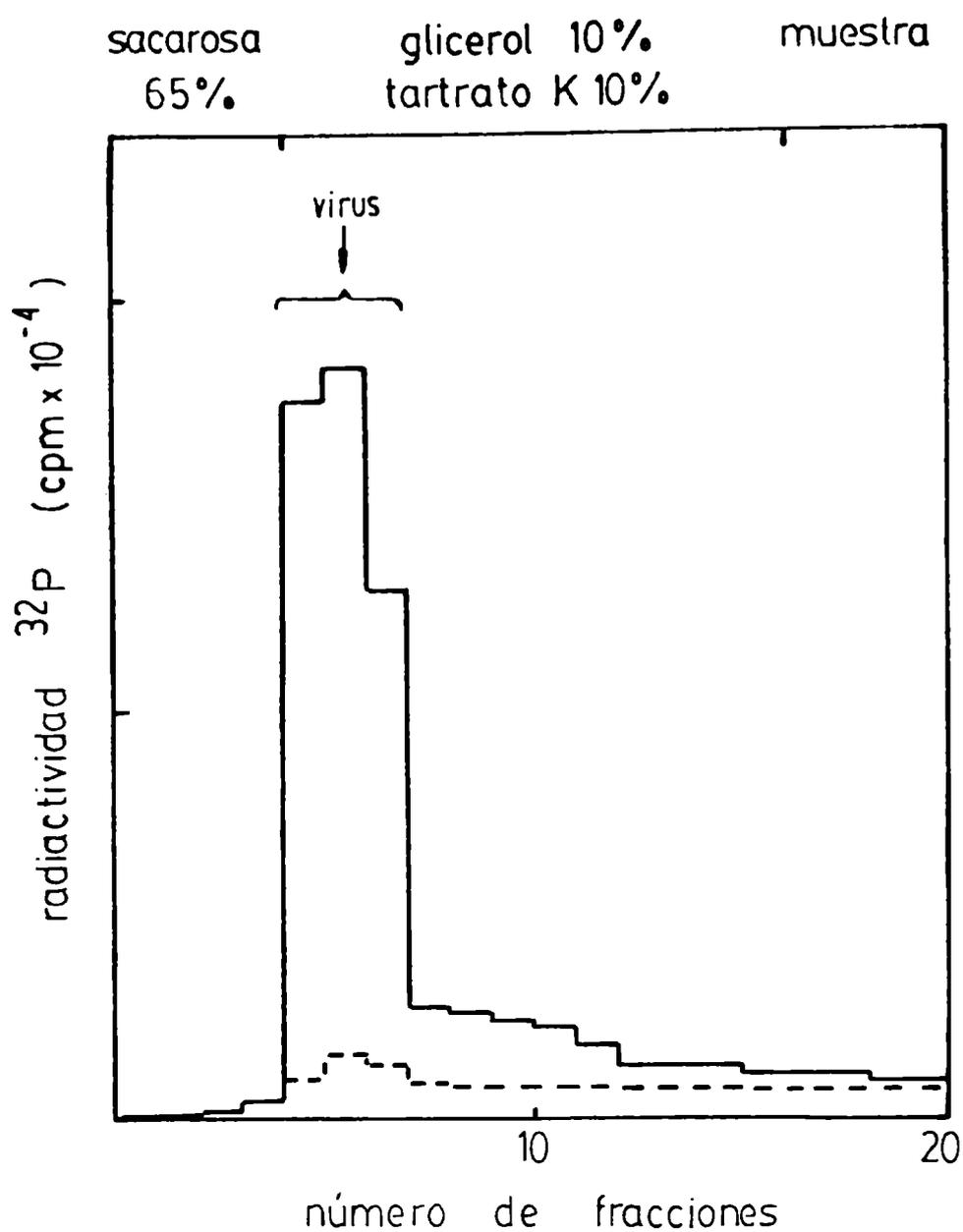


Figura 5: Purificación de la cepa MC_2 del virus Junín. Lavado en glicerol-tartrato

Cultivos de células BHK-21(C-13) en monocapa, en cajas de Petri de 8,5 cm de diámetro ($1,5 \times 10^7$ células) se infectaron con una $\text{mdi} = 2$ del virus Junín MC_2 . Al segundo día post-infección se marcaron con ^{32}P (0,2 mCi/ml, libre de portadores). El medio sobrenadante de dichos cultivos fue centrifugado a baja velocidad, para eliminar células desprendidas y restos celulares. La operación se repitió a alta velocidad para sedimentar el material particulado, pasándolo por un colchón de sacarosa 20% P/V. El precipitado se sembró sobre un doble colchón de glicerol-tartrato/sacarosa y se centrifugó a 50.000 rpm durante 55 minutos en un rotor SW-60 Ti de Spinco. Se recogieron fracciones desde el fondo del tubo y se determinó la radiactividad en alícuotas de 2 μl de cada una de las mismas precipitando con TCA 5% (—).

El medio sobrenadante de células BHK-21 falsamente infectadas se trató de igual manera (---).

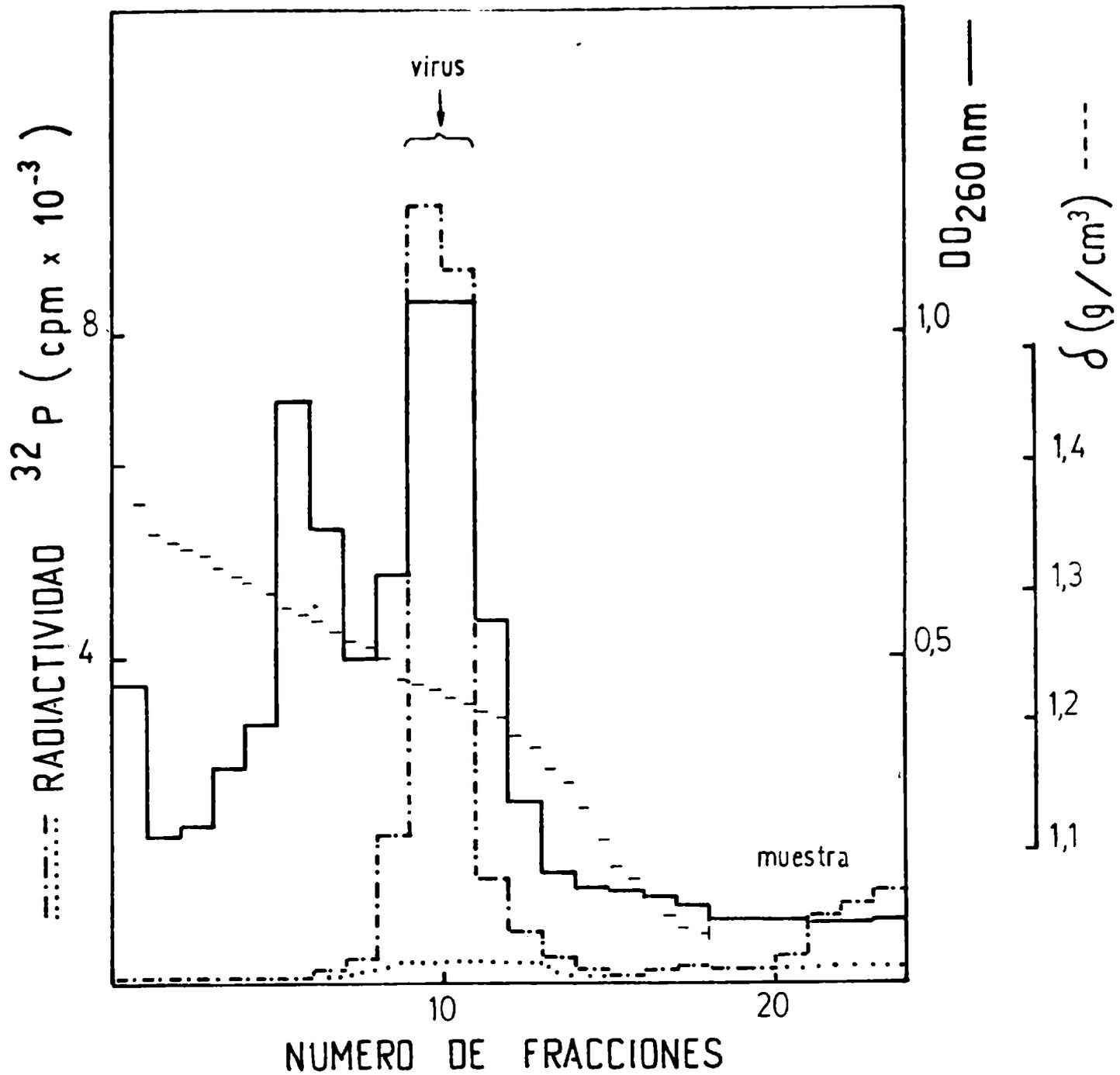


Figura 6: Purificación de la cepa MC₂ del virus Junín por centrifugación isopícnica en ClCs.

Las fracciones de máxima radiactividad de la Figura 5 se diluyeron y se sembraron sobre un gradiente preformado por capas de ClCs. Este fue sometido luego a una ultracentrifugación a 55.000 rpm durante tres horas en el rotor SW 60Ti de Spinco. El gradiente se fraccionó por punción del fondo del tubo y se determinó la radiactividad en alícuotas de 2 μ l (\sim 1/100 del volumen) de cada fracción (-.-.-). El mismo procedimiento se efectuó con el material proveniente del control falsamente infectado (.....). En experiencias similares a las anteriores se partió de 300 ml de medio sobrenadante de cultivos de células BHK-21 infectadas con la cepa MC₂ del virus Junín, crecidas en frascos Roux y con medio no marcado, determinándose la absorbencia a $\lambda = 260$ nm de cada fracción del gradiente de ClCs (—) y la densidad de cada una por refractometría (-----).

recogió en las fracciones de densidad $1,2 \text{ g/cm}^3$, donde normalmente se ubican los arenavirus (Mifune y col., 1971; Webb y col., 1967; Johnson y col., 1973; Romanowski, 1981; Palmer y col., 1977) y a la densidad $1,3 \text{ g/cm}^3$ se halló material no marcado, descrito como proteínas contaminantes (Romanowski, 1981). En tanto que en el gradiente sembrado con el material proveniente de los cultivos falsamente infectados no se encontró prácticamente radiactividad a densidad $1,2 \text{ g/cm}^3$. Esto indicaría que es muy poco probable que existieran fosfolípidos contaminantes marcados con ^{32}P que cosedimentaran con el virus.

Los viriones así purificados poseían una actividad específica, medida como UFP/mg de proteínas, 1500 veces superior a la que presentaban en el medio sobrenadante del cultivo. Por estas razones, este sistema fue el elegido para obtener virus purificado para el análisis de fosfolípidos.

Con el fin de efectuar un estudio comparativo, se aplicó la misma metodología para la purificación de la cepa XJCl₃ del virus Junín y a los virus Tacaribe y Pichindé. Los resultados obtenidos fueron similares.

R.2.1.3. Separación de fosfolípidos virales

Lo expuesto en el capítulo previo (R.1.2.) indica que la escasa masa de fosfolípidos que se obtiene a partir del cultivo de los arenavirus no es un impedimento para que una vez separadas las distintas especies que los constituyen, se puedan revelar las posiciones de las mismas en

el cromatograma mediante el empleo de la técnica de autorradiografía.

Sin embargo, la poca cantidad de material representa un inconveniente para la buena resolución de las distintas especies fosfolipídicas en las cromatografías bidimensionales en capa fina. Para conseguir buenas separaciones, es necesario el agregado de portadores fríos a los extractos lipídicos de los viriones purificados. Los mejores resultados se obtuvieron al emplear como tales, extractos fosfolipídicos de células BHK no marcadas.

La Figura 7 nos muestra la copia en papel de una autorradiografía de una cromatoplaqueta obtenida de esa manera. En ella se puede observar una buena resolución entre los diversos compuestos debido a que las manchas son compactas y con bordes nítidos.

Los resultados que consignaremos a continuación provienen de cromatoplaquetas similares de las cuales se rasparon y recogieron las zonas que impresionaban la película radiográfica para luego determinar la radiactividad contenida en las mismas, por medio de un contador de centelleo líquido. Las proporciones de las distintas especies fosfolipídicas se calcularon con el procedimiento adoptado para el caso de los fosfolípidos celulares (R.2.1.1.).

R.2.2. CUANTIFICACION DE FOSFOLIPIDOS DE VIRUS Y CELULAS ENTERAS

R.2.2.1. Elección de las técnicas estadísticas adecuadas a las características del sistema experimental utilizado

Se estudiaron los fosfolípidos de distintos materiales: cepas MC₂ y XJCl₃ del virus Junín, virus Tacaribe,

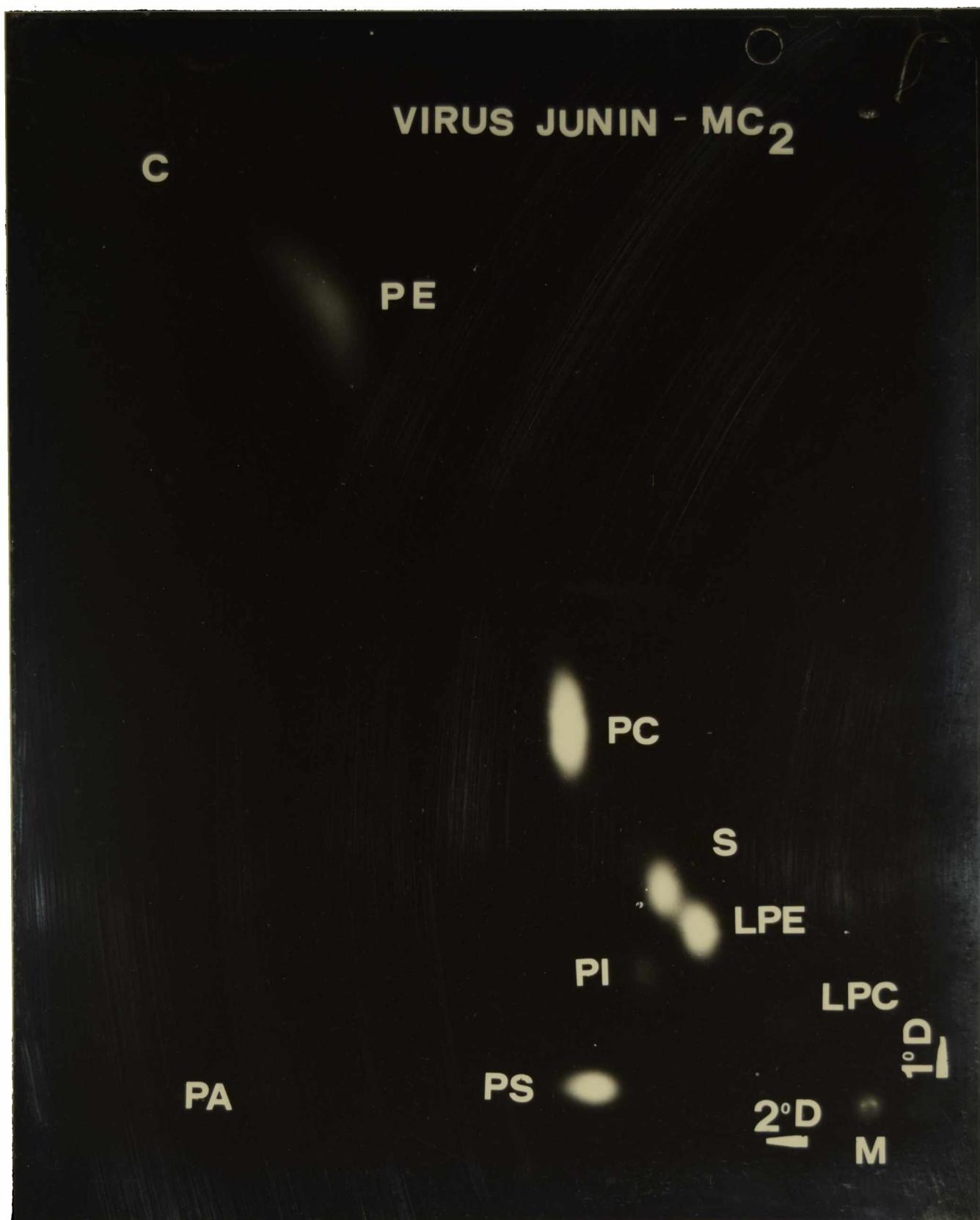


Figura 7: Fosfolípidos virales

Autorradiografía de una cromatografía bidimensional en capa fina del extracto lipídico de la cepa MC₂ del virus Junín. Se analizaron, como se indica en Materiales y Métodos, 100.000 cmp de ³²P. El tiempo de exposición de la placa radiográfica fue de 96 horas. Las manchas correspondientes a LPC, C y PA se observan en la autorradiografía, pero por ser muy tenues no se registraron en la copia en papel. Las manchas que no tienen identificación son las que se computan como fosfolípidos desconocidos.

virus Pichindé, células enteras falsamente infectadas o infectadas con algunos de los arenavirus mencionados.

Para cuantificar estos fosfolípidos se efectuaron varias preparaciones de cada uno de los materiales en estudio. En sendas preparaciones se procedió de acuerdo con lo esquematizado en la Figura 3, lavando o purificando el material de partida según se tratase de células o de virus. Con cada uno de los extractos lipídicos obtenidos se desarrollaron todas las cromatografías posibles, de las cuales se computaron sólo aquéllas en las que se podían identificar claramente cada una de las distintas especies fosfolipídicas. Esto se logró cuando las cromatoplasmas presentaban una resolución semejante a la que se observa en las figuras 4 y 7. Las proporciones de las distintas especies fosfolipídicas en cada una de las placas analizadas, que se establecieron de la manera indicada al comienzo del capítulo (R.2.1.1.) se listan en la Tabla I. En ella se puede apreciar que en general, para un material determinado los datos provenientes de placas correspondientes a una misma preparación son altamente repetitivos. Sin embargo, aquéllos alcanzados a partir de placas sembradas con extractos lipídicos provenientes de dos preparaciones diferentes del mismo material no siempre son iguales. Esto indicó que antes de hacer ningún otro tipo de análisis se debía investigar si la preparación ejercía algún efecto sobre las proporciones de las distintas especies fosfolipídicas. Para ello analizamos, mediante el test de Student, si las distintas preparaciones de cada uno de los materiales estudiados pertenecían a la misma población.

En la Tabla II se presentan los resultados obtenidos

Tabla I

Proporción de las distintas especies fosfolipídicas en las cromatoplacas sembradas con extractos lipídicos virales o celulares

Preparación, Material	Fracciónes asociadas											Fracciónes asociadas	Porcentaje de fracciones asociadas
	PC	PE	LPE ^a	PS	Sph	PI	LPC	PA	C	D			
1CMC2	62.1	17.7	999 ^a	3.4	2.2	999	0.8	0.0	2.1	0.0	LPEPI	11.7	
2CMC2	53.8	24.1	999	3.3	999	999	1.5	0.0	1.8	0.0	LPESPHPI	15.2	
3CELULA	54.6	25.4	999	4.0	999	6.6	0.0	0.0	999	3.6	LPESPH	5.6	
3CELULA	42.0	24.2	4.6	4.7	2.5	5.6	1.4	0.3	1.6	5.0	PI LPC	8.0	
3CELULA	45.6	23.2	5.0	5.3	1.2	999	999	0.0	999	4.0	LPESPH	8.1	
3CMC2	49.2	22.0	999	4.9	999	4.2	1.6	0.1	1.5	4.6			
3CMC2	51.2	19.1	8.1	4.8	1.4	6.3	1.6	0.2	0.7	4.5			
3CMC2	50.5	25.2	999	5.2	999	7.2	1.0	0.5	0.4	3.1	LPESPH	6.5	
4CMC2	58.1	19.7	999	4.4	999	999	0.7	0.6	999	3.1	LPESPHPI	13.3	
4CMC2	57.5	18.4	999	4.9	999	4.2	0.5	0.5	1.3	3.6	LPESPH	8.6	
4CMC2	54.1	19.0	999	4.4	999	4.3	0.8	0.3	1.9	5.8	LPESPH	8.1	
4CMC2	58.6	19.1	999	4.5	999	4.8	0.3	0.0	999	4.0	LPESPH	7.5	
4CMC2	54.3	21.2	999	4.6	999	3.8	0.8	0.0	1.3	5.4	LPESPH	8.9	
4CMC2	50.2	19.7	999	4.7	999	4.7	0.6	0.0	1.3	4.3	LPESPH		
4CXJCL3	54.1	21.4	3.6	4.7	0.9	6.6	0.7	0.0	2.0	6.0			
4CXJCL3	58.1	20.1	3.3	3.4	999	999	0.6	0.0	2.4	4.8	SPHPI	7.2	
4CXJCL3	53.1	18.9	3.1	4.6	1.2	7.8	0.7	0.1	1.4	4.2			
4CTAC	56.6	21.7	3.2	4.0	1.1	6.2	1.2	0.7	1.7	3.4			
5CELULA	50.9	29.4	2.5	6.0	1.5	6.1	0.6	0.0	0.5	1.2			
5CELULA	45.3	29.1	3.4	4.9	1.9	5.6	0.5	0.0	1.7	2.9			
5CELULA	47.9	30.2	2.8	5.0	1.7	6.1	0.3	0.0	2.2	3.5			
5CELULA	46.3	30.7	999	4.7	999	999	0.6	0.5	2.5	1.2	LPESPHPI	12.6	
5CELULA	47.3	30.2	999	4.1	2.3	4.5	999	0.0	2.8	4.0	LPESPHPI	4.0	
5CELULA	48.3	30.6	4.3	4.9	2.2	999	999	0.6	2.8	4.0	LPESPHPI	4.0	
5CELULA	46.4	30.2	3.7	4.2	2.3	3.9	999	0.5	2.5	1.0	LPESPHPI	5.2	
5CELULA	31.0	27.8	999	10.9	11.1	999	1.4	0.0	0.6	2.2			
6VMC2	31.2	23.9	12.5	11.1	11.8	3.4	0.9	0.0	0.6	0.6	LPEPI	14.9	
6VMC2	31.6	22.5	16.1	11.6	11.0	3.4	0.9	0.5	1.0	1.1			
6VTAC	29.4	22.1	18.8	11.2	11.0	3.4	1.3	0.2	0.3	0.3			
6VTAC	30.0	21.7	10.8	10.5	6.8	12.7	0.6	0.3	0.8	4.8			
6VTAC	27.7	20.9	11.4	10.5	7.2	13.8	0.9	0.0	0.5	2.4			
6VTAC	28.3	20.6	999	11.2	8.0	13.9	0.6	0.0	1.8	0.0			
6VTAC	31.3	21.6	10.0	10.3	999	999	1.1	0.0	1.5	2.5	LPESPHPI	31.8	
6VPICH	36.9	20.4	999	11.5	5.8	13.7	1.1	0.3	1.5	1.2			
6VPICH	35.6	23.2	10.2	14.9	9.7	999	0.7	0.0	0.0	2.9	LPESPHPI	24.5	
6VPICH													

Tabla I (Continuación)

Preparación Material, Ensayo	Fracciónes asociadas ^b										Porcentaje de fracciónes a- sociadas ^c	
	PC	PE	LPE	PS	Sph	PI	LPC	PA	C	D		
7CELULA 1	54.8	9999	4.3	4.1	2.0	6.6	1.2	0.0	999	999	PE C D	26.7
7CELULA 2	54.7	19.5	4.4	4.3	1.8	6.8	1.4	0.0	999	999	PE C D	5.1
7CELULA 3	50.3	20.7	5.5	4.9	1.3	999	999	0.0	999	999	PI LPC	9.0
7CMC2 1	54.1	9999	4.6	3.9	1.5	6.9	1.4	0.0	999	999	PE C D	25.6
7CXJCL3 1	54.9	20.8	4.8	5.3	1.5	999	999	0.3	2.0	999	PE C D	8.6
7CXJCL3 2	55.7	19.6	3.8	4.5	2.2	7.6	2.6	0.0	999	999	PE C D	3.4
7CXJCL3 3	59.0	9999	5.5	4.4	2.1	4.8	2.2	0.0	999	999	PE C D	21.3
7CTAC 1	62.6	18.0	3.7	4.5	1.4	7.7	2.5	0.0	2.0	0.0	PE C D	6.3
7CTAC 2	63.5	18.7	3.5	4.0	2.2	999	999	0.0	2.5	0.0	PI LPC	80.2
7CPICH 1	97.9	9999	3.9	3.6	1.7	5.7	1.0	0.0	2.2	0.0	PE	6.8
7CPICH 2	61.4	21.3	3.2	3.7	1.9	5.7	1.0	0.0	2.3	0.0	PC PE	3.1
7CPICH 3	60.4	19.5	999	2.9	1.6	5.3	1.5	0.0	1.8	0.0	LPESPH	5.3
8CELULA 1	51.8	13.1	4.3	5.1	2.4	6.5	1.6	0.0	999	999	PE C D	6.6
8CELULA 2	49.6	21.3	4.0	4.7	1.7	7.1	1.8	0.0	1.0	1.7	LPESPH	3.1
8CELULA 3	54.2	20.8	999	5.3	999	5.9	1.4	0.0	1.5	1.7	LPESPH	5.3
8CMC2 1	58.7	18.0	4.1	5.3	2.3	7.1	1.2	0.3	1.7	0.5	PE	9.7
8CMC2 2	54.7	19.7	999	5.1	999	7.6	1.9	0.0	2.7	0.0	LPESPH	15.8
8CTAC 1	51.9	19.0	7.4	4.9	1.6	7.3	2.4	0.3	3.3	1.3	LPESPH	10.0
8CTAC 2	49.4	20.1	999	5.2	999	6.9	2.7	0.4	3.8	0.0	LPESPH	7.6
8CTAC 3	54.7	19.3	997	4.2	999	999	2.6	0.0	3.4	0.0	LPESPHPI	10.7
9CXJCL3 1	51.6	19.4	999	5.1	1.0	5.5	999	0.2	2.5	0.0	LPESPHPI	7.6
9CXJCL3 2	55.3	20.9	3.3	4.5	1.5	4.8	1.3	0.3	999	999	LPESPH	8.4
9CXJCL3 3	59.8	19.4	997	4.8	2.4	999	1.5	0.0	1.1	0.0	LPESPH	12.0
8CPICH 1	53.2	20.8	999	5.6	999	8.7	3.6	0.0	0.5	0.0	LPESPH	8.4
8CPICH 2	51.4	22.2	2.8	5.4	2.5	999	999	0.0	4.0	0.0	PI LPC	8.4
8CPICH 3	51.6	20.7	999	5.8	2.0	999	999	0.0	4.0	0.0	LPESPH LPC	12.0

Tabla I (Continuación)

Preparación, Material, Ensayo	Fracciónes asociadas										Porcentaje de fracciónes a- sociadas ^c
	PC	PE	LPE	PS	Sph	PI	LPC	PA	C	D	
BVMC2 1	42.0	21.6	299 ^a	8.7	5.5	999	2.4	0.0	0.0	0.6	17.7
BVMC2 2	43.6	20.5	12.8	9.0	6.4	5.1	2.6	0.0	0.0	0.0	
BVMC2 3	41.2	24.9	12.2	7.2	6.0	4.1	2.5	0.3	1.1	0.0	
BVMC2 4	41.4	19.9	11.5	8.3	6.9	4.7	2.0	0.6	999	0.2	3.7
BVKJCL3 1	42.4	19.2	10.9	10.5	4.5	5.3	1.7	0.5	1.3	0.8	
BVXJCLJ 2	44.4	19.3	999	8.3	999	5.3	1.9	0.6	1.8	0.8	16.7
BVXJCL3 3	999	999	10.9	12.0	5.3	6.6	2.1	1.0	999	1.0	61.4
BVXJCL3 4	43.6	19.4	9.3	9.6	5.2	999	999	0.9	2.0	0.4	8.9
BVTAC 1	42.8	20.0	11.2	8.9	5.9	6.9	2.8	0.0	0.0	0.0	
BVTAC 2	37.8	19.5	12.6	11.6	9.7	3.4	2.6	0.8	1.1	0.5	
BVTAC 3	39.2	18.5	999	11.9	999	5.5	999	0.4	0.9	0.0	22.6
BVTAC 4	37.8	19.3	13.2	11.2	8.7	3.3	2.4	1.1	1.3	0.0	
BVPICH 1	42.3	999	9.3	9.7	6.6	3.6	2.4	0.9	999	0.3	22.4
BVPICH 2	47.1	19.3	7.6	11.7	5.3	3.0	2.0	0.6	1.9	0.0	
BVPICH 3	41.3	19.0	12.1	12.0	5.7	4.2	2.8	0.0	1.8	0.0	
BVMC2 1	40.0	23.0	999	9.9	999	3.8	0.3	0.7	1.7	2.8	17.9

^a Con (999) se indica que no se puede determinar la proporción de la especie en forma aislada. Esta especie se resolvió correctamente en el cromatograma pero no se pudo recoger y determinar su radioactividad en forma aislada debido a la poca distancia que la separaba de otras. Por ello se cuantificó junto a estas otras.

^b Los símbolos representan las especies indicadas con 999 o 9999 en la fila correspondiente.

^c La cifra representa la proporción de las especies citadas en b en la fila correspondiente.

TABLA II

Comparación de las proporciones de cada especie fosfolípida entre las distintas preparaciones de fosfolípidos de células

BHK-21 (C-13) enteras falsamente infectadas

Especie fosfolípida	P r e p a r a c i o n e s								C o m p a r a c i o n e s d e m e d i a s											
	3		5		7		8		n ^d	s ^{2e}	t 3/5 ^f	t 3/7	t 3/8	t 5/7	t 5/8	t 7/8				
	\bar{x}^a	n ^b	\bar{x}	n	\bar{x}	n	\bar{x}	n									s ²			
PC	45,9	3	3,3	47,7	7	2,7	53,3	3	6,60	51,9	3	5,3	12	5,5	1,107	3,847	3,119	3,44	2,59	0,72
PE	23,1	3	1,2	30,05	7	0,35	20,1	2	0,72	20,1	3	3,0	11	2,8	6,008	1,967	2,192	7,40	8,6	0
LPE	4,8	2	0,08	3,38	5	0,56	4,9	3	0,36	4,2	2	0,02	8	0,09	5,51	0,355	1,947	6,753	3,17	2,488
PS	4,96	3	0,09	4,8	7	0,39	4,4	3	0,17	5,0	3	0,1	12	0,06	0,916	2,711	0,194	2,291	1,146	2,905
Sph	1,85	2	0,84	1,98	6	0,11	1,7	3	0,13	2,1	2	0,2	9	0,18	0,37	0,387	0,589	0,933	0,283	1,033
PI	4,9	2	0,98	5,24	5	0,98	6,7	2	0,02	6,5	3	0,4	8	0,72	0,17	2,12	2,065	0,736	2,097	0,26
LPC	1,5	2	0,02	0,5	4	0,02	1,3	2	0,02	1,6	3	0,04	7	0,03	7,16	1,24	0,679	5,72	8,93	2,038
PA	1,3	3	0,02	0,23	7	0,08	0	3	0	0	3	0	12	0,04	7,75	1,408	1,408	1,66	1,66	0
C	1,55	2	0,005	2,1	7	0,67	-	-	-	1,2	2	0,1	8	0,5	0,95	-	0,485	-	1,56	-
D	4,5	3	0,25	2,3	7	1,5	-	-	-	1,7	2	0	9	1,05	3,11	-	2,99	-	0,73	-

Leyenda Tabla II

^a Media aritmética de los datos obtenidos en la preparación correspondiente.

^b Número de ensayos realizados dentro de la preparación

^c Varianza de los datos de la preparación

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

^d Grados de libertad; $n_e = (n_3 - 1) + (n_5 - 1) + (n_7 - 1) + (n_8 - 1)$

^e Varianza combinada

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^p s_i^2 (n_i - 1)}{n_e}, \quad p = \text{preparaciones}$$

^f "t" calculado (tc) para comparar las medias de las preparaciones indicadas con los números anotados como subíndices.

$$\text{Ej.: } t_{3/5} = \left| \bar{x}_3 - \bar{x}_5 \right| \sqrt{s^2 \frac{n_3 + n_5}{n_3 \cdot n_5}}$$

* Indica que $tc > t(n_e, \alpha)$ cuando el α (de las tablas "t" de 2 colas) = 0,05

** Indica que $tc > t(n_e, \alpha)$ cuando el α (de las tablas "t" de 2 colas) = 0,02

*** Indica que $tc > t(n_e, \alpha)$ cuando el α (de las tablas "t" de 2 colas) = 0,01

Cuando no aparecen asteriscos en las "comparaciones de medias" significa que $tc \leq t(n_e, \alpha)$ cuando α (de las tablas "t" de 2 colas) = 0,05.

al analizar los datos correspondientes a las células falsamente infectadas. En ella se consignan las razones "t" que permiten comparar las medias (\bar{x}) de la proporción que posee cada fosfolípido estudiado en las distintas preparaciones.

Los resultados obtenidos indican que por ejemplo, no existen diferencias significativas entre los valores medios obtenidos para la especie PC en las preparaciones 3 y 5. Sin embargo, cuando comparamos las medias obtenidas para esta especie en las preparaciones 3 y 7 vemos que sí existen y con un grado de significación de $P \leq 0,01$. Esta diferencia es altamente significativa, por ello se dice que en este último caso existe un fuerte "efecto preparado". Como se desprende de la observación de la Tabla II, estos resultados erráticos se repiten al considerar las otras especies fosfolipídicas de este material. Lo mismo ocurre cuando se analizan las distintas especies fosfolipídicas de los materiales restantes (datos aquí no presentados). Así concluimos que no es lícito suponer que las distintas preparaciones de un mismo material pertenecen a una misma población.

Por otro lado, el muestreo efectuado fue heterogéneo, esto significa que la cantidad de cromatografías que se pudieron desarrollar con los extractos lipídicos de un material determinado difería de una preparación a otra. Además, y pese a que después de los ensayos preliminares los experimentos fueron diagramados de manera tal que los extractos fosfolipídicos de los 9 materiales en estudio pudieran ser preparados en paralelo, esto no siempre se logró.

Por ello sólo es lícito comparar la proporción de cada especie fosfolipídica en los distintos materiales si éstos pertenecen a la misma preparación.

R.2.2.2. Relación entre la proporción relativa de los fosfolípidos de los distintos arenavirus, las distintas células y los distintos arenavirus con las distintas células

Por lo expuesto en el párrafo anterior, comparamos la composición fosfolipídica de los distintos materiales estudiados preparación por preparación. El análisis se efectuó mediante una de las variantes del test de Student para comparaciones múltiples. En el conjunto de tablas III se consignan los resultados obtenidos con los datos de la preparación 8. Al analizar las otras preparaciones obtuvimos resultados similares, por ello las conclusiones que se extraen son generales.

La simple observación de las tablas III nos indica que podemos dividir las en tres sectores en los que se compara la proporción de cada especie fosfolipídica en los distintos materiales. Estos sectores son el izquierdo, donde se cotejan las distintas células entre sí; el superior derecho, donde se comparan las células con los virus, y el derecho inferior, donde se comparan los virus con los virus.

A simple vista también podemos apreciar que para las distintas especies fosfolipídicas no se observan diferencias, y si las hubieran no tienen significación, en los sectores izquierdo y derecho inferior. En tanto, en el sector derecho superior, para algunas especies fosfolipídicas existen diferencias altamente significativas.

A priori esto nos estaría indicando que no existen grandes diferencias de composición fosfolipídica entre los distintos virus o entre las distintas células, pero sí entre virus y células.

TABLA III-A

Comparación de la proporción de PC entre los distintos virus y células enteras

		C o m p a r a c i ó n d e m e d i a s (tc) ^a									
Fila	Columna	CMC ₂	CTac	CXJCl ₃	CPich	VMC ₂	VXJCl ₃	VTac	VPich		
Célula		2,27*	0,05	2,18*	0,53	5,53****	4,45****	7,06****	4,40****		
CMC ₂		-	2,22*	0,71*	2,22*	7,27****	6,24****	8,61****	6,20****		
CTac		-	-	1,70*	0	5,60****	4,51****	7,11****	4,46****		
CXJCl ₃		-	-	-	1,70	7,40****	6,21****	8,92****	6,16****		
CPich		-	-	-	-	5,59****	4,51****	7,11****	4,46****		
VMC ₂		-	-	-	-	-	0,79	1,64	0,85		
CXJCl ₃		-	-	-	-	-	-	2,31*	0,05		
VTac		-	-	-	-	-	-	-	2,37*		

ne^b = 19

TABLA III-B

Comparación de la proporción de PE entre los distintos virus y células enteras

		C o m p a r a c i ó n d e m e d i a s (t c)									
Fila	Columna	CMC ₂	CTac	CXJCL ₃	CPich	VMC ₂	VXJCL ₃	VTac	VPich		
	CÉlula	1,09	0,61	0,20	1,12	1,73	0,81	0,76	0,82		
	CMC ₂	-	0,54	0,91	2,09	2,67 ^{**}	0,36	0,48	0,25		
	CTac	-	-	0,41	1,73	2,39 [*]	0,20	0,11	0,27		
	CXJCL ₃	-	-	-	1,32	1,96	0,61	0,54	0,64		
	CPich	-	-	-	-	0,54	1,93	1,96	1,82		
	VMC ₂	-	-	-	-	-	2,61 ^{**}	2,69 ^{**}	2,39 [*]		
	VXJCL ₃	-	-	-	-	-	-	0,11	0,09		
	VTac	-	-	-	-	-	-	-	0,19		

n_e = 18

TABLA III-C
Comparación de la proporción de PS entre los distintos virus y células enteras

Fila	C o m p a r a c i ó n d e m e d i a s (t c)								
	Columna	CMC ₂	CTac	CXJCL ₃	CPich	VMC ₂	VXJCL ₃	VTac	VPich
Célula		0,22	0,25	0,25	0,75	4,56****	6,83****	7,91****	7,66****
CMC ₂		-	0,45	0,45	0,45	3,87****	5,77****	6,71****	6,60****
CTac		-	-	0	1,01	4,82****	7,10****	8,18****	7,91****
CXJCL ₃		-	-	-	1,01	4,56****	7,10****	8,18****	7,91****
CPich		-	-	-	-	3,86****	6,03****	7,10****	6,91****
VMC ₂		-	-	-	-	-	2,45*	3,61***	3,62**
VXJCL ₃		-	-	-	-	-	-	1,15	1,34
VTac		-	-	-	-	-	-	-	0,27

n_e = 20

TABLA IIII-D

Comparación de la proporción de Sph entre los distintos virus y células enteras

Columna	Fila	C o m p a r a c i ó n d e m e d i a s (t c)									
		CMC ₂	CTac	CXJCl ₃	CPich	VMC ₂	VXJCl ₃	VTac	VPich		
Célula		1,98	0,50	0,53	0,12	5,74 ****	3,86 ***	7,59 ****	5,11 ****		
CMC ₂		-	0,60	0,63	0,10	4,23 ****	3,03 ***	5,78 ****	4,30 ****		
CTac		-	-	0,11	0,59	4,98 ****	3,57 ***	6,51 ****	4,83 ****		
CXJCl ₃		-	-	-	0,66	7,16 ****	4,92 ****	9,10 ****	6,71 ****		
CPich		-	-	-	-	5,60 ****	3,73 ***	7,45 ****	5,32 ****		
VMC ₂		-	-	-	-	-	1,91	2,54 *	0		
VXJCl ₃		-	-	-	-	-	-	4,17 ***	1,79		
VTac		-	-	-	-	-	-	-	2,39 *		

n_e = 13

TABLA III-E

Comparación de la proporción de LPE entre los distintos virus y células enteras

		C o m p a r a c i ó n d e m e d i a s (t c)								
Columna	Fila	CMC ₂	CTac	CXJCl ₃	CPich	VMC ₂	VXJCl ₃	VTac	VPich	
Célula		0,06	2,02	2,59*	0,88	6,79****	5,27****	6,88****	4,87****	
CMC ₂		-	1,80	2,30*	0,71	5,44****	4,23****	5,50****	4,78****	
CTac		-	-	0,49	2,52**	3,26***	2,01*	3,28***	1,54	
CXJCl ₃		-	-	-	3,01**	2,61*	1,41	2,68**	0,94	
CPich		-	-	-	-	6,30****	5,10****	6,24****	4,63****	
VMC ₂		-	-	-	-	-	1,71	0,10	2,38*	
VXJCl ₃		-	-	-	-	-	-	1,80	0,67	
VTac		-	-	-	-	-	-	-	2,49*	

n_e = 9

TABLA III-F
 Comparación de la proporción de PI entre los distintos virus y células enteras

Columna	Fila	C o m p a r a c i ó n d e m e d i a s (t c)							
		CMC ₂	CTac	CXJCl ₃	CPich	VMC ₂	VXJCl ₃	VTac	VPich
Célula		0,99	0,66	0,99	1,91	2,35*	0,99	2,24*	3,59***
CMC ₂		-	0,30	1,81	0,66	2,21*	1,88	3,02***	4,10***
CTac		-	-	1,51	1,31	2,76**	1,54	2,67**	3,86***
CXJCl ₃		-	-	-	2,54*	1,10	0,11	0,93	2,21*
CPich		-	-	-	-	3,57***	2,61*	3,51***	4,11***
VMC ₂		-	-	-	-	-	1,36	0,26	1,24
VXJCl ₃		-	-	-	-	-	-	1,18	2,60*
VTac		-	-	-	-	-	-	-	1,60

n_e = 1,4

TABLA III-G

Comparación de la proporción de LPC entre los distintos virus y células enteras

Columna	Fila	C o m p a r a c i ó n d e m e d i a s (t c)									
		CMC ₂	CTac	CXJCl ₃	CPich	VMC ₂	VXJCl ₃	VTac	VPich		
Célula		0	4,35 ^{****}	0,78	3,06 ^{***}	3,70 ^{***}	1,31	4,35 ^{****}	3,48 ^{****}		
CMC ₂		-	3,88 ^{***}	0,71	2,89 ^{**}	3,26 ^{***}	1,16	3,88 ^{***}	3,10 ^{***}		
CTac		-	-	4,66 ^{****}	6,13 ^{****}	0,92	3,05 ^{***}	0	0,87		
CXJCl ₃		-	-	-	2,31 [*]	4,08 ^{****}	1,94	4,66 ^{****}	3,88 ^{***}		
CPich		-	-	-	-	5,69 ^{****}	3,90 ^{***}	6,13 ^{****}	5,50 ^{****}		
VMC ₂		-	-	-	-	-	2,31	0,93	0		
VXJCl ₃		-	-	-	-	-	-	3,05 ^{***}	2,18 ^{**}		
VTac		-	-	-	-	-	-	-	0,87		

n_e = 15

TABLA III-H

Comparación de la proporción de PA entre los distintos virus y células enteras

		C o m p a r a c i ó n d e m e d i a s (t c)								
Columna	Fila	CMC ₂	CTac	CXJCl ₃	CPich	VMC ₂	VXJCl ₃	VTac	VPich	
Célula		0,73	0,82	0,82	0	0,87	3,49 ^{***}	2,62 ^{**}	2,05	
CMC ₂		-	0	0	0,73	0	2,31 [*]	1,54	1,10	
CTac		-	-	0	0,82	0	2,62 ^{**}	1,75	1,23	
CXJCl ₃		-	-	-	0,82	0	2,62 ^{**}	1,75	1,23	
CPich		-	-	-	-	0,87	3,49 ^{***}	2,62 ^{**}	2,05	
VMC ₂		-	-	-	-	-	2,83 ^{**}	1,88	1,31	
VXJCl ₃		-	-	-	-	-	-	0,94	1,31	
VTac		-	-	-	-	-	-	-	0,44	

n_e = 20

TABLA III-I
Comparación de la proporción de C entre los distintos virus y células

Columna	Fila	C o m p a r a c i ó n d e m e d i a s (t c)								
		CMC ₂	CTac	CXJCl ₃	CPich	VMC ₂	VXJCl ₃	VTac	VPich	
Célula		0,97	2,45	0,58	1,71	0,85	0,67	0,45	0,58	
CMC ₂		-	1,38	0,38	0,64	1,92	0,45	1,57	0,39	
CTac		-	-	1,81	0,84	3,71 ^{***}	2,17 [*]	3,44 ^{***}	1,81	
CXJCl ₃		-	-	-	1,07	1,49	0	1,12	0	
CPich		-	-	-	-	2,87 ^{**}	1,28	2,55 [*]	1,07	
VMC ₂		-	-	-	-	-	1,78	0,51	1,49	
VXJCl ₃		-	-	-	-	-	-	0,68	0	
VTac		-	-	-	-	-	-	-	1,12	

n_e = 16

TABLA III-J

Comparación de la proporción de D entre los distintos virus y células enteras

Columna	Fila	C o m p a r a c i ó n d e m e d i a s (t c)									
		CMC ₂	CTac	CXJCl ₃	CPich	VMC ₂	VXJCl ₃	VTac	VPich		
CÉLULA		3,75 ^{***}	3,57 ^{***}	2,75 ^{****}	4,66 ^{****}	4,11 ^{****}	3,17 ^{***}	4,62 ^{****}	4,39 ^{****}		
CMC ₂		-	0,55	1,00	0,55	0	1,15	0,29	0,27		
CTac		-	-	0,55	1,23	0,62	0,66	1,97	0,92		
CXJCl ₃		-	-	-	1,64	1,10	0	1,44	1,37		
CPich		-	-	-	-	0,62	1,97	0,33	0,31		
VMC ₂		-	-	-	-	-	1,31	0,33	0,31		
VXJCl ₃		-	-	-	-	-	-	1,77	1,64		
VTac		-	-	-	-	-	-	-	0		

n_e = 17

Legenda Tabla III

$${}^a t_c = (t \text{ calculado}) = \frac{|\bar{x} \text{ fila} - \bar{x} \text{ columna}|}{\sqrt{\frac{s^2 (n_{\text{fila}} + n_{\text{columna}})}{n_{\text{fila}} \times n_{\text{columna}}}}}$$

n y s^2 : definidos en Tabla II

^b número de grados de libertad: $n_e = (n_1 - 1) + (n_2 - 1) \dots (n_q - 1)$

* Indica que $t_c > t(\alpha, n_e)$ para α (de las tablas "t" de 1 cola) = 0,025

** Indica que $t_c > t(\alpha, n_e)$ para α (de las tablas "t" de 1 cola) = 0,01

*** Indica que $t_c > t(\alpha, n_e)$ para α (de las tablas "t" de 1 cola) = 0,005

**** Indica que $t_c > t(\alpha, n_e)$ para α (de las tablas "t" de 1 cola) = 0,0005

Cuando no se marca con ningún asterisco significa $t_c \leq t(\alpha, n_e)$ para α (de las tablas "t" de 1 cola) = 0,025

Analizaremos ahora detenidamente estos datos. Para ello consideraremos que un material posee una significativamente mayor o significativamente menor proporción de un determinado fosfolípido que el otro material con el cual se compara cuando presenten una razón t:

$$t_c = \left| \bar{x}_1 - \bar{x}_2 \right| / \sqrt{s^2 \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}, \text{ mayor que } t(n_e, \alpha)$$

de las tablas t de una cola, al ser $\alpha = 0,0005$. Esto implica que en nuestro sistema de múltiples comparaciones el grado de significación será: $P = \alpha \times \text{número de comparaciones} = 0,0005 \times 36 = 0,018 \Rightarrow P = 0,02$.

A continuación describiremos para cada especie fosfolipídica las conclusiones que se desprenden del análisis de las tablas III, indicando además las que provienen de tablas similares que aquí no se presentan y que se obtuvieron al analizar los datos de las otras preparaciones.

Fosfatidilcolina: no existen motivos para pensar que los distintos tipos de células analizadas difieran entre sí en la proporción de esta especie lipídica. Tampoco existen motivos para pensar que los distintos arenavirus estudiados posean una proporción diferente de este fosfolípido. En cambio, los virus poseen una proporción significativamente menor ($P \leq 0,02$) de PC que las células.

Fosfatidiletanolamina: no existen motivos para pensar que las distintas células estudiadas posean una proporción diferente de este fosfolípido. Tampoco existen motivos para pensar que los distintos virus tengan proporciones diferentes

de PE ni que las células tengan proporciones diferentes de las de los virus.

Fosfatidilserina: no existen motivos para pensar que las diferentes células posean proporciones diferentes de PS. Tampoco existen motivos para suponer que los distintos virus difieran entre sí en la proporción de PS. El virus Junín cepa MC₂ muestra, aparentemente en la preparación 8, diferencias con los otros virus. Sin embargo, el grado de significación de estas diferencias sería a lo sumo $P \leq 0,2$. Además, esta anomalía no se presenta al analizar otras preparaciones, por ello concluimos que no existen evidencias para afirmar que la cepa MC₂ del virus Junín posea una proporción de PS diferente de la de los otros arenavirus. Pero, los virus tienen una proporción significativamente mayor de PS que las células ($P \leq 0,02$).

Esfingomielina: no existen motivos para pensar que las distintas células posean distintas proporciones de Sph. Tampoco existen motivos para pensar que los distintos virus posean diferentes proporciones de Sph. El virus Tacaribe mostraría, en la preparación 8, una proporción mayor de Sph que el resto de los arenavirus, pero $P \leq 0,2$. Además, en otros preparados no se observa que este virus presente diferencias en la proporción de Sph con el resto de los de la familia ni aún para $P \leq 0,4$. Por ello se concluye que no hay motivos para pensar que ninguno de estos virus difieran entre sí en la proporción de Sph.

Sin embargo, los virus poseen una proporción significativamente mayor ($P \leq 0,02$) de Sph que las células.

Lisofosfatidiletanolamina: no existen motivos para pensar que los distintos tipos de células analizadas difieran entre sí en la proporción de LPE. Tampoco existen motivos para pensar que los distintos virus posean-entre sí una proporción diferente de LPE. Sin embargo, los virus poseen una proporción significativamente mayor de LPE que las células ($P \leq 0,02$). Las células infectadas con el virus Junín cepa XJCl₃ y con el virus Tacaribe se presentarían según los datos de la Tabla III, como excepción ya que al ser comparadas con los virus parecerían no mostrar diferencias significativas en la proporción de LPE. Sin embargo, como en la preparación 8 existe un solo ensayo para cada una de ellas en el que se determina la proporción de LPE en forma aislada, el resultado no es contundente. Pero considerando lo que ocurre con la proporción de LPE en estas células en otras preparaciones, se concluye que los virus poseen mayor proporción de LPE que las células.

Fosfatidilinositol: no existen motivos para pensar que las distintas células posean diferente proporción de PI. Los distintos virus tampoco poseerían distinta proporción de PI. En cambio, algunos virus parecen tener distinta proporción de PI que algunas células: el grado de significación de estas diferencias es de $0,02 < P \leq 0,2$; por lo cual además de ser erráticas, éstas tienen un grado de significación muy bajo.

Cabe aclarar que la proporción de PI para el SFV y las células BHK que aparecen en la literatura, también son variables (Renkonen y col., 1971).

Lisofosfatidilcolina: con un grado de significación de $P \leq 0,02$

existirían motivos para pensar que algunas células de la preparación 8 difieren de otras, que algunos virus difieren de otros y que algunos virus difieren de algunas células en la proporción de LPC. Sin embargo, cuando se analizan otras preparaciones ocurre que también algunos de estos materiales difieren de otros en la proporción de LPC, pero aquí $P \leq 0,2$. Además, los pares que presentan estas diferencias no son los mismos que los que la presentan en el preparado 8. Por lo tanto, se puede concluir que no existen evidencias para decir que los virus difieran entre sí, ni que las células difieran entre sí, ni que los virus difieran de las células en la proporción de LPC.

Ácido fosfatídico: no existen motivos para pensar que las distintas células posean distinta proporción de PA. Tampoco los hay para pensar que los distintos virus difieran entre sí ni que las distintas células difieran de los distintos virus en la proporción de PA. La aparente diferencia entre las cepas XJCl₃ del virus Junín con la célula huésped en la preparación 8, carece de significación ($P \leq 0,2$).

Cardiolipina: no existen motivos para pensar que las células difieran entre sí, ni los virus difieran entre sí, ni las células difieran de los virus en la proporción de C.

Sumatoria de los fosfolípidos desconocidos (D): no existen motivos para pensar que las células infectadas con cualesquiera de los arenavirus estudiados posean entre sí diferente proporción de estos fosfolípidos. Tampoco existen motivos para pensar que los diferentes virus posean diferente proporción

de los mismos. Sin embargo, las células falsamente infectadas de la preparación 8 poseen una mayor proporción de estos fosfolípidos que las otras células y virus. Pero, como el grado de significación no siempre es $P \leq 0,02$ y además en otras preparaciones no se ve este efecto, no existen evidencias firmes para pensar que las células falsamente infectadas difieran en la proporción de los fosfolípidos desconocidos de las demás células y virus.

Todos los arenavirus poseerían la misma composición fosfolipídica y no alterarían la proporción de los fosfolípidos de las células huéspedes

Sintetizando lo recientemente expuesto, sin necesidad de hacer ningún tipo de extrapolación, podemos afirmar que no hay evidencias que indiquen que las cepas MC₂ y XJCl₃ del virus Junín, el virus Tacaribe y el virus Pichindé cultivados en células BHK-21(C-13) posean una composición fosfolipídica diferente. Además, no hay motivos para pensar que las células infectadas con cualesquiera de los arenavirus mencionados difieran entre sí en su composición fosfolipídica. Tampoco existen motivos para pensar que estas células tengan una composición fosfolipídica diferente de la composición fosfolipídica de las células falsamente infectadas. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que:

los arenavirus poseen	{	mucha mayor proporción de PS mucha mayor proporción de Sph mucha mayor proporción de LPE mucha menor proporción de PC	}	que las células infectadas o falsamente infectadas ($P \leq 0,02$)
-----------------------	---	--	---	--

Estas diferencias son tan notorias que se perciben al comparar las autorradiografías de las cromatoplasmas sembradas con extracto lipídico de células con aquéllas sembradas con la misma cantidad de marca radiactiva de extractos lipídicos de virus (comparar figuras 4 y 7).

El hecho de que la infección viral no provoque alteraciones en la composición fosfolipídica de las células huéspedes no sería una cualidad privativa de los arenavirus. Otros autores han determinado que la infección con el virus de la enfermedad del Newcastle no induce a modificación alguna en los fosfolípidos de la célula huésped entera (Diringer y Rott, 1976). Las células persistentemente infectadas con el virus del sarampión no tendrían diferente proporción de los distintos fosfolípidos que las células no infectadas, pero estos últimos estarían integrados por ácidos grasos de diferente calidad (Anderton y col., 1982). Tampoco el virus del sarcoma de Rous modifica la proporción de los distintos lípidos de las células huéspedes enteras (Maldonado y Blough, 1980). Sin embargo, los herpesvirus, que como vimos adquieren su envoltura en la membrana nuclear, alteran la proporción de los distintos glicolípidos de la célula huésped (Schroder y Merrick, 1979).

2.2.3. Composición fosfolipídica de las células BHK-21(C-13) infectadas con arenavirus y falsamente infectadas

La relación: átomos de fósforo inorgánico (Pi) /

moléculas de compuesto, es constante para cada especie fosfolipídica, 2 para la cardiolipina y 1 para el resto de los fosfolípidos estudiados. Este hecho permite determinar la proporción de los diferentes fosfolípidos de una cromatoplaaca midiendo la cantidad del Pi contenido en las distintas manchas. Procediendo de esta manera diversos autores han establecido la composición fosfolipídica de distintos clones de la célula BHK-21 (Brotherus y Renkonen, 1977; Klenk y Choppin, 1969; Renkonen y col., 1971, 1972a, 1972b; Schlesinger y col., 1973).

De acuerdo con lo indicado precedentemente (R.2.1.1.), nosotros no determinamos la cantidad de Pi mediante métodos químicos sino que medimos la radiactividad de ^{32}P de cada mancha de la cromatoplaaca. Sin embargo, existen diversas razones que indicarían que utilizando esta última técnica se puede establecer la proporción de las distintas especies fosfolipídicas.

Las células BHK-21(C-13) sintetizarían "a novo" sus fosfolípidos, no incorporarían ni moléculas de fosfolípidos intactas, ni lípidos fosforados del suero, puesto que las cantidades de los mismos en el medio de cultivo se mantienen constantes durante el aumento de fosfolípidos celulares (Renkonen y col., 1972b). Este parece ser un hecho general ya que en otras líneas celulares ocurriría lo mismo (Quigley y col., 1971). Así los fosfolípidos que se forman lo harían a partir de precursores orgánicos sencillos y de Pi y en nuestro sistema el ^{32}P , libre de portadores fríos, es la única fuente de Pi.

Por otro lado, después de un pasaje de células BHK-21 en medio marcado con ^{32}P , las proporciones de marca radiactiva halladas para las distintas especies fosfolipídicas no serían muy diferentes de las obtenidas después de

sucesivos pasajes (hasta 4 inclusive) de las células por dicho medio, ni muy diferentes a las proporciones halladas al medir la masa de los distintos fosfolípidos (Renkonen y col., 1972b).

Como entre dos pasajes sucesivos transcurren de 36 a 48 horas, después de 48 horas en un medio con ^{32}P las células BHK-21 cultivadas en monocapas habrían llegado a un equilibrio de marcación de sus fosfolípidos con ^{32}P . Para el presente trabajo se crecieron células en medio marcado con ^{32}P durante 72 horas, pero a partir del tercer día de haber sido repicadas. Pese a que en este estadio el crecimiento celular es diferente del que presentan las células inmediatamente después del repique, igual se estima que en 72 horas se llega a un equilibrio en la marcación con ^{32}P , pues marcando a partir del tercer día posrepique con diferentes precursores orgánicos radiactivos se determinó que la velocidad de recambio de los distintos fosfolípidos en las células BHK-21 es: rápida ($t_{1/2} \leq 4$ horas) para PA y PC; intermedia ($t_{1/2} = 4-6$ horas) para PE y lenta ($t_{1/2} \leq 15$ horas) para PI, PS y Sph (Gallaher y Blough, 1975). Hecho que también se verifica en otras líneas celulares, las que en dos días de marcación logran alcanzar una actividad específica constante para todas las especies fosfolipídicas (Quigley y col., 1972a).

Así el tiempo en el que para este trabajo se marcaron los cultivos celulares en las condiciones experimentales descritas sería más que suficiente para llegar a un equilibrio en la distribución de marca radiactiva (^{32}P) de los distintos fosfolípidos. Esto implica que podemos estimar la proporción de los distintos fosfolípidos midiendo

la cantidad de ^{32}P existente en cada una de las manchas de los cromatogramas obtenidos.

R.2.2.3.1. Proporción de los distintos fosfolípidos en la célula huésped

La composición fosfolipídica de las distintas células estudiadas se estableció a partir del total de los datos obtenidos para cada una de ellas (Tabla I).

Como en nuestro sistema experimental existe un fuerte "efecto preparado" y el número de ensayos efectuados varía de acuerdo con la preparación considerada (R.2.2.1.), para estimar el valor medio que represente a estos datos se los debió agrupar previamente por preparación.

Se halló el promedio de todas las determinaciones efectuadas para cada especie fosfolipídica de cada material en cada preparación. Estos promedios son representativos de la proporción en que el fosfolípido considerado se encuentra en el material en cuestión en la preparación correspondiente, puesto que dentro de la misma los datos son altamente repetitivos. Por ello la media de estos promedios será el mejor estimador de la proporción de dicha especie en tal material. Los resultados obtenidos, para las distintas células estudiadas al efectuar los cálculos de la manera indicada en el párrafo anterior, se representan en la Figura 8. Los datos presentados en esta figura nos permiten conocer que PC y PE son las especies mayoritarias; PA, LPE, C, D y Sph las minoritarias y LPE, PS y PI se hallan en una proporción intermedia.

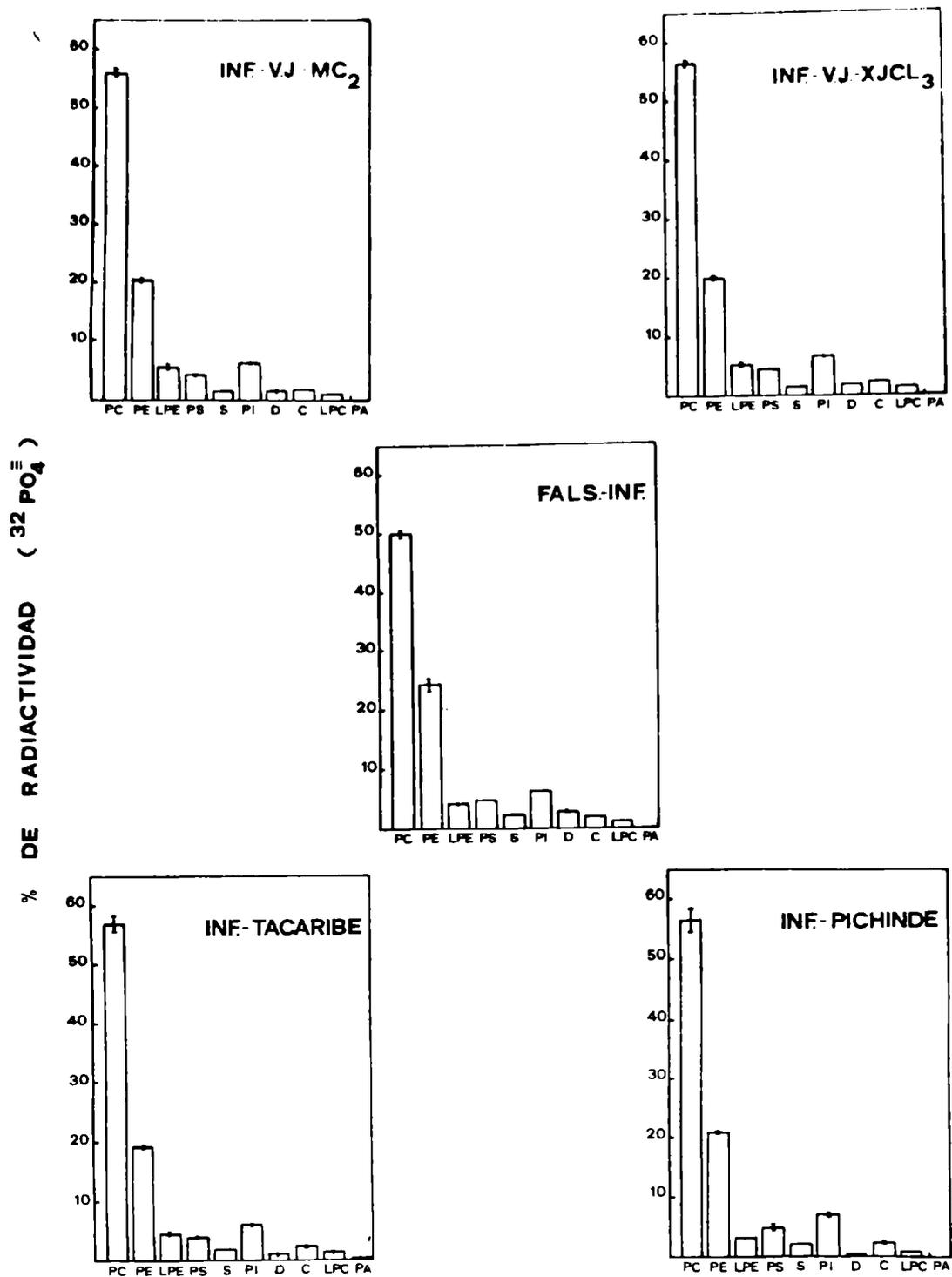


Figura 8: Composición fosfolípídica de células BHK-21(C-13)

Los extractos lipídicos de células BHK-21(C-13), falsamente infectadas (FALS-INF.), infectadas con la cepa MC₂ de virus Junín (INF.-V.J.-MC₂), con la cepa XJCL₃ de virus Junín (INF.-V.J.-XJCL₃), con el virus Tacaribe (INF.TACARIBE) o con el virus Pichindé (INF.PICHINDE), marcadas con ^{32}P , se obtuvieron de acuerdo con el esquema de la Figura 3. Luego se analizaron por cromatografía bidireccional en capa fina. Las manchas conteniendo cada especie fosfolípídica fueron raspadas de la cromatoplaaca correspondiente y puestas en viales conteniendo tolueno-omnifluor. La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido. Se estableció la proporción de las distintas especies fosfolípídicas en cada placa, calculando el porcentaje de radiactividad que las mismas poseían respecto al total de marca recuperada. Se promediaron los valores obtenidos para cada especie fosfolípídica de cada tipo de células en cada preparación. La media de dichos promedios son los datos que se representan en esta figura. Se computaron todos los datos de la Tabla I y las barras indican el error estándar. Los símbolos de las abscisas representan a los distintos fosfolípidos.

Además, la Figura 8 nos indica dentro de qué límites varían las proporciones de cada fosfolípido en cada célula. Sin embargo, no debemos pretender extraer de la figura más información que ésta. Así, no podemos determinar qué semejanzas y diferencias existen entre la composición fosfolipídica de las distintas células mediante la comparación de los distintos histogramas. De haberlo hecho, la conclusión hubiera sido que las células infectadas poseen una mayor proporción de PC y una menor proporción de PE que las falsamente infectadas. Si las comparaciones las hubiésemos realizado mediante el test de Student, pero sobre el total de los datos y no preparación por preparación, la conclusión hubiera sido la misma. Como vimos precedentemente (R.2.2.2.) esto no es cierto. La conclusión a que se llegaría por análisis de las tablas o de los datos totales resultaría falsa porque en estos casos no se tendría en cuenta el "efecto preparado" característico del presente sistema en estudio.

Insistimos en esto porque en varios trabajos en que se investiga la proporción de los lípidos virales y celulares se establece la relación que existe entre los datos obtenidos para los distintos materiales comparando visualmente los promedios de los mismos sin indicar en qué forma se obtienen dichos promedios.

Este tipo de comparaciones se puede realizar sólo si en el sistema en estudio no existe "efecto preparado" o si pese a ello todos los ensayos se han realizado en forma paralela y con muestreo homogéneo. De otra manera, debe indicarse claramente dentro de qué límites es válida la conclusión a la cual se arriba.

R.2.2.3.2. Comparación con los datos bibliográficos

Hasta el presente no se ha realizado ningún trabajo destinado a estudiar la composición fosfolipídica de las células infectadas con arenavirus pero sí existen varios trabajos en los que se analizan los fosfolípidos de las células BHK-21 de diversos clones.

En la Tabla IV se reproducen los resultados hallados por otros autores para las células BHK-21(C-13) y los que nosotros obtuvimos cuando estudiamos a las mismas luego de someterlas a una falsa infección.

La observación de la tabla permite apreciar que en general nuestros resultados son semejantes a los obtenidos por Gallaher y Renkonen al revelar los fosfolípidos y al dosar el Pi mediante métodos químicos (Gallaher y Blough, 1975; Renkonen y col., 1971, 1972a) y son prácticamente iguales a los que los últimos autores establecen al utilizar métodos radioquímicos (Renkonen y col., 1972b). El valor que ellos obtienen para Sph es superior al que nosotros determinamos. Sin embargo, Renkonen indica que no puede separar a esta especie de la LPE; Gallaher no menciona LPE, pero de acuerdo a lo expuesto en el ítem (R. 1.1.), este compuesto no se separa fácilmente de Sph, por lo cual presumiblemente Gallaher podría obtener Sph contaminada con LPE. La sumatoria de los porcentajes que nosotros hemos hallado para Sph y LPE concuerda perfectamente con el que Renkonen encuentra para la Sph contaminada con LPE.

La semejanza de nuestros datos con los bibliográficos resulta interesante porque los hallados en la

TABLA IV

Proporción de las especies fosfolipídicas de células BHK-21(C-13)

Origen de los datos Especie fosfolipídica	Gallaher y Blough (1975)	Renkonen y col., (1971, 1972a)	Renkonen y col., (1972b)	Figura 8 del presente trabajo
PS	6,3	2,6	5,3	4,8 \pm 0,1
LPC	---	1,3	0,8	1,3 \pm 0,2
Sph	9,7	11,0 ^{**}	6,3 ^{**}	2,3 \pm 0,4
LPE	*	----	---	4,3 \pm 0,3
PI	5,1	1,1 ^{***}	6,8	5,8 \pm 0,5
PC	47,6	55,0	53,5	50,0 \pm 2,0
PE	25,1	23,0	21,1	24,0 \pm 2,0
C	----	----	3,4	1,0 \pm 0,2
D	5,4	----	---	2,8 \pm 0,7
PA	0,6	2,1	0,5	0,08 \pm 0,04

* No lo contempla

** Incluye LPE

*** Los autores indican que el valor no es confiable

bibliografía sobre composición fosfolipídica de otros clones de células BHK-21 son sumamente variables. Así, por ejemplo, para el clon Wi-2 que parece ser el más estudiado, se encuentran resultados distintos en los distintos trabajos, aún habiendo sido realizados en el mismo laboratorio (Brotherus y Renkonen, 1977; Renkonen y col., 1971).

R.2.2.4. Composición fosfolipídica de los arenavirus

La proporción de las diferentes especies fosfolipídicas de los distintos arenavirus se estableció hallando la media de los promedios de los datos obtenidos para cada especie en cada preparación, de la misma manera que se hizo para las células. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 9. Ellos nos indican que PC y PE son las especies mayoritarias; D, C, LPC, PA las minoritarias, en tanto que LPE, PS Sph y PI se encuentran en una proporción intermedia, relativamente alta. La observación de la Figura 9 podría hacernos pensar que la cepa XJCl₃ del virus Junín tendría una composición fosfolipídica ligeramente diferente de la de los otros arenavirus. Sin embargo, los análisis estadísticos efectuados indican que esto no es real. La aparente discrepancia se debe a que en la preparación 6 no se analizaron los fosfolípidos de la cepa XJCl₃ del virus Junín (ver Tabla I).

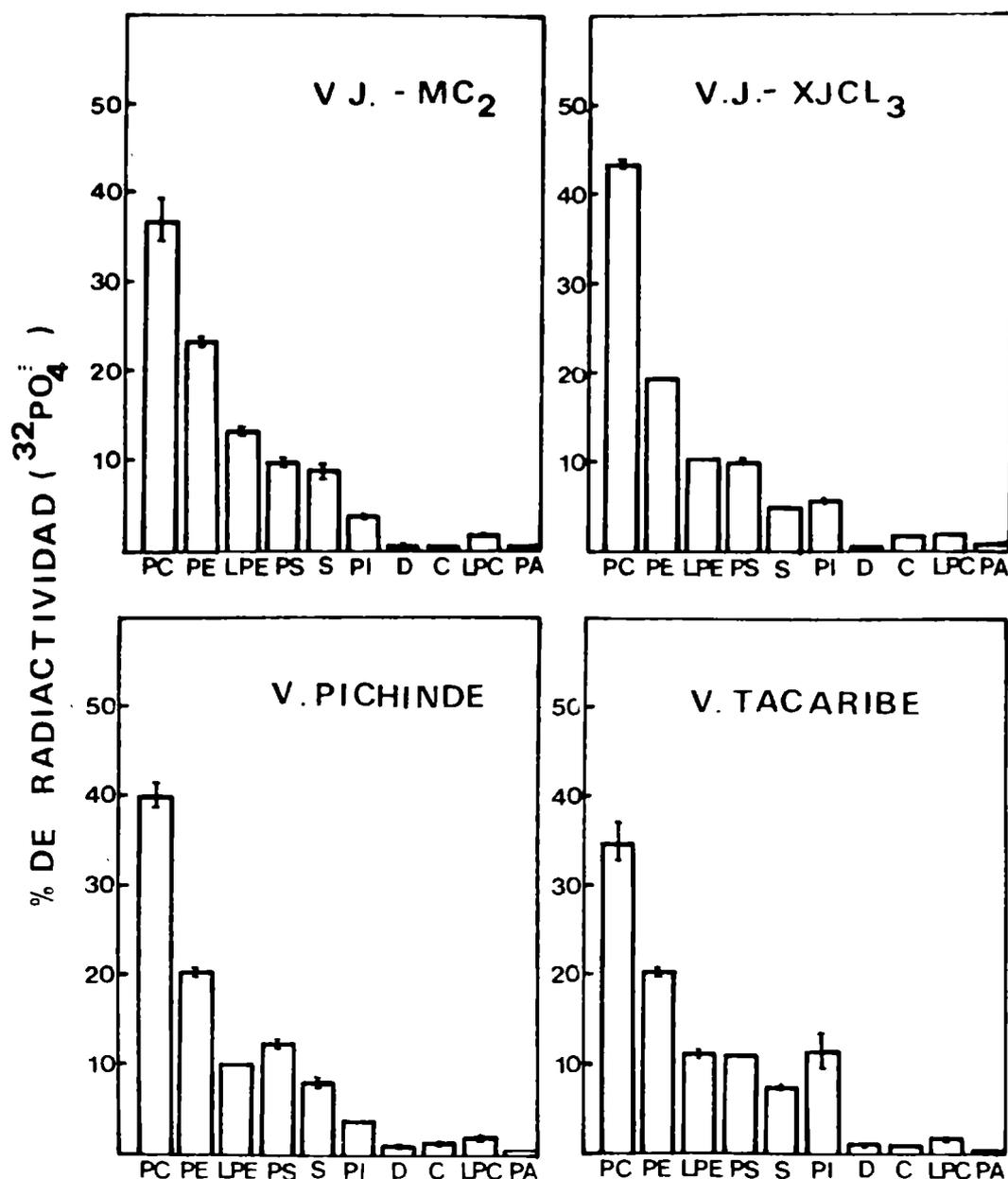


Figura 9: Composición fosfolípídica de arenavirus

Los extractos lipídicos de las cepas MC₂ de virus Junín (V.J.-MC₂), XJCL₃ de virus Junín (V.J.-XJCL₃), de los virus Tacaribe (V.TACARIBE) y virus Pichindé (V.PICHINDE), marcadas con ³²P, se obtuvieron de acuerdo con el esquema de la Figura 3. Luego se analizaron por cromatografía bidireccional en capa fina. Las manchas conteniendo cada especie fueron raspadas de la cromatoplaqa correspondiente y puesta en viales conteniendo tolueno-omnifluor. La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido. Se estableció la proporción de las especies fosfolípídicas en cada placa calculando el porcentaje de radiactividad que las mismas poseían respecto al total de marca recuperada. Se promediaron los valores obtenidos para cada especie fosfolípídica de cada tipo de virus en cada preparación. La media de dichos promedios son los datos representados en esta figura. Se computaron todos los datos de la Tabla I. Las barras indican el error estándar. Los símbolos de las absisas representan a los distintos fosfolípidos.

R.2.2.4.1. Relación con la composición fosfolipídica de otros virus

En la bibliografía no existen datos respecto de la composición fosfolipídica de los arenavirus, pero sí existen para virus de otras familias. Al comparar con estos datos encontramos que los arenavirus cultivados en las células BHK-21(C-13) tienen una composición fosfolipídica semejante a la que presentan el SFV (Renkonen y col., 1972a) y el virus Uukuniemi (Renkonen y col., 1972b) al ser cultivados en este mismo clon celular. Esta composición también es semejante, aunque no tan estrechamente, a la descrita en la bibliografía para la membrana plasmática de las células huéspedes no infectadas, pero diferente a la de las demás fracciones celulares (Renkonen y col., 1971, 1972a).

Cabe aclarar aquí que ya en los primeros ensayos que se hicieron sólo con la cepa MC₂ del virus Junín se detectaron estas semejanzas, por ello resultó interesante extender los estudios a los otros arenavirus.

R.2.2.5. Interpretación de los resultados obtenidos y programación de nuevos experimentos

Los resultados hasta aquí descriptos sugieren que es probable que se cumpla la hipótesis que propone que los arenavirus forman su envoltura tomando componentes de la membrana plasmática celular, teniendo en cuenta los datos de microscopía electrónica (Lascano y col., 1969, 1971, 1974, 1977; Murphy y col., 1970, 1975. Estas observaciones

al microscopio electrónico mostrarían además, cambios morfológicos en las zonas de la membrana plasmática celular de las cuales los virus brotarían. Sin embargo, no descartarían la posibilidad de que los arenavirus completaran su maduración interaccionando con membranas intracitoplasmáticas.

Para tratar de esclarecer si la envoltura viral está relacionada con la membrana plasmática o la membrana del retículo endoplásmico celular, se hizo necesario investigar la composición fosfolipídicas de las mismas. Esto nos llevó a seleccionar y poner a punto las técnicas de separación y caracterización de membranas celulares.

Otro enfoque para establecer si la composición fosfolipídica de los arenavirus es función de la de las células huéspedes consistiría en estudiar la composición fosfolipídica de los virus producidos en células cuyas membranas poseyeran una, diferente de las de las células BHK-21 (C-13).

Como primera aproximación mucho más simple de realizar, se podría analizar la composición fosfolipídica del total de otras células en las cuales desarrollen los arenavirus. Los dosajes que se hicieron de células Vero enteras demostraron que su composición fosfolipídica es muy semejante al de las células BHK-21(C-13) enteras, resultado que hacía prever que también sus membranas plasmáticas podrían ser semejantes. Por ello se decidió continuar con los experimentos destinados a preparar y estudiar las características de la membrana plasmática y de retículo endoplásmico de las células BHK-21(C-13) infectadas con los arenavirus en cuestión y como control las de las células no infectadas.

CAPITULO III: ELECCION Y OPTIMIZACION DE LOS METODOS DE SEPA-
RACION Y CARACTERIZACION DE MEMBRANAS CELULARES

R.3.1. AISLAMIENTO DE MEMBRANAS CELULARES

El primer paso en la preparación de las distintas fracciones celulares lo constituye la ruptura de la membrana de la célula. Para lograrlo se han diseñado un gran número de métodos. El objetivo de todos ellos es provocar la ruptura de la mayor cantidad de células posibles, manteniendo intactas las propiedades biológicas y estructurales de las diferentes membranas y organelos. Sin embargo, la mayoría de los métodos conocidos permiten conservar bien unas merced al detrimento de las otras.

La técnica, más utilizada en la separación de membranas plasmáticas de células en cultivo consiste en modificaciones de las descritas originariamente para separar membranas plasmáticas de células de hígado de rata (Neville, 1960; Emelot y col., 1964) y de ratón (Herzenberg y Herzenberg, 1961). La eficiencia del fraccionamiento de las células hepáticas reside en la presencia de desmosomas que conectan superficies adyacentes de las mismas, esto permite el mantenimiento de las membranas como bloques enteros durante la homogeneización.

Al intentar aplicar esta técnica para aislar membrana plasmática de células en cultivo fue necesario utilizar agentes estabilizantes como Zn^{++} para endurecer las superficies celulares, logrando mantener de esta manera su estructura durante la homogeneización; este método produce "fantasmas" celulares (Warren y col., 1966). Estos "fantasmas" también se han obtenido por choque hiposmótico (Bosman y col., 1968).

El empleo de agentes estabilizantes tiene la desventaja de que la membrana pierde actividad funcional. En tanto

que con la lisis hiposmótica se pueden llegar a romper mitocondrias y lisosomas liberando al medio enzimas líticas que producirían efectos indeseados.

La ruptura mediante un homogenizador Dounce de células HeLa o de mieloma en cultivo y la posterior separación de las distintas fracciones mediante el empleo de gradientes de sacarosa brinda, aparentemente, la posibilidad de obtener a las membranas de las mismas altamente purificadas y sin pérdida de su actividad biológica ni de su estructura (Eylar y Hagopian, 1971). Sin embargo, los autores insisten en que el número de golpes de émbolo en la homogeneización, que es crucial para lograr reproducibilidad de las separaciones, depende del tipo celular. Ellos trabajan con células crecidas en suspensión e indican que el trabajo se complica con las células cultivadas en superficie, pues por las interacciones que existen entre las mismas se produce una agregación de las membranas que dificulta la ruptura y posterior separación (Eylar y Hagopian, 1971).

Se intentó encontrar las condiciones en las que se pudiera separar membrana plasmática de células BHK-21 crecidas en monocapa y se comprobó que las mismas debían variar de una preparación a la otra para poder obtener el grado óptimo de ruptura. De acuerdo a lo expresado (R.2.2.5.) la separación de las membranas celulares no constituye un fin en el presente trabajo sino un medio, por ello es imprescindible contar con un método de aislamiento estandarizado, condición que éste no cumple.

Otro tipo de técnicas actualmente difundidas para el aislamiento de membranas de células en cultivo se fundamentan en el método desarrollado por Wallach y Kamat (1964)

para células de tumor ascítico de Ehrlich. Ella se basa en la conversión de las membranas plasmática y de retículo endoplásmico de las células en pequeñas vesículas mediante la cavitación con N_2 . Estas vesículas luego son fraccionadas mediante el empleo como paso final, de un gradiente de ficoll en Mg^{++} (Wallach y Kamat, 1964).

Posteriormente, el método se empleó para aislar membrana de adipocitos, pero el paso final en este caso consistía en un gradiente de dextrano en Mg^{++} (Avruch y Wallach, 1971); también se ha utilizado satisfactoriamente para separar las membranas plasmáticas y de retículo endoplásmico de células BHK-21 en cultivo de tejido (Gahmberg y Simons, 1970; Makita y Seyama, 1971). La ventaja de este método es que las fracciones membrana plasmática, retículo endoplásmico y mitocondrial se recuperan funcionalmente activas y por lo tanto se supone, conteniendo todos sus componentes bioquímicos. Sin embargo, con esta metodología se observaba contaminación cruzada entre las fracciones retículo endoplásmico y membrana plasmática. Así, en la fracción membrana plasmática existe aproximadamente un 30% de contaminación con retículo endoplásmico, en tanto que en la fracción retículo endoplásmico encuentran un 20% de contaminación con membrana plasmática (Gahmberg y Simons, 1970). Además, ambas fracciones presentan actividad de succinato deshidrogenasa, enzima que sólo se halla presente en mitocondrias (Graham, 1972). Este último autor demuestra la necesidad de eliminar totalmente las mitocondrias de la fracción microsomal, pues si ello no ocurre las mitocondrias podrían establecer una especie de "puente" entre los microsomas de retículo endoplásmico y membrana plasmática, impidiendo una correcta separación

posterior entre estas dos últimas. Para ello propone separar la fracción mitocondrial mediante un gradiente zonal de sacarosa, en vez de hacerlo con centrifugaciones diferenciales. De esta manera obtiene membrana plasmática y retículo endoplásmico de células BHK-21 altamente purificados. Por ello se intentó preparar ambas membranas con este método. Luego de algunos ajustes tales como establecer la cantidad de material necesario para lograr una buena ruptura, velocidad de agitación durante la cavitación, velocidad de descompresión, construcción de los gradientes zonales, el método pudo emplearse satisfactoriamente como se demuestra en el capítulo siguiente.

Cabe aclarar que posteriormente Gotlib propuso un método sencillísimo con el cual, aparentemente, se obtiene membrana plasmática con un alto grado de pureza (Gotlib, 1982). Para ello se hacen crecer células sobre bolitas de vidrio y luego se provoca la lisis celular. De esta manera las membranas plasmáticas quedan adheridas a las bolitas de las que posteriormente son despegadas.

En este trabajo no se ha ensayado esta metodología pues en el momento en que aquel trabajo se publicó ya estaba funcionando con buenos resultados la separación de membrana plasmática y retículo endoplásmico por el método de Graham (1972).

R.3.2. PUREZA DE LAS MEMBRANAS AISLADAS

Existen diversos métodos que permiten establecer el grado de pureza de las distintas membranas celulares aisladas.

En el caso de células de mamíferos, los métodos más difundidos son aquéllos que se basan en la determinación de la actividad de los marcadores biológicos específicos de la membrana en cuestión y de las otras fracciones celulares que podrían estar contaminándola.

De acuerdo con lo ya expresado (R.2.2.5.), para el presente trabajo se pretendía preparar membrana plasmática y de retículo endoplásmico. Para establecer el grado de pureza de estas fracciones se debía investigar cuál era la actividad específica en cada una de ellas de las enzimas marcadoras de membrana plasmática, de retículo endoplásmico, y por lo expuesto (R.3.1.) de mitocondrias y lisosomas, que son los organelos que podrían estar impurificándolas.

Teniendo en cuenta los resultados de otros autores (Gahmber y Simons, 1970) se puede estimar que para medir la actividad específica de estas enzimas en las distintas fracciones por los métodos convencionales se hubiera necesitado partir de cantidades de células muy difíciles de obtener. Por ello fue necesario modificar estos métodos.

Seguidamente se explicarán las razones que llevaron a la selección de las enzimas marcadoras empleadas y se detallará la puesta a punto de las técnicas necesarias para el dosaje de su actividad específica.

R.3.2.1. Determinación de proteínas

Las proteínas son usualmente determinadas por el método de Lowry, usando albúmina bovina como standard (Lowry y col., 1951). Los límites de este método son 5 a

100 μg de proteínas totales.

Un nuevo método parecía ser más sensible y reproducible que el de Lowry (Brandford, 1976). Sin embargo, los datos obtenidos en los distintos ensayos no eran coincidentes y además los blancos eran muy altos. Se intentaron algunas modificaciones pero los resultados se repitieron.

Debido a ello, se decidió probar el método tradicional de Lowry pero modificándolo para un volumen final de 200 μl , con lo que se podían usar cantidades 7 veces menores de proteínas respecto al método original, así los límites serían de 0,8 a 14 μg de proteínas. Los resultados obtenidos fueron repetitivos y los blancos fueron bajos, por ello se adoptó para todas las determinaciones de proteínas que se debieron hacer.

R.3.2.2. Determinación de fósforo inorgánico

La mayoría de las enzimas ensayadas son fosfatasas. Para medir su actividad específica es necesario dosar la cantidad de Pi que liberan. El método de Fiske y Subarow (1925) es el comúnmente más utilizado para dosar Pi. Sin embargo, por las razones expuestas (R.3.2.) se necesitaba un método más sensible. Los métodos más sensibles descritos en la literatura (Bartlett, 1959) adolecen del defecto de no distinguir el Pi del P orgánico, por lo cual no servirían para los fines del presente trabajo.

Por ello se intentó utilizar el método de Fiske y Subarow modificado para dosar cantidades 50 veces

menores respecto al método original. Los límites serían de 0,002 $\mu\text{mol Pi}$ a 0,02 $\mu\text{mol Pi}$. Al aplicarlo obtuvimos resultados repetitivos con valores de blancos bajos y así éste fue el método adoptado.

R.3.2.3. Enzimas marcadoras de la membrana plasmática

Las enzimas más frecuentemente utilizadas como marcadores de la membrana plasmática son 5'nucleotidasa (EC 3.1.3.5), adenosinatrifosfatasa estimulada por Na^+ y K^+ o ATPasa (Na^+-K^+) (EC 3.6.1.3) y la adenilatociclasa (EC 4.6.1.1).

En el caso de las células BHK-21, la ATPasa (Na^+-K^+) aparece como la enzima que posee en la membrana plasmática la mayor actividad específica relativa al homogenado y retículo endoplásmico celular (Gahmberg y Simons, 1970).

Por otro lado, en diferentes células se observó actividad 5'nucleotidasa en el retículo endoplásmico (Widnell, 1972) y el aparato de Golgi (Farquhar y col., 1974) o actividad adenilato ciclasa estimulada por F^- y análogos de GTP en la fracción mitocondrial (Zinder y col., 1976).

Por ello la ATPasa (Na^+-K^+) se presenta como la mejor enzima marcadora de la membrana plasmática de las células BHK-21(C-13). Para dosarla se adoptó la técnica de Wallach y Kamat (1966) pero modificada para que las cantidades de Pi liberadas por la enzima a partir del ATP fueran 50 veces inferiores a lo que se espera con el

método original.

El método se probó midiendo la actividad enzimática en el homogenado celular que se había obtenido mediante la técnica de Eylar; dicha actividad fue de 0,31 $\mu\text{mol Pi/mg}$ proteína h. Otros autores hallan que la actividad de esta enzima en el homogenado de células BHK (obtenido por cavitación), cuando es dosada por este mismo método, es de 0,5 a 0,9 $\mu\text{mol Pi/mg}$ (Gahmber y Simons, 1970).

La diferencia de los resultados podría deberse a la manera distinta en que se produce la ruptura celular, pues como veremos en el homogenado obtenido por cavitación, se encontró la misma actividad que la hallada en la bibliografía (R.4.4.).

Cabe aclarar que no se ha establecido si la velocidad medida corresponde a la velocidad inicial (V_0) de la enzima. Pero sí se ha verificado que la cantidad de Pi liberado es siempre proporcional a la cantidad de material utilizado, con lo cual se percibe que el método sirve a los fines de este trabajo.

R.3.2.4. Enzimas marcadoras del retículo endoplásmico

En contraste con las enzimas marcadoras de membrana plasmática que son comunes a varios y distintos tipos de células, para las de retículo endoplásmico es difícil generalizar debido a que las mismas están asociadas a características funcionales distintivas de la célula.

Los dos marcadores que habitualmente caracterizan a la membrana del retículo endoplásmico, independientemente

del tipo de célula que se trate, son NADH-diaforasa (EC 1.6.99.3) y la glucosa-6-fosfatasa (EC 3.1.3.9). Sin embargo, la actividad de la NADH-diaforasa puede ser localizada también en el aparato de Golgi (Evans, 1980).

Por ello se tomó a la glucosa-6-fosfatasa como marcadora de retículo endoplásmico. Esta enzima se dosó por la técnica detallada (M.11.3.2.) y que es básicamente la descrita por Moré, pero por las razones expuestas (R.3.2.), modificada para utilizar 50 veces menos material que lo propuesto en el trabajo original (Moré, 1971).

La puesta a punto se hizo utilizando el homogenado obtenido por el método de Eylar y Hagopian (1971), se midió una actividad específica de 0,7 $\mu\text{mol Pi} / \text{mg proteín}na hora. El dato bibliográfico indica que en las mismas condiciones de homogeneización, la actividad es de 0,32 $\mu\text{mol Pi/mg proteín}as hora (Brotherus y Renkonen, 1977).$$

Al investigar la actividad de esta enzima en el homogenato obtenido por cavitación también se encontraron valores altos respecto a los datos bibliográficos.

Al medio de incubación se le agregaba tartrato de Na^+ y K^+ para inhibir la fosfatasa ácida (Moré, 1971); sin embargo, fue necesario adicionarle EDTA y F^- para inhibir a la fosfatasa alcalina (Brotherus y Renkonen, 1977; Swanson, 1955). Al proceder de esta manera se encontró una actividad de 0,3 $\mu\text{mol Pi/mg proteín}a hora, similar a la bibliográfica.$

Tampoco en este caso se determinó la V_0 de la enzima. Sin embargo, como se esperaba, la cantidad de Pi liberado aumentaba linealmente con el tiempo y con la cantidad de enzima utilizada. Por lo tanto el sistema servía para los propósitos de este trabajo.

R.3.2.5. Enzimas marcadoras de lisosomas

La enzima marcadora por excelencia de este organelo es la fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2). Se determinó su actividad utilizando β -glicerol fosfato como sustrato (Appelmans y De Duve, 1955a, 1955b; Gianetto y De Duve, 1955).

Esta enzima sufre el fenómeno de latencia; para poder dosar su actividad hay que liberarla y para ello es necesario romper el lisosoma.

Distintos autores proponen diferentes procedimientos mecánicos como tres congelamientos y descongelamientos sucesivos o choque hiposmótico, pero los mejores resultados se obtienen al agregarle Tritón X-100 hasta 0,1% de concentración final a la mezcla de incubación (Evans, 1980). Al aplicar esta técnica en el homogenado obtenido por el método de Eylar se encontró una actividad de 0,5 a 0,6 $\mu\text{mol Pi/mg proteína hora}$, dato semejante al bibliográfico (Gahmber y Simons, 1970).

R.3.2.6. Enzimas marcadoras de mitocondrias

La enzima que se reconoce generalmente como marcadora de mitocondrias es la succinato deshidrogenasa (EC 1.3.99.1). La técnica elegida para dosarla (Arrigoni y Singer, 1962; Boveris y col., 1976) se modificó para volúmenes 10 veces inferiores. Los detalles de la puesta a punto de la misma se detallan en (M.11.3.4.).

En la Figura 10 se muestra la cinética de la enzima en distintas fracciones de células BHK-21(C-13) infectadas

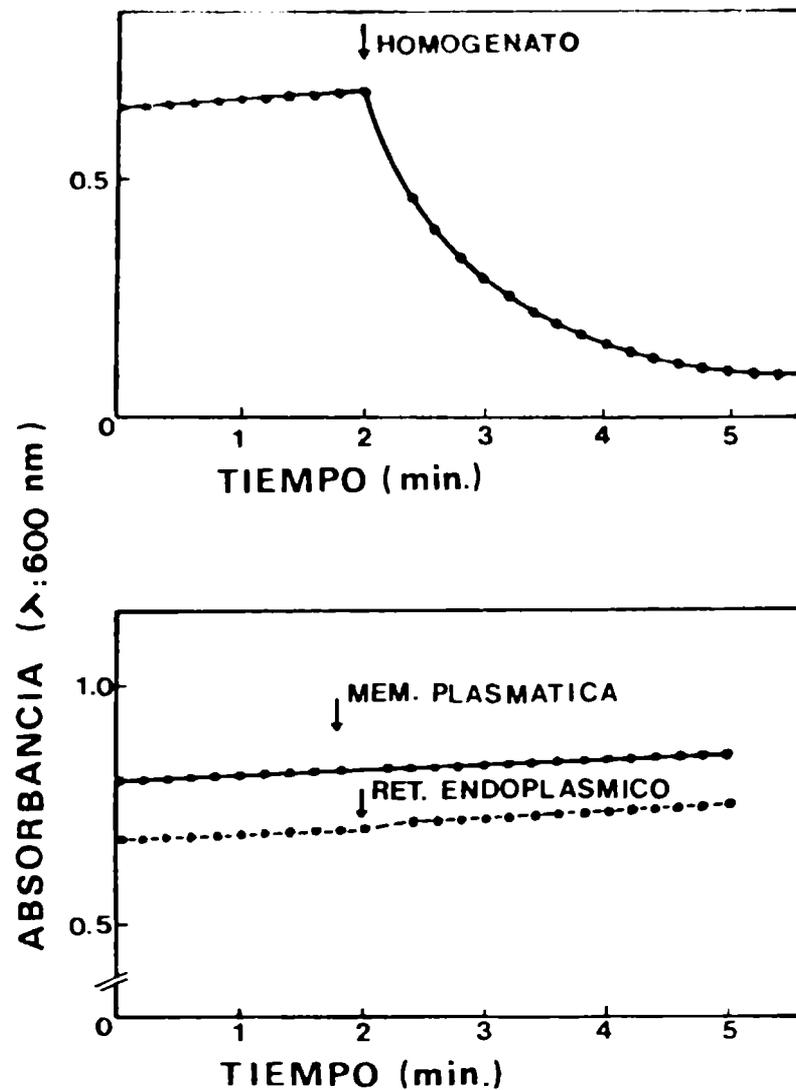


Figura 10: Actividad de la succinato deshidrogenasa. Cinética de la reducción del DCFI por acción de la enzima.

El sustrato final de la reacción fue el DCFI (2-6-diclorofenol-indofenol). La reducción del mismo fue determinada mediante la lectura de la absorbancia a $\lambda = 600 \text{ nm}$. Los detalles de la determinación se describen en Materiales y Métodos.

Las muestras en las que se ensayó la actividad fueron homogenado obtenido por cavitación de células BHK-21(C-13) infectadas con la cepa MC₂ del virus Junín; la membrana plasmática y el retículo endoplásmico de las mismas, preparados según el método de Graham (Graham, 1972).

con la cepa MC₂ del virus Junín. La actividad específica de la enzima se halló determinando la pendiente al tiempo de comenzada la reacción con el agregado de la muestra.

Como se puede observar en la parte superior de la Figura 10, por esta técnica es posible dosar eficientemente la actividad en el homogenado celular que fue de 7 μ mol sustrato transformado/mg proteína hora; también se pudo establecer la actividad específica en materiales en los que la misma era mucho menor. Sin embargo, las fracciones membrana plasmática y retículo endoplásmico aisladas no presentan actividad succinato deshidrogenasa como se ve en la parte inferior de la Figura 10. La importancia de este dato se discutirá más adelante (R.4.4.2).

•

CAPITULO IV: SEPARACION Y CARACTERIZACION DE LAS MEMBRANAS
PLASMATICA Y DE RETICULO ENDOPLASMICO DE
CELULAS BHK-21(C-13) INFECTADAS CON EL VIRUS
JUNIN Y DE LOS CONTROLES NO INFECTADOS

R.4.1. CULTIVO Y HOMOGENIZACION DE CELULAS

Las células BHK-21(C-13) marcadas con ^{32}P provenientes del cultivo de 5 cajas de Petri aportan el material suficiente para analizar los fosfolípidos de la membrana plasmática y retículo endoplásmico de las mismas.

Sin embargo, la metodología implicada en la obtención y caracterización de las mismas requiere una masa muy superior. La marcación del total de células necesarias para lo último involucraría el uso innecesario de una gran cantidad de radiactividad. Para salvar este inconveniente se procedió de acuerdo con lo precedentemente detallado (M.11.1.) a cultivar paralelamente células marcadas con ^{32}P y células no marcadas. Una vez que ambas se mezclaron se procedió según el esquema de la Figura 11, que indica los pasos fundamentales de la metodología seguida (Graham, 1972).

Luego de la ruptura quedaron de un 5 a un 10% de células no infectadas sanas; en cambio, en el caso de células infectadas sólo permanecieron íntegras un 3% del número original.

Posteriormente a la ruptura, se efectuó una centrifugación diferencial para eliminar los núcleos y células enteras. En ambos casos en el precipitado se encontró un 61% de la cantidad de proteínas halladas en el homogenado de partida y en el sobrenadante citoplasmático un 37% de aquéllas. Estos resultados son semejantes a los que se encuentran en la bibliografía (Gahmber y Simons, 1970).

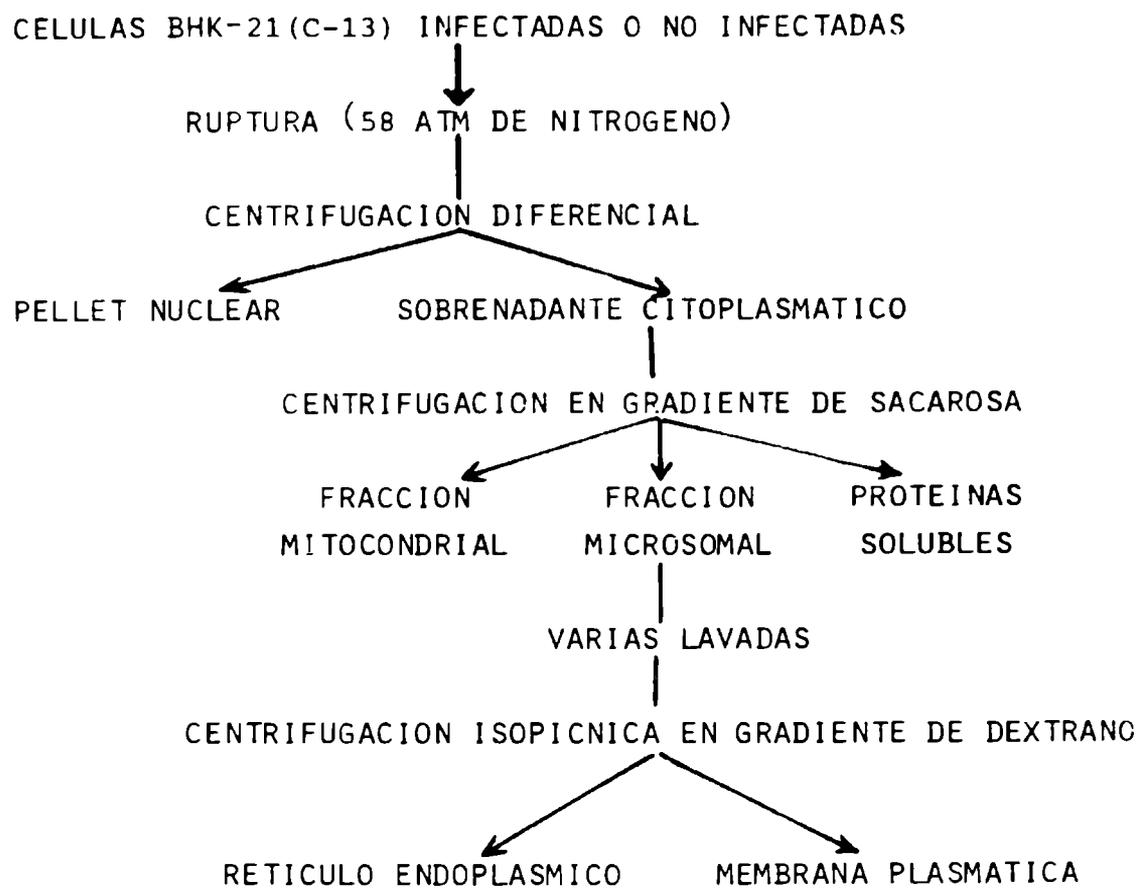


Figura 11: Esquema experimental del aislamiento de las membranas plasmáticas y de retículo endoplásmico de células BHK-21(C-13).

R.4.2. SEPARACION DE LA FRACCION MICROSOMAL

De acuerdo con lo esquematizado en la Figura 11, el sobrenadante citoplasmático se colocó sobre un gradiente de sacarosa que se centrifugó a alta velocidad para separar las distintas fracciones celulares. Concluida la centrifugación, la simple observación de los tubos que contenían los gradientes indicaba que en los mismos había al menos tres bandas.

En el sector izquierdo de la Figura 12 se muestra la distribución de proteínas y radiactividad (^{32}P) de un sobrenadante citoplasmático de células no infectadas sometidas a los procedimientos hasta aquí descritos.

En dicha figura se puede observar un pico de absorbencia en la zona lineal del gradiente de sacarosa de 60% a 30% P/P, que coincide perfectamente con un pico de radiactividad que llamamos MIT. y que correspondería a la fracción mitocondrial (Graham, 1972).

Como veremos luego (R.4.4.1.) en esta fracción había una alta actividad de las enzimas marcadoras de mitocondrias y lisosomas.

En el mismo sector de la figura se muestra también un pico de absorbencia en la zona lineal del gradiente de sacarosa 30% a 10% P/P, separados por un valle (correspondiente a sacarosa 30%) de la banda anterior. Superpuesto con este pico se encuentra un máximo de radiactividad ^{32}P . Esta banda, que llamamos MICR., correspondería a la fracción microsomal (Graham, 1972); las determinaciones enzimáticas efectuadas demostraron que así es (R.4.4.1.).

Por último, en la zona más liviana del gradiente se halla un pico de absorbencia que correspondería a proteínas

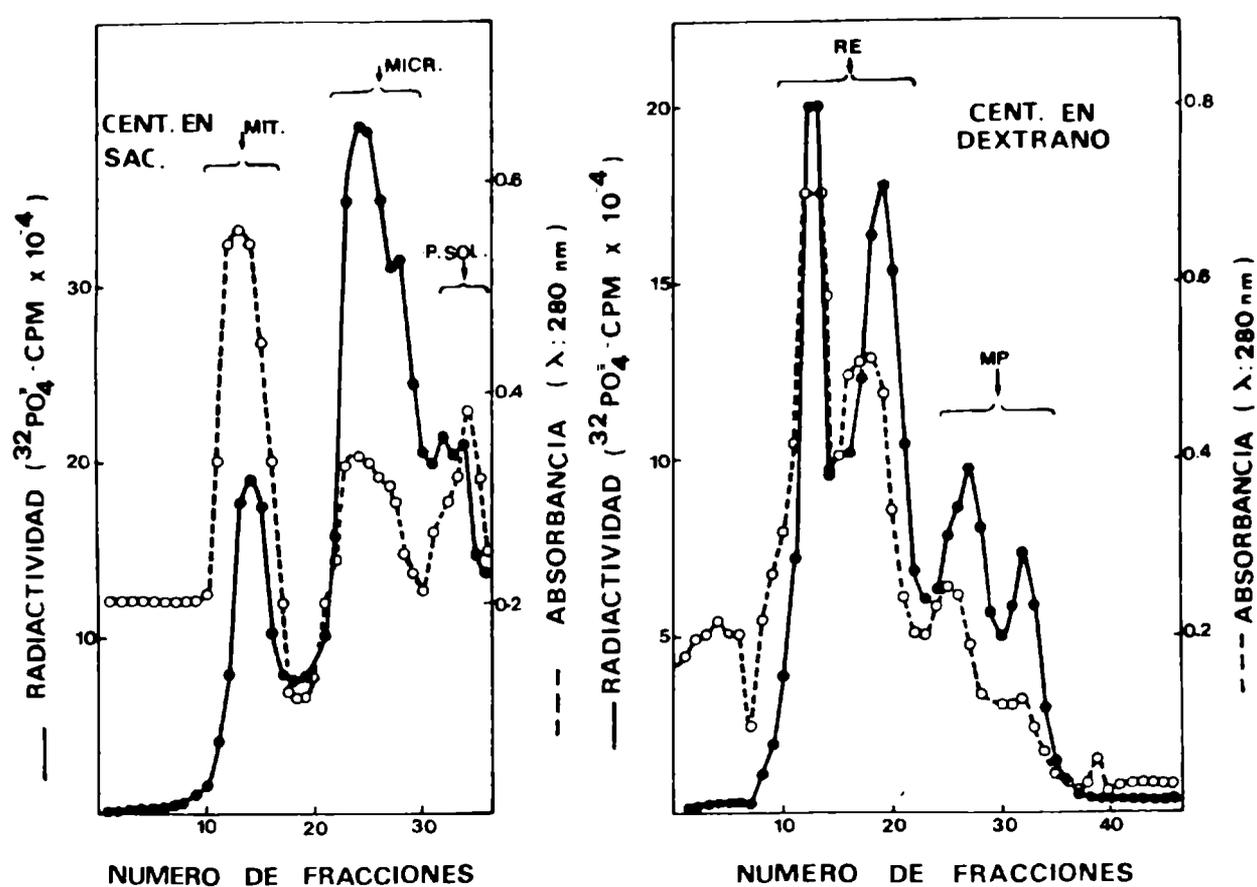


Figura 12: Purificación de la membrana plasmática y retículo endoplásmico de células BHK-21(C-13) no infectadas.

El sobrenadante citoplasmático del homogenado de células BHK-21(C-13) no infectadas obtenido de acuerdo a lo indicado en el punto (M.11.2.) de Materiales y Métodos fue sembrado en un gradiente donde la concentración de sacarosa desde el fondo hacia la boca del tubo iría variando de 60% P/P a 30% P/P, luego habría un colchón de sacarosa 30% P/P y nuevamente una variación de 30% a 10% P/P.

El gradiente fue centrifugado durante 2 horas a 22.000 rpm en un rotor 25.2 de Spinco y fraccionado por punción en el fondo del tubo. La absorbencia de cada fracción se determinó a $\lambda = 280$ nm (---) y la radiactividad por el método de Cherenkof (—), zona izquierda del gráfico.

Las fracciones de máxima radiactividad y absorbencia del gradiente anterior, correspondientes a la fracción microsomal (MICR.), se lavaron varias veces y se sembraron sobre un gradiente preformado por capas de dextrano cuya concentración variaba desde 25% P/P a 5% P/P. El mismo se centrifugó durante 16 horas a 26.000 rpm en un rotor SW-41 de Spinco. El gradiente de dextrano se recogió por punción en el fondo del tubo. A las fracciones obtenidas se les determinó la absorbencia a $\lambda = 280$ nm (---) y la radiactividad por el método de Cherenkof (—), zona derecha del gráfico.

solubles (Graham, 1972). Como era de esperar la radiactividad en esa zona es baja, no se observa un pico de ^{32}P .

Así se logró separar microsomas de mitocondrias de células no infectadas. Como se verá luego (R.4.4.1.) la separación fue eficiente.

Este último hecho no implicaba que se pudieran separar las mitocondrias de los microsomas de las células infectadas con el virus Junín. Trabajos previos habrían indicado que el virus sedimenta con las fracciones citoplasmáticas mitocondrial y microsomal (Coto y col., 1965). Si esto fuera cierto, la posible presencia de viriones maduros que cosedimentarían con ambas fracciones podría establecer una especie de "puente" entre ellas impidiendo su separación o la posterior separación de los microsomas de membrana plasmática y retículo endoplásmico.

El virus Junín posee una densidad de flotación en sacarosa de 1,14 - 1,17 g/cm³ (Añón y col., 1976). Esta densidad corresponde a concentraciones de sacarosa de 33 a 39% P/P. Esto implica que de existir virus maduro en la región citoplasmática, hecho poco probable a la luz de los conocimientos actuales, éste bandearía a lo sumo junto a las mitocondrias pero no a los microsomas.

Sin embargo, los autores postulaban como hecho probable que el "virus se hallara en una unión considerablemente íntima con estas estructuras membranosas" (Coto y col., 1965). Si esto realmente ocurriera, la infección viral estaría modificando la estructura de estas membranas, razón por la cual la separación se podría ver afectada.

En el sector izquierdo de la Figura 13 se muestra la distribución de proteínas y radiactividad del sobrenadante

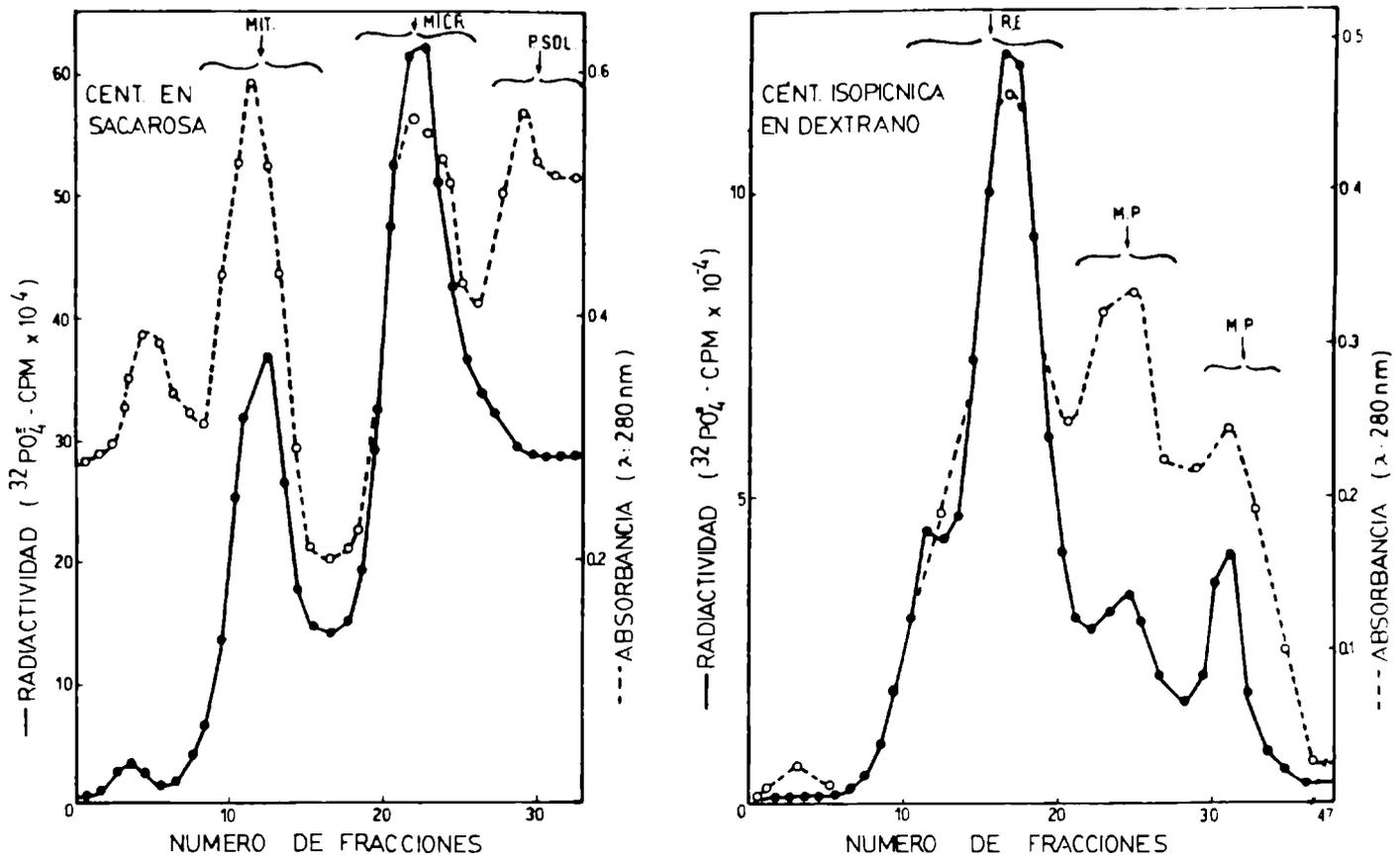


Figura 13: Purificación de la membrana plasmática y de retículo endoplásmico de células BHK-21(C-13) infectadas con la cepa MC_2 de virus Junín.

El sobrenadante citoplasmático del homogenado de células BHK-21(C-13) infectadas con la cepa MC_2 obtenido de acuerdo con lo indicado en el punto (M.11.2) de Materiales y Métodos fue sembrado en un gradiente donde la concentración de sacarosa desde el fondo hacia la boca del tubo iría variando de 60% P/P a 30% P/P, luego habría un colchón de sacarosa 30% P/P y nuevamente una variación de 30% a 10% P/P. El gradiente fue centrifugado durante 2 horas a 22.000 rpm en un rotor 25.2 de Spinco y fraccionado por punción en el fondo del tubo. La absorbancia de cada fracción se determinó a $\lambda = 280\text{ nm}$ (---) y la radiactividad por el método de Cherenkof (—), zona izquierda del gráfico.

Las fracciones de máxima radiactividad y absorbancia del gradiente anterior, correspondientes a la fracción microsomal (MICR.), se lavaron varias veces y se sembraron sobre un gradiente preformado por capas de dextrano cuya concentración variaba desde 25% P/P a 5% P/P. El mismo se centrifugó durante 16 horas a 26.000 rpm en un rotor SW-41 de Spinco. El gradiente de dextrano se recogió por punción en el fondo del tubo. A las fracciones obtenidas se les determinó la absorbancia a $\lambda = 280\text{ nm}$ (---) y la radiactividad por el método de Cherenkof (—), zona derecha del gráfico.

citoplasmático de células infectadas con virus Junín en un gradiente de sacarosa. Al igual que ocurre para el caso de las células no infectadas, aquí también se perciben tres picos de máxima absorbencia. El más pesado, llamado MIT., correspondería a la fracción mitocondrial (R.4.4.2.) y como se observa en la figura coincide con un pico de máxima radiactividad (^{32}P). Separado de este último por un valle de sacarosa 30% P/P se encuentra otra banda de máxima absorbencia, llamada MICR., que correspondería a microsomas (R.4.4.2.). En esa posición también se halla un pico de máxima radiactividad. Y en la parte superior del gradiente se encuentra un pico de absorbencia que correspondería a las proteínas solubles (Graham, 1972), en esa zona se verifica la ausencia de radiactividad.

Como se desprende de la observación de las figuras 12 y 13, la distribución de masa y marca a lo largo de los gradientes de sacarosa fue la misma para el material proveniente de células infectadas y no infectadas. Así, se concluye que independientemente de que el virus cosedimente con alguna fracción citoplasmática o no, la infección viral no altera la separación entre las distintas fracciones de las células BHK-21(C-13) mediante la técnica de Graham.

Otros autores han hallado resultados semejantes trabajando con células infectadas con virus de otras familias utilizando esta u otras técnicas (Soler y col., 1978; Graham, 1972).

Además, en el caso del virus Junín la presencia de viriones maduros en la fracción microsomal indicada por otros autores (Coto y col., 1965) podría deberse a una resolución poco eficiente entre microsomas y mitocondrias ya que ellos efectúan tal separación mediante centrifugaciones diferenciales.

Por otro lado, este virus muy probablemente corresponda al medio extracelular, pues los autores lavan el cerebro de ratón en el que se crece el virus eliminando así los viriones de la superficie del órgano pero no el que se halla en los intersticios intercelulares.

R.4.3. RESOLUCION DEL MATERIAL MICROSOMAL

Las fracciones que presuntamente contenían el material microsomal se centrifugaron, el sedimento se lavó y luego siguiendo el esquema de la Figura 11, se sembró sobre un gradiente de dextrano.

En el sector derecho de la Figura 12 se representan la distribución de proteínas y radiactividad a lo largo de un gradiente de dextrano sembrado con microsomas de células no infectadas. Se puede observar que en el mismo se resuelven cinco bandas. Las dos más pesadas, llamadas RE, que corresponderían a retículo endoplásmico (R.4.4.3.; Graham, 1972) se superponen con sendos picos de radiactividad ^{32}P . Las tres restantes, llamadas MP, corresponderían a membrana plasmática (Graham, 1972). Sin embargo, este resultado sólo se pudo verificar para las dos más pesadas (R.4.4.1.) pues la restante tenía muy poco material y no se pudo hacer ninguna determinación. Las dos bandas MP más densas muestran la presencia de material marcado (^{32}P).

En el sector derecho de la Figura 13 se observa la distribución de radiactividad y proteínas en un gradiente de dextrano sembrado con microsomas de células infectadas con la cepa MC₂ del virus Junín. Este gradiente se recogió en

fracciones de mayor volumen que el anterior, por eso la resolución no fue tan buena.

En la figura se observan tres bandas de máxima absor**ben**cia que se superponen con las tres que indican máxima radiactividad. Como se demuestra más adelante (R.4.4.2.) la banda más pesada, RE, resultó ser retículo endoplásmico y las más livianas, MP, membrana plasmática.

Tanto para las células infectadas como para las no infectadas, entre las bandas RE y MP sólo se recupera del 8% al 9% de las proteínas existentes en el sobrenadante citoplasmático; dato semejante al bibliográfico (Gahmber y Simons, 1970).

Es importante aclarar que a la lectura de absorbencia de cada fracción se le restó el blanco correspondiente. Estos se obtuvieron a partir de un gradiente de dextrano hecho con las mismas características que el que llevaba la muestra pero sembrado con buffer. El gradiente control fue fraccionado de igual forma que el gradiente problema. Se debió hacer la resta de blancos individuales porque las soluciones de dextrano absorben luz de $\lambda = 280$ nm y tal absorción varía mucho con la concentración del compuesto, por lo cual no se podía hallar un valor promedio.

La determinación de proteínas por métodos químicos (Lowry, 1951) indicó que el 20% del material microsomal correspondía a la fracción membrana plasmática y que el 80% restante al retículo endoplásmico. Al integrar las curvas de absorbencia de los gradientes de dextrano de las figuras 12 y 13 se obtiene la misma distribución, que por otro lado es similar a la hallada por otros autores (Gahmber y Simons, 1970).

R.4.4. CARACTERIZACION DE LAS FRACCIONES AISLADAS

Las fracciones membrana plasmática y retículo endoplásmico aisladas se encontraban en una solución de dextrano. El dextrano interfería en las lecturas de absorbencia a $\lambda = 750 \text{ nm}$ necesarias para dosar proteínas por el método de Lowry (1951). Esto hizo que en los ensayos preliminares, los blancos de cada fracción del gradiente de dextrano fueran tratados según el método de Lowry (1951). Las absorbencias que mostraban fueron restadas a la fracción correspondiente. Sin embargo, éste no era el único inconveniente; cuando se quisieran analizar los fosfolípidos de estas fracciones el dextrano podría interferir con la extracción de los mismos por el método de Folch (1957). Por ello, era necesario eliminarlo; para lo cual se hizo una dilución de por lo menos 1/20 de cada una de las fracciones en un buffer adecuado y luego se las ultracentrifugó para concentrar las membranas. Se tomó el sedimento en el volumen de buffer deseado y éste ya libre de dextrano, sirvió para hacer todas las determinaciones enzimáticas y lipídicas necesarias.

A continuación se analizarán las características que presentaron las enzimas marcadoras estudiadas en las distintas fracciones celulares. Los resultados más importantes se representan en la Figura 14.

R.4.4.1. Células no infectadas

La observación de la Figura 14 nos indica que en el homogenado celular se encuentran activas las cuatro

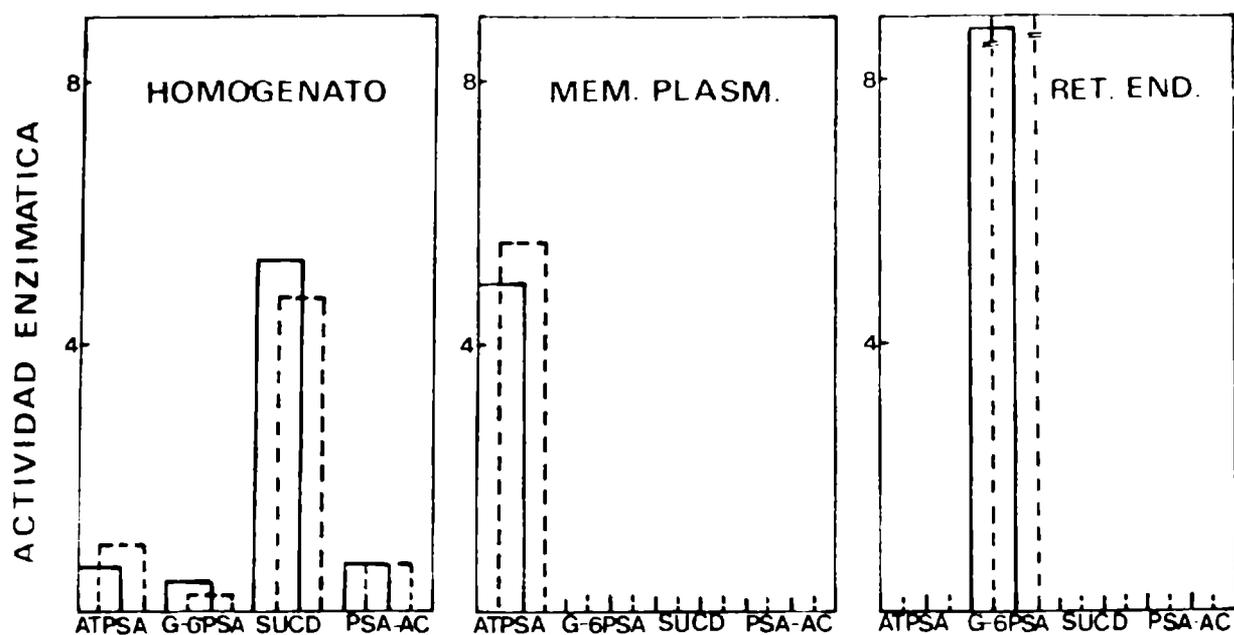


Figura 14: Enzimas marcadoras de membranas en distintas fracciones de células BHK-21(C-13)

El homogenado, la membrana plasmática y el retículo endoplásmico de las células BHK-21(C-13) infectadas con la cepa MC₂ del virus Junín (---) o no infectadas (—) se obtuvieron según el esquema de la Figura 11. En cada una de las fracciones citadas se determinó la actividad de las fosfatasas: ATPasa (Na⁺-K⁺) (ATPSA); glucosa-6-fosfatasa (G-6PSA); fosfatasa ácida (PSA-AC) en μ moles Pi liberado / mg proteína / hora y de la succinato deshidrogenasa (SUCD) en μ moles de sustrato transformado / mg proteína / hora.

RET.END. representa a las 2 fracciones RE de la Figura 12 (—) y a la única RE de la Figura 13 (---).

MEM.PLASM. representa a la fracción MP mas densa de las figuras 12 (—) y 13 (---).

enzimas analizadas. La enzima ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) presenta una actividad comparable a la encontrada en la bibliografía (Gahmber y Simons, 1970).

Las enzimas glucosa-6-fosfatasa y la fosfatasa ácida también presentan una actividad comparable a la que encuentran otros autores (Brotherus y Renkonen, 1977; Gahmber y Simons, 1970). En tanto que no podemos comparar el dato hallado para la succinato deshidrogenasa porque los otros autores no utilizan DCFI como sustrato de reacción. La actividad de esta enzima se halla a partir de una curva que representa a la cinética de la misma. Esta curva es semejante a la mostrada en la parte superior de la Figura 10.

Los resultados obtenidos al analizar la fracción llamada MIT. en la Figura 12 indican que en ella sólo se detecta actividad para las enzimas succinato deshidrogenasa y fosfatasa ácida. La actividad de la succinato deshidrogenasa sería 20 veces superior a la hallada en el homogenado celular. La fosfatasa ácida presentaría en esta fracción una actividad aproximadamente 30 veces superior a la hallada en el homogenado. Este resultado es esperable pues los lisosomas en este sistema sedimentan junto a las mitocondrias (Graham, 1972). Con los resultados obtenidos se confirma que la fracción MIT. es realmente la fracción mitocondrial.

La banda del gradiente de sacarosa que se designó como MICR. (Figura 12), posee una actividad 6 veces superior al homogenado celular de la enzima ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$). En esta fracción también se detectó actividad para la enzima glucosa-6-fosfatasa, pero debido al escaso material que contenía la alícuota que se apartó para estos ensayos no

se pudo establecer su valor numérico. Sin embargo, estamos seguros de que sí existe actividad porque la fracción RE que surge a partir de la MICR. la posee. En cambio, en la fracción MICR. no se detecta actividad de succinato deshidrogenasa ni de fosfatasa ácida. Por ello estamos en condiciones de confirmar que la fracción MICR. es realmente la fracción microsomal y que no se halla contaminada con mitocondrias.

Como se puede observar en la Figura 14, en las fracciones del gradiente de dextrano que en la Figura 12 se llamaron RE sólo se encuentra actividad para la enzima glucosa-6-fosfatasa. La enzima se halla purificada aproximadamente 20 veces respecto al homogenado. Estos resultados indican que la fracción RE es realmente retículo endoplásmico.

En otros trabajos se ha descrito que la enzima NADH-diaforasa, también utilizada comúnmente como marcadora de retículo endoplásmico, se encuentra de 2,50 a 4,06 veces purificada en esta fracción respecto al homogenado celular (Gahmber y Simons, 1970). Esto indica que la fracción que llamamos RE es retículo endoplásmico altamente purificado.

La Figura 14 indica además, que la fracción MP más densa del gradiente de dextrano (Figura 12) sólo posee actividad ATPásica N^+ y K^+ dependiente. Esta actividad es aproximadamente 6 veces superior a la hallada en el homogenado celular y a la que la literatura describe para esta misma fracción (Graham, 1972). En la banda MP más liviana, también se encontró solamente actividad ATPásica ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) dependiente, aunque debido a la escasa cantidad de material que la misma contenía no se pudo precisar su valor

numérico. Para esta banda la literatura informa que la actividad de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) es de 9,2 $\mu\text{mol Pi/mg}$ proteína hora (Graham, 1972).

Los resultados previamente descritos indican que ambas fracciones MP son membrana plasmática.

R.4.4.2. Células infectadas

El análisis de la Figura 14 nos revela que en el homogenado celular de las células infectadas con el virus Junín se encuentran funcionalmente activas las cuatro enzimas ensayadas.

La fracción RE del gradiente de dextrano de la Figura 13 sólo posee actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa y en una proporción 50 veces mayor que en el homogenado celular. Por ello se concluye que esta fracción corresponde al retículo endoplásmico purificado de las células BHK-21 infectadas con el virus Junín.

Las fracciones MP del gradiente de dextrano de la Figura 13 sólo presentan actividad de la enzima ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$). La fracción MP pesada presenta una actividad 5 veces superior a la hallada en el homogenado. Al igual que en los controles no infectados (R.4.4.1.), la actividad de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) en la fracción MP más densa es superior a la hallada en la bibliografía para la misma fracción de las células normales (Graham, 1972). La fracción MP liviana presenta una actividad de 9,4 $\mu\text{mol Pi/mg}$ proteína hora para esta enzima, resultado que concuerda con el bibliográfico para esta fracción en células normales (Graham, 1972).

Este valor a su vez, es semejante al descrito en la bibliografía para la fracción membrana plasmática total de células BHK-21(C-13) normales (Gahmber y Simons, 1970). Evidentemente ambas fracciones MP son membrana plasmática.

En la parte inferior de la Figura 10 se muestra cómo se ha detectado que las fracciones MP y RE de estas células no poseen actividad de la enzima succinato deshidrogenasa, razón por la cual se pudieron separar eficientemente.

R.4.4.3. Influencia de la infección viral sobre la actividad de las enzimas marcadoras de las membranas celulares

De lo recientemente expuesto (R.4.4.1. y R.4.4.2.) y de la observación de la Figura 14 se desprende que tanto las membranas plasmáticas como las de retículo endoplásmico de células infectadas y no infectadas se obtuvieron altamente purificadas. Lo que confirma, como se previera (R.4.2.) que la infección viral no impide la buena resolución entre ambas fracciones.

A su vez esto demuestra que se está en condiciones de estudiar los fosfolípidos de las membranas de sendas células.

Los resultados presentados en la Figura 14 ponen en evidencia además, que las actividades de las enzimas estudiadas no sufren modificaciones en el homogenado ni en la membrana plasmática celular por la infección viral. Las pequeñas diferencias encontradas son mínimas frente a las halladas por otros autores al infectar estas células con otros virus (Graham, 1972).

Sin embargo, la infección con el virus Junín parece aumentar la actividad de la glucosa-6-fosfatasa en el retículo endoplásmico.

Las células BHK-21 sufren un cambio significativo en el Km y por ende en la actividad de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) por la infección con el virus del polioma (Graham, 1972). El autor hace incapié en que la disminución de esta actividad debe tomarse más bien como una modificación producida en la estructura de la enzima que en el descenso numérico de esa proteína en la membrana plasmática celular. Más aún, interpreta que la variación de esta actividad pueda deberse más que a un cambio estructural directo de la proteína a un cambio del entorno lipídico de la misma en el seno de la membrana plasmática, inducido por el virus y que él supone puede ocurrir (Graham, 1972).

Este no es el único caso en que un virus altera la actividad de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$).

Se sabe que los virus que ejercen un efecto citolítico sobre las células huéspedes provocan una inhibición en la síntesis de las proteínas celulares ("fenómeno de shutoff"). La alteración en la estructura y función de la membrana plasmática de la célula huésped parece jugar, en estos casos, un papel muy importante durante la replicación viral. La sola adsorción del virus a la membrana plasmática provoca alteraciones en su fluidez y permeabilidad a ciertas sustancias (Carrasco, 1981; Carrasco y Esteban, 1982; Carrasco y Smith, 1976; Imprain y col., 1980).

Varios laboratorios han demostrado que existe una alteración en los niveles intracelulares de Na^+ y K^+ o del transporte a través de membrana de los mismos o ambas

cosas, luego de las infecciones virales (Egberts y col., 1977; Garry y col., 1979a y 1979b; Nair y col., 1979, 1981). La elevación de la concentración intracelular de Na^+ se consideró como excepcionalmente importante en la inducción por parte de los virus de la inhibición en la síntesis proteica. En células fibroblásticas de pollo un incremento de la concentración de Na^+ y un descenso en el K^+ intracelular se correlacionarían con un descenso de la síntesis de proteínas (Garry y col., 1979b). Aparentemente, la presencia del virus inhibiría a la bomba de Na^+ ($\text{ATPasa Na}^+-\text{K}^+$) y esto sería la causa de la inhibición selectiva de la traducción de mensajeros de las células infectadas (Garry y col., 1979a).

Sin embargo, en otros sistemas virus-célula huésped tal alteración en los niveles intracelulares de cationes monovalentes ocurre después de la inhibición de la síntesis de proteínas (Egberts y col., 1977; Francoeur y Stanner, 1978; Nair y col., 1979, 1981). Los últimos autores han medido la actividad de la $\text{ATPasa (Na}^+-\text{K}^+)$ en el homogenado de células HeLa infectadas con virus polio y encuentran un pequeño descenso de la misma. Ellos concluyen que la alteración en la permeabilidad de la membrana o, mejor dicho, la inhibición de la actividad de la $\text{ATPasa (Na}^+-\text{K}^+)$ es responsable de la acumulación de Na^+ (Nair y col., 1979). A su vez, se ha demostrado que la captación de aminoácidos en células HeLa está inhibida por la presencia del virus polio (Schaefer y col., 1982). El descenso en el transporte de aminoácidos, debido a la alteración de la membrana por el virus, puede ser el causante de la inhibición de la síntesis de proteínas.

Este autor presenta datos que sirven como un soporte experimental para la hipótesis que plantea que la modificación de la membrana celular juega un papel importante en la estrategia de la patogenicidad y citopatogenicidad del virus, en la alteración del metabolismo y muerte celular (Schaefer y col., 1982).

Sin embargo, otros autores demuestran que aunque el virus herpes simple tipo 1 induce una alteración en la concentración intracelular de Na^+ y K^+ , este hecho no explica la inhibición de la síntesis de proteínas inducida por el virus ya que esta inhibición es anterior en el tiempo a la alteración en la concentración de los cationes (Hackstadt y Mallavia, 1982).

De cualquier manera, si fuera cierto que la alteración de la actividad ATPásica (Na^+-K^+) puede explicar la inhibición de la síntesis proteica celular y la citopatogenicidad del virus, el hecho de que no se encuentre alterada la actividad de esta enzima en células BHK-21 infectadas con el virus Junín, estaría de acuerdo con el hecho de que este virus no ejerce efecto citopático sobre dichas células y no inhibe la síntesis proteica de las mismas, por lo menos durante las 72 horas post-infección (Pedersen, 1979; Coto y col., 1970).

En cambio, el posible aumento de actividad observado para la glucosa-6-fosfatasa podría correlacionarse con el aumento de la cantidad de retículo endoplásmico rugoso observado al microscopio electrónico (Lascano y Berría, 1977, 1979). Como se sabe, en este sitio se produce gran parte de la síntesis de proteínas y fosfoglicéridos. No es de extrañar entonces, que la célula infectada que debe sintetizar

una cantidad extra de estos compuestos, para formar virus, se observe un aumento en el tamaño del retículo endoplásmico y el consiguiente aumento numérico de sus enzimas marcadoras.

CAPITULO V: PROPORCION RELATIVA DE LOS FOSFOLIPIDOS DE LAS
MEMBRANAS DE CELULAS BHK-21(C-13) INFECTADAS
CON EL VIRUS JUNIN Y CELULAS NO INFECTADAS,
SU RELACION CON LA PROPORCION RELATIVA DE LOS
FOSFOLIPIDOS DEL VIRUS JUNIN.

R.5.1. COMPOSICION FOSFOLIPIDICA DE LAS MEMBRANAS CELULARES

En el capítulo precedente se demuestra que con la metodología esquematizada en la Figura 11 se obtienen membranas plasmáticas y de retículo endoplásmico de células BHK-21 infectadas con el virus Junín y células no infectadas, altamente purificadas (R.4.4.1. y R.4.4.2.).

Para estudiar los fosfolípidos de dichas membranas se partió de células marcadas con ^{32}P y se procedió de acuerdo con lo esquematizado en la citada figura.

A cada una de las fracciones obtenidas, en el último paso de la purificación, se les eliminó el dextrano (R.4.4) y se les extrajeron sus lípidos mediante el método de Folch y col. (1957). Los componentes fosfolipídicos del extracto se analizaron por cromatografía bidimensional en capa fina. Con cada uno de los extractos lipídicos obtenidos se desarrollaron todas las cromatografías posibles, pero sólo se computaron aquellas que presentaban una resolución igual o mejor que la que se muestra en las figuras 4 y 7. Las proporciones de las distintas especies aisladas en cada cromatoplaqueta se estableció de la manera indicada al estudiar los fosfolípidos virales y de células enteras (R.2.1.1). Los valores obtenidos para sendas membranas de células infectadas y células no infectadas se listan en la Tabla V. Para el caso de las membranas de las células no infectadas se realizó una sola preparación y los resultados obtenidos fueron repetitivos tanto para la membrana plasmática como para el retículo endoplásmico. En el caso de células infectadas en el que se analizaron dos preparaciones diferentes, encontramos que los datos obtenidos para cada una de las membranas no sólo son repetitivos dentro de la preparación, sino también entre preparaciones.

Analizaremos ahora la distribución que presentan los

Tabla V

Proporción de las distintas especies fosfolipídicas en las cromatoplasmas sembradas con extractos lipídicos de membranas celulares

Preparación Material	Fracciónes asociadas											Porcentaje de fracciónes asociadas ^c
	PC	PE	LPE	PS	Sph	PI	LPC	PA	C	D	b	
9RECMC2 1	50.9	17.8	6.9	5.2	2.8	7.9	2.5	0.9	2.6	2.3	2.1LPESPHPI	18.0
9RECMC2 2	50.2	19.4	9.9	5.6	9.9	9.9	1.6	0.5	2.4	2.4	1.7LPESPH	11.2
9RECMC2 3	50.6	18.9	9.9	4.8	9.9	7.1	2.1	0.7	2.8	4.6	4.0LPESPHPI	13.3
10RECMC2 1	50.1	21.0	9.9	4.3	9.9	9.9	1.7	0.5	4.6	4.9	3.7	
10RECMC2 2	50.3	20.6	5.2	4.0	1.9	6.1	1.8	0.8	4.9	0.8	0.8	
9MPCMC2 1	54.8	19.4	7.8	3.5	4.2	5.9	1.4	0.6	2.6	0.8	0.8	
9MPCMC2 2	51.1	20.4	7.8	4.0	4.4	7.2	1.2	0.6	2.6	0.8	0.8	
9MPCMC2 3	54.1	18.4	5.2	3.7	4.2	8.2	1.2	0.0	2.0	3.0	3.0	
9MPCMC2 4	55.1	16.6	9.9	4.3	9.9	9.9	1.7	0.0	2.3	0.7LPESPHPI	19.1	
9MPCMC2 5	54.9	17.9	6.9	3.5	9.9	9.9	0.9	0.9	1.9	3.5SPHPI	9.7	
9MPCMC2 6	53.2	23.3	9.9	3.1	3.9	9.9	1.0	0.2	1.3	0.9LPEPI	12.8	
9MPCMC2 7	54.9	16.0	8.6	2.9	3.7	9.9	9.9	0.1	1.6	3.8PI LPC	9.9	
10MPCMC2 1	55.4	20.4	2.8	3.5	2.8	6.1	1.5	0.2	2.6	4.6	6.0	
10MPCMC2 2	52.6	19.3	5.5	3.8	1.8	6.1	1.8	0.5	2.5	2.5	8.7LPESPH	13.4
11MPCCEL 1	41.0	17.0	9.9	6.9	9.9	7.0	1.6	1.7	1.7	7.9	9.9C D	8.3
11MPCCEL 2	40.0	15.0	13.3	6.0	3.6	8.5	0.6	2.3	1.8	9.9	5.1	
11MPCCEL 3	43.0	19.0	9.7	6.0	3.9	7.4	0.6	1.7	9.9	1.3	4.7PI LPC	8.2
11RECEL 1	45.5	23.0	7.1	5.8	2.4	7.6	1.0	1.3	1.4	1.4	3.6LPEPI	14.0
11RECEL 2	47.8	20.0	6.4	5.5	2.6	9.9	9.9	1.7	2.1	2.1	9.9C D	7.7
11RECEL 3	49.0	22.0	9.9	5.1	2.8	9.9	1.2	1.2	2.1	9.9		
11RECEL 4	47.0	19.0	7.1	5.3	2.5	7.0	1.3	2.3	9.9	9.9		

^aCon (999) se indica que no se puede determinar la proporción de la especie en forma aislada. Esta especie se resolvió correctamente en el cromatograma pero no se pudo recoger y determinar su radioactividad en forma aislada debido a la poca distancia que la separaba de otras. Ello se cuantificó junto a estas otras.

^bLos símbolos representan las especies indicadas con 999 o 9999 en la fila correspondiente.

^cLa cifra representa la proporción de las especies citadas en b en la fila correspondiente.

distintos fosfolípidos en las membranas estudiadas, tanto en las células infectadas como de los controles no infectados.

R.5.1.1. Composición fosfolipídica de la membrana plasmática y el retículo endoplásmico en células no infectadas

La proporción de las diferentes especies fosfolipídicas en la membrana plasmática y de retículo endoplásmico de los controles no infectados se estableció hallando los promedios de los valores obtenidos en la preparación 11 para cada especie fosfolipídica en sendas membranas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 15. En la misma también se consignan los resultados previamente establecidos para el homogenado celular (R.2.2.3.1).

Los datos de la figura demuestran que tanto para el homogenado como para ambas membranas las especies mayoritarias son PC y PE, en tanto que PA y LPC se encuentran en muy baja proporción. PI se encuentra en una proporción intermedia en los tres casos. La proporción de fosfolípidos no identificados es comparable a la de PI en la membrana plasmática, pero es baja en las otras dos fracciones. La cardiolipina se halla en baja proporción en los tres casos; en tanto que LPE, PS y Sph se encuentran en una alta o regular proporción en la fracción membrana plasmática, mientras que en el homogenado y retículo endoplásmico se encuentran en una proporción menor.

Los resultados presentados en la Figura 15 para la membrana plasmática y retículo endoplásmico celular son semejantes a los encontrados por Renkonen en dichas fracciones (Renkonen y col., 1971, 1972a). Sin embargo, tanto los

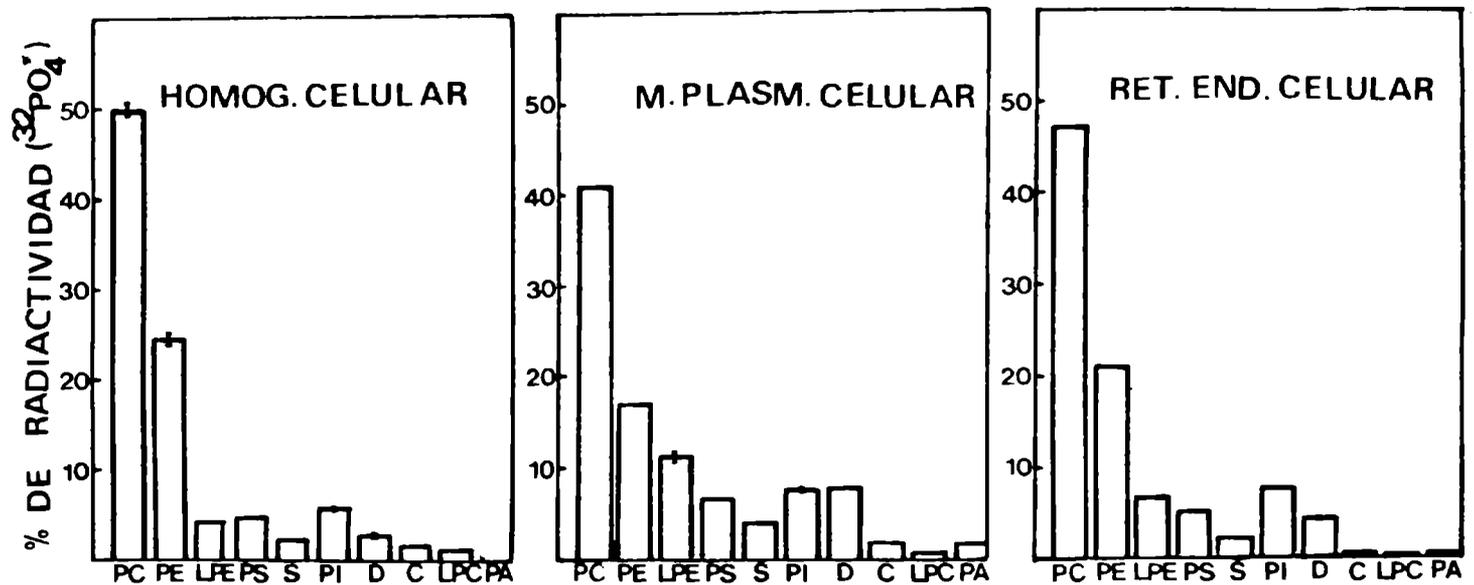


Figura 15: Composición fosfolipídica de las distintas fracciones de las células BHK-21(C-13)

Los extractos lipídicos de las células enteras falsamente infectadas (HOMOG.) se obtuvieron de acuerdo con el esquema de la Figura 3. La membrana plasmática (M.PLASM.) y el retículo endoplásmico (RET.END.) de las células BHK-21 (C-13) no infectadas se obtuvieron de acuerdo con el esquema de la Figura 11. Luego se extrajeron sus lípidos mediante el método de Folch. Los fosfolípidos de estos extractos se analizaron por cromatografía bidimensional en capa fina. Las manchas conteniendo cada especie fueron raspadas de la cromatoplaaca correspondiente y puestas en viales conteniendo tolueno-omnifluor. La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido. Se estableció la proporción de las especies fosfolipídicas en cada placa, calculando el porcentaje de radiactividad que las mismas poseían respecto al total de marca recuperada. Para el caso de la membrana plasmática se promediaron para cada especie fosfolipídica todos los datos de la preparación 11, que son los que figuran en la Tabla V. Lo mismo se hizo para el caso del retículo endoplásmico. Para el homogenado celular se promediaron los datos obtenidos para cada especie en cada una de las preparaciones computadas en la Tabla I y luego se estableció la media de dichos promedios.

Las barras indican el error estandard y los símbolos de las absisas representan a los distintos fosfolípidos.

resultados de Renkonen como los presentados en este trabajo difieren de los hallados por Blough (Blough y col., 1977). Los trabajos de este último autor difieren también de los hallados por Klenk para las membranas de las células BHK-21-F, aunque Blough indique que coinciden (Blough y col., 1977, Klenk y Choppin, 1970).

En la membrana plasmática celular, Renkonen y col. en contraron que la Sph se halla en una proporción de 15-17% respecto al total de fosfolípidos, valor este último significativamente más alto que el aquí presentado. Sin embargo, los autores indican que esta especie está contaminada con LPE. La suma de los porcentajes que en este trabajo se obtiene para las especies Sph y LPE en la membrana plasmática es semejante al valor que Renkonen y col. encuentran para la Sph. Como ya se detallara (R.1.3.), en este trabajo se puso especial cuidado en la identificación de Sph, PI y LPE, por ello se puede afirmar que la proporción de LPE es superior a la de Sph y por lo tanto no debe restársele importancia al lisoderivado al considerarlo como un contaminante.

En el retículo plasmático Renkonen encuentra que la PE se halla en una proporción de 15% respecto al total de fosfolípidos, en tanto que en la célula entera determina un porcentaje de 23%. Los datos de la Figura 15 indican que en el presente trabajo se halló un 21% de PE en el retículo endoplásmico y un 24% en el homogenado celular. Al ser el retículo endoplásmico una de las membranas mayoritarias de la célula, es lógico esperar que la proporción de sus fosfolípidos sea semejante a lo observado en la célula entera.

R.5.1.1.1. Relación entre la proporción de los fosfolípidos de la membrana plasmática y del retículo endoplásmico de células no infectadas

Los datos de composición fosfolipídica para la membrana plasmática y retículo endoplásmico surgen de la misma preparación. Por ello y en virtud de lo expresado previamente (R.2.2.1), podemos comparar los datos obtenidos para ambas fracciones.

La observación de la Figura 15 nos indicaría que ambas membranas poseen una composición fosfolipídica diferente.

El análisis estadístico (test de Student) de estos datos nos demuestra que:

- la proporción de PC en la membrana plasmática es significativamente menor que en el retículo endoplásmico, $P < 0,005$;
- la proporción de LPE en la membrana plasmática es significativamente mayor que en el retículo endoplásmico, $P < 0,025$;
- la proporción de PS en la membrana plasmática es significativamente mayor que en el retículo endoplásmico, $P < 0,005$;
- la proporción de Sph en la membrana plasmática es significativamente mayor que en el retículo endoplásmico, $P < 0,005$.

En las especies restantes no existen motivos para pensar que la proporción en la membrana plasmática sea diferente de la proporción en el retículo endoplásmico.

Para poder afirmar que la membrana plasmática de las células BHK-21 posee menor proporción de PC y mayor proporción de LPE, PS, Sph que la membrana de retículo

endoplásmico, deberíamos verificar que estas relaciones se cumplan en otras preparaciones, de la misma manera que se hizo cuando se estudiaron los fosfolípidos de las células enteras y los virus (R.2.2.2.). Sin embargo, cuando se realizó aquel estudio vimos que aunque los datos hallados para un determinado fosfolípido en las distintas preparaciones de un mismo material no era constante, la relación que existía entre la proporción de ese fosfolípido en el material en cuestión y otro material era la misma, independientemente de la preparación considerada (R.2.2.2). Por ello, es altamente probable que la membrana plasmática difiera de la del retículo endoplásmico en la proporción de los compuestos arriba mencionados.

Sin hacer análisis estadístico, solamente comparando en forma visual los datos obtenidos, otros autores también encuentran que la membrana plasmática de las células BHK-21(C-13) poseen menor cantidad de PC y mayor de PS y Sph (contaminada con LPE) que el retículo endoplásmico (Renkonen y col., 1971, 1972a).

De acuerdo con lo previamente indicado (R.2.2.1.), para poder comparar la composición fosfolipídica de la membrana plasmática y retículo endoplásmico de estas células con el homogenado celular, deberíamos haber obtenido los fosfolípidos de estos materiales a partir de una misma preparación. Sin embargo, debido a la metodología implicada y la gran cantidad de material del que se parte, para llegar a purificar pequeñas cantidades de membrana, esto es muy difícil de realizar (ver Materiales y Métodos).

Por otro lado, es muy poco probable que las grandes diferencias que se observan entre las proporciones de algunos fosfolípidos (PC, LPE, PS) en la membrana plasmática respecto a las células enteras, se deban a efectos de

la preparación, lo cual indicaría que estos materiales po seen una composición fosfolipídica diferente. En tanto que los resultados de la Figura 15 indicarían que no exis tirían motivos para pensar que la composición fosfolipídi ca del retículo endoplásmico sea diferente de la de las células enteras.

R.5.1.2. Composición fosfolipídica de la membrana plasmática y del retículo endoplásmico de células infectadas con virus Junín.
Relación entre ambas

La proporción de las diferentes especies fosfolipídicas en la membrana plasmática y en el retículo endoplásmico de las células infectadas con la cepa MC₂ del virus Junín se estableció de la forma en que se hizo cuando lo considerado eran las células enteras o los virus (R.2.2.3.1.). Así se halló el promedio de todas las determinaciones efectuadas para cada especie fosfolipídica de cada membrana en cada preparación. Luego se halló la media de dichos promedios. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 16. En la misma también se consignan los resultados previamente ob tenidos para el homogenado de estas células y para el virus infectante.

En los cuatro casos las especies mayoritarias son PC y PE, presentando C, LPC y PA en una menor proporción; lo mismo ocurre con D en el homogenado celular y el virus; en las membranas celulares estos fosfolípidos se presentan en una proporción ligeramente superior. PI se halla en los cuatro casos en una proporción intermedia. Por su parte, LPE, Sph y PS se presentan en baja proporción en las membranas y en el homogenado de las células infectadas, pero en una alta

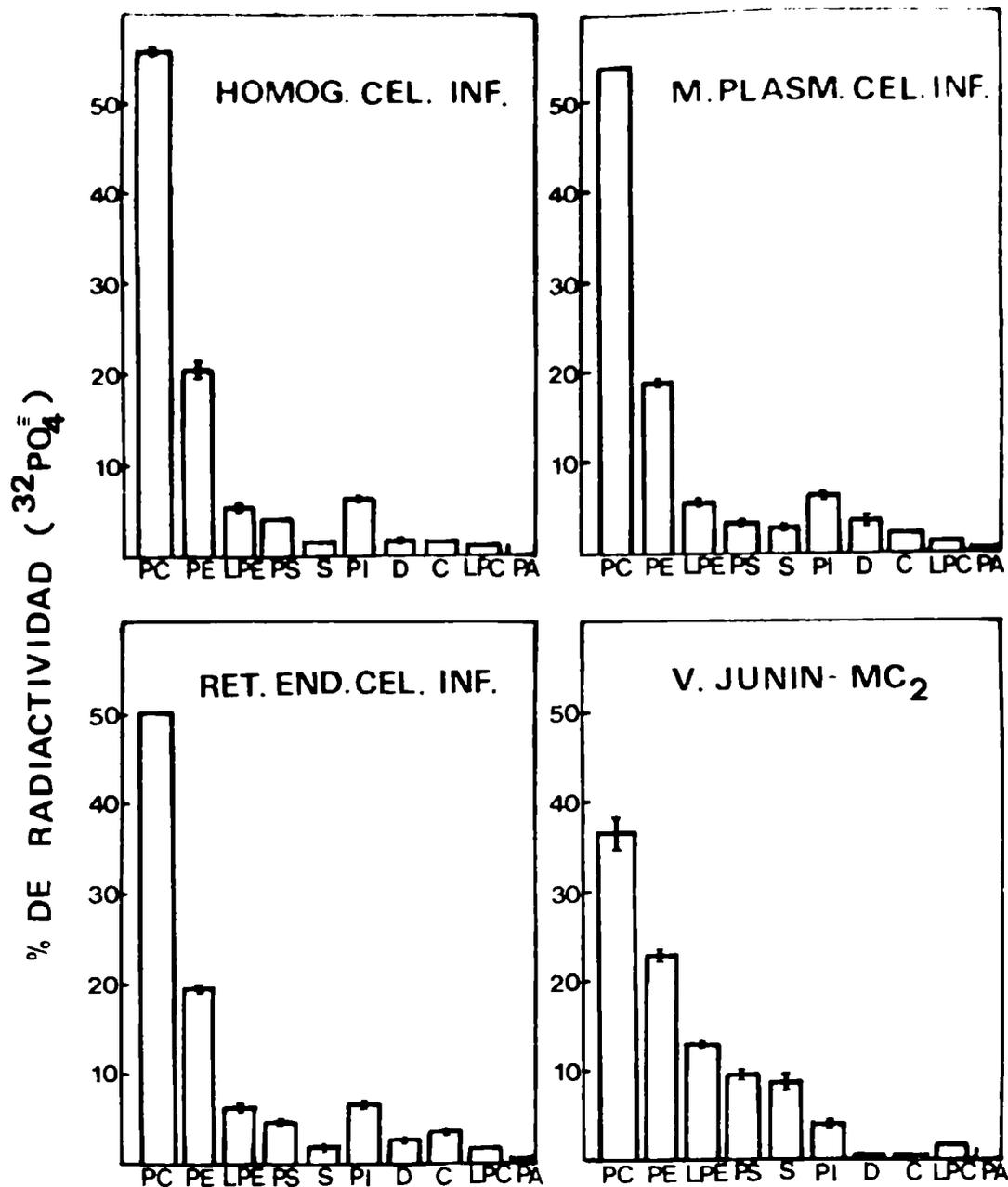


Figura 16: Composición fosfolipídica de las distintas fracciones de las células BHK-21(C-13) infectadas con la cepa MC₂ del virus Junín.

La membrana plasmática (M.PLASM.) y el retículo endoplásmico (RET.END.) de las células infectadas con la cepa MC₂ del virus Junín se obtuvieron de acuerdo con el esquema de la Figura 11. El virus Junín (V.JUNIN-MC₂) se purificó y de acuerdo con el esquema de la Figura 3 las células enteras infectadas con la cepa MC₂ del virus Junín (HOMOG.CEL.INF.) se lavaron y concentraron. A cada uno de estos materiales se les extrajeron sus lípidos mediante el método de Folch. Sus fosfolípidos se analizaron por cromatografía bidimensional en capa fina. Las manchas conteniendo cada especie fueron raspadas de la cromatoplaque correspondiente y puestas en viales conteniendo tolueno-omnifluor. La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido. Se estableció la proporción de las especies fosfolipídicas en cada placa, calculando el porcentaje de radiactividad que las mismas poseían respecto al total de marca recuperada. Se promediaron los valores obtenidos para cada especie fosfolipídica de cada material en cada preparación. La media de dichos promedios son los datos representados en esta figura. Para las fracciones celulares se computaron todos los datos de la Tabla V y para el caso de los virus y homogenado celular todos los datos de la Tabla I. Las barras indican el error estándar. Los símbolos de las abscisas representan a los distintos fosfolípidos.

proporción en el virus.

Por haber efectuado los ensayos en paralelo, podemos comparar los datos representados en la figura para membrana plasmática y retículo endoplásmico. En la Figura 16 se observa que estas fracciones poseen diferente composición fosfolipídica. Al efectuar el análisis estadístico tanto con los datos de la preparación 9 como con los de la 10 se encontró que la membrana plasmática posee una proporción significativamente mayor ($P \leq 0,005$) de PC que en retículo endoplásmico, en tanto que la proporción de PS en la misma es menor ($P \leq 0,005$) que la del retículo endoplásmico. Para el resto de las especies no existen motivos para pensar que sus proporciones son diferentes en la membrana plasmática y el retículo endoplásmico.

Esto nos estaría indicando que la infección con el virus Junín altera totalmente la relación que existe entre la proporción de los distintos fosfolípidos de la membrana plasmática y el retículo endoplásmico en la célula huésped.

Es importante aclarar que mediante el test de Student comprobamos que las fracciones retículo endoplásmico de los preparados 9 y 10 pertenecían a la misma población, y lo mismo ocurría con las fracciones membrana plasmática de dichos preparados. Evidentemente, no se detecta "efecto preparado". Sin embargo, para afirmar fehacientemente que esto último es cierto, deberíamos extender los estudios a otras preparaciones.

R.5.1.3. Relación entre la composición fosfolipídica de las membranas de células infectadas y de las de células no infectadas

Como vimos (R.5.1.2.) la infección viral modifica la relación de fosfolípidos entre la membrana plasmática y el

retículo endoplásmico celular. Ahora bien, esa alteración ¿a qué se debe?, a una modificación en la composición fosfolipídica del retículo endoplásmico, de la membrana plasmática o de ambas.

Para resolver esta pregunta deberíamos comparar estadísticamente la composición fosfolipídica de la membrana plasmática de células infectadas y células no infectadas y el retículo endoplásmico de una con el de la otra. Pero los datos presentados pertenecen a preparaciones diferentes, por lo que de acuerdo a lo expuesto (R.2.2.1) tal comparación no se puede hacer. Por otro lado, como ya se vio (R.5.1.1.1) es imposible preparar en paralelo membranas de células infectadas y falsamente infectadas.

Sin embargo, la observación de las figuras 15 y 16 nos indicaría que los fosfolípidos del retículo endoplásmico de las células infectadas no se mostrarían en proporciones muy diferentes a las que tal membrana posee en las células control.

Por otro lado, las proporciones de algunos fosfolípidos en la membrana plasmática de la célula infectada se muestran muy diferentes (más del 25%) que las que presenta esta fracción en las células control. Tal diferencia muy difícilmente se pueda deber a un efecto de la preparación. Por ello se concluye que es altamente probable que la infección viral provoque alteraciones en la composición fosfolipídica de la membrana plasmática.

Sin embargo, los cambios que se producen en esta última fracción, aunque grandes, no serían suficientes para provocar una alteración en la composición fosfolipídica de la célula entera (R.2.2.2), pues la proporción de membranas plasmáticas respecto al total de las membranas celulares es muy baja.

La posible alteración de los fosfolípidos de la membrana plasmática celular por la infección viral se presentaría como un hecho interesante, pues si bien en la literatura en general sólo se indica la composición fosfolipídica de los distintos virus estudiados y la membrana plasmática de la célula huésped no infectada, los pocos trabajos que informan la composición fosfolipídica de la membrana plasmática de células infectadas muestran que la misma no se alteraría por la infección con aquellos virus (Renkonen y col., 1971; Maldonado y Blough, 1980; Guigley y col., 1972b).

Sin embargo, Maldonado y Blough (1980) encontraron que aunque la proporción de los distintos fosfolípidos no se modifica, sí se modificaría la cadena de ácidos grasos que los componen cuando la célula es infectada. Con ello los autores explican el cambio de fluidez que las membranas experimentan por la infección viral. Otros autores encontraron cambios en la proporción de los glicolípidos pero no en los fosfolípidos (Buck y col., 1970).

No hemos encontrado datos en la bibliografía que indiquen qué sucede con la composición fosfolipídica del retículo endoplásmico con las infecciones virales.

R.5.2. RELACION ENTRE LA COMPOSICION FOSFOLIPIDICA DEL VIRUS JUNIN CON LAS MEMBRANAS DE LAS CELULAS HUESPEDES Y DE LOS CONTROLES NO INFECTADOS

Para poder comparar la composición fosfolipídica que poseen los virus con las diferentes fracciones de las células huéspedes y de las células control, se deberían haber obtenido

los fosfolípidos de todos los materiales en la misma preparación. Como vimos (R.5.1.1.1.), en nuestras condiciones de trabajo esto no se puede realizar.

Sin embargo, en la preparación 9 se estudiaron paralelamente los fosfolípidos de la membrana plasmática, retículo endoplásmico de células infectadas con el virus Junín cepa MC₂ y los de los virus crecidos en ellas.

El medio sobrenadante del cultivo de células infectadas poseía un título en UFP/ml semejante al que se obtenía cuando se estudiaban los fosfolípidos virales. La composición fosfolipídica hallada para el virus fue semejante al promedio de las determinaciones anteriores y se consigna en la Tabla I. Esto nos permite comparar, aunque no mediante técnicas estadísticas, la proporción de los diferentes fosfolípidos del virus y de las membranas de la célula huésped. Los datos de la Figura 16 muestran que la composición fosfolipídica del virus no es semejante a la de la membrana plasmática ni a la del retículo endoplásmico de las células huéspedes.

De la observación de las figuras 15 y 16 se deduce que las diferencias halladas entre la proporción de los fosfolípidos del virus y del retículo endoplásmico de las células no infectadas son muy grandes como para poder ser explicadas por efecto de la preparación. Por otro lado, ya se demostró (R.2.2.2.) que el virus posee una composición fosfolipídica diferente de la de las células enteras infectadas o falsamente infectadas. Esto no parece ocurrir cuando se compara el virus con la membrana plasmática de las células control, la composición fosfolipídica del virus sería semejante a la de estas membranas.

Sin embargo, el virus parecería tener menor proporción

de PC y mayor de PE, Sph y PS que la membrana plasmática de las células control. La misma relación parece tener el SFV con la membrana plasmática de las células huéspedes (Renkonen y col., 1971; Richardson y Vace, 1976). Lo mismo ocurriría con el virus del sarcoma de Rous (Guigley y col., 1972b), el virus de la parainfluenza (Klenk y Choppin, 1969), el de la stomatitis vesicular (Mc Sharry y col., 1971), el Unkuniemi (Renkonen y col., 1972b) y el virus Sindbis (Hirschberg y Robbins, 1974).

C O M E N T A R I O S

E

I N T E R P R E T A C I O N

COMENTARIOS E INTERPRETACION

Son muchos los trabajos que se han realizado y se están realizando para estudiar los cambios en la superficie celular producidos por los virus o los compuestos químicos, muchos de ellos carcinógenos. Se ha documentado que muchas variaciones en los constituyentes o las propiedades de las membranas plasmáticas celulares acompañan a las modificaciones estructurales o funcionales de las células; alteración en el transporte de glucosa (Hatanaka y Hanafusa, 1970), en el transporte de cationes (Egberts y col., 1977; Garry y col., 1979a, 1979b; Nair y col., 1979, 1981; Carrasco y Esteban, 1982), en la composición de glicolípidos (Buck y col., 1970), en glicopéptidos (Hakomori y col., 1971). El significado de estos determinantes potenciales de las alteraciones celulares responsables de diferentes patologías aún es incierto.

En el caso de las infecciones con algunos virus, después de muchas investigaciones destinadas a conocer la morfogénesis viral y la interacción virus/célula se pudieron dilucidar algunos aspectos de la patogenia que los mismos desarrollan en el huésped; inhibición de la síntesis de proteínas (Carrasco, 1981; Carrasco y Esteban, 1982; Carrasco y Smith, 1976; Imprain y col., 1980); lesiones semejantes a la aterosclerosis (Fabricant y col., 1978). El esclarecimiento de estos fenómenos implica la necesidad de comparar los componentes bioquímicos de las diferentes fracciones de las células normales y modificadas con los del virus.

Los fosfolípidos y el colesterol constituyen una gran proporción de la masa seca de las membranas plasmáticas celulares (Weinstein y col., 1969). Su estudio ayuda a determinar muchas de las propiedades físicas y funcionales de las membranas. Así, trabajos realizados en otros laboratorios destinados al estudio de los fosfolípidos de los virus y células huéspedes, apoyados por las observaciones realizadas al microscopio electrónico, han

demostrado que la mayoría de los virus animales con envoltura surgen de las células huéspedes por brotación a través de las membranas plasmáticas celulares, y su composición fosfolipídica refleja la de esta membrana (Introducción).

En dicho proceso estos virus se llevarían los lípidos, fundamentalmente fosfolípidos y colesterol de dichas membranas, no así sus proteínas pues en la partícula viral se hallan 2 - 3 o a la sumo 6 especies de proteínas distintas y no las 15 o más que se encuentran en la membrana plasmática de las células en cultivos (Renkonen y col., 1971).

Estudios de microscopía electrónica mostrarían arenavirus brotando principalmente de la membrana plasmática celular, y en muy escasa cantidad, del retículo endoplásmico (Lascano y Berría, 1969, 1971, 1974, 1977; Murphy y col., 1970, 1975). Por otro lado, existen datos que indican la existencia de antígenos virales, constituidos por las proteínas glicosiladas, unidos a la membrana plasmática de células infectadas con virus Junín (Martínez Peralta y col., 1979c).

Todo esto hizo suponer a los distintos investigadores que los arenavirus completarían su ciclo adquiriendo la envoltura por brotación a través de la membrana plasmática celular. Sin embargo, también se han visto proteínas de rotavirus (Soler y col., 1982), del virus SV40 (Maul y col., 1978) y del virus del polioma (Griffith y Consigli, 1984) que son virus no envueltos, asociadas a la membrana plasmática celular. Además, como ya vimos, muchos coronavirus se ven asociados a la membrana plasmática celular y, sin embargo, estos virus adquirirían su envoltura en el complejo de Golgi (Oshiro, 1973). Este hecho suscitaba el interrogante de si realmente la envoltura viral se formaba a partir de los elementos de la membrana plasmática celular.

Se sabía que cada uno de los arenavirus tiene sus propias proteínas características. Las pertenecientes a cada miembro de

la familia son semejantes aunque no iguales a las que constituyen a los otros (Buchmeier y col., 1978; Ramos y col., 1972; Vezza y col., 1977; Gard y col., 1977; Martínez Segovia y De Mitri, 1977; Romanowski, 1981).

Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo muestran que los distintos arenavirus estudiados poseen la misma composición fosfolipídica. Esta composición sería semejante aunque no exactamente igual a la de la membrana plasmática celular, es muy diferente a la de las células enteras y también lo sería respecto a la del retículo endoplásmico de las mismas. Además, la composición fosfolipídica de los arenavirus es muy similar a la hallada por otros autores para el togavirus SFV y el bunyavirus Unkuniemi, cuando son cultivados en la misma línea celular (Renkonen y col., 1971, 1972b).

Por otro lado, la infección viral provocaría una gran alteración en la composición fosfolipídica de la membranas plasmática celular, pero no en la del retículo endoplásmico ni en la de las células enteras.

Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis que plantea que los arenavirus, como otros virus, formarían su envoltura con proteínas propias y fosfolípidos de la membrana plasmática celular que arrastrarían al brotar.

No obstante, el hecho de que los arenavirus, al igual que otros virus, posean una composición fosfolipídica similar a la de la membrana plasmática de las células huéspedes no infectadas, pero no exactamente igual, descarta la idea de que la maduración a través de dicha membrana ocurra al azar. Las diferencias halladas radican en que los arenavirus poseen menor proporción de PC y mayor de PS, Sph y LPE que la membrana plasmática celular, algo semejante a lo que ocurre con otros virus (Klenk y Choppin, 1969; Quigley y col., 1972b; Renkonen y col., 1971). Esto indicaría que los arenavirus brotan a través de zonas específicas de

la membrana plasmática celular, con una composición fosfolipídica diferente a la composición fosfolipídica promedio.

Para explicar este fenómeno, cuando se observó en los otros virus, por los autores citados en el párrafo anterior, se plantearon varias hipótesis. Una de ellas plantea la posibilidad de que fueran las propiedades físicas y químicas de las proteínas virales las que pudieran causar un reordenamiento en la membrana plasmática celular. Este reordenamiento implicaría la eliminación de proteínas celulares y la inserción de las virales, alrededor de las cuales se ordenarían determinados tipos de fosfolípidos formando así los "parches" por los que la capsida viral tendría afinidad y que serían los encargados de formarle la envoltura.

Nuestros resultados muestran que la actividad de la enzima marcadora de la membrana plasmática ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) no se altera por la infección viral. Esto indicaría que es muy poco probable que el virus indujera un reordenamiento de las proteínas de dicha membrana.

Otra hipótesis basaba su explicación en la heterogeneidad de la membrana plasmática celular; así se supone que la membrana posee "parches" de bicapas lipídicas, carentes de proteínas y con una composición fosfolipídica ligeramente diferente de la composición fosfolipídica promedio (Coleman y col., 1970) las proteínas de la envoltura viral tendrían afinidad por esos "parches".

Esta hipótesis explicaría las pequeñas diferencias halladas entre la composición fosfolipídica de los virus y membrana plasmática celular, y el hecho de que pese a que la composición fosfolipídica de la membrana plasmática de la célula huésped se modifique con la infección viral, la actividad de las enzimas marcadoras, no se vea alterada.

Sin embargo, por los conocimientos actuales no debería pensarse en estos "parches" como sitios estáticos en la membrana. Ya desde 1971 existen trabajos y en la actualidad hay grandes

evidencias que sugieren que las proteínas y los lípidos están en la membrana plasmática de las células normales, intactas, en un estado fluido (Singer y Nicolson, 1972), pudiendo existir difusión lateral de estos lípidos y proteínas (Kornberg y Mc Connell, 1971).

Si la brotación de los virus ocurre a través de una membrana biológica fluida y dinámica, las nucleocápsides y proteínas de la envoltura viral podrían seleccionar áreas de esa superficie que podrían tener fácilmente, en un instante determinado, una composición fosfolipídica diferente de la composición fosfolipídica promedio y además, en el momento de la brotación, estas áreas "parches" carecerían espontáneamente de proteínas celulares. Así, al brotar, el virus llevaría mayor cantidad de ciertos lípidos y menor de otros, por ello su composición fosfolipídica sería diferente de la composición fosfolipídica promedio de la membrana plasmática la que a su vez quedaría alterada por la infección viral. Sin embargo, el virus no se vería obligado a modificar la cantidad ni la estructuración de las proteínas celulares, en la membrana plasmática fluida para insertar sus propias proteínas. Esto explicaría por qué la actividad de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) no se haya modificado por la presencia del virus. Pues, aunque la enzima necesite de un entorno lipídico característico para desarrollar su actividad (Graham, 1972), lo que se modifica es la composición fosfolipídica total de la membrana lo cual no implica que la zona que rodea a esta u otras proteínas celulares en la estructura dinámica deba alterarse.

Esta interpretación que por lo visto parece explicar correctamente los datos experimentales obtenidos, se representa en la Figura 17.

La selección de determinados "parches" con una composición fosfolipídica característica en esa estructura fluida puede deberse no solamente a una interacción específica de las proteínas

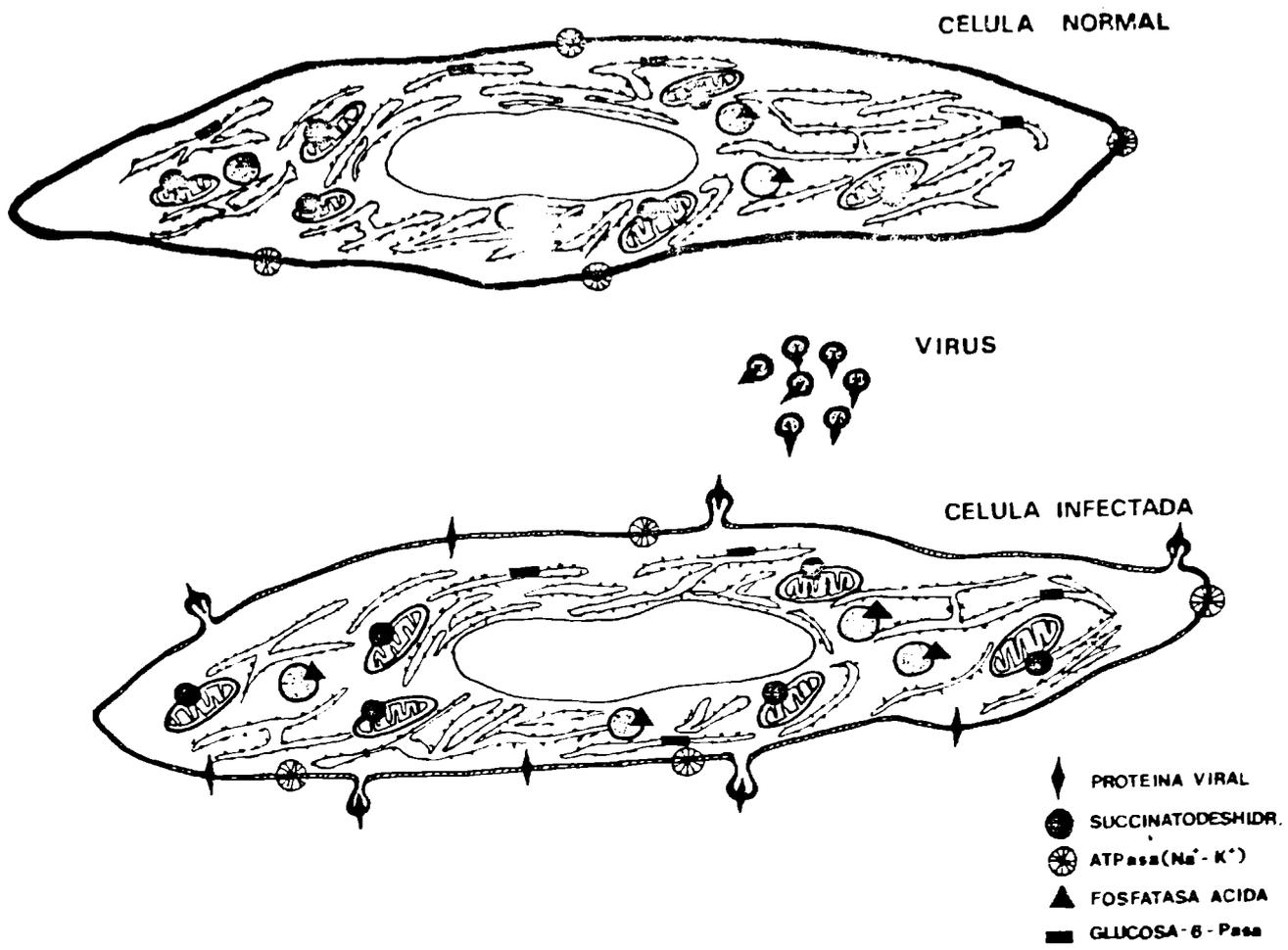


Figura 17: Interpretación del mecanismo probablemente utilizado por el virus Junín al surgir de los cultivos celulares.

virales con determinados lípidos sino más bien al requerimiento por parte de la nucleocápside viral de una zona de la membrana plasmática celular con una diferencia local en las propiedades físicas, tal como tensión superficial, para permitir la maduración del virión (Quigley y col., 1972b).

El radio de curvatura de los virus es muy distinto al de las células; para que la envoltura se adapte a la misma, los virus seguramente necesitan una composición lipídica algo diferente de la de la membrana plasmática celular (Quigley y col., 1972b). Esto podría explicar cómo virus de muy diferentes familias, arenaviridae, togaviridae, bunyaviridae, etcétera, pueden llegar a tener composición fosfolipídica semejante al ser cultivados en una línea celular determinada sin que esta composición sea exactamente igual a la de la membrana de la cual brotan.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los arenavirus Junín —cepas MC₂ y XJCl₃—, Tacaribe y pichindé, crecidos en células BHK-21(C-13) en cultivo, poseen todos la misma composición fosfolipídica.
2. Los arenavirus Junín, Tacaribe y Pichindé, crecidos en células BHK-21(C-13) en cultivo, poseerían una composición fosfolipídica semejante, aunque no igual a la de la membrana plasmática de estas células cuando no han sido infectadas.
3. La composición fosfolipídica de los arenavirus Junín, Tacaribe y Pichindé, crecidos en células BHK-21(C-13), sería diferente de la composición fosfolipídica de las membranas plasmáticas de estas células cuando ellas han sido infectadas con estos arenavirus.
4. Los arenavirus Junín, Tacaribe y Pichindé crecidos en células BHK-21(C-13) presentan una composición fosfolipídica semejante a la que otros autores encuentran para virus de otras familias crecidos en la misma línea y clon celular.
5. La composición fosfolipídica de los arenavirus Junín, Pichindé y Tacaribe crecidos en células BHK-21(C-13) es diferente de la composición fosfolipídica de las células BHK-21(C-13) enteras, infectadas con estos arenavirus o falsamente infectadas.
6. La composición fosfolipídica de los arenavirus Junín, Tacaribe y Pichindé crecidos en células BHK-21(C-13) sería diferente de la composición fosfolipídica del retículo endoplásmico de las células BHK-21(C-13), no infectadas o infectadas con arenavirus.

7. La composición fosfolipídica de la membrana plasmática de las células BHK-21(C-13) se vería totalmente modificada por la infección de estas células con el virus Junín.
8. La composición fosfolipídica del retículo endoplásmico de las células BHK-21(C-13) no se modificaría por la infección de estas células con el virus Junín.
9. La composición fosfolipídica de las células BHK-21(C-13) enteras no se altera cuando estas células se infectan con el virus Junín, el virus Tacaribe o el virus Pichindé.
10. La actividad de la enzima ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$), marcadora de la membrana plasmática celular, no se altera en las células BHK-21(C-13) cuando ellas se infectan con el virus Junín.

Estos resultados se interpretan con el esquema de la Figura 17. Ellos apoyarían la hipótesis que plantea que los arenavirus brotan a través de "parches" de la membrana plasmática celular. Estos se formarían como consecuencia de las características dinámicas de dicha membrana y estarían constituidos por lugares carentes de proteínas celulares y con una composición lipídica diferente de la composición fosfolipídica promedio de esta fracción celular. Las proteínas tendrían afinidad por estos "parches".



B I B L I O G R A F I A

- Abelson, H.T.; Smith, G.H.; Hoffman, H.A. and Rowe, P.W. (1969). Use of enzyme-labelled antibody for electron microscope localization of LCM virus antigens in infected cell cultures. *J. Natl. Cancer Inst.* 42, 497-515.
- Abodeely, R.A.; Palmer, E.; Lawson, L.A. and Randall, C.C. (1971). The proteins of enveloped and de-enveloped equine (herpes) virus and the separated enveloped. *Virology* 44, 146-152.
- Adams, R.H. and Brown, D.T. (1982) Inhibition of Sindbis virus maturation after treatment of infected cells with trypsin. *J. Virol.* 41, 692-702.
- Altstiel, L.D. and Landsberger, F.R. (1981a) Lipid-protein interactions between the surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus and the lipid bilayer. *Virology* 115, 1-9.
- Altstiel, L.D. and Landsberger, F.R. (1981b) Structural changes in BHK cell plasma membrane caused by the binding of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 39, 82-86.
- Anderson, R. and Dales, S. (1978) Biogenesis of poxviruses, glycolipid metabolism in vaccinia-infected cells. *Virology* 84, 108-112.
- Anderton, P.; Wild, T.F. and Zwingelstein, G. (1982) Phospholipids in a measles virus persistent infection: modification of fatty acid metabolism and fatty acid composition of released viruses. *J. Gen. Virol.* 62, 249-258.
- Añón, M.C.; Grau, O.; Martínez Segovia, Z. and Franzenández, M.T. (1976). RNA composition of Junin virus. *J. Virol.* 18, 833-838.
- Appelmans, F. and de Duve, C. (1955a) Further observations on the binding of acid phosphatase by rat-liver particles. *Biochem. J.* 59, 426-433.
- Appelmans, F.; Wattiaux, R. and de Duve, C. (1955b) The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. *Biochem. J.* 59, 438-445.

- Armstrong, C. and Lillie, R.D. (1934) Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. Public Health Rep. 49, 1019-1027.
- Arribalzaga, R.A. (1955) Una nueva enfermedad epidémica a germen desconocido: hipertermia nefrotóxica, leucopenia y enantémica. Día Médico 27, 1204-1210.
- Arrigoni, O. and Singer, T. (1962) Limitations of the phenazine methasulphate assay for succinic and related dehydrogenases. Nature 193, 1256-1258.
- Auperin, D.D.; Romanowski, V.; Galinski, M. and Bishop, D.H.L. (1984) Novel coding strategy of arenaviruses and ambisense viral S RNA. J. Virol. (en prensa).
- Avruch, J. and Wallach, D.F.H. (1971) Biochim. Biophys. Acta 233, 334-347.
- Bächli, T.; Gerhard, W.; Lindenmann, J. and Mühlethaler, K. (1969) Morphogenesis of influenza A virus in Ehrlich ascites tumor cells as revealed by thin-sectioning and freeze-etching. J. Virol. 4, 769-772.
- Bartlett, G.R. (1959) Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem. 234, 466-468.
- Ben Porat, T. and Kaplan, A.S. (1971) Phospholipid metabolism of herpesvirus - infected and uninfected rabbit kidney cells. Virology 45, 252-259.
- Ben Porat, T. and Kaplan, A.S. (1972) Studies on the biogenesis of herpesvirus envelope. Nature (London) 235, 165
- Bibor-Hardy, V.; Suh, M.; Ponchelet, M. and Simard, R. (1982) Modification of the nuclear envelope of BHK cells after infection with herpes simplex virus type 1. J. Gen. Virol. 63, 81-94.
- Blenkarn, J.I. and Apostolov, K. (1981) The correlation of fatty acid content of infected cells and virions with Newcastle disease virus (NDV) virulence. J. Gen. Virol. 52, 355-358.

- Blough, H.A. and Tiffany, J.M. (1973) Lipids in viruses. *Adv. Lipid Res.* 11, 267-271.
- Blough, H.A. (1974) Newly synthesized lipids incorporated into influenza virus membranes. *Nature (London)* 251, 333-335.
- Blough, H.A.; Tiffany, J.M. and Aaslestad, A.G. (1977) Lipids of rabies virus and BHK-21 cell membranes. *J. Virol.* 21, 950-955.
- John, W.; Rutter, G.; Hohenberg, H. and Manweiler, K. (1983) Inhibition of measles virus budding by phenothiazines. *Virology* 130, 44-55.
- Bosmann, H.B.; Hagopian, A. and Eylar, E.H. (1968) Cellular membranes: the isolation and characterization of the plasma and smooth membranes of HeLa cells. *Arch. Biochem.* 128, 51-69.
- Boveris, A.; Cárdenas, E. and Stoppani, O.M. (1976) Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 156, 435-444.
- Bowen, H.A. and Lyles, D.S. (1981) Structure of Sendai viral proteins in plasma membranes of virus-infected cells. *J. Virol.* 37, 1079-1082.
- Brandford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brotherus, J. and Renkonen, O. (1977) Subcellular distribution of lipids in cultured BHK cell: evidence for the enrichment of lysobisphosphatic acid. *J. Lipid Res.* 18, 191-201.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1980) Multivalent feed back regulation HMG CoA reductase a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J. Lipid Res.* 21, 505-517.
- Browning, D.R. (1971) *Cromatografía (Toray-Masson S.A.)* Barcelona.
- Breese, S.S. and De Boer, C.J. (1966) Electron microscope observation of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology* 28, 420-428.

- Buchmeier, M.J.; Elder, J.H. and Oldstone, M.B.A. (1978) Protein structure of LCM virus: identification of the virus structural and cell associated polypeptides. *Virology* 89, 133-145.
- Buchmeier, M.J.; Welsh, R.M.; Dutko, F.J. and Oldstone, M.B.A. (1980) The virology and immunobiology of Lymphocyt Choriomeningitis Virus infectios. *Adv. Immunol.* 30, 275-331.
- Buck, C.A.; Glick, M.C. and Warren, L. (1970) A comparative study of glycoproteins from the surface of control and Rous Sarcoma Virus transformed hamster cells. *Biochemistry* 9, 1567-1576.
- Buckley, S.M. and J. Casals (1970) Lassa fever, a new disease of man from West Africa. III. Isolation and characterization of the virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19, 680-691.
- Bücke, M. and Bäche, T. (1982) Microscopy of internal structures of Sendai Virus associated with the cytoplasmic surface of host membranes. *Virology* 120, 349-359.
- Buttke, T.M. and Gafford, L.G. (1982) Effects of Fowlpox Virus infection on lipid metabolism in culture chicken embryo cells. *J. Virol.* 43, 749-752.
- Calisher, C.H.; Tzianabos, T.; Lord, R.D. and Coleman, P.H. (1970) Tamiami Virus, a new member of the Tacaribe group. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19, 520-536.
- Carrasco, L. and Smith, A.E. (1976) Sodium ions and the shut off host cell protein synthesis by picornaviruses. *Nature (London)* 264, 807-809.
- Carrasco, L. (1981) Modification of membrane permeability induced by animal viruses early in infection. *Virology* 113, 623-629.
- Carrasco, L. and Esteban, M. (1982) Modification of membrane permeability in Vaccinia Virus-infected cells. *Virology* 117, 62-69.
- Carrascosa, J.L.; Carazo, A.L.; Carrascosa, A.L.; García, N.; Santisteban, A. and Viñuela, E. (1984) General morphology and capsid. Fine structure of African swine fever virus particles. *Virology* (en prensa).

- Carter, M.F.; Biswal, N. and Rawls, W.E. (1973) Characterization of nucleic acids of Pichinde virus. *J. Virol.* 11, 61-68.
- Carter, M.F.; Biswal, N. and Rawls, W.E. (1974). Polymerase activity of Pichinde virus. *J. Virol.* 13, 577-583.
- Casals, J.; Buckley, S.M.; Cedeno, R. (1975) Antigenic properties of the arenaviruses. *Bull. WHO* 52, 421-427.
- Choppin, P.W.; Klenk, H.D.; Compans, R.W. and Caligniri, L.A. (1971) The parainfluenza virus SU5 and its relationship to the cell membrane. En: "Perspectives in Virology" Vol. VII (M. Pollard ed.) 127-156. Academic Press, New York.
- Christie, W.W. (1973) "Lipids analysis", Pergamon Press, primera edición.
- Coleman, R.; Finean, J.B.; Knutton, S. and Limbrick, A.R. (1970) A structural study of the modification of erythrocyte ghosts by phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta* 219, 81-92.
- Compans, R.W.; Holmes, K.V.; Dales, S. and Choppin, P.W. (1966) An electron microscopic study of moderate and virulent virus-cell interactions of the parainfluenza virus SV5. *Virology* 30, 411-416.
- Compans, R.W. and Dimmock, N.J. (1969) An electron microscopic study of single cycle infection of chick embryo fibroblasts by influenza virus. *Virology* 39, 499-503.
- Compans, R.W. and Klenk, H.D. (1979) Viral membranes, "Comprehensive Virology", Vol. XIII (Fraenkel-Conrat, H. and R.R. Wagner, eds.), Plenum Press, New York.
- Coombs, K.; Mann, E.; Edwards, J.; Brown, D. (1981) Effects of chloroquine and cytochalasin B on the infection of cells by Sinbis virus and vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 37, 1060-1065.
- Coto, C.; Zaharzewskij, L. y Parodi, A.S. (1965) Localización subcelular del virus Junín en el cerebro del ratón lactante. Estudio de infectividad. *Rev. Soc. Argent. Biol.* 41, 128-134.
- Coto, C.E. y Parodi, A.S. (1968) Purificación del virus Junín (Fiebre hemorrágica Argentina) a partir de cerebro de ratón infectado. *Rev. Soc. Argent. Biol.* 44, 77-84.

- Coto, C.E.; Vombergar, M.D. de, Tkaczewski, L.Z. (1970) Interacción del virus Junín con células de riñón de mono. Medicina (B. Aires) 30, Supl. 1, 38-44.
- Coto, C.E.; Help, G.L. and Tzaczewski, L.Z. (1972) Biological properties of Junin virus purified from infected mouse brain. Medicina (B. Aires) 32, 281-289.
- Daelli, M.G.; Coto, C.E. (1982) Efecto de dos inhibidores de la glicosilación sobre la replicación del virus Junín. XVIII Reunión Nacional de SAIB, trabajo N° 172.
- Dales, S. and Mosbach, E.H. (1968) Vaccinia as model for membrane biogenesis. Virology 35, 564-569.
- Damonte, E.B. y Coto, C.E. (1974) Análisis de los factores que condicionan la formación de placas en células Vero infectadas con los virus Junín y Tacaribe. Rev. Asoc. Arg. Microbiol. 6, 15-22.
- Darlington, R.W. and Moss, L.H. (1969) The envelope of herpes virus. Progr. Med. Virol. 11, 16-20.
- David-Ferreira, J.F. and Manaker, R.A. (1965) An electron microscope study of the development of a mouse hepatitis virus in tissue culture cells. J. Cell Biol. 24, 57-61.
- De Larco, J. and Todaro, G.J. (1976) Membrane receptors for murine leukemia viruses: characterization using purified viral envelope glycoprotein gp70. Cell 8, 365-371.
- Diringer, H. and Rott, R. (1976) Metabolism of preexisting lipids in baby hamster kidney cells during fusion from within, induced by Newcastle disease virus. Eur. J. Biochem. 65, 155-160.
- Douglas, V.F. and Baltimore, D. (1984) Liposome encapsulation of retrovirus allows efficient superinfection of resistant cell lines. J. Virol. 49, 269-272.
- Downs, W.G.; Andersen, C.R.; Spence, L.; Aitken, T.H.G. and Greenhall, A.H. (1963) Tacaribe virus, a new agent isolated from anti-basis bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 12, 640-646.

- Dulbecco, R. and Vogt, M. (1954) Plaque formation and isolation of pure lines of poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* 99, 167-182.
- Dutko, F.Y.; Kennedy, S.I.T. and Oldstone, M.B. (1981) Genome structure of lymphocytic choriomeningitis virus: complementary termini? en: "The replication of negative strand viruses" (D.H.L. Bishop and R.W. Compans, eds.) pp 43-49, Elsevier, New York.
- Egberts, E.; Hackett, P.B. and Traub, P. (1977) Alteration of the intracellular energetic and ionic condition by mengovirus infection of Ehrlich ascities tumor cells and its influence on protein synthesis in the midphase of infection. *J. Virol.* 22, 591-597.
- Els, H.J. and Lecatsas, G. (1972) Morphological studies on Simian virus SA11 and the 'related' O agent. *J. Gen. Virol.* 17, 129-132.
- Emmelot, P.; Bos, C.J.; Benedetti, E.L. and Rünke, P.H. (1964) Studies on plasma membranes. Chemical composition and enzyme content of plasma membrane isolated from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 90, 126-145.
- Epstein, M.A. (1962) Observations on the fine structure of mature herpes simplex virus and on the composition of its nucleoid. *J. Exp. Med.* 115, 1-7.
- Erwin, C. and Brown, D. (1983) Requirement of cell nucleus for Sindbis virus replication in culture *Aedes Albopictus* cells. *J. Virol.* 45, 792-799.
- Estes, M.K.; Graham, D.Y.; Smith, E.M. and Gerba, G.P. (1979) Rotavirus. Stability and inactivation. *J. Gen. Virol.* 43, 403-409.
- Evans, W.H. (1980) Preparation and characterization of mammalian plasma membranes. En: "Laboratory Techniques" (Work, E. and Work, T. S., Eds.).
- Eylar, E.H. and Hagopian, A. (1971) Isolation of plasma membranes from mammalian cells. *Methods Enzymol.* Vol. XXIII, 123-130.
- Fabricant, C.G.; Krook, L. and Gillespie, J.H. (1973) Virus Induced cholesterol crystal. *Science* 181, 561-567.

- Fabricant, C.G.; Fabricant, J.; Litrenta, M.M. and Minick, C.R. (1978) Virus induced atherosclerosis. *J. Exp. Med.* 148, 335-340.
- Farber, F.E. and Rawls, W.E. (1975) Isolation of ribosome-like structure from Pichinde virus. *J. Gen. Virol.* 26, 21-31.
- Farquhar, M.G.; Bergeron, J.J.M. and Palade, G.E. (1974) Cytochemistry of Golgi fractions prepared from rat liver. *J. Cell Biol.* 60, 8-25.
- Fiske, C.H. and Subarrow, Y. (1925) Characterization of phosphorus compounds by acid lability. *J. Biol. Chem.* 66, 375-379.
- Folch, J.; Lees, M. and Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Fong, B.S.; Hunt, R.C. and Brown, J.C. (1976) Asymmetric distribution of phatidylethanolamine in the membrane of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 20, 658-661.
- Fong, C.K.Y.; Tenser, R.B.; Hsiung, G.D. and Gross, P.A. (1973) Ultrastructural studies of the envelopment and release of guinea pig herpes-like virus in cultured cells. *Virology* 52, 468-475.
- Francoeur, A.M. and Stanners, C.P. (1978) Evidence against the role of K^+ in the shut-off of protein synthesis by vesicular stomatitis virus. *J. Gen. Virol.* 39, 551-554.
- Franze-Fernández, M.T.; López, R.; Iapalucci-Espinoza, S. and Salomón, . (1984) Diferencial interaction of Tacaribe virus with BHK21 and Vero cells. IV Pan American Biochemistry Congress, Communication 67.
- Gahnberg, C.G. and Simons, K. (1970) Isolation of plasma membrane fragments from BHK-21 cells. *Acta Path. Microbiol. Section B*, 73, 176-182.
- Gallaher, W.R. and Blough, H. (1975) Synthesis and turnover of lipids in monolayer cultures of BHK21 cells. *Arch. Bioch. and Biophys.* 168, 104-114.

- Gallick, G.E. and Arlinghans, R.B. (1984) Incorporation of lipids into variants of moloney sarcoma virus which produced gag mos fusion proteins. *Virology* 133, 228-232.
- Gard, G.P.; Vezza, A.C.; Bichop, D.H.L. and Compans, R.W. (1977) Structural proteins of Tacaribe and Tamiami virions. *Virology* 83, 84-96.
- Garoff, H.; Simons, K. and Renkonen, O. (1974) Isolation and characterization of the membrane proteins of Semliki Forest virus. *Virology* 61, 493-496.
- Garry, R.F.; Westbrook, K. and Waite, M. (1979a) Differential effects of Ovabain on host and Sindbis virus specified protein synthesis. *Virology* 99, 179-182.
- Garry, R.F.; Bishop, J.M.; Parker, S.; Westbrook, K.; Lewis, G. and Waite, M.R.F. (1979b) Na⁺ and K⁺ concentrations and the regulation of protein synthesis in Sindbis virus-infected chick cells. *Virology* 96, 108-120.
- Genty, N. and Bussenau, F. (1980) Is cytoskeleton involved in vesicular stomatitis virus reproduction? *J. Virol.* 34, 777-781.
- Gianetto, R. and De Duve, C. (1955). Comparative study of the binding of acid phosphatase, β -glucuronidase and cathepsin by rat-liver particles. *Biochem. J.* 59, 433-438.
- Gliedman, J.B.; Smith, J.F. and Brown, D.T. (1975) Morphogenesis of Sindbis virus in cultured *Aedes albopictus* cells. *J. Virol.* 16, 913-919.
- Gotlib, L.J. (1982) Isolation of cell plasma membranes on micro carrier culture beads. *Biochimica et Biophysica Acta* 685, 21-26.
- Graham, J. (1972) Isolation and characterization of membranes from normal and transformed tissue-culture cells. *Biochem. J.* 130, 1113-1124.
- Grau, O. (1977) Los RNAs del virus Junín. *Ciencia e Investigación* 33, 305-309.

- Grau, O.; Franze-Fernández, M.T.; Romanowski, V.; Rustici, S.M. and Rosas, M.F. (1981) Junin virus structure. En; "The replication of negative strand viruses" (Bishop, D.H.L. and Compans, R.W. Eds.) Elsevier North Holland, New York, pp. 11-14.
- Gregoriades, A. (1980) Interaction of influenza M protein with viral lipid and phosphatidylcholine vesicles. *J. Virol.* 36, 470-479.
- Griffin, J.A.; Bosak, S. and Compans, R.W. (1983) Effects of hexose starvation and the role of sialic acid in influenza virus release. *Virology* 125, 324-334.
- Griffith, G.R. and Consigli, R.A. (1984) Isolation and characterization of monopinocytotic vesicles containing polyomavirus from the cytoplasm of infected mouse kidney cells. *J. Virol.* 50, 77-85.
- Guerrero, L.B. de; Weissenbacher, M.C. y Parodi, A.S. (1969) Inmunización contra la Fiebre Hemorrágica Argentina con una cepa atenuada del virus Junín. Inmunización de cobayos. *Medicina (B. Aires)* 29, 1-5.
- Hackstadt, T. and Mallavia, L.P. (1982) Sodium and potassium transport in herpes simplex virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 60, 199-207.
- Haines, H. and Baerwald, R.J. (1976) Nuclear membrane changes in herpes simplex virus-infected BHK-21 cells are seen by freeze-fracture. *J. Virol.* 17, 1038-1041.
- Hakomori, S.; Saito, T. and Vogt, P.K. (1971) Transformation of Rous sarcoma virus: effects structural glycolipids. *Virology* 44, 609-621.
- Hatanaka, M. and Hanafusa, H. (1970) Analysis of a functional change in membrane in the process of cell transformation by Rous sarcoma transport. *Virology* 41, 647-652.
- Helenius, A.; Karteubeck, J.; Simons, K. and Fories, E. (1980) On the entry of SFV into BHK-21 cells. *J. Cell Biol.* 84; 404-420.

- Help, G.I.; Coto, C.E. y Tkaczewski, L.Z. de (1970) Evaluación del método de purificación del virus Junín. Medicina (B. Aires) 30, 15-21.
- Henderson, I.C.; Lieber, M.M. and Todaro, G.J. (1974) Minck cell line Mv/Lu (CCL-64). Focus formation and generation of "non-produces" transformed cell lines with murine and feline sarcoma viruses. Virology 60, 282-287.
- Herzenberg, L.A. and Herzenberg, L.A. (1961) Association of H-2 antigens with the cell membrane fraction of mouse liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47, 762-767.
- Hirschberg, C.G. and Robbins, P.W. (1974) The glycolipids and phospholipids of Sindbis virus and their relation to the lipids of the host cell plasma membrane. Virology 61, 602-607.
- Hosaka, Y.; Yasuda, Y. and Fukai, K. (1983) Hemolysis by liposomes containing influenza virus hemoagglutinins. J. Virol. 46, 1014-1017.
- Howard, C.R. and Simpson, D.I.H. (1980) The biology of the arenaviruses. J. Gen. Virol. 51, 1-14.
- Huang, R.T.C.; Wahn, K.; Klenk, H.D. and Rott, R. (1980) Fusion between cell membrane and liposomes containing the glycoproteins of influenza virus. Virology 104, 294-302.
- Ichihashi, Y. and Oie, M. (1982) Functional differences between the external and protoplasmic surfaces of plasma membranes in activating vaccinia virus infectivity. Virology 122, 290-296.
- Ichihashi, Y. and Oie, M. (1983) The activation of vaccinia virus infectivity by the transfer of phosphatidylserine from the plasma membrane. Virology 130, 306-317.
- Imprain, C.C.; Foster, K.A.; Micklem, K.J. and Pasternak, C.A. (1980) Nature of virally mediated changes in membrane permeability to small molecules. Biochem. J. 186, 847-860.
- Johnson, D.C. and Spear, P.G. (1982) Moneusin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface and the egress of virions from infected cells. J. Virol. 43, 1102-1107.

- Johnson, K.M.; Wiebenga, N.H.; Mackenzie, R.B.; Kuns, M.L.; Tauraso, N.M.; Shelokov, A.; Webb, P.A.; Justines, G. and Beye, H.K. (1965) Viruses isolations from human cases of hemorrhagic fever in Bolivia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.)* 118, 113-118.
- Johnson, K.M.; Webb, P.A. and Justines, G. (1973) Biology of Tacaribe-complex viruses. En: "Lymphocytic choriomeningitis virus and other arenaviruses" (Lehmann-Grube, E. Ed.) pp. 241-258, Springer, Berlín.
- Kates, M.; Allison, A.C.; Tyrrell, D.A. and James, A.T. (1961) Lipids of influenza virus and their relation to those of the host cell. *Biochim. Biophys. Acta* 52, 455-462.
- Kelly, D.C. (1975) Frog virus 3 replication; electron microscope observations on the sequence of infection in chick embryo fibroblasts. *J. Gen. Virol.* 26, 71-81.
- Kiley, M.P.; Tomori, O.; Regnery, R.L. and Johnson, K.M. (1980) Characterization of the arenaviruses Lassa and Mozambique. *Replication of the Negative Stranded Viruses* (International meeting, Virgin Islands).
- Klenk, H. and Choppin, P.W. (1969) Lipids of membrane of monkey and hamster kidney cells and of parainfluenza virions grown in these cells. *Virology* 38, 255-268.
- Klenk, H.D. and Choppin, P.W. (1970) Plasma membrane lipids and parainfluenza virus assembly. *Virology* 40, 939-947.
- Kornberg, R.D. and Mc Connell, H.M. (1971) Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 2564-2568.
- Landsberger, F.R.; Compans, R.W.; Choppin, P.W. and Lenard, J. (1973) Organization of the lipid phase in viral membranes: Effects of independent variation of the lipid and the protein composition. *Biochemistry* 12, 4498-4501.

- Lascano, E.F. y Berría, M.I. (1969) Microscopía electrónica de cultivos primarios de fibroblastos de ratón inoculados con virus Junín. *Medicina (B. Aires)* 29, 487-492.
- Lascano, E.F. y Berría, M.I. (1971) Microscopía electrónica de virus Junín en cultivos primarios de riñón de conejo y riñón de hamster. *Medicina (B. Aires)* 31, 1-5.
- Lascano, E.F. and Berría, M.I. (1974) Ultrastructure of Junin virus in mouse whole brain and mouse brain tissue culture. *J. Virol.* 14, 965-974.
- Lascano, E.F. (1977) Microscopía electrónica del virus Junín. *Ciencia e Investigación (Bs. Aires)* 33, 283-289.
- Lascano, E.F.; Berría, M.I. and Martínez Segovia, Z.M. (1979) Arenavirus: controversial aspects of their fine structure. *Medicina (B. Aires)* 39, 218-222.
- Laver, W.G. and Valentine, R.C. (1969) Morphology of the isolated hemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus. *Virology* 38, 105-109.
- Lee, P.M.; Cherry, R.J. and Bächli, T. (1983) Correlation of rotational mobility and flexibility of Sendai virus spike glycoproteins with fusion activity. *Virology* 128, 65-76.
- Leung, W.C.; Ghosh, H.P. and Rawls, W.E. (1977) Strandedness of Pichinde virus RNA. *J. Virol.* 22, 235-237.
- Leung, W.C. (1978) Considerations of the replication of Pichinde virus. An arenavirus. En: "Negative strand viruses and the host cell" (Mahy, B.W.J. and Barry, R.D. Eds.) pp. 415-426, Academic Press, New York.
- Leung, W.C.; Leung, M.F.K.L. and Rawls, W.E. (1979) Distinctive RNA transcriptase, polyadenilic acid polymerase and polyuridilic acid polymerase activities associated with Pichinde virus. *J. Virol.* 30, 98-107.

- Leung, W.C.; Harnish, D.; Ramsingh, A.; Dimmock, K; and Rawls, W.E. (1981) Gene mapping in Pichinde virus. En: "The negative replication of negative strand viruses" (Bishop, D.H.L. and Compans, R.W. Eds.) pp. 51-57, Elsevier, New York.
- Lodish, H.F. and Porte, M. (1980) Heterogeneity of vesicular stomatitis virus particles. Implications for virion assembly. *J. Virol.* 33, 52-58.
- López, R.A.; Salomón, H.; Grau, O. and Franze-Fernández, M.T. (1983) Estudio de parámetros biológicos en la replicación de arenavirus. En: Primer Congreso Argentino de Virología. Comunicación 11.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.C. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Luukkonen, A.; Kääriäinen, L. and Renkonen, O. (1976) Phospholipids of Semliki Forest virus grown in cultured mosquito cells. *Biochim. Biophys. Acta* 450, 109-113.
- Lyles, D.S.; Randall, C.C. and White Jr., H.B. (1975) An alteration in the kinetic properties of a cholesterologenic enzyme in Folupax virus infection. *Virology* 66, 106-116.
- Lyles, D.S. and Landsberger, F.R. (1977) Sendai virus-induced hemolysis: Reduction in heterogeneity of erythrocyte lipid bilayer fluidity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1918-1922.
- Mac Pherson, I. and Stoker, M. (1962) Polyoma transformation of hamster cell clones. An investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16, 147-151.
- Maiztegui, J.I. (1975) Clinical and epidemiological patterns of Argentine hemorrhagic fever. *Bull. WHO* 52, 567-575.
- Maiztegui, J.I. y Sabattini, M.S. (1977) Extensión progresiva del área endémica de fiebre hemorrágica argentina. *Medicina (B. Aires)* 37, Supl. 3, 162-166.

- Makita, A. and Seyama, Y. (1971) Alterations of forssman-antigenic reactivity and of monosaccharide composition in plasma membrane from polyoma transformed hamster cells. *Biochim. Biophys. Acta* 241, 403-411.
- Maldonado, R.L. and Blough, H.A. (1980) A comparative study of the lipids of plasma membranes of normal cells and those infected and transformed by Rous sarcoma virus. *Virology* 102, 62-70.
- Martínez Peralta, L.; Cossio, P.M.; Sabattini, M.S.; Maiztegui, J.I.; Arana, R.M. and Laguens, R.P. (1979a) Ultrastructural immunohistochemical and virological studies in organs of *Calomys musculinus* infected with Junin virus by natural routes. *Medicina (B. Aires)* 39, 213-217.
- Martínez Peralta, L.; Laguens, R.P.; Cossio, P.M.; Sabattini, M.S.; Maiztegui, J.I. and Arana, R.M. (1979b) Presence of viral particles in the salivary gland of *Calomys musculinus* infected with Junin virus by a natural route. *Intervirology* 11, 111-116.
- Martínez Peralta, L.; Leon, M.E.; Coto, C.E. and Laguens, R.P. (1979c) Effect of glucosamine on the replication of the arenavirus Junin in Vero cells. *Intervirology* 11, 188-190.
- Martínez Pintos, I.F. (1962) Epidemiología del Mal de los Rastrojos. *Anales Com. Inv. Cient. (Prov. Bs. As.)* 3, 9-102.
- Martínez Segovia, Z.M.; Holstein, B.A. y Grazioli, F. (1967) Multiplicación del virus Junín en cultivo de tejidos. *Ciencia e Investigación* 23, 35-37.
- Martínez Segovia, Z.M. and Díaz, A. (1968) Purification of Junin virus by an aqueous biphasic polymer system. *Appl. Microbiol.* 15, 1602-1604.
- Martínez Segovia, Z.M. and Grazioli, F. (1969) The nucleic acid of Junin virus. *Acta Virol.* 13, 264-268.
- Martínez Segovia, Z.M.; De Mitri, M.I. and Bendersky, S. (1974) Nutritional requirements for Junin virus production in BHK culture cells. *Acta Physiol. Latinoam.* 24, 656-661.

- Martínez Segovia, Z.M. and De Mitri, M.I. (1977) Junin virus structural proteins. *J. Virol.* 21, 579-583.
- Matthews, R.E.F. (1979) Classification and nomenclature of viruses. Third report of the International Committee on Taxonomy of viruses. *Intervirology* 12, 132-296.
- Matthews, R.E.F. (1982) Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of viruses. (Karger-Basel, Eds.)
- Maul, G.G.; Rovera, G.; Vorbrodt, A. and Abramzuk, J. (1978). Membrane fusion as a mechanism of simian virus 40 entry into different cell compartments. *J. Virol.* 28, 936-944.
- McSharry, J.J. and Wagner, R.R. (1971) Lipid composition of purified vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 7, 59-70.
- Mersich, S.E.; Damonte, E.B. and Coto, C.E. (1981) Induction of the RNA polymerase II activity in Junin virus infected cells. *Intervirology* 16, 123-127.
- Mettler, N.E.; Buckley, S.M. and Casals, J. (1961) Propagation of Junin virus, the etiological agent of Argentinian hemorrhagic fever, in HeLa cell cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107, 684-688.
- Mettler, N.E.; Casals, J. and Shope, R.E. (1963) Study of antigenic relationships between Junin virus, the etiologic agent of Argentine hemorrhagic fever and other arthropodborne viruses. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 12, 647-652.
- Mifune, K.; Carter, M. and Rawls, W. (1971) Characterization studies of the Pichinde virus. A member of the arenavirus group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 136, 637-644.
- Moore, N.F.; Patzer, E.J.; Shaw, J.M.; Thompson, T.E. and Wagner, R.R. (1978) Interaction of vesicular stomatitis virus with lipid vesicles: Fluidity and infectivity. *J. Virol.* 27, 320-329.

- Morgan, C.; Rose, H.M.; Holden, M. and James, E.P. (1959)
Electron microscopic observations on the development of herpes simplex virus. *J. Exp. Med.* 110, 643-649.
- Moré, J.D. (1971) Isolation of Golgi apparatus. *Method Enzymol.* Vol. XXII, 130-148.
- Murphy, J.S. and Bang, F.B. (1952) Observations with the electron microscope on cells of the chicks chorioallantoic membrane infected with influenza virus. *J. Exp. Med.* 95, 259-263.
- Murphy, F.A.; Webb, P.A.; Johnson, K.M. and Whitfield, S.G. (1969) Morphological comparison of Machupo with lymphocytic choriomeningitis virus: Basis for a new taxonomic group. *J. Virol.* 4, 535-542.
- Murphy, F.A.; Webb, P.A.; Johnson, K.M.; Whitfield, S.G. and Chappel, A. (1970) Arenaviruses in Vero cells: Ultrastructural studies. *J. Virol.* 6, 507-518.
- Murphy, F.A.; Whitfield, S.G.; Webb, P.A. and Johnson, K.M. (1973) Ultrastructural studies of arenaviruses. En: "Lymphocytic Choriomeningitis virus and other arenaviruses" (F. Lehmann-Grube, ed.), pp. 273-285, Springer, Berlin.
- Murphy, F.A. and Whitfield, S.G. (1975) Morphology and morphogenesis of arenaviruses. *Bull. WHO* 52, 409-416.
- Nair, C.N.; Stowers, J.W. and Singfield, B. (1979) Guanidine sensitive Na⁺ accumulation by poliovirus-infected HeLa cells. *J. Virol.* 31, 184-189.
- Nair, C.N. (1981) Monovalent cation metabolism and cytopathic effects of poliovirus-infected HeLa cells. *J. Virol.* 37, 268-273.
- Neville, D.M. Jr. (1960) The isolation of a cell membrane fraction from rat liver. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8, 413-422.
- Ofodile, A.; Paonos, M.; Molomot, N. and Duffy, J.L. (1973) The morphological and biological characteristics of the M-P strain of LCM virus. *Infect. Immunol.* 7, 309-312.

- Oshiro, L.S. (1973) Coronaviruses. En: " Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages" (A.J. Dalton and F. Haguenu, eds.), pp. 331-335, Academic Press, New York.
- Padula, P. y Martínez Segovia, Z. (1983) Efecto de enzimas proteolíticas en la estructura y funciones de las glucoproteínas del virus Junín. Primer Congreso Argentino de Virología, Comunicación N° 10.
- Palmer, E.L.; Obijeski, J.E.; Webb, P.A. and Johnson, K.M. (1977) The circular segmented nucleocapsid of an arenavirus - Tacaribe virus. J. Gen. Virol. 36, 541-545.
- Parodi, A.S.; Greenway, D.J.; Rugiero, H.R.; Rivero, E.; Frigerio, M.J.; Mettler, N.E.; Garzon, F.; Boxaca, M.; Guerrero, L.B. de, y Nota, N.R. (1958) Sobre la etiología del brote epidémico de Junín. Día Médico 30, 2300-2302.
- Parodi, A.S.; De La Barrera, J.M.; Rugiero, H.R.; Greenway, D.J.; Yerga, M.; Mettler, N.; Boxaca, M. y Frigerio, M.J. (1959a) Los reservorios del virus de la fiebre hemorrágica epidémica de la provincia de Buenos Aires. Prensa Med. Arg. 46, 554-556.
- Parodi, A.S.; Rugiero, H.R.; Greenway, D.J.; Mettler, N.E.; Martínez, A.; Boxaca, M. y De La Barrera, J.M. (1959b) Aislamiento del virus Junín (FHA) de los ácaros de la zona epidémica (*Echinolaelaps echidninus*, Berlese) Prensa Med. Arg. 46, 2242-2244.
- Pasian, E.; Fernández Cobo, M.; Padula, P.; De Mitri, M.I. y Martínez Segovia, Z.M. (1983) Posible rol de la actina en la brotación del virus Junín. Primer Congreso Argentino de Virología. Comunicación N° 8.
- Payne, L.G. (1980) Significance of extracellular envelope virus in the "in vitro" and "in vivo" dissemination of vaccinia. J. Gen. Virol. 50, 89-100.
- Payne, L.G. and Kristensson, K. (1982) Effect of glycosylation inhibitors of release of enveloped vaccinia virus. J. Virol. 41, 367-375.

- Pedersen, I.R. (1970) Density gradient centrifugation studies on LCM virus and on viral nucleic acid. *J. Virol.* 6, 414-420.
- Pedersen, I.R. (1973) Different classes of ribonucleic acid isolated from lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 11, 416-423.
- Pedersen, I.R. (1979) Structural components and replication of arenaviruses. *Advances in Virus Research* 24, 277-330.
- Perdue, M.L.; Kemp, M.C.; Randall, C.C. and O'Callaghan, D.J. (1974) Studies of the molecular anatomy of the L-M cell strain of equine herpes virus type 1: Proteins of the nucleocapsid and intact virion. *Virology* 59, 201-210.
- Pfau, C.J.; Bergold, G.H.; Casals, J.; Johnstone, K.M.; Murphy, F.A.; Pedersen, I.R.; Rawls, W.P.; Rowe, W.P.; Webb, P.A. and Weissenbacher, M.C. (1974) Arenaviruses. *Intervirology* 4, 207-213.
- Pfefferkorn, E.R. and Hunter, H.S. (1963) The source of the ribonucleic acid and phospholipid of Sindbis virus. *Virology* 20, 446-451.
- Pinheiro, F.P.; Shope, R.E.; de Andrade, A.H.P.; Bensabeth, G.; Cacios, G.V. and Casals, J. (1966) Amapari, a new virus of the Tacaribe group from rodents and mites of Amapá territory, Brazil. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* 122, 531-535.
- Pirotsky, I.; Zuccarini, J.; Molinelli, E.A.; Di Pietro, A.; Barre-ra Oro, J.G.; Martini, P. y Copello, A.R. (1959) Virosis hemorrá-gica del noroeste bonaerense; endemo-epidemiológica, febril, enantémica y leucopénica. Talleres gráficos del Inst. Nac. Microb. Buenos Aires, Ministerio de Asistencia Social y Salud Pública.
- Pospischil, B.A. and Bachmann, P.A. (1980) Nuclear changes in cells infected with parapoxviruses stomatitis papulosa and orf: an "in vivo" and "in vitro" ultrastructural study. *J. Gen. Virol.* 47, 113-121.

- Quigley, J.P.; Rifkin, D.B. and Reich, E. (1971) Phospholipid composition of Rous sarcoma virus, host cell membranes and other enveloped RNA viruses. *Virology* 46, 106-116.
- Quigley, J.P.; Rifkin, D.B. and Einhorn, M.H. (1972a) Determination of phospholipid composition of RNA tumor viruses by ^{32}P labeling of infected cell cultures. *Anal. Biochem.* 47, 614-619.
- Quigley, J.P.; Rifkin, D.B. and Einhorn, M.H. (1972b) Lipids studies of Rous sarcoma virus and host cell membranes. *Virology* 50, 550-557.
- Ramos, B.A.; Courtney, R.J. and Rawls, W.E. (1972) The structural proteins of Pichinde virus. *J. Virol.* 10, 661-667.
- Randerath, K. (1970) Thin layer chromatography, Second revised and enlarged edition, Verlag Chemie, Academic Press.
- Rao, P.R.; Bonar, R.A. and Beard, J.W. (1966) Lipids of the BAI strain A avian tumor virus and of the myeloblast host cell. *Exp. Mol. Pathol.* 5, 374-381.
- Renkonen, O.; Kääriäinen, L.; Simons, K. and Gahmberg, C.G. (1971) The lipid class composition of Semliki Forest virus and of plasma membranes of the host cells. *Virology* 36, 318-326.
- Renkonen, O.; Gahmberg, C.G.; Simons, K. and Kääriäinen, L. (1972a) The lipids of the plasma membrane and endoplasmic reticulum from cultured baby hamster kidney cells (BHK-21). *Biochim. Biophys. Acta* 255, 66-78.
- Renkonen, O.; Kääriäinen, L.; Pettersson, R. and Oker-Blom, N. (1972b) The phospholipid composition of Uukuniemi virus, a non cubical tick-borne arbovirus. *Virology* 50, 899-901.
- Renkonen, O.; Kääriäinen, L.; Gahmberg, C.G. and Simons, K. (1972c) Lipids of Semliki Forest virus and host cell membranes. In: *Current Trends in the Biochemistry of Lipids* (J. Ganguly and R.M. S. Smellie, eds.), pp. 407-422, Academic Press, New York.

- Richardson, C.D. and Vance, D.E. (1976) Biochemical evidence that Semliki Forest virus obtains its envelope from the plasma membrane of the host cell. *J. Biol. Chem.* 251, 5544-5550.
- Ridha, K. and Menezes, J. (1983) Sendai virus envelopes can mediate Epstein Barr virus binding to and penetration into Epstein Barr virus receptor negative cells. *J. Virol.* 46, 325-332.
- Romanowski, V. (1981) Estructura bioquímica del virus Junín. Tesis Doctoral (Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata).
- Romanowski, V. and Bishop, D.H.L. (1983) The formation of arenaviruses that are genetically diploid. *Virology* 126, 87-95.
- Rothman, J.E.; Tsai, D.K.; Dawidowicz, E.A. and Lenard, J. (1976) Transbilayer phospholipid asymmetry and its maintenance in the membrane of influenza virus. *Biochemistry* 15, 2361-2367.
- Rott, R.; Drzeniek, R. and Frank, H. (1970) On the structure of influenza viruses. En: "The biology of large RNA virus" (R.D. Barry and B.W.J. Mahy, eds.), pp. 74-85, Academic Press, London.
- Rouser, G.; Siakotos, A.N. and Fleischer, S. (1966) Quantitative analysis of spots. *Lipids* 1, 85-86.
- Rowe, W.P.; Murphy, F.A.; Bergold, G.H.; Casals, J.; Hotchin, J.; Johnson, K.M.; Lehmann-Grube, F.; Mims, C.A.; Traub, E. and Webb, P.A. (1970) Arenaviruses: proposed name for a newly defined virus group. *J. Virol.* 5, 651-652.
- Rubin, H. (1960) A virus in chick embryos which induces resistance "in vitro" to infection with Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46, 1105-1119.

- Rustici, S.M.; Remorini, P.G.; Rosas, M.F.; Baro, N.I. y Grau, O. (1982) Proteínas intracelulares del virus Junín. XVIII Reunión Anual de SAIB. Comunicación N° 170.
- Sabattini, M.S. (1966) Virus Junín en la provincia de Córdoba. Comisión Nac. Coord. para estudio y lucha contra la fiebre hemorrágica argentina, Bs. As. 85-102.
- Sabattini, M.S.; González del Río, L.; Díaz, G. y Vega, V.R. (1977) Infección natural y experimental de roedores con virus Junín. Medicina (B. Aires) 37, Supl. 3, 149-161.
- Sarma, P.S.; Cheong, M.P.; Hartley, J.W. and Huebner, J. (1967) A viral interference test for mouse leukemia viruses. Virology 33, 180-184.
- Sarma, P.S.; Log, T. (1971) Viral interference in feline leukemia sarcoma complex. Virology 44, 352-358.
- Schaefer, A.; Kühne, J.; Zibine, R. and Koch, G. (1982) Poliovirus-induced alterations in HeLa cell membrane functions. J. Virol. 44, 444-449.
- Schlesinger, H.R.; Wells, H.J. and Hummler, K. (1973) Comparison of the lipids of intracellular and extracellular rabies viruses. J. Virol. 12, 1028-1030.
- Schroder, E. and Merrick, J.M. (1979) Alterations in glycosphingolipid patterns in a line of African green monkey kidney cells infected with herpesvirus. J. Virol. 32, 734-740.
- Schwartz, J. and Roizman, B. (1969) Concerning the egress of herpes simplex virus from infected cells: electron microscopic observations. Virology 38, 42-48.
- Sefton, B.M. and Gaffney, B.J. (1974) Effect of the viral proteins on the fluidity of the membranes lipids in Sindbis virus. J. Mol. Biol. 90, 343-352.
- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175, 720-731.

- Sly, W.S.; Lagwinska, E. and Schlesinger, S. (1976) Enveloped virus acquires membrane defect when passaged in fibroblasts from I-cell disease patients. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2443-2449.
- Soler, C.; Musalem, C.; Loroño, M. and Espejo, R. (1982) Association of viral particles and viral proteins with membranes in SA 11-infected cells. J. Virol 44, 983-992.
- Spring, S.B. and Roizman, B. (1968) Herpes simplex virus products in productive and abortive infection. III. Differentiation of infectious virus derived from nucleus and cytoplasm with respect to stability and size. J. Virol. 2, 979-983.
- Steck, F.T. and Rubin, H. (1966a) The mechanism of interference between an avian leukosis virus and Rous sarcoma virus. I. Establishment of interference. Virology 29, 628-841.
- Steck, F.T. and Rubin, H. (1966b) The mechanism of interference between an avian leukosis virus and Rous sarcoma virus. II. Early steps of infection by RSV of cells under conditions of interference. Virology 29, 642-653.
- Stern, W. and Dales, S. (1974) Biogenesis of vaccinia: concerning the origin of the envelope phospholipids, Virology 62, 293-298.
- Stoker, M.G.P. and Mac Pherson, I.A. (1961) Studies on transformation of hamster cells by polyoma virus "in vitro". Virology 14, 631-641.
- Swanson, M.A. (1955) Glucose-6-phosphatase from liver. Methods Enzymol. 2, 541-543.
- Taube, S. and Rothfield, L.I. (1978) Isolation of the envelope of vesicular stomatitis virus. J. Virol. 26, 730-735.
- Tiffany, J.M. and Blough, H.A. (1969) Fatty acid composition of three strains of Newcastle disease virus. Virology 37, 492-496.
- Trapido, H. and Sanmartín, C. (1971) Pichinde virus. A new virus of the Tacaribe group from Colombia. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 20, 631-641.

- Tsai, K.H. and Lenard, J.I. (1975) Asymmetry of influenza virus membrane bilayer demonstrated with phospholipase C. *Nature* (London) 225, 554-555.
- Vezza, A.C.; Gard, G.P.; Compans, R.W. and Bishop, D.H.L. (1977) Structural components of the arenavirus Pichinde. *J. Virol.* 23, 776-786.
- Vezza, A.C.; Clewley, J.P.; Gard, G.P.; Abraham, N.Z.; Compans, R.W. and Bishop, D.H.L. (1978) The virion RNA species of the arenaviruses Pichinde, Tacaribe and Tamiami. *J. Virol.* 26, 485-497.
- Vezza, A.C.; Cash, P.; Jahrling, P.; Eddy, G. and Bishop, D.H.L. (1980) Arenaviruses recombinants between prototype Pichinde and Pichinde Muchique viruses and evidence that arenavirus sRNA codes for N polypeptide. *Virology* 106, 250-260.
- Vilches, A.M.; Barrera Oro, J.G. y Gutman Frugone, L.F. (1965) Una nueva área epidémica de fiebre hemorrágica argentina iniciada a continuación de una epizootia en población aumentada de roedores silvestres. *Segundas Jornadas Epidemiológicas Argentinas* (Salta) 3, 359-360.
- Vogt, P.K. and Ishizaki, R. (1966) Patterns of viral interference in the avian leukosis and sarcoma complex. *Virology* 30, 368-372.
- Von Bonsdorff, C.H.; Saikku, P. and Oker-Blom, N. (1970) Surface structure of Uukuniemi virus. *Acta Virol.* 14, 109-114.
- Wallach, D.F.H. and Kamat, V.B. (1964) Plasma and cytoplasmic membrane fragments from Ehrlich ascites carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52, 721-728.
- Wallach, D.F.H. and Kamat, V.B. (1966) Preparation of plasma-membrane fragments from mouse ascites tumor cells. *Method Enzymol.* Vol. VIII, 166-172.
- Warren, L.; Glick, M.C. and Nass, M.K. (1966) Membranes of animal cell. I. Methods of isolation of the surface membrane. *J. Cell. Physiol.* 68, 269-288.

- Webb, P.A.; Johnson, K.M.; Mackenzie, R.B. and Kuns, M.L. (1967) Some characteristics of Machupo virus, causative agent of Bolivian hemorrhagic fever. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 16, 531-539.
- Webb, P.A.; Johnson, K.M.; Hibbs, J.B. and Kuns, M.L. (1970) Parana, a new Tacaribe complex virus from Paraguay. *Arch. Ges. Virus Forsch.* 32, 379-388.
- Webster, R.G. and Darlington, R.W. (1969) Disruption of myxoviruses with Tween 20 and isolation of biologically active hemagglutinin and neuraminidase subunits. *J. Virol.* 4, 182-187.
- Wecker, E. (1957) Die Verteilung von ^{32}P in virus der klassischen Geflügelpest bei verschiedenen Markierungsverfahren. *Z. Naturforsch.* 12b, 208-211.
- Weinstein, D.B.; Marsh, J.B.; Glick, M.C. and Warren, L. (1969) Membranes of animal cells. IV. Lipids of the L-cell and its surface membrane. *J. Biol. Chem.* 244, 4103-4111.
- Weissenbacher, M.C.; Guerrero, L.B. de, y Boxaca, M.C. (1975) Experimental biology and pathogenesis of Junin virus infection in animal and man. *Bull. WHO* 52, 507-515.
- Weissenbacher, M.C. y Damonte, E.B. (1983) Fiebre hemorrágica argentina. *Adel. Microbiol. Enf. Infecc. Vol.* 2, 119-171.
- Whitfield, S.G.; Murphy, F.A. and Sudai, W.D. (1971) Eastern equine encephalomyelitis virus: An electron microscopic study of aedes triseriatus (SAY) salivary gland infection. *Virology* 43, 110-117.
- White, H.B. Jr.; Powell, S.S.; Gafford, L.G. and Randall, C.C. (1968) The occurrence of squalene in lipid of fowlpox virus. *J. Biol. Chem.* 243, 4517-4525.
- Widnell, C.C. (1972) Cytochemical localization of 5'-nucleotidase in subcellular fractions isolated from rat liver: I. The origin of 5'-nucleotidase activity in microsomes. *J. Cell. Biol.* 52, 542-558.

- Witte, O.N.; Tsukamoto-Adey, A. and Weissman, I.L. (1977) Cellular maturation of oncornavirus glycoproteins: Topological arrangement of precursor and product form in cellular membranes. *Virology* 76, 539-543.
- Wulff, H.; Lange, J.V. and Webb, P.A. (1978) Interrelationships among arenaviruses measured by indirect immunofluorescences. *Intervirology* 9, 344-350.
- Yasumura, Y. and Kawatika, Y. (1963) Studies of SV40 virus in tissue culture cells. *Nippon Rinsho*. 21, 1201-1215.
- Zakowski, J.J. and Wagner, R.R. (1980) Localization of membrane-associated proteins in vesicular stomatitis virus by use of hydrophobic membrane probes and cross-linking reagents. *J. Virol.* 36, 93-102.
- Zinder, O.; Nikodijevic, O.; Hoffmann, P.G. and Pollard, H.B. (1976) Regulation of secretion from the adrenal medulla: Evidence for adenylate cyclase activity in secretory vesicle membranes. *J. Biol. Chem.* 251, 2179-2184.