

UCH-FC  
DOC-D  
539

**ESTUDIO DEL CICLO INFECTIVO DEL VIRUS DE LA NECROSIS  
PANCREATICA INFECCIOSA, IPNV, MEDIANTE LA UTILIZACION DE  
ANTIVIRALES.**

**Tesis**  
**entregada a la**  
**Universidad de Chile**  
**en cumplimiento parcial de los requisitos**  
**para optar al grado de**  
**Doctor en Ciencias con mención en Biología.**

**Facultad de Ciencias.**

01-0201047

**por**

**MATILDE MYRIAM JASHES MORGUES.**

**Octubre de 1996**

**Director de Tesis: Dra. Ana María Sandino.**



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

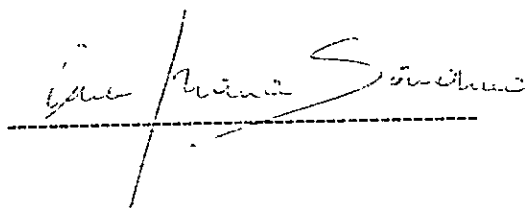
Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

Matilde Myriam Jashés Morgues

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 24 de Octubre de 1996

Director de Tesis:

Dra. Ana María Sandino



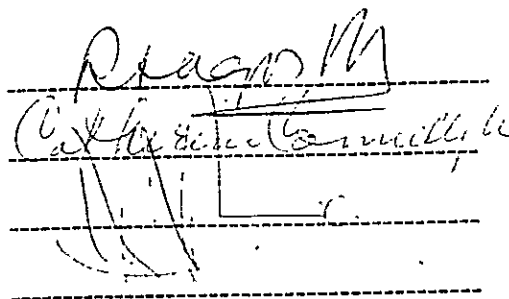
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Rosalba Lagos

Dra. Catherine Connelly

Dr. Romilio Espejo

Dr. Victor Cifuentes



Esta tesis fue financiada parcialmente mediante el proyecto Fondecyt para estudiantes de Doctorado # 2940006, además Fondecyt financió parte de mis estudios.

**A Rafael y  
A nuestros hijos  
Karen, Nicole y Jacobo**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a mi Directora de tesis Dra. Ana María Sandino no sólo por la formación y dedicación entregada en el desarrollo de esta tesis, sino también porque siempre respetó y valoró mis ideas. Además me enseñó a enfrentar nuevos desafíos con optimismo y confianza.

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos al Dr. Eugenio Spencer, quien me brindó su apoyo durante la realización de esta tesis.

Agradecer a aquellas personas que estuvieron conmigo durante el desarrollo del Doctorado; a mis compañeros con los que compartí largas jornadas de estudio, y a los profesores quienes entregaron lo mejor de sí.

Quiero agradecer a la Fundación Andes, quienes confiaron en este proyecto al otorgarme la Beca Fundación Andes.

Agradezco a mis compañeros del Laboratorio por todo el cariño y apoyo que recibí de ellos. En especial a Marcela, María Teresa, Marisol y a Marcelo, con quienes compartí la alegría de experimentos exitosos y en ocasiones también pequeñas frustraciones, ellos me brindaron ayuda y parte de su tiempo. También la colaboración de Rodrigo, y especialmente la de Javier quienes me asesoraron en la difícil tarea de utilizar el "software". A Gigi, quien hizo más dulce nuestros días en el Laboratorio.

A Vivi por su permanente apoyo y amistad, en momentos difíciles me dió la fuerza para seguir adelante.

Agradezco especialmente a mi amiga Anita, por ser como es. Ella me ha entregado su amistad y cariño durante gran parte de mi vida.

A mis padres y mis hermanas por su cariño, confianza y comprensión.

Finalmente deseo agradecer a mi familia a mi esposo Rafael, quien me estimuló a emprender este desafío, y especialmente a Karen, Nicole, y Jacobo quienes debieron sacrificar varios momentos de su infancia.

## INDICE DE MATERIAS

	página
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMEN.....	xix
SUMMARY.....	xxi
INTRODUCCION.....	1
MATERIALES.....	25
METODOS.....	29
1. OBTENCION DEL VIRUS IPN.....	29
2. TITULACION DEL VIRUS IPN.....	29
3. OBTENCION DE PARTICULAS DEL VIRUS IPN MARCADAS RADIATIVAMENTE CON <sup>35</sup> S.....	30

		página
4.	EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LA REPLICACION DEL VIRUS IPN EN CELULAS CHSE-214. ENSAYO DE INHIBICION DE LA FORMACION DE PLACAS.....	31
5.	EVALUACION DEL EFECTO CITOTOXICO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LAS CELULAS CHSE-214.....	33
5.1.	EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.....	33
5.2.	EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LA SINTESIS DE DNA CELULAR....	34
5.3.	EVALUACION DEL EFECTO DE EICAR SOBRE LA SINTESIS DE PROTEINAS CELULAR.....	35
6.	EVALUACION DEL EFECTO DE LOS POLISACARIDOS SULFATADOS DE <i>Durvillaea antarctica</i> SOBRE LA TRANSCRIPCION <i>in vitro</i> DEL VIRUS IPN.....	36
7.	EFECTO DE EICAR SOBRE ALEVINES DE TRUCHA ARCOIRIS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON VIRUS IPN.....	36
7.1.	INFECCION EXPERIMENTAL DE LOS ALEVINES CON VIRUS IPN.....	36
7.2.	TRATAMIENTO CON EICAR DE LOS ALEVINES INFECTADOS.....	37
7.3.	DETECCION DEL VIRUS IPN EN LOS ALEVINES MUERTOS.....	38
8.	SINTESIS DE LAS MACROMOLECULAS DEL VIRUS IPN EN CELULAS CHSE-214.....	39
8.1.	SINTESIS DE LOS POLIPEPTIDOS VIRALES.....	39
8.2.	SINTESIS DEL RNA GENOMICO VIRAL.....	40

	<b>página</b>
8.2.1. EXTRACCION DEL RNA GENOMICO DEL VIRUS IPN.....	41
8.3. SINTESIS DEL RNA MENSAJERO VIRAL. DETECCION MEDIANTE LA TECNICA DE NORTHERN.....	41
8.3.1. EXTRACCION DEL RNA.....	42
8.3.2. ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DEL RNA A MEMBRANA DE NYLON .....	43
8.3.2.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-UREA Y ELECTROTRANSFERENCIA DEL RNA A MEMBRANA DE NYLON.....	43
8.3.2.2. ELECTROFORESIS EN GEL AGAROSA-FORMALDEHIDO Y TRANSFERENCIA DEL RNA A MEMBRANA DE NYLON POR CAPILARIDAD.....	43
8.3.3. OBTENCION Y MARCACION RADIATIVA DE LA SONDA.....	44
8.4. HIBRIDACION CON LA SONDA RADIATIVA.....	47
9. EVALUACION DEL EFECTO DE EICAR SOBRE LA REPLICACION DEL RNA Y LA TRANSCRIPCION DEL VIRUS IPN EN CULTIVO CELULAR.....	47
9.1. EFECTO DE EICAR SOBRE LA SINTESIS DEL RNA GENOMICO VIRAL EN CELULAS CHSE-214.....	47
9.2. EFECTO DE EICAR SOBRE LA TRANSCRIPCION VIRAL EN CELULAS CHSE-214. EVALUACION A TRAVES DE LA SINTESIS DE LOS POLIPEPTIDOS VIRALES.....	48
9.3. REVERSION DE LA INHIBICION DEL IPNV POR EICAR MEDIANTE LA ADICION DE NUCLEOSIDOS .....	49
9.4. USO DE EICAR Y GUANOSINA PARA ESTUDIAR EL INICIO DE LA REPLICACION DEL RNA VIRAL.....	50



	página
9.5. USO DE CICLOHEXIMIDA PARA ESTUDIAR EL REQUERIMIENTO DE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN EL INICIO DE LA REPLICACION DEL RNA VIRAL.....	50
<b>RESULTADOS</b> .....	52
1. EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE EL VIRUS IPN.....	52
1.1. EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES MEDIANTE EL ENSAYO DE INHIBICION DE LA FORMACION DE PLACAS.....	52
1.2. EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LA TRANSCRIPCION <i>in vitro</i> DEL VIRUS IPN.....	65
2. EVALUACION DEL EFECTO CITOTOXICO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LAS CELULAS CHSE-214.....	67
2.1. EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR .....	67
2.2. EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LA SINTESIS DE DNA CELULAR...	69
3. EFECTO DE EICAR SOBRE ALEVINES DE TRUCHA ARCOIRIS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL VIRUS IPN.....	69
3.1. INFECCION EXPERIMENTAL DE LOS ALEVINES CON VIRUS IPN Y TRATAMIENTO CON EICAR.....	70
4. SINTESIS DE LAS MACROMOLECULAS DEL VIRUS IPN EN CELULAS CHSE-214.....	73
4.1. SINTESIS DE LOS POLIPEPTIDOS VIRALES.....	74

	<b>página</b>
4.2. SINTESIS DEL RNA GENOMICO VIRAL.....	80
4.3. SINTESIS DEL RNA MENSAJERO VIRAL.....	86
5. EVALUACION DEL EFECTO DE EICAR SOBRE LA REPLICACION DEL RNA Y LA TRANSCRIPCION DEL VIRUS IPN EN CULTIVO CELULAR.....	92
5.1. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EICAR SOBRE LA SINTESIS DEL RNA GENOMICO VIRAL EN CELULAS CHSE-214.....	93
5.2. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EICAR SOBRE LA EXPRESION DE LOS POLIPEPTIDOS VIRALES EN CELULAS CHSE-214.....	96
5.3. EFECTO DE EICAR SOBRE LA SINTESIS DEL RNA GENOMICO Y LA EXPRESION DE LOS POLIPEPTIDOS VIRALES AL AGREGARLO A DIFERENTES TIEMPOS DE LA INFECCION.....	99
5.3.1. EFECTO DE EICAR SOBRE LA SINTESIS DEL RNA GENOMICO VIRAL AL AGREGARLO A DIFERENTES TIEMPOS DE LA INFECCION.....	100
5.3.2. EFECTO DE EICAR SOBRE LA EXPRESION DE LA SINTESIS DE LOS POLIPEPTIDOS VIRALES AL AGREGARLO A DIFERENTES TIEMPOS DE LA INFECCION.....	103
5.4. REVERSION DE LA INHIBICION DEL IPNV POR EICAR MEDIANTE LA ADICION DE NUCLEOSIDOS.....	106
5.4.1. EFECTO DE LA ADICION DE GUANOSINA EN LA INHIBICION DE EICAR SOBRE LA SINTESIS DEL RNA GENOMICO Y LA EXPRESION DE LOS POLIPEPTIDOS VIRALES .....	107
5.4.2. EFECTO DE LA ADICION DE ADENOSINA Y CITOSINA EN LA INHIBICION DE EICAR SOBRE LA SINTESIS DEL RNA GENOMICO VIRAL.....	110

	<b>página</b>
5.5. UTILIZACION DE EICAR Y GUANOSINA PARA ESTUDIAR EL INICIO DE LA REPLICACION DEL RNA DEL VIRUS IPN.....	115
5.6. UTILIZACION DE CICLOHEXIMIDA PARA ESTUDIAR EL REQUERIMIENTO DE LA SINTESIS DE LAS PROTEINAS EN EL INICIO DE LA REPLICACION DEL RNA VIRAL.....	122
<b>DISCUSION.....</b>	<b>129</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>148</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>150</b>

## LISTA DE TABLAS

		página
TABLA 1	EFEECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LA REPLICACION DEL VIRUS IPN EN CELULAS CHSE-214.....	62
TABLA 2	EFEECTO DE LOS POLISACARIDOS SULFATADOS DE <i>Durvillaea antarctica</i> SOBRE LA TRANSCRIPCION <i>in vitro</i> DEL VIRUS IPN.....	66
TABLA 3	EFEECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR Y LA SINTESIS DE DNA DE LAS CELULAS CHSE-214.....	68
TABLA 4	EFEECTO DE EICAR SOBRE LA INFECCION DEL VIRUS IPN EN TRUCHA ARCOIRIS.....	71
TABLA 5	EFEECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE EL VIRUS IPN EN CELULAS CHSE-214.....	130

## LISTA DE FIGURAS

		<b>página</b>
FIGURA 1	MORTALIDAD COMPARATIVA DE TRUCHAS DE DIFERENTE EDAD INFECTADAS CON IPNV..	4
FIGURA 2A	ESTRUCTURA DE COMPUESTOS ANTIVIRALES: ANALOGOS DE GUANOSINA.....	14
FIGURA 2B	ESTRUCTURA DE COMPUESTOS ANTIVIRALES..	15
FIGURA 3	MECANISMO DE ACCION DE LA RIBAVIRINA.....	16
FIGURA 4	ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE LA SONDA DE cDNA AISLADA A PARTIR DEL PLASMIDIO VLN.....	46
FIGURA 5	ESQUEMA USADO PARA LOS ENSAYOS DE INHIBICION DE LA FORMACION DE PLACAS DEL VIRUS IPN.....	53
FIGURA 6	EVALUACION DEL EFECTO DE LA RIBAVIRINA SOBRE LA REPLICACION DEL VIRUS IPN MEDIANTE EL ENSAYO DE INHIBICION DE LA FORMACION DE PLACAS DE LISIS.....	55
FIGURA 7	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE EICAR SOBRE LA REPLICACION DEL VIRUS IPN MEDIANTE EL ENSAYO DE INHIBICION DE LA FORMACION DE PLACAS DE LISIS.....	57
FIGURA 8	EVALUACION DEL EFECTO DE PIRAZOFURINA SOBRE LA REPLICACION DEL VIRUS IPN MEDIANTE EL ENSAYO DE INHIBICION DE LA FORMACION DE PLACAS DE LISIS.....	60

		<b>página</b>
FIGURA 9	SINTESIS DE LOS POLIPEPTIDOS DEL VIRUS IPN EN CELULAS CHSE-214.....	75
FIGURA 10	CINETICA DE LA SINTESIS DE LOS POLIPEPTIDOS DEL VIRUS IPN EN CELULAS CHSE-214.....	78
FIGURA 11	CINETICA DE LA SINTESIS DEL RNA GENOMICO DEL VIRUS IPN EN CELULAS CHSE-214.....	82
FIGURA 12	CINETICA DE LA SINTESIS DEL RNA GENOMI- CO DEL VIRUS IPN EN CELULAS CHSE-214, DETECTADO MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 7%.....	84
FIGURA 13	DETECCION DEL RNA MENSAJERO DEL VIRUS IPN MEDIANTE LA TECNICA DE NORTHERN. ANALISIS DEL RNA EN ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-UREA.....	87
FIGURA 14	DETECCION DEL RNA MENSAJERO DEL VIRUS IPN MEDIANTE LA TECNICA DE NORTHERN. ANALISIS DEL RNA EN ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA-FORMALDEHIDO.....	89
FIGURA 15	EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EICAR SOBRE LA SINTESIS DE RNA GENOMICO DEL VIRUS IPN.....	94
FIGURA 16	EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EICAR SOBRE LA EXPRESION DE LOS POLIPEPTIDOS DEL VIRUS IPN.....	97
FIGURA 17	EFFECTO DE EICAR SOBRE LA SINTESIS DE RNA GENOMICO DEL VIRUS IPN AL AGREGARLO A DIFERENTES TIEMPOS DE LA INFECCION.....	101

		página
FIGURA 18	EFFECTO DE EICAR SOBRE LA EXPRESION DE LOS POLIPEPTIDOS DEL VIRUS IPN AL AGREGARLO A DIFERENTES TIEMPOS DE LA INFECCION.....	104
FIGURA 19	EFFECTO DE LA ADICION DE GUANOSINA EN LA INHIBICION DE EICAR SOBRE LA REPLICACION DEL RNA DEL VIRUS IPN.....	108
FIGURA 20	EFFECTO DE LA ADICION DE GUANOSINA EN LA INHIBICION DE EICAR SOBRE LA EXPRESION DE LOS POLIPEPTIDOS DEL VIRUS IPN.....	111
FIGURA 21	EFFECTO DE LA ADICION DE ADENOSINA O CITOSINA EN LA INHIBICION DE EICAR SOBRE LA REPLICACION DEL RNA DEL VIRUS IPN.....	113
FIGURA 22	USO DE EICAR Y GUANOSINA PARA ESTUDIAR LOS REQUERIMIENTOS DEL INICIO DE LA REPLICACION DEL RNA DEL VIRUS IPN.....	117
FIGURA 23	CINETICA DE LA SINTESIS DE LOS POLIPEPTIDOS DEL VIRUS IPN AL REVERTIR MEDIANTE GUANOSINA LA INHIBICION VIRAL PRODUCIDA POR EICAR.....	118
FIGURA 24	CINETICA DE LA SINTESIS DEL RNA GENOMICO DEL VIRUS IPN AL REVERTIR MEDIANTE GUANOSINA LA INHIBICION VIRAL PRODUCIDA POR EICAR.....	120
FIGURA 25	UTILIZACION DE CICLOHEXIMIDA EN EL ENSAYO EICAR /GUANOSINA. EFFECTO SOBRE LA SINTESIS DE LOS POLIPEPTIDOS DEL VIRUS IPN.....	125
FIGURA 26	UTILIZACIÓN DE CICLOHEXIMIDA EN EL ENSAYO EICAR/GUANOSINA.EFFECTO SOBRE LA SINTESIS DE RNA GENOMICO DEL VIRUS IPN.....	127

FIGURA 27

ESQUEMA PROPUESTO PARA EL INICIO DE LA  
REPLICACION DEL RNA DEL VIRUS IPN.....

página

144



## LISTA DE ABREVIATURAS

AICAR	5-amino-1- $\beta$ -D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida
BFA	brefeldina A
CBX	carbenoxolona de sodio
CCX	ciclooxolona de sodio
cDNA	ácido desoxiribonucleico complementario
CHSE-214	línea celular de embrión de salmón Chinook
Ci	Curie
CTP	citidina 5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
DXV	virus X de la Drosophila
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EICAR	5-etinil-1- $\beta$ -D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida

EICAR-MP	EICAR 5'- monofosfato
GTP	guanosina 5'-trifosfato
HEPES	ácido N-2-hidroximetil piperazin-N'-2-etanosulfónico
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana
hpi	horas post infección
hpG	horas post guanosina
IBDV	virus de la enfermedad infecciosa de la bursa
IMP	inosina monofosfato
IPNV	virus de la necrosis pancreática infecciosa
kDa	kiloDalton
m A	miliamper
MEM	medio mínimo esencial
m.o.i.	multiplicidad de infección
MOPS	ácido sulfónico morfolinopropano
N.D.	No determinado
N.I.	No hubo inhibición
OMP	orotidil monofosfato
OV	virus de la ostra
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de base
PEG	polietilenglicol

Ribavirina-MP	ribavirina 5'-monofosfato
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SSC	amortiguador compuesto por citrato de sodio y cloruro de sodio
SDS	dodecilsulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
TBE	amortiguador Tris Borato EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'tetrametilendiamina
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
TV	virus Tellina
u.f.p.	unidades formadoras de placas
U.I.	unidades internacionales
UV	luz ultravioleta
V	Volt
VP	proteína viral
VPg	proteína viral del genoma

## RESUMEN

El virus de la necrosis pancreática infecciosa, IPNV, es el agente causal de una enfermedad que produce alta morbilidad y mortalidad especialmente entre los salmónidos. El IPNV pertenece a la familia *Birnaviridae*, y su genoma se constituye de dos segmentos de RNA de doble hebra los que tienen una proteína viral, denominada VPg, unida en forma covalente al extremo 5' terminal de ambas hebras de RNA. A partir de uno de los segmentos de RNA, segmento A, se sintetiza una poliproteína que da origen a tres de los cuatro polipéptidos estructurales, VP2, VP3 y VP4. El segmento de RNA B codifica sólo para el polipéptido VP1 el que se encuentra en el virión en dos formas: libre en la nucleocápside, que correspondería a la RNA polimerasa viral y también unido al RNA, como la VPg.

Se conoce muy poco del ciclo infectivo del IPNV y de los otros miembros de la familia *Birnaviridae*. Por esto, el propósito de esta tesis fue estudiar el ciclo replicativo del virus IPN, para lo cual se utilizó compuestos antivirales. La ventaja de utilizar compuestos antivirales como una herramienta para estudiar la replicación viral es que a la vez es posible obtener información para establecer a futuro una terapia antiviral.

Mediante un ensayo de inhibición de la formación de placas se evaluó un grupo de antivirales, y se determinó que el EICAR (5-etinil-1-β-D-ribofuranosilimidazol-4-carboxa-

mida), un compuesto derivado de la ribavirina, y la pirazofurina inhiben eficientemente la replicación del IPNV. Ambos compuestos se perfilan como buenos candidatos para ser evaluados *in vivo* con fines terapéuticos, ya que la concentración del antiviral que inhibe la replicación del virus no tiene efecto citotóxico en la célula. Se realizaron estudios para evaluar el efecto de EICAR sobre la infección del IPNV en trucha arcoiris, y se observó que el tratamiento con este antiviral protege eficientemente a los peces de la muerte.

Se utilizó el EICAR para estudiar la replicación del RNA del IPNV. Se determinó que el EICAR inhibe la síntesis del RNA tanto genómico como mensajero del IPNV. Los resultados obtenidos sugieren que la inhibición de la replicación del RNA y la transcripción viral no ocurre principalmente por efecto directo del EICAR sobre las macromoléculas involucradas en la síntesis del RNA. Además se determinó que la inhibición de la síntesis del RNA viral causada por EICAR se revierte al agregar guanosina y no otros nucleósidos, como adenosina o citosina, sugiriendo que el mecanismo por el cual el EICAR inhibe el IPNV se relaciona con una alteración de la vía sintética de los nucleótidos de guanina. Se diseñó un ensayo, mediante el uso de EICAR y guanosina, que permitió estudiar el inicio de la replicación del RNA viral. En experimentos en los que se utilizó cicloheximida se observó que para iniciar la síntesis de RNA genómico se requirió de nueva síntesis de polipéptidos virales, aún cuando en la célula había una síntesis significativa de ellos. Nuestros resultados sugieren que durante el ciclo infectivo del IPNV se requiere de la síntesis continua de proteínas para iniciar la replicación del RNA viral, probablemente se necesita una concentración crítica de los polipéptidos virales.

## SUMMARY

The infectious pancreatic necrosis virus, IPNV, is the causal agent of a disease that causes high morbidity and mortality of young hatchery-reared salmonids. The IPNV belongs to the *Birnaviridae* family. Its genome is a bisegmented double-stranded RNA that possesses a virus-encoded genome-linked protein (VPg) attached to the 5' end of both segments. The genome segment A encodes a polyprotein that originates 3 of the 4 viral structural polypeptides, VP2, VP3, VP4. The RNA segment B, on the other hand, encodes a single gene product, VP1, that according to its nucleotide sequence it seems to be the viral RNA polymerase. This gene product also corresponds to Vpg.

Currently, very little is known about the *Birnaviridae* infective cycle, including IPNV. The aim of this thesis was to study the IPNV replicative cycle using antiviral drugs. The advantage of using antiviral drugs is that it also obtain information for establishing an antiviral therapy in the future.

A group of antiviral drugs were evaluated by a virus plaque inhibition assay. It was found that EICAR (5-ethynyl-1- $\beta$ -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide), a ribavirin derivative, and pyrazofurin efficiently inhibit the IPNV replication. Both compounds seem to be good candidates for further evaluation in an *in vivo* model of IPNV infection, because

no cytotoxic effect was observed at IPNV-inhibitory concentration. Studies *in vivo* were carried out to evaluate the effect of EICAR on IPNV infected rainbow trout, finding that treatment with this antiviral efficiently protected the fishes from death.

EICAR was used to study viral RNA replication, inhibiting both genomic and messenger IPNV RNA synthesis. The results obtained suggest that the inhibition of the viral replication and transcription is not mainly due to a direct effect of EICAR on the macromolecules involved in IPNV RNA synthesis. EICAR inhibition of viral RNA synthesis is reversed upon adding guanosine but not any other nucleoside, such as adenosine or cytosine, suggesting that the mechanism for IPNV EICAR inhibition is related to the guanine nucleotides synthesis. An assay using EICAR and guanosine was designed to study the requirements of initiation viral RNA replication. Experiments protein synthesis inhibition with cycloheximide indicate that there is a requirement of the *novo* protein synthesis for initiation of viral RNA replication, in spite that there is synthesis of viral polypeptides. Taken together these results suggest that in the IPNV infective cycle it is essential a continuous protein synthesis for the initiation of viral RNA replication, and probably a critic concentration of viral polypeptides is required.

## INTRODUCCION

### ANTECEDENTES GENERALES

En Chile el cultivo de salmones y truchas ha crecido en forma espectacular en los últimos años convirtiéndose en una actividad comercial importante, sin embargo la rentabilidad se ve afectada debido a las pérdidas que se producen por la muerte de las especies cultivadas. La principal causa de muerte se debe a las enfermedades infecciosas causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos, las que son un problema para el futuro de esta actividad.

En la actualidad se han identificado más de 60 virus como agentes causales de enfermedades que afectan a las especies en cultivo (Mc Allister, 1988; Samil y Munro, 1989). Estos corresponden a virus de las familias: *Adeno*, *Herpes*, *Irido*, *Birna*, *Calici*, *Rabdo*, *Reo*, y *Retroviridae* (Wolf, 1988).

Uno de los agentes virales de mayor incidencia es el virus de la necrosis pancreática infecciosa, IPNV, miembro de la familia *Birnaviridae*. El IPNV se ha detectado en la mayoría de los centros productores de salmón del mundo, incluyendo Chile (Mac Donald y col., 1983; Hedrick y col., 1983; Mc Allister y col., 1984; Hedrick y col., 1985; Wolf, 1988; Kusuda y col., 1993; Sanjuan y col., 1993). Entre las especies marinas, económicamente importantes, afectadas por este agente viral encontramos las que pertenecen al género: *Salmo* (trucha arcoiris y salmón del atlántico), *Oncorhynchus* (salmón coho, salmón rosado,



salmón chum, salmón kokane, salmón chinook y trucha amago) y al *Salvelinus* (trucha alpina, trucha lacustre americana y umbrea japonesa). El virus IPN también se ha aislado desde *Anguilla japonica* (anguila japonesa), *Anguilla anguilla* (anguila europea), *Solea solea* (lenguado común), *Cyprinus carpa* (carpa común), *Sooptthalmus maximus* (alevines de turbot) y de mariscos como *Crassostrea gigas* (ostra del Pacífico), *Crassostrea virginica* (ostra americana), *Ostrea edulis* (ostra plana), *Mercenaria mercenaria* (almeja), *Mytillus edulis* (mejillón) y *Patella vulgata* (lapa) entre otras (Mc Allister, 1988; Novoa y col., 1993; Hsu y col., 1993).

Esta amplia distribución se explica en parte por el mecanismo de transmisión del virus IPN (Pilcher y Fryer, 1980; Wolf, 1988; Mc Allister, 1988). Una forma de diseminación importante se debe a la transmisión vertical, la que se produce porque las hembras que son portadoras del IPNV producen ovas contaminadas, y en muchos casos las ovas son exportadas a los países productores de salmón ingresando de este modo el virus a esos países. La transmisión horizontal ocurre como consecuencia de la eliminación del virus a través de las heces y la orina (Mc Allister, 1988; Mc Allister y Owens, 1992), parte del virus liberado al medio proviene de peces que sobreviven a los brotes virales, los que generalmente se convierten en portadores de por vida y eliminan constantemente pequeñas cantidades del patógeno al medio (Pilcher y Fryer, 1980).

Inicialmente se determinó la existencia de 3 serotipos del virus IPN: el serotipo 1, al que pertenece la cepa VR-299 la que es predominante en Norte América; el serotipo 2, al que pertenece la cepa Sp predominante en Europa; y el serotipo 3, al que pertenece la cepa europea Ab. Actualmente se pueden distinguir alrededor de 10 serotipos y además se ha

efectuado una genotipificación, basada en el análisis de la secuencia del genoma viral, definiéndose tres genogrupos principales y una variedad de subgrupos (Barrie y col., 1992; Heppell y col., 1992).

El grado de patogenicidad entre los diferentes aislados de IPNV es variable, las cepas más virulentas corresponden a la VR-299 y la Sp, en cambio la cepa Ab se ha descrito como avirulenta. También se observa distintos grados de patogenicidad entre diferentes aislados de un mismo serotipo (McAllister, 1988).

La enfermedad causada por el virus IPN se conoce como la necrosis pancreática infecciosa y produce una alta morbilidad y mortalidad especialmente en los salmónidos (Pilcher y Fryer, 1980; Samil y Munro, 1989). Sin embargo, la infección puede variar desde una infección inaparente o subclínica hasta una enfermedad aguda donde la mortalidad es casi total o total. La letalidad por el IPNV depende además de la edad; en los peces de uno a cuatro meses causa una mortalidad que puede llegar hasta un 100 %, en cambio en los peces de seis o más meses prácticamente sólo se desarrollan síntomas subclínicos y los peces se transforman en portadores del virus. Aquellos peces de menor edad que sobreviven a la enfermedad también pueden convertirse en portadores del virus (Mc Allister, 1988). En la figura 1 se observa el resultado de un estudio en el que se determinó la mortalidad comparativa de truchas de diferente edad infectadas en forma experimental con una dosis estándar de IPNV, vemos que el mayor porcentaje de muerte ocurre en las truchas de 30 y 60 días de edad, disminuyendo al aumentar la edad y en los peces de alrededor de 120 días prácticamente no se produce muerte (Wolf, 1988).

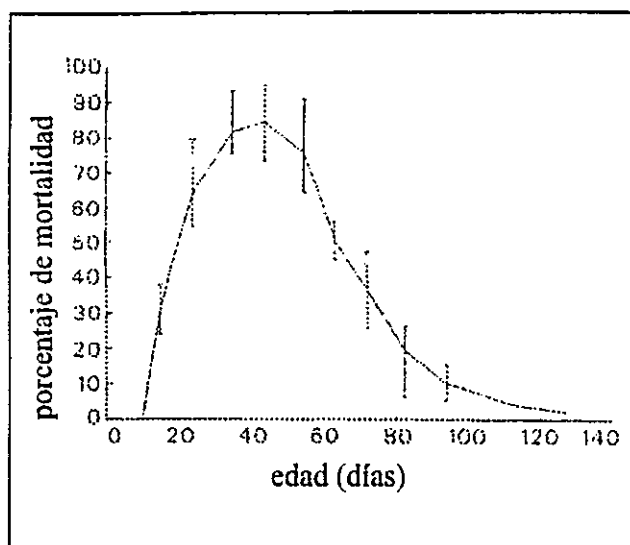


FIGURA 1  
MORTALIDAD COMPARATIVA DE TRUCHAS DE DIFERENTE EDAD INFECTADAS CON IPNV.  
Comparación de la mortalidad de truchas arcoiris de diferente edad al ser infectadas con una dosis estándar de virus IPN.  
(Tomado de Wolf, 1988)

El período de incubación del IPNV es corto, pueden transcurrir sólo 3 a 5 días hasta que aparecen los primeros signos de la enfermedad y la muerte. Los signos clínicos dependen de diversos factores tales como la edad, la condición fisiológica del huésped, la temperatura del agua y la cepa viral. Los peces enfermos muestran un comportamiento típico, en el cual el nado rotatorio se alterna con la postración. Además presentan oscurecimiento de la piel, exoftalmia, distensión abdominal y palidez de las branquias (Mc Allister, 1988; Wolf, 1988). Desde el punto de vista histológico, tal como su nombre lo indica, la infección produce la necrosis del tejido pancreático y también se observa cambios en el tejido adiposo adyacente, en el tejido hematopoyético renal, en el estómago y en el hígado (Wolf, 1988).

Actualmente no hay tratamiento ni prevención efectivos para controlar la enfermedad provocada por el virus IPN, sólo es posible evitar el contacto con el virus, lo que se logra

en parte mediante la detección precoz del virus y la erradicación de los individuos infectados y de sus contactos (Pilcher y Fryer, 1980). El desarrollo de una vacuna efectiva para controlar la necrosis pancreática infecciosa ha resultado difícil a pesar que el virus inactivado con formalina es un inmunógeno potente (Dixon y Hill, 1983). La principal dificultad radica en que no se ha logrado proteger a los peces de edad inferior a los seis meses, justamente la población más susceptible a la infección y en los que el virus causa la muerte. Además, aunque es posible transferir la inmunidad al inyectar intraperitonealmente el suero de los peces adultos inmunizados no se ha logrado transferir los anticuerpos maternos a las ovas, y por otra parte se ha demostrado que en los peces portadores el virus persiste aún teniendo un título elevado de anticuerpos anti-IPNV (Mc Allister, 1988). Otra alternativa para controlar esta enfermedad es obtener a través de cruzamiento genético peces híbridos resistentes al IPNV, sin embargo los resultados no han sido muy satisfactorios y en algunos casos pese a que se ha logrado híbridos resistentes, esta resistencia no se ha transmitido a la descendencia (Dorson y col., 1991).

## CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS IPN

El virus IPN es un virus sin envoltura, posee cápside icosaédrica, sólo una cubierta de proteínas de aproximadamente 60 nm de diámetro y su genoma está formado por ácido ribonucleico de doble hebra segmentado. Basado en estas características el IPNV se clasificó inicialmente como un miembro de la familia *Reoviridae* (Cohen y col., 1973 ). Sin embargo, posteriormente a través de la caracterización bioquímica y biológica del IPNV se determinó

que tenía diferencias importantes respecto de los miembros de la familia *Reoviridae*, y se creó una nueva familia de virus denominada *Birnaviridae*, a la que pertenecen también el virus de la enfermedad infecciosa de la bursa, IBDV (aislado de pollo); el virus X de la *Drosophila*, DXV (aislado de la *Drosophila melanogaster*); el virus Tellina, TV y el virus de la ostra, OV (ambos aislados de moluscos bivalvos) (Dobos y col., 1979). De los cinco virus que componen esta familia el virus IPN es el que más se ha estudiado (Dobos y Roberts, 1982).

El virus IPN tiene una masa molecular de  $55 \times 10^6$  Dalton, y el genoma viral compuesto por los segmentos de RNA A y B equivale al 8,7 % del peso de la partícula viral (Mac Donald y Yamamoto, 1977; Dobos y col., 1979). Ambos segmentos de RNA genómico poseen una proteína viral unida covalentemente al extremo 5' terminal, llamada VPg (Persson y col., 1982; Calvert y col., 1991). El virión está formado por cuatro polipéptidos estructurales denominados VP1, VP2, VP3 y VP4 (Dobos y col., 1979).

El segmento de RNA A, de 3.100 pares de bases, tiene una masa molecular de  $2,5 \times 10^6$  Dalton y al igual que en el IBDV codifica para una poliproteína de 106 kDa (Jagadish y col., 1988). Esta poliproteína es procesada cotraduccionalmente y da origen a tres proteínas estructurales; el precursor del polipéptido VP2 (pVP2), VP3 y VP4. El polipéptido VP2 tiene una masa molecular de 54 kDa y representa un 62 % del total de las proteínas, constituye en forma mayoritaria la cápside del virión y es el principal responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes (Mac Donald y Dobos, 1981; Samil y Munro, 1989; Lawrence y col., 1989). Además se ha sugerido que este polipéptido estaría glicosilado, pero no se ha determinado si esta modificación es importante para la infección

(Estay y col., 1990). El polipéptido VP3 tiene una masa molecular de 31 a 32 kDa y formaría parte de la nucleocápside (Lawrence y col., 1989). Con respecto a VP4 ha habido discrepancias, en un comienzo se pensó que era una proteína no estructural ya que no se podía detectar en el virus purificado incluso mediante el análisis electroforético de los polipéptidos marcados radiactivamente (Duncan y Dobos, 1986; Duncan y col., 1987; Lawrence y col., 1989; Havarstein y col., 1990). Sin embargo en experimentos recientes se demostró, mediante la técnica de Western, que VP4 forma parte de la partícula viral, tiene una masa molecular de 29 kDa y correspondería a la proteasa viral, que se activaría durante la síntesis y procesaría a la poliproteína. Se determinó además que en la célula infectada se detecta una forma truncada de este polipéptido (VP4<sub>t</sub>), de aproximadamente 25 kDa, se encuentra en menor concentración que VP4, y también forma parte del virión (Magyar y Dobos, 1994). Recientemente se determinó la existencia de otro polipéptido viral el que sólo se ha detectado en las células infectadas, estaría codificado en un segundo marco de lectura abierto dentro del segmento de RNA A, correspondería a un polipéptido de 17 kDa rico en residuos de arginina y su función aún no se conoce (Magyar y Dobos, 1994; Heppell y col., 1995).

El segmento de RNA B tiene aproximadamente 2.784 pares de bases y una masa molecular de  $2,3 \times 10^6$  Dalton, codifica para el polipéptido VP1 de aproximadamente 94 kDa. Este polipéptido se encuentra en el virión en dos formas; libre en la nucleocápside y unido en forma covalente al extremo 5' terminal de ambas hebras del RNA genómico (Mac Donald y Dobos, 1981; Mertens y col., 1982; Persson y col., 1982; Calvert y col., 1991; Duncan y col., 1992). Se ha postulado que la VP1 libre correspondería a la RNA polimerasa viral,

ya que se encuentra en un bajo número de copias en la partícula viral, es la proteína viral de mayor peso molecular y además la secuencia nucleotídica del genoma correspondiente a la VP1 tiene secuencias conservadas de consenso entre las RNA polimerasas RNA dependientes (Duncan y col., 1991). La forma de la proteína VP1 que está unida al RNA genómico es la denominada VPg (proteína viral del genoma), constituye una característica de la familia *Birnaviridae* ya que también se encuentra en otros miembros de esta familia (Muller, 1987). Este tipo de proteína viral unida covalentemente al genoma se ha encontrado en diversas familias de virus, los que poseen genomas compuestos por RNA o DNA, como *Adenoviridae* y *Picornaviridae* (Salas, 1991), sin embargo éste es el único caso en que se ha detectado una VPg en una familia de virus cuyo genoma es RNA de doble hebra. Se ha demostrado que estas proteínas tienen un rol fundamental en la replicación del genoma viral y probablemente también en la morfogénesis (Wimmer, 1982; Salas, 1991).

El IPNV se multiplica en el citoplasma celular, este virus se puede replicar en varias líneas celulares de peces a temperaturas inferiores a los 24 °C, produciendo cambios en la célula que se manifiestan como un efecto citopático característico. Las líneas comúnmente utilizadas para su aislamiento son: CHSE-214 (células de embrión de salmón Chinook), FHM (*Phinaphales promelas*), RTG-2 (células de gónadas de trucha arcoiris) y BF-2 (células de fibroblasto de bluegill). La eficiencia de la producción de la progenie viral varía según la línea celular utilizada, los mejores resultados se obtienen al utilizar la línea celular CHSE-214 donde un ciclo de replicación tarda alrededor de 16 a 22 horas a 22 °C (Pilcher y Fryer, 1980; Lannan y col., 1984; Mc Allister, 1988).

Sin embargo es muy poco lo que se sabe respecto del ciclo infectivo del virus IPN,

de los mecanismos de transcripción y de replicación del RNA, así como de la morfogénesis. Esto se debe en gran medida a que durante varios años se asumió que el ciclo replicativo del IPNV era similar al de la familia *Reoviridae*. Incluso respecto de las etapas iniciales del ciclo replicativo la información se limita solamente a un estudio en el que se ha sugerido que el virus ingresaría a la célula mediante endocitosis, los resultados de este trabajo indican que además otra etapa del ciclo infeccioso posterior a la entrada del virus podría requerir de estructuras de membrana de la célula (Farias y col., 1988; Couve y col., 1992). Los otros estudios efectuados en cultivo celular corresponden a los realizados por Dobos en el año 1977 y 1980 (Dobos, 1977; Somogyi y Dobos, 1980), en los que se analizó la síntesis de las macromoléculas del IPNV durante el ciclo replicativo. Se estudió la síntesis de los polipéptidos del IPNV en la línea celular RTG-2 y se determinó que los polipéptidos virales se sintetizan en forma sincrónica a partir de las 5 a 6 horas post infección (hpi). Se observó que durante la infección el IPNV no induce la inhibición de la síntesis de las proteínas del huésped, y además se determinó que la replicación viral es sensible a la actinomicina D durante las primeras horas de la infección, lo que dificulta aún más la identificación de aquellos polipéptidos virales, como VP2, cuya migración electroforética es similar a la de componentes celulares que están presentes en una elevada concentración (Dobos, 1977). La síntesis de RNA se estudió, en cambio, en la línea celular CHSE-214. Se detectaron tres formas de RNA: 1) dos segmentos de RNA de doble hebra de 14 S, idénticos al RNA de la progenie viral y que se detecta a partir de las 8 horas post infección; 2) dos especies de RNA de 24 S, sensible a RNAsa, los que se encuentran asociados a polisomas y son precipitables en LiCl. Esta forma correspondería a los mensajeros virales y se detectan a partir de las 3 a



4 horas post infección; 3) finalmente un producto de 14 a 16S, parcialmente resistente a RNAsa, el que probablemente es un intermediario de transcripción. Los autores sugieren que el RNA mensajero es el templado para la síntesis de la hebra complementaria originando así el RNA de doble hebra, y proponen que la replicación del RNA ocurriría a través de un mecanismo de replicación conservativo similar al de los reovirus (Somogyi y Dobos, 1980).

Por otra parte a través de ensayos *in vitro* se ha detectado una actividad RNA polimerasa asociada a la partícula viral, tanto en IPNV (Mertens y col., 1982), como en DXV (Bernard, 1980) y en IBDV (Spies y col., 1987). En los tres casos, el producto de esta reacción permanece asociado al virión y es liberado a través de la degradación proteolítica del virus. En IPNV e IBDV se identificaron dos productos; uno de 24 S y otro de 14 S, el producto principal de la reacción es el RNA de 14 S cuyas características, tanto de resistencia a RNAsa, sedimentación y migración electroforética, son idénticas a las del RNA genómico. El producto 24 S es sensible a RNAsa A y al ser analizado tanto por electroforesis en gel de poliacrilamida, como por centrifugación en un gradiente de sacarosa resulta a la vez idéntico al RNA de simple hebra producido en las células infectadas. Además, en el caso de IBDV se demostró que al agregar este RNA a un sistema de traducción *in vitro* se sintetizaban las proteínas virales (Spies y col., 1987). Sin embargo la cantidad de producto que se obtiene en los ensayos de transcripción *in vitro* es muy baja, ya que al parecer aún no se ha logrado establecer las condiciones que permitan reiniciar la síntesis de RNA. A pesar de esta limitante, a partir de estos estudios se ha postulado que la síntesis de RNA ocurriría a través de un mecanismo asimétrico, semiconservativo, que involucraría el desplazamiento de una de las hebras parentales (Bernard, 1980; Mertens y col., 1982; Dobos, 1995).

Obviamente este mecanismo difiere radicalmente del propuesto a partir del estudio de la síntesis de RNA en cultivo celular (Somogyi y Dobos, 1980). Además en trabajos recientes se demostró que cuando se incubaba el virus purificado en presencia de [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-GTP el nucleótido se une al polipéptido VP1 formando VP1-GMP. Se determinó, sin embargo, que las características de esta reacción no eran las propias de una guanililtransferasa, ya que el GMP se une a la VP1 a través de un enlace fosfodiéster y además la VP1-GMP no puede transferir el grupo GMP a una molécula aceptora. Se estableció que después de la formación de VP1pG se une un segundo GMP y se forman complejos VP1pGpG, esta adición secuencial de guanina a VP1 es dependiente de la presencia del templado. A partir de estos resultados se ha sugerido que este polipéptido actuaría como un partidor durante la síntesis de RNA, lo que explicaría la presencia de VP1 unida en forma covalente al genoma del virus (VPg) (Dobos, 1993; Dobos, 1995).

Basándose en las características del virus IPN, específicamente en que los polipéptidos virales se originan a través de la síntesis de una poliproteína y a la presencia de una VPg unida covalentemente al extremo 5' de ambos segmentos de RNA genómico, en esta tesis se postula que estas características deben ser determinantes en los mecanismos de replicación del RNA y en la morfogénesis de los virus de la familia *Birnaviridae*. De tal modo que definirían un ciclo infectivo de características propias y probablemente diferente del de la familia *Reoviridae*, discrepando de lo que tradicionalmente se ha postulado. A nuestro parecer podría tener incluso más similitud con otras familias, como la *Picornaviridae*. Debido a la escasa información que existe respecto al IPNV en esta tesis

se propuso abordar el estudio del ciclo replicativo viral mediante la utilización de inhibidores que teóricamente podrían afectar diferentes eventos del ciclo viral, ya que de este modo se podrá conocer aspectos generales de la replicación del IPNV y posteriormente, en función de los resultados, utilizar algún (os) compuesto (s) antiviral (es) para estudiar una etapa determinada.

## **ANTIVIRALES**

Para estudiar el ciclo infectivo viral se recurre frecuentemente a la utilización de inhibidores, tradicionalmente estos inhibidores son compuestos cuya utilidad no va más allá de su función como herramienta para los estudios de biología molecular. En la última década, sin embargo, el desarrollo de la biología molecular y la necesidad de controlar las epidemias, principalmente aquellas causadas por el virus herpes y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) generó un mayor desarrollo y utilización de estos inhibidores, principalmente de aquellos con propiedades terapéuticas a los que se les denomina antiviral. Así, se reconoció la importancia de interrelacionar los estudios dirigidos a la utilización de los compuestos antivirales como inhibidores específicos del ciclo infectivo viral, y aquellos estudios con miras hacia el control de la enfermedad a través de una quimioterapia antiviral.

Entre las drogas antivirales que actualmente tienen licencia para el uso clínico encontramos: amantadina, idoxuridina, trifluridina, vidarabina, aciclovir, ribavirina, zidovudina (AZT), ganciclovir. Además, existe una gran cantidad de compuestos que están en vía de ser utilizados en terapia (Hirsh y Kaplan, 1990; Marsden, 1992; De Clercq, 1993).

Sin embargo, principalmente por el problema de la efectividad de las drogas y debido a la generación de resistencia a los antivirales resulta importante encontrar nuevas alternativas. Actualmente se invierte una gran cantidad de recursos y esfuerzo en la búsqueda de nuevas drogas antivirales, tanto en la síntesis química de compuestos, como en la extracción de compuestos antivirales a partir de productos naturales. Se ha desarrollado una serie de compuestos que tienen actividad antiviral de amplio espectro, es decir, que inhiben a un grupo muy amplio de virus. Estos interfieren diferentes procesos del ciclo replicativo viral, por ejemplo, el ingreso del virus a la célula, la transcripción y la replicación del genoma viral, la glicosilación de proteínas virales, etc. En el esquema de la figuras 2A y 2B se incluye la estructura de algunos de estos compuestos antivirales.

Entre los inhibidores de transcripción y replicación del genoma viral se encuentran los compuestos sintéticos análogos de nucleósidos. Uno de ellos es la ribavirina, 1- $\beta$ -D-ribofuranosil -1,2,4-triazol-3-carboxamida, un análogo de guanosina también conocido como virazol, que inhibe una gran variedad de virus de RNA de simple y doble hebra (figura 2A) (Scholtissek, 1976; Gilbert y Knight, 1986; Shigeta y col., 1992). Este compuesto es utilizado en el tratamiento de infecciones respiratorias severas causadas por el virus respiratorio sincicial (RSV), infecciones producidas por el virus influenza A y B y parainfluenza. En la figura 3 se muestra un esquema del mecanismo de acción de la ribavirina. Se ha establecido que cuando la ribavirina ingresa a la célula se monofosforila principalmente a través de una nucleósido quinasa (Zimmerman y Deeprise, 1978) y que esta forma de la ribavirina, ribavirina 5' monofosfato (ribavirina-MP), es un inhibidor competitivo de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMP deshidrogenasa) una enzima

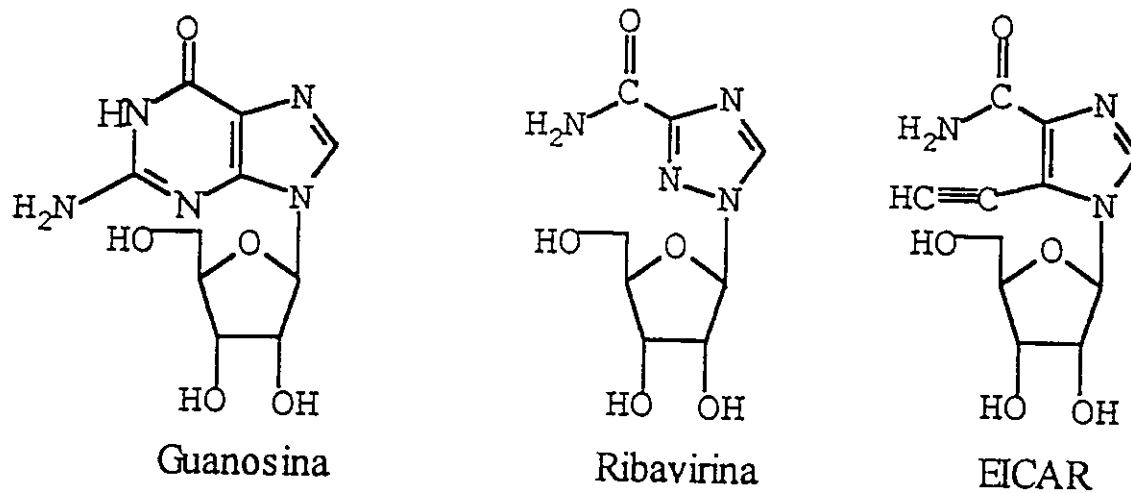
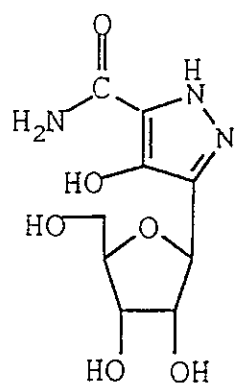
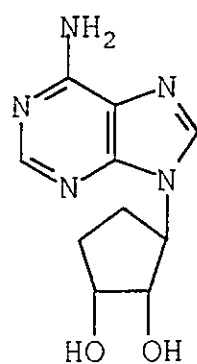


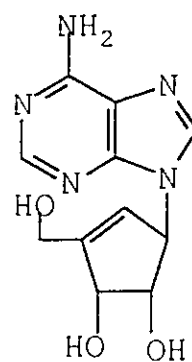
FIGURA 2A  
ESTRUCTURA DE COMPUESTOS ANTIVIRALES:  
ANALOGOS DE GUANOSINA



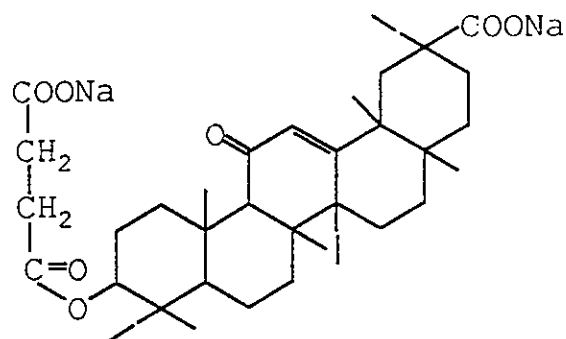
Pirazofurina



Noraristeromicina



3-Deazaneplanocina A



Carbenoxolona de Sodio

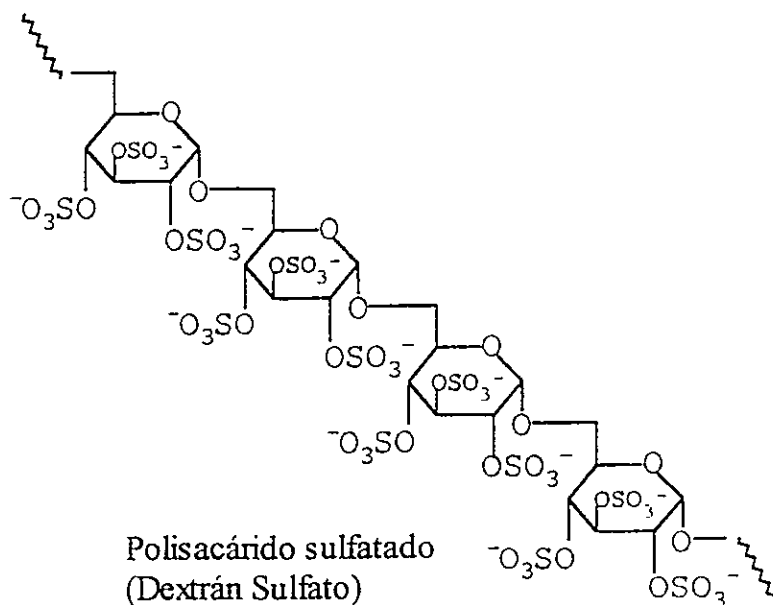
Poliacárido sulfatado  
(Dextrán Sulfato)

FIGURA 2B  
ESTRUCTURA DE COMPUESTOS ANTIVIRALES

**FIGURA 3**  
**MECANISMO DE ACCION DE LA RIBAVIRINA**

La enzima clave en el mecanismo de inhibición es la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMP deshidrogenasa) que cataliza la reacción: inosina monofosfato (IMP) → xantosina monofosfato (XMP).

PRPP:5-fosforibosil-1-pirofosfato; PRA:5-fosforibosilamina; GAR:glicinamida ribonucleótido; FGAR:formilglicinamida ribonucleótido; FGAM:formilglicinamidina ribonucleótido; AIR:5-aminoimidazol ribonucleótido; ACAIR: 5-amino-4-carboxiaminoimidazol ribonucleótido; SAICAR: N-Succinil-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido; AICAR: 5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido; FAICAR: N-Formilaminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido.

El esquema se realizó en base a información obtenida de De Clercq, 1993 y Lehninger y col., 1993

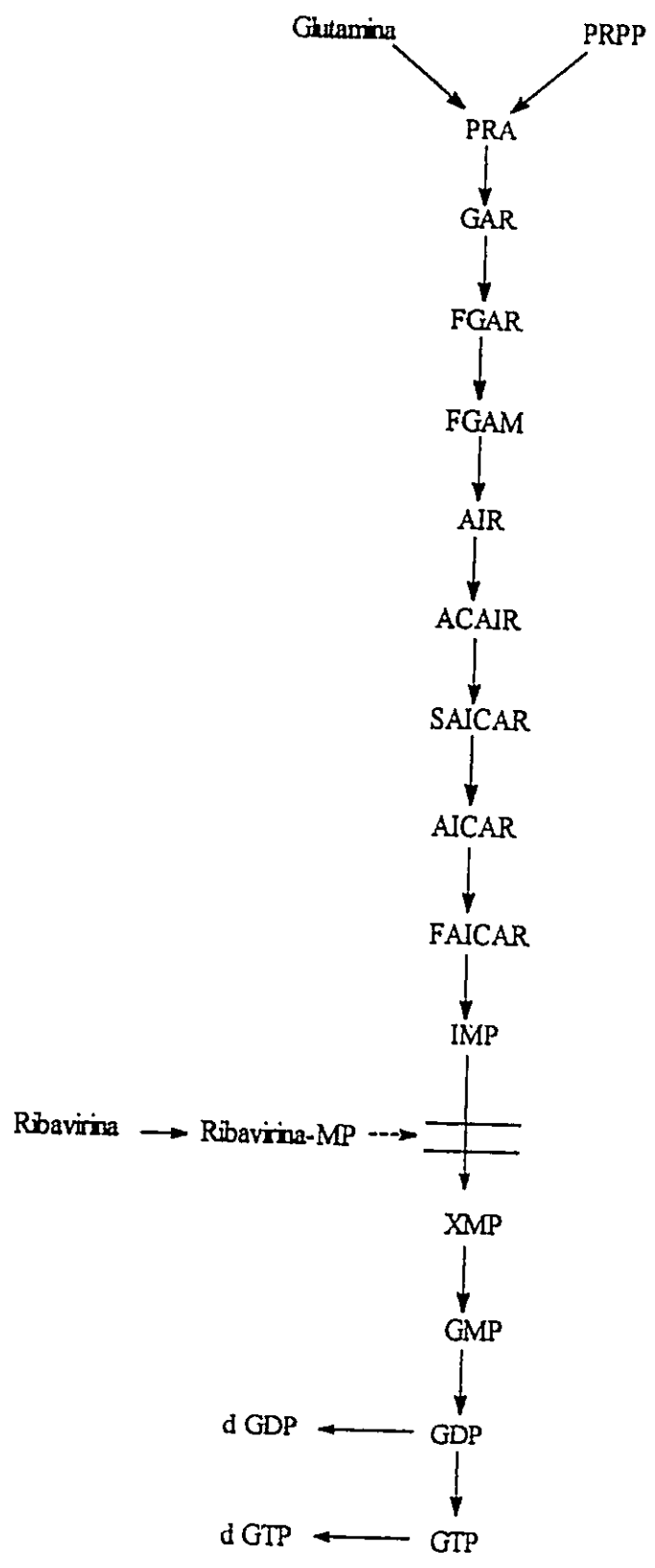


FIGURA 3



que participa en la biosíntesis *de novo* de los nucleótidos de purinas y que convierte la inosina monofosfato (IMP) en xantosina monofosfato (XMP). Como consecuencia inmediata de la inhibición se produce un aumento del nivel de IMP intracelular y una disminución del nivel del "pool" de GTP y dGTP intracelular. Se ha demostrado que la inhibición viral puede ser revertida específicamente por algunos nucleósidos como la guanosina o xantosina y no por otros, como AICAR, adenosina, citosina, uridina, de tal modo que la inhibición se superaría al sintetizarse los nucleótidos de guanina a partir de guanosina y xantosina. En el caso de guanosina probablemente la síntesis de los nucleótidos ocurra a través de la vía alternativa o vía de rescate, ya que la vía de biosíntesis *de novo* permanece bloqueada por el antiviral (Scholtissek, 1976). Se ha propuesto que la IMP deshidrogenasa reconocería a la ribavirina-MP como un análogo del IMP o del GMP, que es un regulador de la reacción catalizada por esta enzima, a pesar que la estructura química de la ribavirina es similar a la del precursor de la biosíntesis de las purinas: 5-amino-1- $\beta$ -D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida (AICAR). Sin embargo mediante cristalografía de rayos X se determinó que la estructura cristalina de la ribavirina es similar a la de la guanosina y no al AICAR. Además, se demostró que la ribavirina es utilizada como un sustrato en reacciones enzimáticas en que el sustrato es guanosina, e incluso la enzima guanina aminohidrolasa reconoce como sustrato tanto a la guanina como a la base que forma parte de la estructura de la ribavirina y en cambio AICAR 5'-monofosfato no es capaz de inhibir la enzima IMP deshidrogenasa. (Streeter y col., 1973; Zimmerman y Deepröse, 1978; Stridh, 1983).

A pesar que la reducción del nivel del "pool" de GTP intracelular es sin duda el efecto principal que produce la ribavirina cuando ingresa a la célula, se ha descrito que en

el virus influenza además la forma 5' trifosfato de la ribavirina puede interferir directamente con la síntesis de RNA y con la formación del cap. Se demostró que al aumentar la concentración de ribavirina (incluso sobre 25  $\mu\text{M}$ ) la actividad antiinfluenza aumenta progresivamente con una reducción del nivel intracelular de los nucleótidos de guanina, pero si se aumenta aún más la concentración de ribavirina (100  $\mu\text{M}$ ) la inhibición aumenta sin una consecuente disminución del "pool" de GTP (Wray y col., 1995; Gilbert y Vernon, 1985). También se demostró en ensayos *in vitro* que la ribavirina es un inhibidor directo de la RNA polimerasa del virus de la estomatitis vesicular (VSV) y de la transcriptasa reversa del HIV (De Clercq, 1993)

En los últimos años se han sintetizado una serie de derivados de la ribavirina, el más potente es el EICAR, 5-etinil-1- $\beta$ -D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida (figura 2A), que es alrededor de 10 a 100 veces más potente y tiene un espectro antiviral que es similar al de la ribavirina; es inhibidor de poxvirus, togavirus, arenavirus, reovirus, ortomixovirus y paramixovirus (De Clercq y col., 1991; Shigeta y col., 1992). En base a sus características el EICAR se perfila como un buen candidato para ser utilizado en una terapia antiviral y los resultados de algunas evaluaciones del efecto antiviral *in vivo* son satisfactorios (De Clercq y col., 1991). Se ha postulado que el mecanismo de acción antiviral del EICAR, al igual que el de la ribavirina, se basaría en la inhibición de la inosina monofosfato deshidrogenasa. A partir de ensayos de inhibición de la formación de placas para diferentes virus (virus respiratorio sincicial, parainfluenza, reovirus, virus de la estomatitis vesicular y Sindbis) se demostró que el efecto inhibidor del EICAR sobre el virus es revertido en presencia de guanosina y no de otros nucleósidos como adenosina, citidina, uridina, inosina (De Clercq

y col., 1991). Esto estaría respaldado por los estudios realizados posteriormente por Balzarini (Balzarini y col., 1993) en que se evaluó el efecto de EICAR como un inhibidor de la proliferación de células leucémicas de ratón (L 1210) y células de linfocitos humano (CEM). En este trabajo se demostró que el EICAR es un inhibidor potente de la actividad IMP deshidrogenasa en las células intactas, y además que el EICAR 5'-monofosfato (EICAR-MP) es un potente inhibidor de la IMP deshidrogenasa purificada a partir de extractos de células L1210 (la razón  $K_i/K_m$  corresponde a 0,06). Se determinó que existe una correlación entre la inhibición de la proliferación de las células tumorales y la inhibición de la IMP deshidrogenasa en las células intactas, lo que se confirmó midiendo el nivel intracelular de los nucleótidos en presencia de EICAR determinando que efectivamente este antiviral produce la acumulación de inosina monofosfato y el agotamiento de los niveles de GTP y dGTP. Además se determinó que el efecto del EICAR sobre la proliferación celular se revierte al agregar guanosina, guanina y no adenosina.

Por otra parte, utilizando líneas celulares CEM mutantes; CEM deficiente en la adenosina quinasa y CEM deficiente en la hipoxantina/guanina fosforibosiltransferasa (enzima de la vía alternativa o vía de rescate para la síntesis de nucleótidos de guanina) se determinó que, al igual que la ribavirina, el EICAR sería activado a la forma EICAR-MP principalmente a través de una actividad adenosina quinasa celular. Esto coincide con el análisis de esta actividad enzimática en una línea celular mutante de la L1210 seleccionada en base a su resistencia a EICAR, la que posee solamente un 5 % de la actividad adenosina quinasa presente en las células no mutadas (Balzarini y col., 1993).

Otro compuesto que inhibe a los virus RNA de simple como de doble hebra y

también a los virus DNA es la pirazofurina, 4-hidroxi-3- $\beta$ -ribofuranosilpirazol-5-carboxamida, (figura 2B), la que supera a varios compuestos antivirales en potencia y en selectividad. Al parecer la pirazofurina 5'-monofosfato inhibiría la orotidilmonofosfato descarboxilasa (OMP descarboxilasa), una enzima que participa en la biosíntesis de las pirimidinas (De Clercq, 1993).

Una serie de compuestos que son derivados carbocíclicos de la adenosina (figura 2B), como la 3-deazaneplanocina A, aristeromicina, 5'- noraristeromicina y 6'- $\beta$ -fluroaristeromicina, inhiben la replicación de un amplio grupo de virus (De Clercq, 1985; De Clercq, 1993). Estos compuestos se han descrito como inhibidores de la S-adenosil homocisteína hidrolasa (SAH-hidrolasa), la enzima que hidrolisa a la S-adenosilhomocisteína (SAH) que es producto de la reacción de metilación catalizada por metiltransferasas, que usan S-adenosilmetionina (SAM) como sustrato, y que actúa a la vez como un inhibidor retrógrado de estas reacciones. Como consecuencia de la inhibición se acumula la SAH, impidiendo así las reacciones de metilación que se requieren para la maduración de los RNA mensajeros virales que poseen una estructura cap (De Clercq y Cools, 1985; De Clercq y col., 1989; De Clercq, 1993).

Otro compuesto reconocido por su amplio espectro antiviral es el ácido fosfonofórmico, foscarnet, un análogo de pirofosfato que inhibe una serie de virus DNA y RNA entre los que destacan el HIV, herpes, el citomegalovirus, varicella zoster y Epstein-Barr. El efecto de este antiviral se debe a la inhibición de las polimerasas virales (Stridh y col., 1989; Crumpacker, 1992).

Por otra parte existen compuestos como los triterpenos cuyas propiedades antivirales

se debe a un efecto más complejo. Se ha estudiado el mecanismo de acción de dos de estos compuestos, la carbenoxolona de sodio (CBX) (figura 2B) y la ciclooxolona de sodio (CCX) (Dargan y Subak-Sharpe, 1985; Dargan y Subak-Sharpe, 1992; Dargan y col., 1992). Estos compuestos inducen alteraciones en la célula que afectan algunas funciones relacionadas con estructuras de membranas celulares que son necesarias para la replicación de varios virus, muy similar a la que se logra con brefeldina A (BFA), un metabolito de hongo que se ha utilizado para estudiar el tráfico de membranas en células eucarióticas (Pelham, 1991; Irurzun y col., 1992). La BFA bloquea el transporte de las proteínas desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi, e inhibe la formación de vesículas que no están cubiertas por clatrina, y en cambio no afecta otros procesos celulares que involucran membranas como la endocitosis, la acidificación del endosoma y la función del lisosoma. Se ha demostrado que la BFA inhibe la replicación del virus polio, ya que impediría la formación de una clase específica de vesículas a las que está asociado el complejo de replicación del RNA viral (Irurzun y col., 1992; Maynell y col., 1992).

También se ha determinado que sustancias polianiónicas como los polisacáridos sulfatados tienen actividad antiviral (figura 2 B). Se ha demostrado que el dextrán sulfato y la heparina, así como otros polisacáridos sulfatados, inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y de una amplia variedad de virus que tienen envoltura (Baba y col., 1988; De Clercq, 1993). Si bien el mecanismo principal de acción se debería a la inhibición de la adsorción viral, también se ha observado inhibición de la transcripción *in vitro* del HIV (Neushul, 1990).

## ANTIVIRALES Y VIRUS IPN

Los estudios basados en el control del virus IPN mediante quimioterapia se limitan a los trabajos realizados en los años 60 y 70, en los que se utilizó compuestos no registrados para uso legal como yoduro, yoduro de polivinilpirrolidona (PVP), lográndose muy pocos beneficios en la reducción de la mortalidad, además de efectos secundarios sobre el peso y la pigmentación de los peces (Wolf, 1988).

Posteriormente se han realizado muy pocos estudios para evaluar el efecto de compuestos inhibidores o antivirales sobre el virus IPN (Migus y Dobos, 1980; Hasobe y Saneyoshi, 1980; Savan y Dobos, 1980; Hudson y col., 1988). El más importante es el trabajo realizado por Migus (Migus y Dobos, 1980), en él se demostró que la ribavirina es capaz de inhibir la replicación del IPNV en las células CHSE-214 a una concentración de 10 µg/ml, aparentemente por efecto del antiviral sobre la síntesis de RNA viral. Se probó además el efecto de la ribavirina sobre alevines de trucha arcoiris infectados experimentalmente con virus IPN, sin embargo en presencia del antiviral no se observó disminución de la mortalidad causada por el virus (Savan y Dobos, 1980).

Debido a la importancia que desde el punto de vista económico tiene establecer una terapia para controlar la necrosis pancreática infecciosa en esta tesis se propone estudiar el ciclo replicativo del virus IPN utilizando como inhibidores compuestos antivirales que tengan una promisoriosa aplicación terapéutica. Esta aproximación tiene un doble propósito: utilizar el antiviral como una herramienta para estudiar el ciclo replicativo del IPNV, y a la vez

obtener información que permita establecer las bases de futuros estudios destinados al control de la necrosis pancreática infecciosa mediante una quimioterapia.

Con este fin, se evaluó un grupo de antivirales que presentan actividad antiviral de amplio espectro para virus RNA de simple y doble hebra, que actualmente se perfilan como una posible alternativa de terapia en otros virus y que afectan diferentes eventos del ciclo replicativo. Se evaluó antivirales que actúan a nivel de transcripción y replicación del genoma viral: 1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida (ribavirina); 5-etinil-1-β D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida (EICAR); 4-hidroxi-3-β-D-ribofuranosilpirazol-5-carboxamida (pirazofurina); derivados carbocíclicos de la adenosina como la deazaneplanocina A, noraristeromicina, 6'-β-fluoroaristeromicina; y el ácido fosfonofórmico (foscarnet). También antivirales que inhiben procesos asociados a membranas celulares como la carbenoxolona de sodio y la brefeldina A. Además, se probó polisacáridos sulfatados que podrían inhibir la entrada del virus a la célula e incluso la transcripción viral, se evaluó la actividad antiviral de los polisacáridos sulfatados extraídos del alga *Durvillaea antarctica*, conocida como cochayuyo, y del alga *Desmarestia meenziessii*. Posteriormente se estudió el efecto inhibitorio producido por EICAR, uno de los antivirales que resultó inhibir eficientemente la replicación del IPNV, y se utilizó este compuesto antiviral para estudiar la replicación del RNA viral. Con este fin se estableció la cinética de la síntesis de las macromoléculas del IPNV en las células CHSE-214. Finalmente, basándose en los resultados obtenidos en cultivo celular con EICAR, se determinó el efecto de este antiviral sobre la necrosis pancreática infecciosa en alevines de trucha arcoiris infectados experimentalmente con virus IPN.

## MATERIALES

### VIRUS

En este trabajo se utilizó la cepa VR-299 del virus de la necrosis pancreática infecciosa, IPNV, donada por el Dr. Juan Kuznar del departamento de Bioquímica de la Universidad de Valparaíso.

### CELULAS

Para la propagación del virus IPN se utilizó la línea celular de embrión de salmón Chinook, denominada CHSE-214, donada por el Dr. J.L. Fryer del Departamento de Microbiología de la Universidad del Estado de Oregon, E.E.U.U.

### PECES

Los peces empleados para evaluar el efecto de EICAR *in vivo*, corresponden a la especie trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss*. Estos se obtuvieron desde la Piscicultura Experimental de la Universidad de Chile, ubicada en Castro, Chiloé.



## ALIMENTO PARA PECES

Durante el tiempo que duró el ensayo *in vivo* los peces se alimentaron con "pellet" de alimentación primaria. Fue donado por el Dr. Juan Bataglia, Piscicultura Experimental de la Universidad de Chile.

## SONDA

Como sonda para la detección del RNA mensajero del IPNV se utilizó un segmento de DNA de 809 pares de bases, complementario a la región comprendida entre los nucleótidos 412 y 1211 de la región del segmento A de RNA genómico, que codifica para la proteína VP2 de la cepa Jasper. Este segmento, clonado en el plasmidio VLN (pVLN), fue donado por el Dr. Siba Samal de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad de Maryland, College Park, MD, E.E.U.U.

## ANTIVIRALES

Los compuestos 5-etinil-1- $\beta$ -D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida (EICAR), 4-hidroxi-3- $\beta$ -D-ribofuranosilpirazol-5-carboxamida (pirazofurina), deazaneplanocina A, noraristeromicina, 6'- $\beta$ - fluoroaristeromicina, fueron donados por el Dr. Erik de Clercq del Rega Institut for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, Bélgica.

El triterpeno, carbenoxolona de sodio fue donado por Miss Baxendale del Laboratorio Biorex de Londres.

Ribavirina, brefeldina A y el ácido fosfonofórmico (foscarnet) se obtuvieron de Sigma.

Los compuestos naturales, polisacáridos sulfatados de *Durvillaea antarctica* fueron

extraídos a partir del alga *Durvillaea antarctica*, conocida comúnmente como cochayuyo y los polisacáridos sulfatados de *Desmarestia meenziessii* fueron extraídos del alga de ese mismo nombre, proveniente de la Antártica. La extracción y caracterización de estos compuestos fue realizada por el bioquímico Elisa Zuñiga del Departamento de Química de la USACH, según técnicas ya descritas (Matsuhira y col., 1996).

Filifolinol fue extraído a partir del exudado resinoso del *Heliotropium filifolium*, una planta que se encuentra en las costas del norte y centro de Chile y del sur del Perú. La planta fue colectada desde Carrizal Bajo, III Región de Chile, el compuesto fue extraído y caracterizado químicamente por el Dr. René Torres del Departamento de Química de la USACH (Torres y col., 1994).

## FUENTES DE MATERIALES, ENZIMAS Y REACTIVOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

**BIORAD:** acrilamida, N,N'-metileno-bis-acrilamida, Temed, persulfato de amonio, sacarosa, xilencianol.

**Cycleguard:** bomba de filtración continua Aqua-clear Mini.

**Dupont:** omnifluor, [ $^{32}$ P]-ácido ortofosfórico, [ $\alpha$   $^{32}$ P]dCTP, [ $^3$ H]-UTP.

**Enzo Diagnostics:** filtros de fibra de vidrio.

**Fluka:** tiocianato de guanidina y ácido sulfónico morfolinopropano.

**GIBCO- BRL:** enzima de restricción EcoRI, sistema de marcación de partidores múltiples (random primers DNA labeling system), bolsas de revelado, suero fetal bovino, Tris, glicina, medio mínimo esencial (MEM), medio mínimo esencial deficiente en metionina, tripsina, agarosa de baja temperatura de gelificación.

**ICN Pharmaceuticals:** Trans-  $^{35}\text{S}$ -label, [  $^3\text{H}$ ]-timidina.

**Kodak:** placas X-OMAT K.

**Laboratorio Chile:** penicilina, nistatina, estreptomycin.

**Merck:** cloroformo, fenol, etanol absoluto, dodecilsulfato de sodio, ácido etilendiamino-tetraacético, glicerol, ácido tricloroacético, cristal violeta en solución (GRAM'S), formaldehído, cloruro de magnesio, acetato de amonio, cloruro de cesio.

**Nunc :** botellas y placas de cultivo.

**Schleicher y Schuell:** membrana de nylon S&S Nytran.

**Sera:** lana filtrante, acondicionador de agua para acuarios (sera aquatan), termómetros para acuarios.

**Sigma:** DNA de espermio de salmón, dextrán sulfato, marcadores de masa molecular molecular para proteínas preteñidas, azul de bromofenol, polietilenglicol 8000, dietilpirocarbonato, ditiotreitól, adenosina, citosina, guanosina, proteinasa K, ATP, CTP, GTP, UTP, bromuro de etidio, HEPES, pirofosfato de sodio, bentonita, actinomicina D, agarosa, formamida, cloruro de litio, azul de tripán.

**Stratagene:** columnas de filtración Nucltrap.

**Reactivos de calidad comercial:** etanol, ácido bórico, urea, nitrato de plata y tolueno .

## METODOS

### 1. OBTENCION DEL VIRUS IPN.

La propagación del virus IPN se realizó en monocapas de células CHSE214, las que se cultivaron hasta aproximadamente un 90 % de confluencia en medio mínimo esencial (MEM), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, penicilina 100 UI/ml, nistatina 25 UI/ml, estreptomycinina 100 µg/ml y HEPES 10 mM pH 7,3 (medio de crecimiento). Se infectó la monocapa a una multiplicidad de infección (m.o.i.) igual a 1 u.f.p/célula con la cepa viral VR-299, en MEM suplementado con SFB al 2 %, penicilina 100 UI/ml; nistatina 25 UI/ml; estreptomycinina 100 UI/ml y HEPES 10 mM pH 7,3 (medio de infección). Se realizó el proceso de adsorción viral durante 1 hora a 15 °C y luego se incubó a 15 °C hasta observar un efecto citopático mayor al 90 %, lo que toma aproximadamente 3 días. El inóculo viral se alicuotó y se guardó a - 20 °C.

### 2. TITULACION DEL VIRUS IPN.

Para la titulación del inóculo viral, se creció monocapas de células CHSE-214 en placas de cultivo de 6 pocillos de 9,6 cm<sup>2</sup> de superficie, en las condiciones descritas en métodos 1. Se realizó diluciones seriadas del inóculo viral en MEM 2X suplementado con SFB al 10%; penicilina 100 UI/ml; nistatina 25 UI/ml; estreptomycinina 100 µg/ml y

HEPES 10 mM pH 7,3 y se infectaron los pocillos con un volumen de 300  $\mu$ l de cada una de estas diluciones. Se realizó el proceso de adsorción durante 1 hora de incubación a 15 °C y posteriormente a la monocapa celular se le agregó una cubierta de agarosa de baja temperatura de gelificación, al 0,5 % en medio de crecimiento. Al cabo de 3 días de incubación a 15 °C, las células se fijaron con 1 ml de formaldehído al 37 % a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego de retirar el fijador y la cubierta de agarosa, la monocapa celular se tiñó con una solución de cristal violeta al 0,5 % durante 1 hora. Finalmente, se lavó con agua, se observó las placas de lisis y se determinó el título viral .

### **3. OBTENCION DE PARTICULAS DEL VIRUS IPN MARCADAS RADIATIVAMENTE CON <sup>35</sup>S.**

Se propagó el virus IPN en monocapas de células CHSE-214 crecidas en botellas de cultivo de 175cm<sup>2</sup>, tal como se describió en métodos 1, con la diferencia que posterior a la adsorción viral se cambió el medio de crecimiento por medio de infección deficiente en metionina. Se agregó 10  $\mu$ Ci/ml de trans-<sup>35</sup>S- label (Actividad específica: 1183 Ci/mmol, ICN Pharmaceuticals), el que se mencionará en el texto como [<sup>35</sup>S]- metionina. Se incubó durante 3 días a 15 °C, momento en que se observó un efecto citopático mayor al 90 %. El proceso de purificación se basó en el método de Chang y col. (Chang y col., 1978) con las siguientes modificaciones. Una vez desprendida la monocapa celular infectada se realizaron 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento para lisar las células y liberar el virus al medio, se centrifugó a 5.000xg durante 10 minutos a 4°C, luego al sobrenadante se le agregó polietilenglicol al 5 % p/v; cloruro de sodio al 2,2 % p/v y se incubó con agitación

toda la noche a 4 °C, posteriormente se centrifugó a 9 000xg durante 30 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido se resuspendió en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8,5 y se ultracentrifugó a través de un colchón de sacarosa al 25 % a 150.000xg durante 120 minutos a 4 °C. El precipitado resultante se resuspendió en un volumen de 500 µl de Tris-HCl 50 mM pH 8,5 y posteriormente se sometió a una ultracentrifugación a través de una gradiente discontinua de 20 % sacarosa-CsCl 30-40% p/v, a 150.000 xg durante 90 minutos a 4 °C. La gradiente se colectó en fracciones de 250 µl y se determinó la presencia del virus en las distintas fracciones, tanto por la presencia de su RNA genómico analizado en electroforesis en gel de poliacrilamida al 7 %, como de las proteínas virales marcadas radiactivamente analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 12 %-SDS. Finalmente, las fracciones en las cuales se determinó la presencia del virus se juntaron, se diluyeron con 2 volúmenes de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 y se ultracentrifugó a 150.000xg durante 90 minutos a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 100 µl de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, la suspensión viral se alicuotó y las alicuotas se congelaron a -20°C. Las ultracentrifugaciones se realizaron en una ultracentrífuga Beckman, modelo L2-65B.

#### **4. EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LA REPLICACION DEL VIRUS IPN EN CELULAS CHSE-214. ENSAYO DE INHIBICION DE LA FORMACION DE PLACAS .**

Se creció monocapas de células CHSE-214 en placas de cultivo de 6 pocillos de 9,6 cm<sup>2</sup> de superficie, en las mismas condiciones descritas en métodos 2. Se removió el medio de crecimiento y la monocapa se infectó con 100 a 200 unidades formadoras de

placas (u.f.p.) de IPNV. Después de 1 hora de adsorción viral a 15 °C, se retiró el inóculo y la monocapa celular se cubrió con agarosa de baja temperatura de gelificación al 0,5 % en medio de crecimiento. Se incubó durante 3 días a 15 °C y posteriormente las células se fijaron y se tiñeron, tal como se describió en métodos 2. Se determinó la inhibición en la formación de las placas de lisis al agregar distintas concentraciones de cada uno de los compuestos antivirales, se probó cada uno de ellos en un amplio rango de concentración. En general, el antiviral se agregó al pocillo junto con la cubierta de agarosa, sin embargo en ocasiones, según se indica en los resultados, el antiviral se agregó además junto con el virus durante el proceso de adsorción y también se preincubó el antiviral con la monocapa celular durante 1 a 2 horas previo a la infección viral.

Para aquellos compuestos que inhibieron la formación de placas del IPNV se determinó la  $EC_{50}$ , es decir la concentración del antiviral requerida para inhibir en un 50 % la formación de placas. Esta se calculó como el promedio de la concentración del antiviral que inhibía el 50 % de las placas de lisis que se obtuvo de tres experimentos independientes realizados por duplicado. En el cálculo no se consideró los experimentos en que se tenían menos de 20 placas de lisis.

## 5. EVALUACION DEL EFECTO CITOTOXICO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LAS CELULAS CHSE-214.

### 5.1. EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Se creció monocapas de células CHSE-214 en placas de cultivo de 24 pocillos de 2 cm<sup>2</sup> de superficie hasta una confluencia aproximada de un 95 a 100 %. Con el fin de lograr un estado estacionario, sin crecimiento celular, se retiró el suero fetal bovino del medio de cultivo. Se agregó a cada pocillo diferentes concentraciones del compuesto antiviral y se incubó durante 3 días a 18 °C. Al término de la incubación, se observó el estado de la monocapa celular al microscopio óptico invertido, se soltó las células mediante dos lavados con una solución de EDTA 0,5 mM y luego se agregó una solución de EDTA 0,5 mM y tripsina al 0,02 % y se dejó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Finalmente, se agregó MEM suplementado con SFB al 5 % y se realizó un conteo de las células vivas, mediante el método de exclusión del colorante azul de tripán, según técnicas descritas (Catálogo de Cultivo Celular, Sigma 1994). Se cuantificó en un hemocitómetro el número de células viables provenientes de cultivos incubados en ausencia y en presencia del antiviral. Mediante este ensayo se evaluó cada antiviral en un rango de concentración determinado. Se determinó la CC<sub>50</sub>, es decir la concentración del antiviral requerida para reducir la viabilidad celular en un 50 %. Esta se calculó a partir de la concentración del antiviral que inhibía la viabilidad celular en un 50 % que se obtuvo de tres experimentos independientes realizados por triplicado.



## 5.2. EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LA SINTESIS DE DNA CELULAR.

Se creció monocapas de células CHSE-214, en placas de cultivo de 24 pocillos de 2 cm<sup>2</sup> de superficie sólo hasta una confluencia aproximada de un 50 %, con el propósito de tener una monocapa celular en crecimiento activo. Se retiró el medio y se agregó 300 µl de medio MEM suplementado con SFB al 5%. A cada pocillo se agregó diferentes concentraciones del compuesto antiviral en un amplio rango de concentración y 1 µCi/ml de [<sup>3</sup>H]-timidina (Actividad específica: 67 Ci/mmol, ICN Biomedicals). Luego de incubar durante 18 a 20 horas a 18 °C, se observó el estado de la monocapa celular y se retiró el medio de cultivo. La monocapa celular fue tratada con 200 µl de tampón hipotónico (Tris-HCl 3 mM pH 8,1; MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM; NaCl 3 mM) y SDS 0,5 %, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo ésta se raspó y se precipitó el material ácido insoluble, tanto de la monocapa celular como del sobrenadante del cultivo, para lo cual se agregó TCA al 5 % previa adición de DNA de espermio de salmón 0,4 mg/ml y pirofosfato de sodio 100 mM. Se incubó a 4 °C. por 30 minutos y la solución se filtró al vacío sobre filtros de lana de vidrio, los que se lavaron con TCA al 5 % y con etanol frío. Los filtros se secaron y se les agregó 3 ml de omnifluor en tolueno. La radiactividad asociada se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS-5000 TD .

Mediante este ensayo se evaluó un amplio rango de concentración para cada uno de los compuestos antivirales. Se determinó la IC<sub>50</sub>, es decir la concentración del antiviral requerida para reducir la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en un 50 %. Esta se calculó como el promedio de la concentración del antiviral que disminuía la síntesis de DNA celular en un

50 % que se obtuvo de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

La nomenclatura usada en este trabajo:  $EC_{50}$ ,  $CC_{50}$ ,  $IC_{50}$ , como también la expresión de la concentración del antiviral en  $\mu\text{g/ml}$  corresponde a la utilizada por consenso en las publicaciones realizadas en la revista Antiviral Research y en las presentaciones de los congresos de "The International Society for Antiviral Research".

### **5.3. EVALUACION DEL EFECTO DE EICAR SOBRE LA SINTESIS DE PROTEINAS CELULAR.**

Al igual que en el ensayo anterior, se creció monocapas de células CHSE-214 en placas de cultivo de 24 pocillos de  $2\text{ cm}^2$  de superficie sólo hasta una confluencia aproximada de un 50 %, con el propósito de lograr una monocapa celular en crecimiento activo. Se retiró el medio, se agregó 300  $\mu\text{l}$  de medio MEM suplementado con SFB al 5 % y a cada pocillo se agregó diferentes concentraciones de EICAR (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4 y 5  $\mu\text{g/ml}$ ) y 20  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^{35}\text{S}$ ]- metionina. Luego de incubar durante 19 horas a 18 °C se observó el estado de la monocapa celular, se retiró el medio de cultivo y la monocapa fue tratada con 200  $\mu\text{l}$  de una solución de digestión compuesta por Tris-HCl 0,2 M pH 8,0; SDS 1 %; EDTA 10 mM durante 10 minutos a temperatura ambiente. La monocapa se raspó, se juntó con el sobrenadante del cultivo y las proteínas se precipitaron con TCA al 10 %. Se incubó en hielo por 30 minutos, luego se filtró al vacío sobre filtros de lana de vidrio y se lavó con TCA y etanol frío. Los filtros se secaron y se les agregó 3 ml de omnifluor en tolueno. La radiactividad asociada se determinó en un contador de centelleo líquido Packard, modelo TRICAR B 2100 Tr. El ensayo se realizó por triplicado.

## 6. EVALUACION DEL EFECTO DE LOS POLISACARIDOS SULFATADOS DE *Durvillaea antarctica* SOBRE LA TRANSCRIPCION *in vitro* DEL VIRUS IPN.

A una mezcla estándar de transcripción se le agregó diferentes concentraciones de los polisacáridos sulfatados de *Durvillaea antarctica* o de un hidrolisado parcial de estos polisacáridos, el que se obtuvo por tratamiento con HCl durante 15 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla estaba constituida por amortiguador Tris-HCl 120 mM pH 8,5; MgCl<sub>2</sub> 14 mM; ATP, CTP, GTP 4 mM de cada uno; [ <sup>3</sup>H ]-UTP 0,24 mM (Actividad específica 100 cpm/pmol) y 3x10<sup>7</sup> u.f.p. de virus IPN parcialmente purificado, en un volumen final de 25 µl utilizando agua tratada con DEPC 0,1 %. La mezcla se incubó por 60 minutos a 45 °C y luego se agregó proteinasa K a una concentración final de 160 µg/ml y se incubó por 30 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo a 0 °C, agregando pirofosfato de sodio 100 mM y DNA de espermio de salmón 0,4 mg/ml. El material ácido insoluble se precipitó con TCA al 5 % y se dejó en hielo, al menos durante 15 minutos. Luego la solución se filtró al vacío sobre filtros de fibra de vidrio, los que se lavaron con TCA al 5 % y con etanol frío. Los filtros se secaron y se les agregó 3ml de omnifluor en tolueno. La radiactividad asociada se contó en un contador de centelleo líquido Beckman LS-5000 TD.

## 7. EFECTO DE EICAR SOBRE ALEVINES DE TRUCHA ARCOIRIS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON VIRUS IPN.

### 7.1. INFECCION EXPERIMENTAL DE LOS ALEVINES CON VIRUS IPN.

Se utilizó alevines de trucha arcoiris de un peso promedio de 0,9 g y de

aproximadamente 8 semanas de edad. Previo a la infección, se esperó 4 días para que los alevines se adaptaran a las condiciones del laboratorio. Los peces se dispusieron en acuarios con agua tratada con un acondicionador de agua, mantenida a una temperatura entre los 12-15 °C durante todo el experimento. El oxígeno se suministró mediante burbujeo constante, utilizando una bomba de burbujeo de aire y piedras difusoras. El agua se cambió diariamente, excepto durante el fin de semana en que ésta se filtró mediante bombas de filtración mecánica continua (Aquaclear Mini). Los peces se alimentaron a una tasa de un 3,5 % de su peso. Al quinto día se separó un grupo de 40 alevines correspondiente al control sano los que se mantuvieron sin infectar. Los 120 alevines restantes se infectaron bajo las siguientes condiciones: los peces en ayuno se sumergieron en agua que contenía una suspensión de virus IPN de  $10^5$  u.f.p./ ml de la cepa VR-299 y para hacer más efectiva la infección se aumentó el burbujeo y simultáneamente se les dió una pequeña porción de alimento. Después de 1 hora los peces se lavaron para evitar arrastrar el virus en su superficie y posteriormente se distribuyeron en tres grupos de 40 alevines cada uno los que dispusieron en acuarios independientes, durante el resto del día los peces no recibieron alimentación. El material que estuvo en contacto con los peces como acuarios, termómetros, piedras de difusión, mangueras para aspirar, mallas para trasladar los peces, se separó debidamente y se asignó a cada grupo de trabajo un conjunto de material de uso exclusivo.

## **7.2. TRATAMIENTO CON EICAR DE LOS ALEVINES INFECTADOS.**

Dos de los tres grupos de peces infectados fueron tratados con EICAR durante los 12 días que duró el experimento. El tratamiento se inició 2 horas después de la infección de

los peces y consistió en una inmersión diaria durante 2 horas en una solución de EICAR, uno de los grupos fue tratado con EICAR 0,2 µg/ml y el otro con 1 µg/ml. Las soluciones de EICAR se guardaron a 4 °C durante los 12 días. Los peces no tratados con EICAR, es decir los peces correspondientes a los controles tanto sanos como infectados, se sumergieron paralelamente en agua sin el antiviral. Se observó diariamente la muerte de los peces en cada uno de los grupos de trabajo.

### **7.3. DETECCION DEL VIRUS IPN EN LOS ALEVINES MUERTOS.**

Con el propósito de verificar la presencia de IPNV en los peces muertos los alevines se procesaron lo que consistió en cortar la cabeza, la cola y homogenizar el resto del pez. Luego se le agregó un volumen de MEM, se agitó en un vortex y se centrifugó durante 15 minutos a 3.000 rpm en centrífuga ependorf. Al sobrenadante se le agregó penicilina 800 UI/ml; nistatina 400 UI/ml; estreptomycin 800 µg/ml y se dejó toda la noche a 4 °C. Posteriormente se realizó dos diluciones de este homogeneizado, 1:50 y 1:100 en el medio de infección, con las que se inoculó monocapas de células CHSE-214 cultivadas en placas de 6 pocillos de 9,6 cm<sup>2</sup> de superficie y se incubó a 15 °C. Se observó diariamente para determinar la aparición del efecto citopático celular, y al momento de observar el efecto citopático característico del virus IPN se verificó la presencia del virus a través de la detección del RNA genómico. Con este fin se realizó la extracción de RNA a una alícuota de 300 µl del sobrenadante de estos cultivos, tal como se describe en métodos 8.2.1., y el RNA extraído se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7 %, a 50 V durante 20 horas y posterior tinción con nitrato de plata.

## 8. SINTESIS DE LAS MACROMOLECULAS DEL VIRUS IPN EN CELULAS CHSE-214.

### 8.1. SINTESIS DE LOS POLIPEPTIDOS VIRALES .

Se infectó con virus IPN monocapas de células CHSE-214 cultivadas en placas de petri de 8,8 cm<sup>2</sup> de superficie, a una m.o.i. de 20 - 50 u.f.p./célula. La infección se realizó en medio de infección y se incubó durante 1 hora a 15 °C. Posterior a la adsorción viral, se retiró el inóculo, la monocapa celular se lavó 2 veces con medio de infección y este momento se denominó 0 hora post infección (hpi). Luego se agregó medio de infección y la incubación se continuó por 2 horas más a 15 °C. Al cabo de este tiempo, se retiró el medio y la monocapa celular se irradió con luz ultravioleta de 254 nm (UV), para lo cual se utilizó una lámpara de una intensidad de 400  $\mu$ W/cm<sup>2</sup>, la que se le aplicó durante 15 segundos a una distancia de 20 cm, condiciones similares a las descritas anteriormente (Dobos, 1980). Se agregó nuevamente medio de infección y se incubó a 15 °C. Para establecer el momento en que se inicia la síntesis de los polipéptidos virales a distintos tiempos de la infección se agregó un pulso de dos horas de [<sup>35</sup>S]-metionina 50  $\mu$ Ci/ml, según se indica en los resultados. Dos horas previo a la marcación radiactiva de los polipéptidos el medio de cultivo se cambió por MEM deficiente en metionina suplementado con SFB al 2 %; penicilina 100 UI/ml; nistatina 25 UI/ml; estreptomycinina 100  $\mu$ g/ml y HEPES 10 mM pH 7,3. Al finalizar la marcación, se observó el estado de la monocapa celular al microscopio óptico invertido, se retiró el sobrenadante celular y la monocapa se resuspendió en 100  $\mu$ l de la solución disruptora de proteínas (solución de corrida para

PAGE-SDS). Las muestras se guardaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para luego someterlas a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 %-SDS, preparado según el método de Laemmli (Laemmli, 1970), a 50 V por 20 horas y posteriormente se realizó una autorradiografía.

## 8.2. SINTESIS DEL RNA GENOMICO VIRAL.

Se infectó con inóculo de virus IPN monocapas de células CHSE-214 cultivadas en placas de petri de  $8,8\text{ cm}^2$ , a una m.o.i. de 20-50 u.f.p./célula. Se incubó durante 1 hora a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , posterior a la adsorción viral se retiró el inóculo y la monocapa celular se lavó 2 veces con el medio de cultivo. Este momento se denominó tiempo 0 hora post infección. A continuación se agregó a cada muestra  $50\text{ }\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^{32}\text{P}$ ]- ácido ortofosfórico y se incubó a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas, luego se agregó actinomicina D  $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$  y se continuó la incubación hasta los diferentes tiempos post infección, según se indica en los resultados. Se verificó el estado de la monocapa celular, se retiró el sobrenadante de cultivo y a la monocapa celular se le agregó tampón hipotónico, se raspó y homogenizó. Finalmente se realizó la extracción y precipitación del RNA como se indica en métodos 8.2.1.

Las muestras de RNA se guardaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para luego someterlas a una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7 % o un gel de poliacrilamida 5 %-urea 8 M y posterior autorradiografía. El gel de poliacrilamida 5 %-urea 8 M se preparó de acuerdo a protocolos descritos (Sambrook y col., 1989). A las muestras se les agregó solución de corrida para geles de poliacrilamida-urea que contiene formamida desionizada 90 %, EDTA 0,001 M; xilencianol 0,05 % p/v; azul de bromofenol 0,05 % p/v. La electroforesis se corrió en la

solución amortiguadora compuesta por: Tris-HCl 0,089 M; Acido bórico 0,089 M; EDTA 0,02 M pH 8,0 (TBE) a un voltaje constante de 180 V, durante 22 horas. La electroforesis en gel de poliacrilamida al 7 % se corrió a 50 V por 20 horas. Cuando se marcó el RNA con [  $^3\text{H}$  ]-uridina posterior a la electroforesis en gel de poliacrilamida 5%-urea 8M se efectuó una fluorografía según técnicas descritas (Sambrook y col., 1989).

### **8.2.1. EXTRACCION DEL RNA GENOMICO DEL VIRUS IPN .**

A la suspensión de células se le agregó un volumen de una solución de digestión que contiene Tris-HCl 0,2 M pH 8,0; SDS 1%; EDTA 10 mM y proteinasa K 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , luego la mezcla se incubó a 50 °C por 1 hora. El RNA se extrajo con un volumen de una solución de cloroformo/fenol (1:1) y posteriormente se precipitó a -20 °C por 30 minutos con 2,5 volúmenes de etanol y acetato de sodio pH 5,2 a una concentración final de 0,25 M (Sambrook y col., 1989).

### **8.3. SINTESIS DE RNA MENSAJERO VIRAL. DETECCION MEDIANTE LA TECNICA DE NORTHERN.**

Para determinar la síntesis de RNA mensajero del virus IPN, se siguió un protocolo similar al utilizado para establecer la síntesis de RNA genómico (métodos 8.2.). Sin embargo, a diferencia del protocolo empleado para el RNA genómico en este caso no se agregó un radioisotopo ya que el RNA mensajero se detectó mediante la técnica de Northen. A las 10 hpi se verificó el estado de la monocapa celular, se retiró el medio de cultivo e inmediatamente se realizó la extracción del RNA, siguiendo el protocolo que se indica en



métodos 8.2.1. El experimento se realizó por duplicado, para evaluar la precipitación del ácido nucleico extraído con y sin LiCl. La técnica de Northern se realizó utilizando dos protocolos, como se describe a continuación.

### 8.3.1. EXTRACCION DEL RNA.

La extracción del RNA mensajero se realizó de modo similar a la extracción del RNA genómico del IPNV, con algunas modificaciones. Todas las soluciones se prepararon con agua tratada previamente con DEPC al 0,1 % y esterilizada. Cada muestra fue procesada inmediatamente al detener la incubación y se trabajó cuidadosamente manteniendo siempre condiciones libres de RNAsas. A la monocapa celular se le agregó un volumen de la solución de digestión y luego la mezcla se incubó a 50 °C por 1 hora. El RNA se extrajo con un volumen de una solución de cloroformo/fenol (1:1) y posteriormente se precipitó a -20°C por 30 minutos con 2,5 volúmenes de etanol y acetato de sodio 2,5 M pH 5,2. A muestras paralelas se realizó el mismo protocolo de extracción del RNA, pero previo a la precipitación con etanol se precipitó con LiCl 4M durante toda la noche a 4 °C, siguiendo los procedimientos descritos (Sambrook y col., 1989). Finalmente las muestras de RNA se resuspendieron en agua tratada con DEPC y estéril. Estas se sometieron tanto a una electroforesis en geles de poliacrilamida 5 %-urea 8 M como a una electroforesis en gel de agarosa-formaldehído, como se describe a continuación.

### **8.3.2. ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DEL RNA A MEMBRANA DE NYLON.**

#### **8.3.2.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-UREA Y ELECTROTRANSFERENCIA DEL RNA A MEMBRANA DE NYLON.**

Previo a la preparación del gel se trató la cámara de electroforesis y los vidrios con NaOH 0,4 N durante 30 minutos para eliminar las RNAsas presentes y luego se enjuagó exhaustivamente con agua destilada tratada con DEPC y esteril. Se preparó un gel de poliacrilamida al 5 %-urea 8 M, tal como se describió en métodos 8.2. Inmediatamente antes de cargar las muestras en el gel se les agregó un volumen de la solución de muestra para geles de poliacrilamida-urea y se mantuvieron en hielo. El gel se corrió a un voltaje constante de 180 V durante 22 horas en una solución de TBE. Posteriormente, este gel se trató con una solución de NaOH 50 mM durante 30 minutos y luego con una solución de Tris-HCl 50 mM pH 7,5 por 30 minutos. A continuación el RNA se transfirió a una membrana de nylon, esta se realizó a 190 mA durante 2 horas en una solución amortiguadora de Tris-HCl-glicina, siguiendo protocolos ya descritos (Sambrook y col., 1989). Al finalizar la transferencia el ácido nucleico se inmobilizó a la membrana, incubándola a 80 °C por 1 hora.

#### **8.3.2.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA-FORMALDEHIDO Y TRANSFERENCIA DEL RNA A MEMBRANA DE NYLON POR CAPILARIDAD.**

Se trató la cámara de electroforesis en la forma descrita en el punto anterior, para

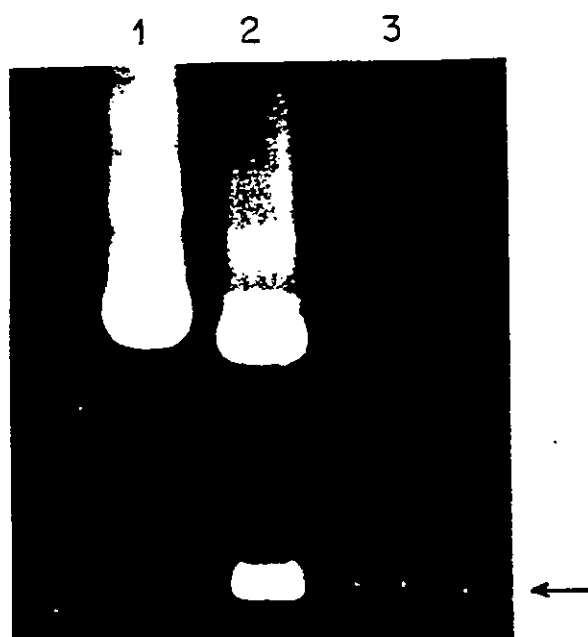
eliminar las RNAsas. Se preparó un gel de agarosa al 1% en una solución que contenía ácido sulfónico morfolinopropano (MOPS) 20 mM; acetato de sodio 8 mM; EDTA 1 mM pH 8,0 y formaldehído 6,3 % según el protocolo de Sambrook (Sambrook y col., 1989). Inmediatamente antes de aplicar las muestras de RNA en el gel, se trataron con una solución que contiene: MOPS 20 mM; acetato de sodio 8 mM; EDTA 1 mM pH 8,0; formamida desionizada 50 %; formaldehído 6,6 %; bromuro de etidio 33 µg/ml; azul de bromofenol 0,04 % y glicerol 5 %. Las muestras se calentaron por 10 minutos a 60 °C y se mantuvieron en hielo hasta ser analizadas. El gel se corrió a voltaje constante de 80 V durante 5 horas en una solución amortiguadora de MOPS 20 mM; acetato de sodio 8 mM; EDTA 1 mM pH 8,0. Luego de fotografiar el gel bajo una fuente de luz ultravioleta de onda corta, se procedió a tratar el gel para su transferencia a una membrana de nylon. Los gels se incubaron por 45 minutos en una solución de NaOH 50 mM; NaCl 10 mM a temperatura ambiente y luego se neutralizaron incubando por 45 minutos en Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron por 1 hora con una solución 20 X SSC compuesta por NaCl 3 M; citrato de sodio 0,3 M pH 7,0. El RNA se transfirió por capilaridad a membranas de nylon durante 18 horas, como se describe en Sambrook y col., (Sambrook y col. 1989), usando para la transferencia una solución SSC 10X. Luego de la transferencia se inmovilizaron los ácidos nucleicos a las membranas, incubándolas a 80 °C por 1 hora.

### **8.3.3. OBTENCION Y MARCACION RADIATIVA DE LA SONDA.**

Como sonda de hibridación se utilizó un segmento de 809 pares de bases del cDNA del segmento de RNA A del IPNV, clonado en el plasmidio VLN (pVLN). Este segmento

se recuperó por una digestión enzimática con la enzima EcoRI, siguiendo técnicas descritas (Sambrook y col., 1989). Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE con el fin de verificar la digestión enzimática. El trozo de agarosa correspondiente al segmento de 809 pares de bases se cortó y la sonda se recuperó mediante centrifugación de la agarosa a través de lana filtrante a 10.000 rpm por 5 minutos en centrífuga ependorf. Posteriormente se extrajo y precipitó el DNA, finalmente se midió la concentración del segmento espectrofotométricamente a una longitud de onda de 260 nm. En la figura 4 se muestra una fotografía del gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, donde se observa la migración del plasmidio completo (carril 1), el plasmidio digerido (carril 2) y una alícuota del segmento de 809 pares de bases purificado (carril 3).

La sonda purificada se marcó radiactivamente con [ $\alpha$   $^{32}$ P]-dCTP, mediante el método de Random primer, utilizando un kit comercial GIBCO-BRL. Esto consistió básicamente en denaturar el DNA, calentando a 95 °C por 5 minutos e inmediatamente traspasarlo a hielo. Se realizó luego la marcación a 25 °C por 1,5 horas en 50  $\mu$ l de una mezcla que contiene dTTP; dATP; dGTP; 20  $\mu$ M de cada uno; amortiguador Tris-HCl que contiene una mezcla de los hexadeoxiribonucleótidos; BSA; HEPES; MgCl<sub>2</sub>; 2-mercaptoetanol, pH 6,8; 50  $\mu$ Ci de [ $\alpha$   $^{32}$ P]-dCTP (Actividad específica: 3.000 Ci/mmol, Dupont) y 3 unidades de fragmento Klenow. Una vez finalizada la marcación, la sonda se purificó de los nucleótidos libres, mediante filtración en columnas Stratagene (# 400701), las cuales retienen los nucleótidos libres. La radiactividad incorporada a la sonda se cuantificó agregando una alícuota del eluido de la columna a un filtro de microfibra de vidrio y midiendo la radiactividad en un contador de centelleo líquido Beckman LS-5000 TD



**FIGURA 4**  
**ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE LA SONDA DE cDNA AISLADA A PARTIR DEL PLASMIDIO VLN.**

En un gel de agarosa al 1 % se cargó en el carril 1: 1  $\mu\text{g}$  de DNA del plasmidio VLN sin digerir ; carril 2: 2  $\mu\text{g}$  de DNA del plasmidio digerido con Eco RI y en el carril 3: 100 ng del inserto de 809 pb aislado. La electroforesis se realizó a 100 V por 3 horas y posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . La flecha indica la migración correspondiente al inserto.

#### **8.3.4. HIBRIDACION CON LA SONDA RADIATIVA.**

Las membranas se prehibridaron por 2 horas a 42 °C en una solución que contiene formamida desionizada 40 %; dextrán sulfato 10 %; solución amortiguadora citrato de sodio, NaCl (SSC) 6 X; SDS 1 % y DNA de espermio de salmón 250 µg/ml como bloqueador. Se eliminó esta solución y las membranas se incubaron en la misma solución de prehibridación, pero en presencia de la sonda previamente denaturada por calentamiento a 95 °C durante 5 minutos. Se agregó  $1 \times 10^6$  cpm de sonda por cada mililitro de solución de hibridación. La hibridación se realizó durante 18 horas a 42 °C. Luego se eliminó la solución radiactiva y las membranas se lavaron dos veces por 30 minutos a temperatura ambiente en una solución SSC 2X y SDS 0,1 %. Posteriormente, se realizaron dos lavados a 52 °C por 30 minutos en SSC 0,1 X y SDS 0,1%, para finalmente exponer con una placa autorradiográfica Kodak X-OMAT.

### **9. EVALUACION DEL EFECTO DE EICAR SOBRE LA REPLICACION DEL RNA Y LA TRANSCRIPCION DEL VIRUS IPN EN CULTIVO CELULAR.**

#### **9.1. EFECTO DE EICAR SOBRE LA SINTESIS DEL RNA GENOMICO VIRAL EN CELULAS CHSE-214.**

Para evaluar el efecto de EICAR sobre la síntesis de RNA genómico del IPNV se infectó monocapas de células CHSE-214, crecidas en placas de petri de 8,8 cm<sup>2</sup> de superficie, con el inóculo viral siguiendo el protocolo descrito en métodos 8.2. En estos experimentos no se adicionó actinomicina D, ya que en la presencia de EICAR y

actinomicina D la monocapa celular se afectaba. El RNA genómico viral intracelular se marcó radiactivamente con [ $^{32}\text{P}$ ]-ácido ortofosfórico 50  $\mu\text{Ci/ml}$  agregando la marca a las 0 hpi y hasta alrededor de las 10 hpi. En general, se agregó 0.5  $\mu\text{g/ml}$  de EICAR a las 0 hpi al medio de incubación. Las variaciones de este protocolo respecto de la concentración del antiviral y del momento en que éste se adicionó se especifican en los resultados. A las 10 hpi se observó el estado de la monocapa celular, se descartó el sobrenadante y se realizó la extracción y posterior precipitación del RNA de la monocapa celular, tal como se describió en métodos 8.2.1. Ocasionalmente, según se indica en los resultados, a tiempos más prolongados de incubación fue necesario extraer el RNA tanto de la monocapa como de las células que se soltaron en el medio de incubación. Finalmente, las muestras de RNA se sometieron a una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7% y posterior autorradiografía.

## **9.2. EFECTO DE EICAR SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN VIRAL EN CELULAS CHSE-214. EVALUACION A TRAVÉS DE LA SÍNTESIS DE LOS POLIPEPTIDOS VIRALES.**

El efecto de EICAR sobre la expresión de los polipéptidos del virus IPN se evaluó siguiendo un protocolo similar al descrito en métodos 8.1., sin embargo en presencia del antiviral no se aplicó luz ultravioleta a la monocapa celular ya que en presencia de EICAR y UV la monocapa se afectaba. Las proteínas se marcaron intracelularmente mediante un pulso de [ $^{35}\text{S}$ ]-metionina 50  $\mu\text{Ci/ml}$  de dos horas entre las 6 y las 8 hpi. En general se agregó 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de EICAR directamente al medio de incubación a las 0 hpi, las variaciones

de este protocolo se indican en los resultados. Las muestras se analizaron sometiendo la monocapa celular, resuspendida en solución disruptora de proteínas, a una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12 %- SDS y posterior autorradiografía.

Ocasionalmente, según se indica en los resultados, a tiempos más prolongados de incubación fue necesario colectar las células del sobrenadante de cultivo para analizar tanto los polipéptidos virales tanto de las células que se soltaron como de la monocapa celular.

### **9.3. REVERSION DE LA INHIBICION DEL IPNV POR EICAR MEDIANTE LA ADICION DE NUCLEOSIDOS.**

Los ensayos de reversión del efecto de EICAR tanto sobre la síntesis del RNA genómico como sobre la expresión de los polipéptidos virales se realizaron infectando monocapas de células CHSE-214, crecidas en placas de petri de 8,8 cm<sup>2</sup> de superficie, en la forma ya descrita en métodos 8.1. Al retirar el inóculo, en el tiempo 0 hpi, se agregó al medio de cultivo EICAR 0.5 µg/ml y 5, 10, 50 µg/ml de guanosina o 10, 50, 100 µg/ml de adenosina o de citosina. Para evaluar el efecto sobre la síntesis de RNA genómico se agregó, también en ese momento, [ <sup>32</sup>P ]- ácido ortofosfórico 50 µCi/ml y se incubó a 15 °C hasta las 10 hpi. Al igual que en las otras ocasiones, se observó el estado de la monocapa celular y se procedió a extraer el RNA el que se analizó posteriormente mediante electroforesis y autorradiografía. Para evaluar el efecto de los nucleósidos sobre la inhibición de la síntesis de polipéptidos virales se realizó el mismo experimento, pero en este caso se marcó los polipéptidos intracelularmente mediante un pulso radiactivo de [ <sup>35</sup>S ]-metionina 50 µCi/ml, entre las 6 a 8 hpi y éstos se analizaron mediante electroforesis y posterior autorradiografía.



#### **9.4. USO DE EICAR Y GUANOSINA PARA ESTUDIAR EL INICIO DE LA REPLICACION DEL RNA VIRAL.**

Se infectó monocapas de células CHSE-214 crecidas en placas de petri, tal como se describió en métodos 8.1. A las 1,5 hpi se adicionó EICAR 0,5  $\mu\text{g/ml}$  al medio de cultivo celular, se continuó con la incubación a 15 °C y a las 10 hpi se adicionó guanosina 10  $\mu\text{g/ml}$ , momento que se denominó como 0 horas post guanosina (hpG). Se analizó la síntesis de los polipéptidos y del RNA genómico, para lo cual se tomó muestras tanto de RNA como de los polipéptidos virales a los diferentes tiempos pre y post guanosina. Para observar la síntesis del RNA genómico sintetizado después de la adición del nucleósido se agregó el radioisotopo junto con la guanosina (0 hpG) y en el caso de los polipéptidos se marcó radiactivamente a partir de las 0 hpG mediante pulsos radiactivos de 2 horas, a los tiempos que se indican en los resultados. Al igual que en los experimentos descritos anteriormente el RNA y los polipéptidos se analizaron mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida al 7 % y poliacrilamida al 12 %-SDS, respectivamente.

#### **9.5. USO DE CICLOHEXIMIDA PARA ESTUDIAR EL REQUERIMIENTO DE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN EL INICIO DE LA REPLICACION DEL RNA VIRAL.**

Se realizó experimentos similares a los descritos en métodos 9.4. y además en una serie de muestras paralelas se inhibió la síntesis de las proteínas que ocurre desde el momento en que se adicionó la guanosina. Para ello a las 10 hpi se agregó al medio de cultivo cicloheximida 40  $\mu\text{g/ml}$ , a las 11 hpi se agregó guanosina 10  $\mu\text{g/ml}$  y en este caso este

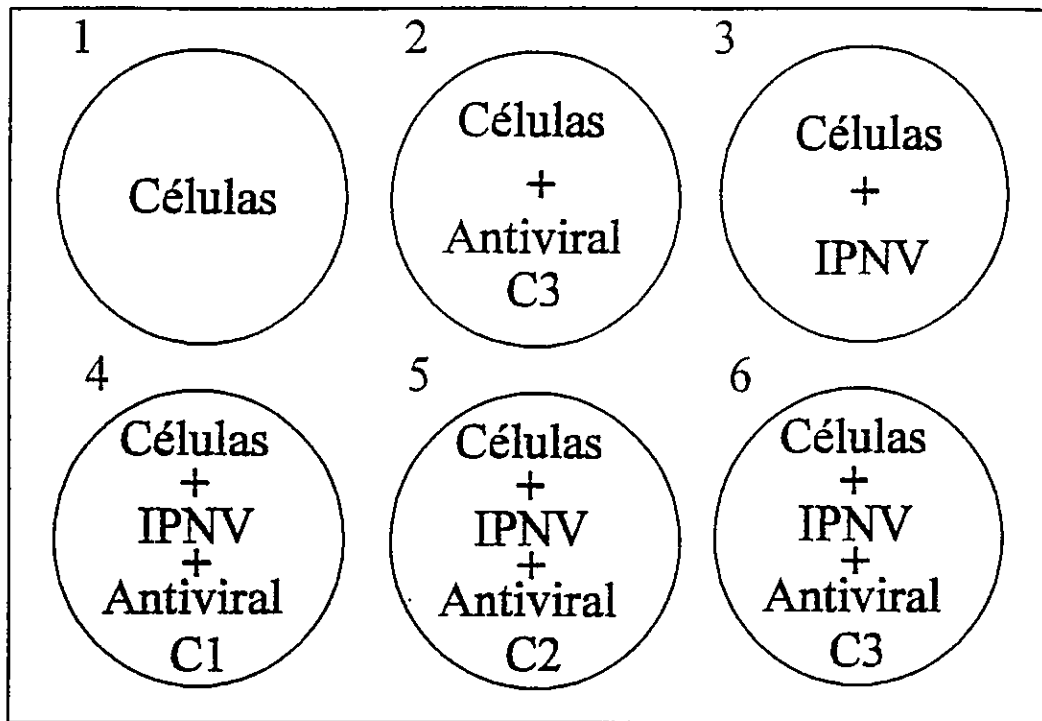
momento se consideró como 0 hpG. Tal como se describió anteriormente, se tomó muestras a los distintos tiempos posteriores a la adición de la guanosina, en presencia o en ausencia de la cicloheximida tanto para determinar la síntesis de los polipéptidos como del RNA genómico. El análisis del RNA y los polipéptidos se realizó mediante electroforesis y posterior autorradiografía.

## RESULTADOS

### 1. EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE EL VIRUS IPN.

#### 1.1. EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES MEDIANTE EL ENSAYO DE INHIBICION DE LA FORMACION DE PLACAS.

Inicialmente se evaluó el efecto de algunos compuestos antivirales mediante la inhibición del efecto citopático celular característico del virus IPN, y además se determinó la inhibición de la progenie viral a través de la detección del RNA genómico viral en electroforesis en gel de poliacrilamida. Si bien con estas técnicas se lograba determinar los compuestos que inhibían al virus IPN no era posible cuantificar el grado de inhibición de cada uno de ellos (datos no mostrados). Por este motivo se desarrolló un ensayo de inhibición de la formación de placas para el virus IPN en el que se usó agarosa de baja temperatura de gelificación para proteger la monocapa celular, la que se afectaba considerablemente al usar la agarosa común. De este modo se evaluaron 12 compuestos antivirales que teóricamente podrían afectar distintos eventos del ciclo replicativo viral. En la figura 5 se muestra un esquema del ensayo tipo como referencia para analizar estos resultados, en el que se indica a que corresponde cada uno de los pocillos de la placa de cultivo en los resultados que se discutirán a continuación.



**FIGURA 5**  
**ESQUEMA USADO PARA LOS ENSAYOS DE INHIBICION DE LA FORMACION DE PLACAS DEL VIRUS IPN**

Se realizaron ensayos de inhibición de la formación de placas del virus IPN según se indica en métodos 4.1. En todos los ensayos se siguió el siguiente esquema:

- pocillo 1, monocapa de células CHSE-214 sin infectar y sin tratamiento con el compuesto antiviral (control de células);
- pocillo 2, la monocapa celular en presencia de la mayor de las concentraciones del antiviral utilizada en el ensayo;
- pocillo 3, la monocapa celular infectada con el virus IPN y en ausencia del compuesto antiviral (control de infección);
- pocillos 4 a 6, la monocapa celular infectada con el virus IPN, a la que se le adicionó diferentes concentraciones del compuesto antiviral ensayado. C1, C2, C3 corresponden a concentraciones crecientes del compuesto antiviral agregado.

Los compuestos se evaluaron, en general, para un rango de concentración en el que se incluyó concentraciones menores y mayores que las descritas como inhibitorias para cada uno de los compuestos con otros virus. En las figuras 6 a 8 se observa una selección de algunos de los resultados que se obtuvo mediante el ensayo de inhibición de la formación de placas con los 3 compuestos antivirales que inhibieron la replicación del IPNV.

En la figura 6 se resume el efecto de la ribavirina, el que se incluyó en el estudio porque se ha descrito que inhibe el virus IPN, y además se utilizó como referencia para comparar la efectividad respecto de su derivado EICAR. Se probó la ribavirina en un rango de concentración de 0,05 a 40  $\mu\text{g/ml}$ , adicionándola sobre las células infectadas junto con la cubierta de agarosa. Se observa que al agregar la ribavirina incluso a concentraciones cercanas a 1  $\mu\text{g/ml}$  (figura 6 A y B) se produce una inhibición total de las placas virales respecto del control que corresponde a la monocapa celular infectada con el virus IPN en ausencia del antiviral (pocillo 3 en A y B). Se determinó la concentración del antiviral requerida para inhibir en un 50 % la formación de placas del IPNV ( $EC_{50}$ ) a partir de ensayos realizados entre 0,2 y 0,7  $\mu\text{g/ml}$  de ribavirina y se obtuvo una  $EC_{50}$  de 0,53  $\mu\text{g/ml}$ .

Se evaluó el EICAR en un rango de concentración entre 0,01 a 20  $\mu\text{g/ml}$ , adicionándolo también a la monocapa infectada junto con la cubierta de agarosa. En los ensayos que se muestran en la figura 7 se observa lo sensible que resultó el IPNV a este compuesto, ya que concentraciones tan bajas como 0,1  $\mu\text{g/ml}$  (figura 7 B y C) inhibieron completamente la formación de placas. Además, es posible observar que concentraciones del orden de los 20  $\mu\text{g/ml}$  de EICAR aparentemente no afectaron la monocapa celular la que se observa intacta (figura 7 A, pocillo 2). Se determinó la  $EC_{50}$ , en ensayos realizados entre

**FIGURA 6**  
**EVALUACION DEL EFECTO DE LA RIBAVIRINA SOBRE LA REPLICACION DEL VIRUS IPN MEDIANTE EL ENSAYO DE INHIBICION DE LA FORMACION DE PLACAS DE LISIS.**

Se realizaron ensayos de inhibición de la formación de placas para el virus IPN en monocapas de células CHSE-214 (como se señala en métodos 4.1.) y se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de ribavirina, la que se agregó a la monocapa junto con la agarosa. En la figura, se señala la concentración de ribavirina, en  $\mu\text{g/ml}$ , que se adicionó a cada pocillo. Cada pocillo de las placas de cultivo A y B contiene:

- 1 células CHSE-214
- 2 células CHSE-214 en presencia de ribavirina en la concentración señalada
- 3 células CHSE-214 infectadas con IPNV
- 4, 5 y 6 células CHSE-214 infectadas con IPNV, a las que se les adicionó ribavirina en las concentraciones señaladas.

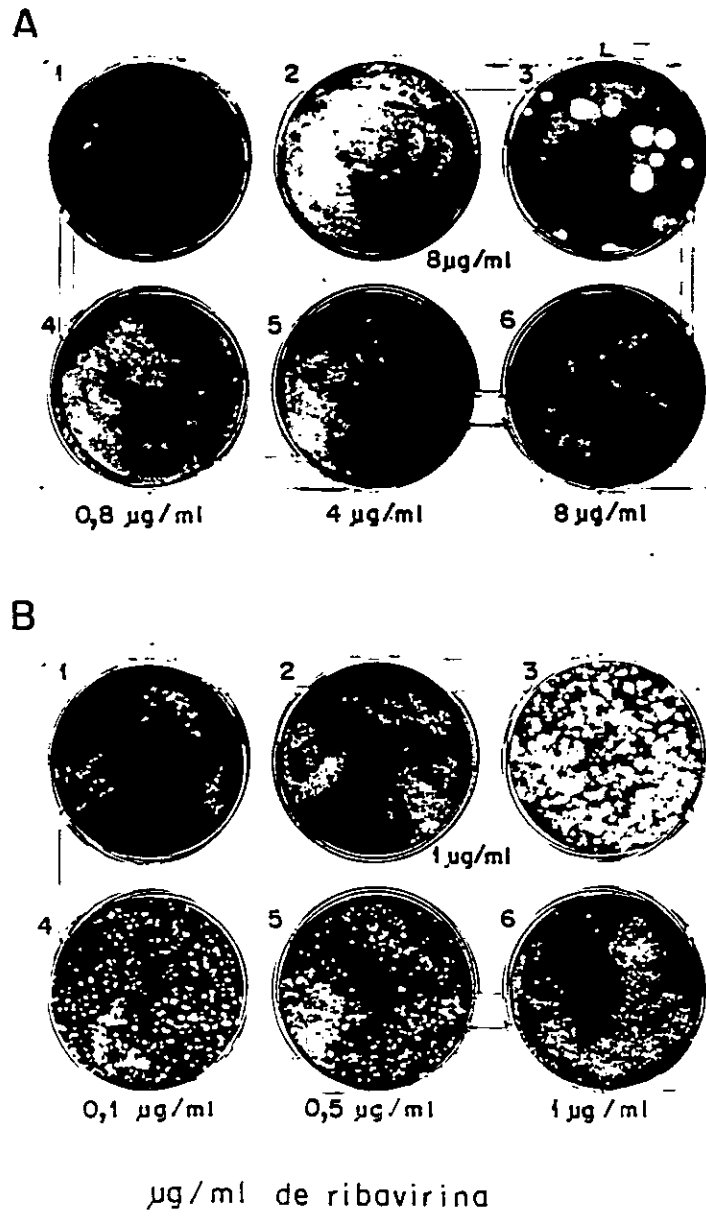


FIGURA 6

**FIGURA 7**  
**EVALUACION DEL EFECTO DE EICAR SOBRE LA REPLICACION DEL VIRUS IPN MEDIANTE EL ENSAYO DE INHIBICION DE LA FORMACION DE PLACAS DE LISIS.**

Se realizaron ensayos de inhibición de la formación de placas para el virus IPN en monocapas de células CHSE-214 (como se señala en métodos 4.1.) y se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de EICAR, el que se agregó a la monocapa junto con la agarosa. En la figura, se señala la concentración de EICAR, en  $\mu\text{g/ml}$ , que se adicionó a cada pocillo. Cada pocillo de las placas de cultivo A, B y C contiene:

- 1 células CHSE-214
- 2 células CHSE-214 en presencia de EICAR en la concentración señalada
- 3 células CHSE-214 infectadas con IPNV
- 4, 5 y 6 células CHSE-214 infectadas con IPNV, a las que se les adicionó EICAR en las concentraciones señaladas.



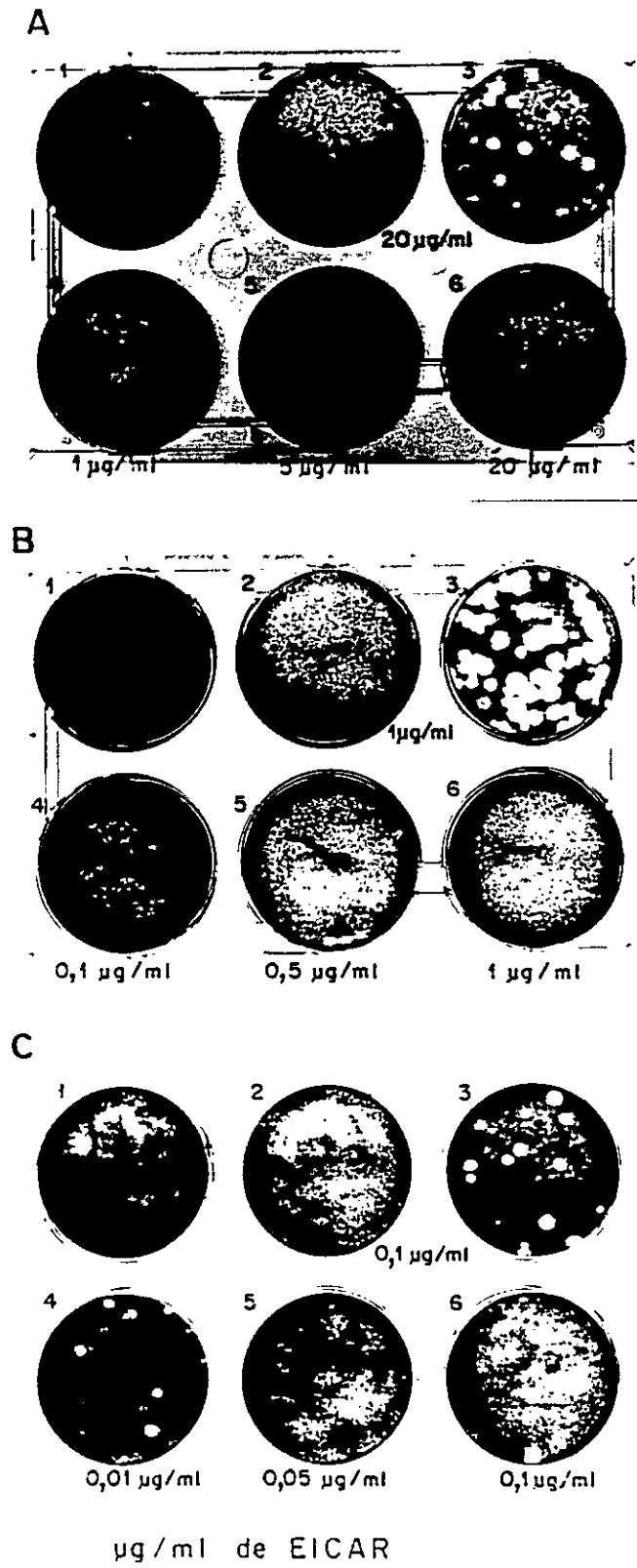


FIGURA 7

0,01 a 0,06  $\mu\text{g/ml}$  de EICAR, la que resultó ser de 0,014  $\mu\text{g/ml}$ .

Se evaluó el efecto de la pirazofurina, en un rango de concentración entre 0,5 a 50  $\mu\text{g/ml}$  y el antiviral se agregó a la monocapa infectada junto con la cubierta de agarosa. En la figura 8 se observa que la pirazofurina resultó inhibir eficientemente el virus IPN y además que la monocapa no se afecta visiblemente con el compuesto (figura 8 B, pocillo 2 respecto del control celular sin antiviral en el pocillo 1). A partir de ensayos realizados entre 0,5 a 1  $\mu\text{g/ml}$  de pirazofurina se determinó que la  $EC_{50}$  corresponde a 0,56  $\mu\text{g/ml}$ .

En la tabla 1 se incluye un resumen de los resultados obtenidos con los 12 compuestos antivirales ensayados en este estudio.

Se evaluó el efecto de compuestos antivirales que son derivados carbocíclicos de la adenosina, al probar la 5'-noraristeromicina no se observó inhibición de la formación de placas del IPNV en el rango de concentración ensayada, de 1 a 100  $\mu\text{g/ml}$ . Lo mismo ocurrió con la 6'- $\beta$ -fluoroaristeromicina, que es un derivado de la 5'- noraristeromicina descrito como un inhibidor más potente, el que se evaluó en un rango de concentración de 0,01 a 50  $\mu\text{g/ml}$  y además en este caso concentraciones cercanas a 1  $\mu\text{g/ml}$  afectaron la monocapa celular. La 3-deazaneplanocina A, otro compuesto de esta familia, tampoco inhibió la formación de placas cuando se ensayó entre 1 a 200  $\mu\text{g/ml}$ . En los 3 casos los resultados fueron negativos al agregar estos compuestos junto con la cubierta de agarosa y también al agregarlos además durante la adsorción del virus e incluso al preincubar durante 1 hora la monocapa celular con los antivirales.

Se probó el efecto del ácido fosfonofórmico o foscarnet, los ensayos se realizaron para un rango de concentración de 15 a 90  $\mu\text{g/ml}$  y no se observó inhibición, incluso al

**FIGURA 8**  
**EVALUACION DEL EFECTO DE PIRAZOFURINA SOBRE LA REPLICACION DEL VIRUS IPN MEDIANTE EL ENSAYO DE INHIBICION DE LA FORMACION DE PLACAS DE LISIS.**

Se realizaron ensayos de inhibición de la formación de placas para el virus IPN en monocapas de células CHSE-214 (como se señala en métodos 4.1.) y se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de pirazofurina, la que se agregó a la monocapa junto con la agarosa. En la figura se señala la concentración del compuesto antiviral,  $\mu\text{g/ml}$ , que se adicionó a cada pocillo. Cada pocillo de las placas de cultivo A y B contiene:

- 1 células CHSE-214
- 2 células CHSE-214 en presencia de pirazofurina en la concentración señalada
- 3 células CHSE-214 infectadas con IPNV
- 4, 5 y 6 células CHSE-214 infectadas con IPNV, a las que se les agregó pirazofurina en las concentraciones señaladas.

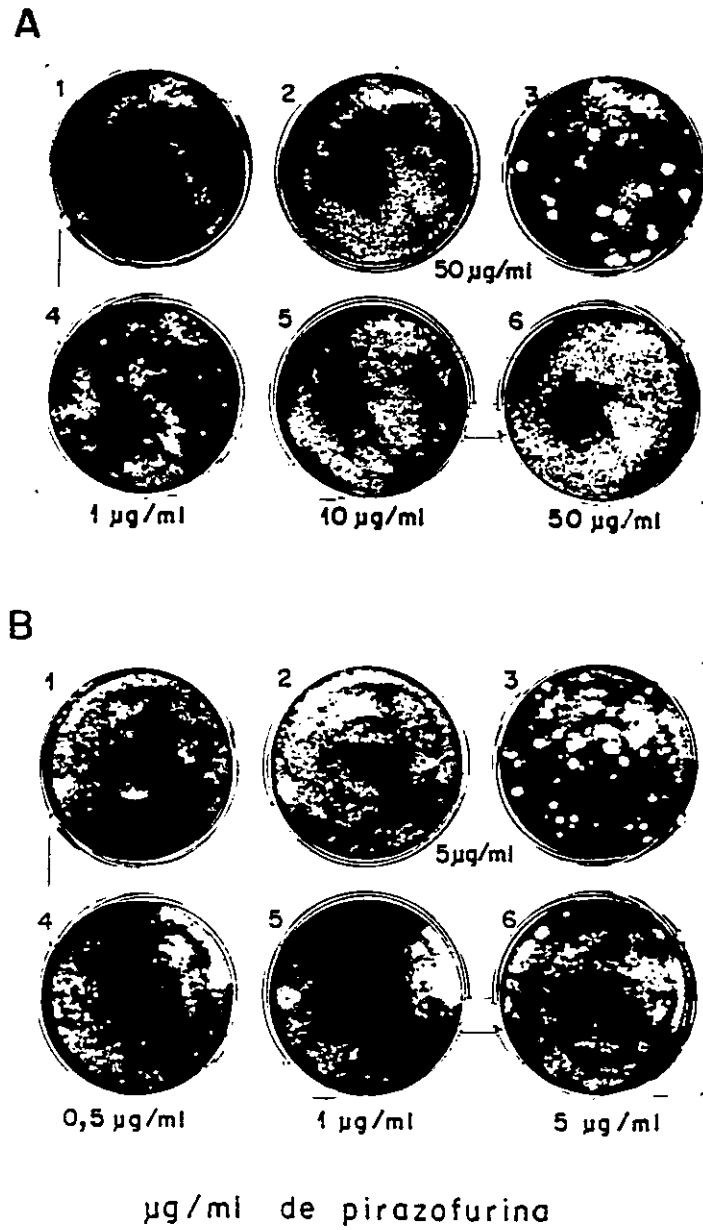


FIGURA 8

**TABLA I**  
**EFEECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LA REPLICACION DEL VIRUS IPN EN CELULAS CHSE-214**

COMPUESTO ANTIVIRAL	ENSAYO DE INHIBICION DE LA FORMACION DE PLACAS DE LISIS (rango de concentración ensayada µg/ml)	RANGO DE CONCENTRACION DEL ANTIVIRAL USADO PARA DETERMINAR LA EC <sub>50</sub> (µg/ml)	EC <sub>50</sub> (µg/ml)
● Ribavirina	0,05-40	0,2-0,7	0,53 ± 0,14
● EICAR	0,01-20	0,01-0,06	0,014 ± 0,008
● Pirazofurina	0,5-50	0,5-1	0,56 ± 0,1
● 5'-Noraristeromicina	1-100	N.I.	—
● 6'-β-Fluoroaristeromicina	0,01-50	N.I.	—
● 3-Deazaneplanocina A	1-200	N.I.	—
● Acido fosfonofórmico	15-90	N.I.	—
● Brefeldina A	0,1-50	N.I.	—
● Carbenoxolona de sodio	30-600	N.I.	—
● Polisacáridos sulfatados de <i>Durvillaea antarctica</i>	1-900	30 % de inhibición (a partir de 50 µg/ml)	—
● Polisacáridos sulfatados de <i>Desmarestia menziessii</i>	10-200	N.I.	—
● Filifolinol	1-200	N.I.	—

<sup>a</sup> Concentración del compuesto antiviral requerida para inhibir en un 50 % la formación de placas del virus IPN. Los valores son el promedio ± la desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados por duplicado.  
 N.I. . . No hubo inhibición.

agregar el compuesto durante la adsorción viral y junto con la agarosa. Resultados similares se observaron al realizar además una preincubación de las células con el foscarnet a 18 °C durante 2 horas. Se ensayó concentraciones más elevadas de foscarnet (hasta de 300 µg/ml) y también se aumentó el tiempo de incubación de las células con el antiviral (hasta 6 horas), sin embargo en ambas condiciones el foscarnet resultó ser citotóxico para las células CHSE-214.

Se estudió el efecto de dos compuestos que se han descrito en la literatura como inhibidores para una gran variedad de virus; la brefeldina A (BFA) y la carbenoxolona de sodio (CBX). Ambos inducen la alteración de algunas funciones de las membranas celulares, produciendo la inhibición de aquellos virus que requieren de estas funciones en su ciclo infectivo. Se evaluó el efecto de la brefeldina A, en un rango de concentración entre 0,1 y 50 µg/ml, sin embargo resultó ser citotóxica incluso a concentraciones de 0,1 µg/ml. Posteriormente se analizó el efecto de la BFA sobre la síntesis de RNA genómico del virus IPN durante el ciclo infectivo, en las condiciones en que se realizaron estos experimentos (las que se especifican en los métodos 9.1.) la BFA no resultó ser citotóxica para las células CHSE-214 y se determinó que concentraciones superiores a 2 µg/ml de BFA inhiben la síntesis del RNA genómico del IPNV. Se evaluó el efecto de la carbenoxolona de sodio, el que se probó en un rango de concentración de 30 a 600 µg/ml, sin embargo este compuesto no inhibió la formación de placas del IPNV incluso al agregarlo durante la adsorción viral y en una preincubación con las células durante 1 o 2 horas a 18 °C.

Finalmente, se probó una serie de compuestos naturales extraídos a partir de algas o plantas. Uno de ellos corresponde a los polisacáridos sulfatados de *Durvillaea antarctica*,

el cual se probó en un rango de concentración entre 1 a 900  $\mu\text{g/ml}$ . No se observó inhibición del IPNV al agregar el compuesto junto con la cubierta de agarosa y durante la adsorción viral, ni tampoco al adicionarlo además en una etapa de preincubación. Sin embargo, cuando se preincubó con el compuesto en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO) se observó que a partir de 10  $\mu\text{g/ml}$  se inhibía la formación de placas del IPNV, y a 50  $\mu\text{g/ml}$  la inhibición alcanzó a un 30 %. Al usar concentraciones mayores del polisacárido no se observó un aumento de la inhibición. Similar grado de inhibición se obtuvo al agregar el compuesto previamente hidrolizado, y en este caso no se encontró diferencia al agregarlo en presencia o en ausencia de DMSO. Se evaluó también el efecto de los polisacáridos de *Desmarestia menziessii*, se probó entre 10 y 200  $\mu\text{g/ml}$  y no se observó inhibición de la formación de placas del IPNV aún al realizar una preincubación incluso en presencia de DMSO, a diferencia de lo que ocurrió con los polisacáridos de *Durvillaea antarctica*. En estos experimentos se observó que los polisacáridos sulfatados extraídos de ambas algas no afectaron visiblemente la monocapa celular. Finalmente se evaluó el efecto de filifolinol, un compuesto extraído a partir del exudado resinoso de *Heliotropium filifolium*, el que se probó entre 1 y 200  $\mu\text{g/ml}$ . Al agregar filifolinol no se inhibió la formación de placas del virus IPN y tampoco al preincubar la monocapa celular con el compuesto durante 2 horas a 18 °C o incluso en presencia de DMSO. Además se observó que concentraciones del compuesto cercanas a 100  $\mu\text{g/ml}$  afectaron claramente la monocapa celular.

En resumen, a partir de los ensayos de inhibición de la formación de placas del IPNV se puede concluir que de los 12 compuestos ensayados, la ribavirina, el EICAR y la pirazofurina resultaron ser efectivos inhibidores del virus IPN. En función de lo descrito en

la literatura, probablemente los tres compuestos inhiban la replicación del RNA y de la transcripción viral. Además, se obtuvo un 30 % de inhibición al utilizar los polisacáridos sulfatados de *Durvillaea antarctica*.

## 1.2. EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LA TRANSCRIPCION *in vitro* DEL VIRUS IPN.

No fue posible evaluar el efecto de la ribavirina, el EICAR y la pirazofurina sobre la transcripción *in vitro* del virus IPN ya que no contábamos con sus derivados fosforilados.

En el caso de los polisacáridos sulfatados extraídos de *Durvillaea antarctica* se intentó determinar si el efecto de inhibición sobre la formación de placas del virus IPN, el que aparentemente requiere del ingreso del compuesto a la célula, se relaciona con la inhibición de la transcripción viral como se ha sugerido para el HIV a partir de los ensayos de transcripción *in vitro* (Neushul, 1990). Se realizó un ensayo de transcripción *in vitro* para el IPNV cuyas condiciones habían sido previamente establecidas en nuestro laboratorio. Se evaluó el efecto de los polisacáridos sulfatados, tanto de la fracción entera como de la fracción parcialmente hidrolisada, se probó concentraciones que fluctuaron entre 1 y 100 µg/ml. Los resultados se muestran en la tabla 2 donde vemos que la fracción no hidrolisada de los polisacáridos inhibe la transcripción viral en un 30 a 70 % y que la inhibición aumenta a medida que aumenta la concentración de este compuesto. Con la fracción hidrolisada se obtuvo alrededor de un 40 % de inhibición a la menor concentración ensayada, sin embargo no se observó un aumento de la inhibición dependiente de la concentración.



**TABLA 2**  
**EFFECTO DE LOS POLISACARIDOS SULFATADOS DE *Durvillaea antarctica***  
**SOBRE LA TRANSCRIPCION *in vitro* DEL VIRUS IPN**

POLISACARIDOS SULFATADOS DE <i>D. antarctica</i>	CONCENTRACION ( $\mu\text{g/ml}$ )	% DE INHIBICION DE LA TRANSCRIPCION DEL IPNV <i>in vitro</i>
● Fracción entera	1	27
	5	33
	10	47
	50	57
	100	74
● Fracción hidrolisada	1	43
	5	36
	10	49
	50	39
	100	46

## 2. EVALUACION DEL EFECTO CITOTOXICO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LAS CELULAS CHSE-214.

Se evaluó el efecto sobre las células CHSE-214 de aquellos compuestos que inhibieron la formación de placas del virus IPN. Se determinó el efecto sobre la viabilidad celular y sobre el crecimiento celular.

### 2.1. EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

El efecto de los compuestos antivirales sobre la viabilidad celular se evaluó como la determinación de la muerte celular mediante el ensayo de exclusión de azul de tripán, al incubar las células con el compuesto durante 3 días a 18 °C. Con este propósito la monocapa celular se creció hasta una confluencia aproximada de un 90-100 % y para lograr un estado de menor crecimiento o estado estacionario el ensayo se realizó, además, en ausencia de suero fetal bovino (SFB). Los resultados de estos ensayos se muestran en la tabla 3, para cada compuesto antiviral se evaluó concentraciones menores y mayores a la respectiva  $EC_{50}$  cuyos valores se incluyeron en esta tabla. Se determinó la concentración de ribavirina capaz de reducir en un 50 % la viabilidad celular, en ensayos realizados entre 40 a 200  $\mu\text{g/ml}$  y se obtuvo una  $CC_{50}$  de 100  $\mu\text{g/ml}$ . Para EICAR, a partir de ensayos realizados entre 10 a 100  $\mu\text{g/ml}$ , se determinó una  $CC_{50}$  de 50  $\mu\text{g/ml}$  y en el caso de la pirazofurina se probó concentraciones de hasta 50  $\mu\text{g/ml}$  y no se observó alteración de la viabilidad celular. En los ensayos con los polisacáridos sulfatados de *Durvillaea antarctica* se probó concentraciones hasta de 400  $\mu\text{g/ml}$  y no se afectó la viabilidad celular.

**TABLA 3**  
**EFFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR Y LA SINTESIS DE**  
**DNA DE LAS CELULAS CHSE-214**

COMPUESTO ANTIVIRAL	CONCENTRACION DEL ANTIVIRAL QUE REDUCE EN UN 50% LA VIABILIDAD CELULAR CC <sup>a</sup> <sub>50</sub> (µg/ml)	CONCENTRACION DEL ANTIVIRAL QUE REDUCE EN UN 50% LA SINTESIS DE DNA CELULAR IC <sup>b</sup> <sub>50</sub> (µg/ml)	CONCENTRACION DEL ANTIVIRAL QUE INHIBE EN UN 50% LA FORMACION DE PLACAS DEL IPNV EC <sup>c</sup> <sub>50</sub> (µg/ml)
● Ribavirina	100	0,49 ± 0,11	0,53 ± 0,14
● EICAR	50	0,86 ± 0,16	0,014 ± 0,008
● Pirazofurina	>50	>50	0,56 ± 0,1
● Polisacáridos sulfatados de <i>D. antarctica</i> .	>400	N.D.	<sup>d</sup>

El signo mayor se utiliza para indicar aquellos compuestos en los que a la mayor concentración ensayada no se afectó la viabilidad celular o la síntesis de DNA según corresponda

N.D. No determinado

<sup>a</sup> Se obtuvo el mismo valor en los 3 experimentos independientes realizados por triplicado

<sup>b</sup> Los valores son el promedio ± la desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados por triplicado

<sup>c</sup> Los valores son el promedio ± la desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados por duplicado

<sup>d</sup> La inhibición alcanzó sólo a un 30% .

## 2.2. EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE LA SINTESIS DE DNA CELULAR

El efecto de los compuestos antivirales sobre la síntesis de DNA celular se evaluó mediante un ensayo en el que se creció las células sólo hasta una confluencia aproximada de un 50 %, y para asegurar un crecimiento celular activo se agregó un 5 % de SFB durante las 18 a 20 horas de incubación con el compuesto antiviral. Se determinó el efecto de diferentes concentraciones del compuesto antiviral sobre la incorporación de [<sup>3</sup>H]- timidina a material ácido insoluble. Para cada compuesto se determinó la concentración del antiviral que reduce la incorporación de [<sup>3</sup>H]- timidina en un 50 %, la que se denominó IC<sub>50</sub>. Los resultados de estos experimentos se muestran en la tabla 3. Vemos que la IC<sub>50</sub> para la ribavirina y el EICAR, la que en ambos casos se determinó en un rango de concentración entre 0,1 a 1 µg/ml, correspondió a 0,49 µg/ml y a 0,86 µg/ml respectivamente. Al utilizar pirazofurina la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina no disminuyó en un 50 % incluso a concentraciones de hasta 50 µg/ml del compuesto. Los resultados muestran que la concentración citotóxica que afectó la síntesis de DNA celular para la ribavirina es similar a la concentración del compuesto requerida para inhibir la formación de placas del IPNV, en cambio para el EICAR y la pirazofurina la concentración citotóxica resultó ser alrededor de 60 y 100 veces mayor que la concentración inhibitoria respectivamente.

## 3. EFECTO DE EICAR SOBRE ALEVINES DE TRUCHA ARCOIRIS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL VIRUS IPN.

En base a los resultados obtenidos en la evaluación de los compuestos antivirales en

cultivo celular, el EICAR y la pirazofurina se perfilan como buenos candidatos para ser probados en ensayos *in vivo*. En este trabajo se evaluó el EICAR *in vivo*, utilizando alevines de trucha arcoiris.

### 3.1. INFECCION EXPERIMENTAL DE LOS ALEVINES CON VIRUS IPN Y TRATAMIENTO CON EICAR.

La infección experimental se realizó utilizando protocolos similares a los que se han descrito en la literatura (Savan y Dobos, 1980; Hasobe y Saneyoshi, 1985). Los alevines se infectaron por inmersión durante 1 hora, en una suspensión de un inóculo de IPNV ( $10^5$  u.f.p./ml). Dos horas después de concluir la infección se inició un tratamiento diario con el antiviral en dos de los tres infectados, el que consistió en la inmersión de los peces en una solución de EICAR durante 2 horas. El experimento duró alrededor de 12 días, desde el momento de la infección y se evaluó la muerte de los alevines diariamente. Al cuarto día, se observó que algunos de los peces infectados y que permanecieron sin tratamiento presentaban el nado característico de la enfermedad producida por el virus IPN, descrito como un nado rotatorio alrededor del eje del pez. La muerte se inició el quinto día tanto en el grupo de los peces infectados sin tratamiento (grupo 2) como en el grupo de los peces infectados y tratados con  $0,2 \mu\text{g/ml}$  de EICAR (grupo 3) y en los siguientes días, hasta el día 12, se fueron muriendo paulatinamente peces del grupo 2 (alrededor de 2 a 3 peces por día) y también del grupo 3. No se detectó muerte de los peces sanos no infectados (grupo 1) ni de los peces infectados y tratados con  $1 \mu\text{g/ml}$  de EICAR (grupo 4). En la tabla 4 se muestra un resumen de este experimento, donde se observa el porcentaje de muerte

**TABLA 4**  
**EFEECTO DE EICAR SOBRE LA INFECCION DEL VIRUS IPN EN TRUCHIA**  
**ARCOIRIS**

PECES EN ESTUDIO (n=40)	% DE MUERTE A LOS 12 DIAS POSTINFECCION
● Grupo 1: controles sanos	0,0
● Grupo 2: infectados	50,0
● Grupo 3: infectados tratados con 0,2 µg/ml de EICAR	12,5
● Grupo 4: infectados tratados con 1 µg/ml de EICAR	0,0

Los grupos estaban integrados por 40 alevines de aproximadamente 0,9 g de peso. La infección consistió en una inmersión durante 1 hora en una suspensión de virus IPN cepa VR-299 ( $10^5$  u.f.p./ml) y el tratamiento con antiviral consistió en una inmersión diaria durante 2 horas por 12 días en una solución de EICAR de 0,2 y 1 µg/ml. Controles sanos e infectados fueron inmersos en agua por tiempos similares a los peces tratados con el antiviral.

acumulada en cada grupo de estudio hasta el término del experimento. Se puede ver que en el grupo control no se murió ningún pez, 0 % de muerte acumulada, en cambio en el grupo infectado se murió un 50 % de los peces del acuario. En el grupo de peces infectados y tratados con la concentración de 0,2  $\mu\text{g/ml}$  de EICAR la muerte alcanzó sólo a un 12,5 % y en el grupo tratado con una concentración de EICAR de 1  $\mu\text{g/ml}$  no se produjo ninguna muerte. Los alevines muertos se procesaron con el fin de determinar en el tejido del pez la presencia del virus IPN mediante la identificación del efecto citopático característico del IPNV, la que posteriormente se confirmó a través de la detección del RNA genómico viral en electroforesis en gel de poliacrilamida al 7 %.

Cabe destacar que el experimento se detuvo en el día 12 ya que se produjo la muerte repentina de todo el grupo de los alevines infectados sin tratamiento que quedaban. Esto ocurrió en el momento en que se realizaba el tratamiento diario con el antiviral a los grupos tratados (grupo 3 y 4) y paralelamente a los controles no tratados, tanto los del grupo 1 como los del grupo 2, se les cambiaba a otro acuario que contenía agua con el fin de mantener las mismas condiciones en todos los grupos de estudio. Aparentemente la muerte se debió al estrés que normalmente se produce en los peces al manipularlos y que en ocasiones puede producir la muerte (Jofré, J., 1988). Aparentemente esto tuvo consecuencias mayores en los peces infectados sin tratamiento, los que presentaban signos de la enfermedad y estaban más débiles. En cambio en los peces sanos y en ambos grupos de peces infectados y tratados no se produjo ninguna muerte, mas aún, éstos se mantuvieron durante 30 días más sin tratamiento antiviral observándose una mortalidad de alrededor de un 2-5 %, similar a la del grupo control sin infectar. Sin embargo, con el propósito de no sobreestimar nuestros

resultados al considerar como un 100 % la mortalidad para el grupo 2 se decidió evaluar el experimento sólo hasta el día 12. Posteriormente, al trabajar con otros propósitos con alevines infectados con el virus IPN hemos podido corroborar que al someter a los peces al estrés que normalmente les produce un cambio de agua se produce la muerte de los peces que muestran los signos de la enfermedad.

#### **4. SINTESIS DE LAS MACROMOLECULAS DEL VIRUS IPN EN CELULAS CHSE-214.**

A partir de los ensayos de inhibición de la formación de placas se determinó que el EICAR inhibe eficientemente la replicación del IPNV. Basándonos en que se ha descrito que este antiviral afecta la transcripción y la replicación del genoma de otros virus (De Clercq, 1993) se realizaron experimentos para determinar si la inhibición del EICAR sobre el IPNV corresponde a la inhibición de la transcripción y la replicación del RNA viral, con el propósito de obtener información acerca del mecanismo por el cual este compuesto inhibe el virus IPN y luego utilizar el EICAR para estudiar la replicación del RNA viral. Con este fin, se estableció el momento en que se sintetizan las macromoléculas del IPNV en la línea celular CHSE-214, ya que previamente la síntesis de RNA y de los polipéptidos virales se había determinado en líneas celulares diferentes, tal como se describió en la introducción. Además nuestro interés era detectar las macromoléculas virales en un bajo número de células (placas de petri de 8,8 cm<sup>2</sup> de superficie), condición en la que era factible realizar el estudio con el antiviral.



#### 4.1. SINTESIS DE LOS POLIPEPTIDOS VIRALES

Al analizar la síntesis de los polipéptidos virales se constató que tal como se describió en el trabajo realizado por Dobos (Dobos, 1977) es difícil identificar los polipéptidos del virus IPN en la célula infectada, ya que varios de los polipéptidos virales y en especial VP2 tienen una migración electroforética que coincide con la de polipéptidos celulares presentes en alta concentración. Además debido que la replicación del IPNV es sensible a la actinomicina D no se puede utilizar este compuesto para inhibir en forma eficiente y selectiva la síntesis de RNA del huésped. Por esto con el fin de identificar los polipéptidos del IPNV se infectó monocapas de células CHSE-214, tal como se describió en los métodos y a las 2 horas post infección para disminuir el fondo celular a la monocapa celular se le aplicó radiación de luz ultravioleta (UV) de 254 nm, utilizando una lámpara de una intensidad  $400 \mu\text{Watt}/\text{cm}^2$  durante 15 segundos a una distancia de 20 cm, condiciones similares a las previamente descritas (Dobos, 1977). Al finalizar el tratamiento con luz UV se marcó radiactivamente los polipéptidos agregando medio de cultivo deficiente en metionina y  $50 \mu\text{Ci}/\text{ml}$  de [ $^{35}\text{S}$ ]- metionina y se analizó la síntesis de los polipéptidos virales durante la infección. En la figura 9 se muestra la autorradiografía de un gel de poliacrilamida al 12 %-SDS en el que se sometió a electroforesis los polipéptidos presentes en las células CHSE-214 infectadas (figura 9A y B, carril 1) y no infectadas con el virus IPN (figura 9B, carril 2) luego de transcurridas 18 horas post infección. Se observa la aparición de cuatro polipéptidos, los que tienen un peso molecular que corresponde al descrito para los polipéptidos VP1, VP2, VP3 y VP4 del IPNV, los que comigran con polipéptidos celulares (figura 9B, carril 1 y 2). En el carril 2 de la figura 9A se muestra la migración electroforética

**FIGURA 9**  
**SINTESIS DE LOS POLIPEPTIDOS DEL VIRUS IPN EN CELULAS CHSE-214.**

Se sometió a electroforesis los polipéptidos de:

**A)** monocapas de células CHSE-214 infectadas con IPNV (carril 1) y del virus IPNV purificado a partir de cultivos infectados en presencia de [ $^{35}\text{S}$ ]- metionina (carril 2)

**B)** monocapas de células CHSE-214 infectadas con IPNV (carril 1) o sin infectar (carril 2). En M se señala la migración de los marcadores de masa molecular:  $\alpha$ -2- macroglobulina, 220kDa;  $\beta$  galactosidasa, 120 kDa; Fosfofructoquinasa, 76 kDa; Piruvato quinasa, 66kDa; Lactato deshidrogenasa, 42.7 kDa; Triosafofato isomerasa, 32.5 kDa.

Como se describió en los métodos monocapas de células CHSE-214 se infectaron con IPNV y a las 2 hpi se irradiaron con luz UV, al finalizar el tratamiento se agregó MEM deficiente en metionina y 50  $\mu\text{Ci/ml}$  de trans- $^{35}\text{S}$ -label y se incubó a 15°C hasta las 18 hpi, se retiró el medio de cultivo y a la monocapa se le agregó 100  $\mu\text{l}$  de solución disruptora de proteínas. Las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-SDS, a 50V por 20 horas. El gel se secó y se realizó una autorradiografía.  
hpi : horas post infección.

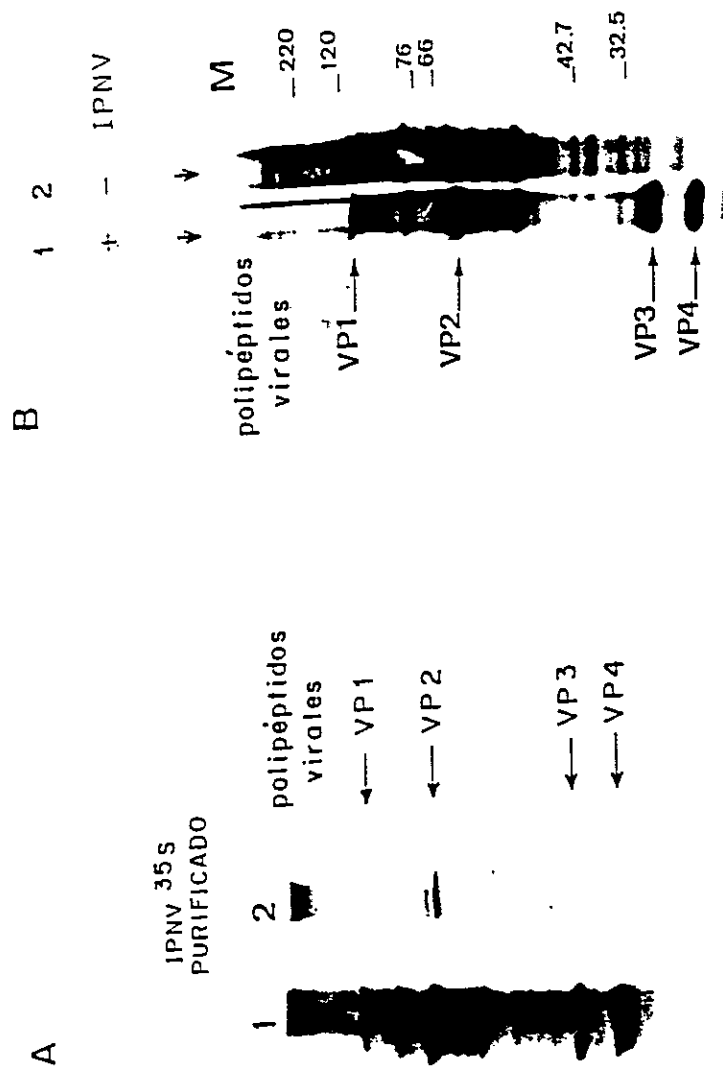


FIGURA 9

de los polipéptidos del virus purificado crecido con [ $^{35}\text{S}$ ]- metionina en el que se puede distinguir las bandas que corresponden a los polipéptidos VP2 y VP3, y en cambio la que corresponde al polipéptido VP1 aparece como una banda de débil intensidad, lo que se debe a que VP1 se encuentra en un bajo número de copias en el virión. Además no se observa el polipéptido VP4 el que sólo se ha logrado detectar en el virus purificado mediante la técnica de Western, usando anticuerpos específicos preparados a partir de una proteína de fusión expresada en *E. coli* (Magyar y Dobos, 1994). A pesar de esta limitante, en la figura 9A se aprecia que la migración de los polipéptidos presentes en la célula infectada (carril 1) coincide con la migración correspondiente a los polipéptidos VP1, VP2 y VP3 del virus purificado (carril 2). En la figura 10 se muestra la cinética de la aparición de los polipéptidos virales durante la infección, los polipéptidos se marcaron entre las 4 y las 10 horas post infección mediante pulsos de [ $^{35}\text{S}$ ]- metionina de 2 horas, desde las 4 a 6 hpi (carril 2), 6 a 8 hpi (carril 4) y 8 a 10 hpi (carril 6). A partir de las 10 hpi se marcó por 14 horas, es decir hasta las 24 hpi y ya que era evidente el desprendimiento de células de la monocapa se analizó los polipéptidos presentes en la monocapa y en el medio de cultivo (carriles 8 y 10 respectivamente). Vemos que a las 6 a 8 hpi es posible visualizar la aparición de VP1 y VP3 (carril 4), y en cambio el resto de los polipéptidos virales se distinguen a partir de las 8 a 10 hpi. Sin embargo, como se mencionó en la introducción, la síntesis de los polipéptidos VP2, VP3 y VP4 es sincrónica, ya que estos se originan a partir de una poliproteína que es procesada cotraduccionalmente y por lo tanto se asume que si se puede detectar la presencia de VP3 también deben estar presentes VP2 y VP4. Por este motivo se decidió seguir la aparición de los polipéptidos virales principalmente a través de la detección de VP3 entre las

**FIGURA 10**  
**CINETICA DE LA SINTESIS DE LOS POLIPEPTIDOS DEL VIRUS IPNV EN**  
**CELULAS CHSE-214.**

Se infectó monocapas de células CHSE-214 con IPNV y a las 2 horas post infección se aplicó radiación ultravioleta, se agregó MEM deficiente en metionina y se incubó a 15 °C. Mediante un pulso de 2 horas de 50  $\mu$ Ci/ml de trans-<sup>35</sup>S-label se marcó radiativamente los polipéptidos sintetizados en las células infectadas (IPNV+) y no infectadas (IPNV -) entre las 4 a 6; 6 a 8; 8 a 10 hpi (carriles 1 a 6). Finalizada la marcación, se retiró el medio de cultivo y a la monocapa se le agregó 100  $\mu$ l de solución disruptora de proteínas. Además se analizó los polipéptidos sintetizados desde las 10 a las 24 hpi en la monocapa (carriles 7 y 8) y en el sobrenadante celular (9 y 10), como se indicó en los métodos. Las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% -SDS, a 50 V por 20 horas. El gel se secó y se realizó una autorradiografía. Se señala con flechas los polipéptidos del IPNV.  
hpi: horas postinfección.

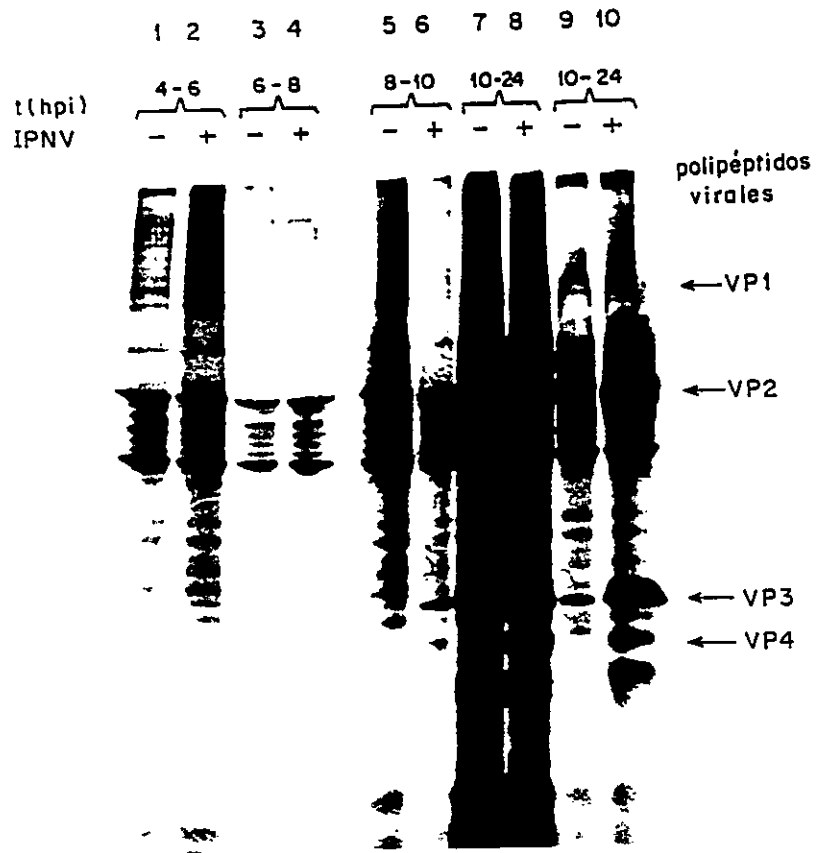


FIGURA 10

6 a 8 hpi. Cabe señalar que en experimentos posteriores se analizó la síntesis de los polipéptidos virales entre las 6 a 8 hpi en ausencia de luz UV y se observó, en general, una mayor cantidad de las proteínas virales.

Con respecto a las diferencias observadas en la visualización de los polipéptidos virales éstas no se pueden explicar en base a diferencias en el contenido de metionina de cada polipéptido, ya que a partir de la secuencia nucleotídica del segmento de RNA A se deduce que VP2, VP3 y VP4 tendrían un porcentaje muy similar de este aminoácido ( Duncan y col., 1987 ). En el caso de VP2, es difícil identificarlo a una baja concentración ya que como se mencionó anteriormente este comigra con un polipéptido celular que aparece como una banda importante en las autorradiografías. Por otra parte se ha descrito que en la célula infectada junto con VP4 se detecta en menor concentración una forma truncada de este polipéptido (VP4<sub>t</sub>), lo que explicaría porque VP4 ( polipéptido no truncado ) se observa en menor concentración que VP3 a pesar que la cantidad total de VP4 (VP4 y VP4 truncada) debe ser igual a la del resto de los polipéptidos que componen la poliproteína (VP2 y VP3) (Magyar y Dobos, 1994). Finalmente en relación a VP1, si bien no se espera que este polipéptido se sintetice en la misma proporción que VP2, VP3 y VP4 ya que es codificado por el segmento de RNA B y por tanto no forma parte de la poliproteína, es importante considerar que en el gel de poliacrilamida al 12 % sólo se detecta la VP1 libre y no aquella VP1 que se une en forma covalente al RNA viral (VPg) (Mac Donald and Dobos, 1981).

#### 4.2. SÍNTESIS DEL RNA GENÓMICO VIRAL.

Para establecer la síntesis del RNA genómico viral se infectó monocapas de células

CHSE-214 en presencia de una baja concentración de actinomicina D la que se agregó a las 2 hpi para no afectar significativamente la producción de la progenie viral. Se probó diferentes concentraciones de actinomicina D y el mejor resultado se obtuvo con una concentración de 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . El RNA se marcó agregando 50  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^3\text{H}$ ]-uridina o de [ $^{32}\text{P}$ ]-ácido ortofosfórico a las 0 hpi y luego a diferentes tiempos post infección se extrajo el RNA de la monocapa y se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida. Con el propósito de identificar también los mensajeros virales a partir del RNA marcado radiactivamente el RNA se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 5 %- urea 8 M, ya que es posible observar RNA de doble y de simple hebra. Sin embargo a partir de estos experimentos no fue posible detectar el RNA mensajero, como se discutirá posteriormente. Finalmente el RNA genómico se analizó mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida al 7 %. En la figura 11 se muestra la autorradiografía de un gel de poliacrilamida 5 % - urea 8 M, en el que se sometió a electroforesis el RNA marcado con [ $^3\text{H}$ ]-uridina luego de ser extraído de la monocapa celular infectada (IPNV+) y no infectada (IPNV-). En las células infectadas se puede observar claramente la presencia de dos bandas, las que corresponden a los dos segmentos de RNA de doble hebra que componen el genoma del IPNV, el que se detecta entre las 8 y las 12,5 hpi (carriles 11 y 12). En la figura 12 se muestra la autorradiografía de un gel de poliacrilamida al 7 %, en el que se sometió a electroforesis el RNA extraído a partir de células infectadas en las mismas condiciones recién descritas, excepto que en este caso el RNA se marcó con 50  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^{32}\text{P}$ ]-ácido ortofosfórico. Vemos que el RNA genómico se detecta entre las 8 y las 10 hpi (carril 4).



**FIGURA 11**  
**CINETICA DE LA SINTESIS DEL RNA GENOMICO DEL VIRUS IPN EN**  
**CELULAS CHSE-214.**

A monocapas de células CHSE-214 infectadas con IPNV (IPNV+) o no infectadas (IPNV-) se les agregó 50  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^3\text{H}$ ]-uridina posterior a la adsorción (0 hpi). A las 2 hpi se agregó 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de actinomicina D a las muestras marcadas Act D+ y se continuó con la incubación a 15 °C hasta las 5,5 hpi (carriles 1 a 4); 8 hpi (carriles 5 a 8); 12,5 hpi (carriles 9 a 12); 15 hpi (carriles 13 a 16) y 23 hpi (carriles 17 a 20). Se extrajo el RNA de la monocapa y se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida 5 %-urea 8 M a 150V por 22 horas. Se efectuó una fluorografía y posterior autorradiografía. Las flechas señalan la migración de los segmentos A y B de RNA genómico del IPNV.  
hpi: horas post infección.

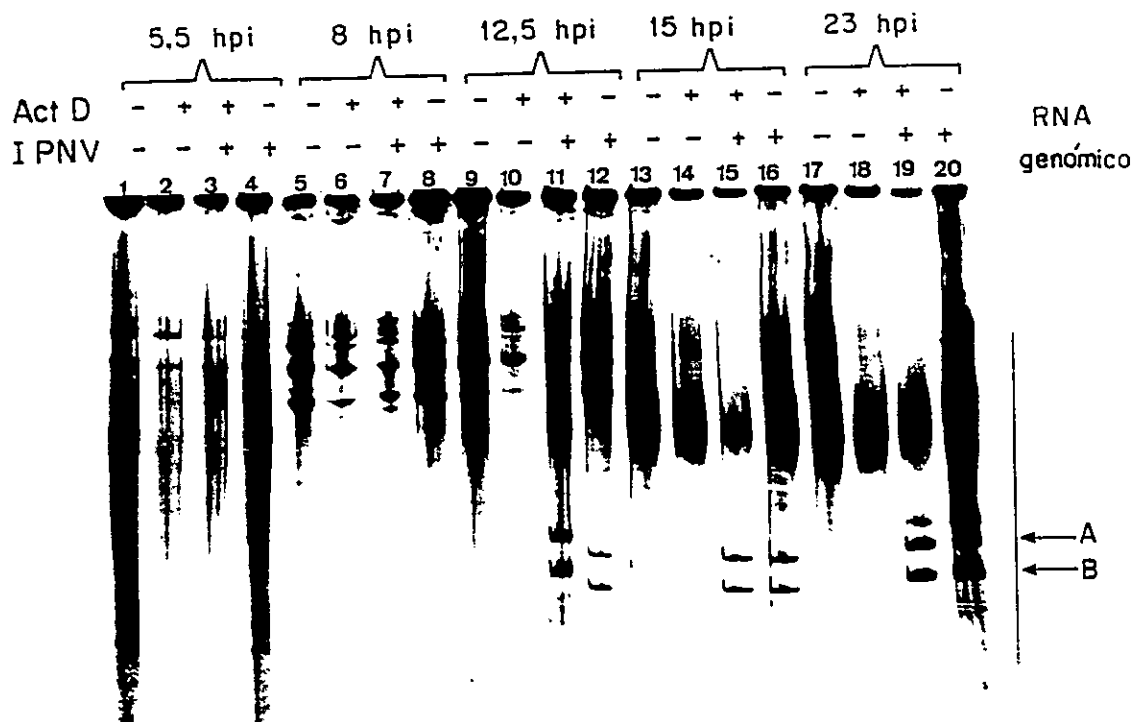


FIGURA 11

**FIGURA 12**  
**CINETICA DE LA SINTESIS DEL RNA GENOMICO DEL VIRUS IPNV EN**  
**CELULAS CHSE-214, DETECTADO MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL**  
**DE POLIACRILAMIDA AL 7%.**

Se infectó monocapas de células CHSE-214 con IPNV, posterior a la adsorción se retiró el inóculo y se adicionó 50  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^{32}\text{P}$ ]-ácido ortofosfórico (0 hpi). Se continuó la incubación a 15 °C y a las 2 hpi se agregó 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de actinomicina D. A las 8, 10 y 24 hpi se extrajo el RNA de la monocapa infectada (carriles 2, 4 y 6) y sin infectar (carriles 1, 3 y 5) y se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%, a 50 V por 20 horas. El gel se secó y se realizó una autorradiografía. La flechas señalan la migración de los segmentos A y B de RNA genómico del IPNV.  
hpi: horas post infección.

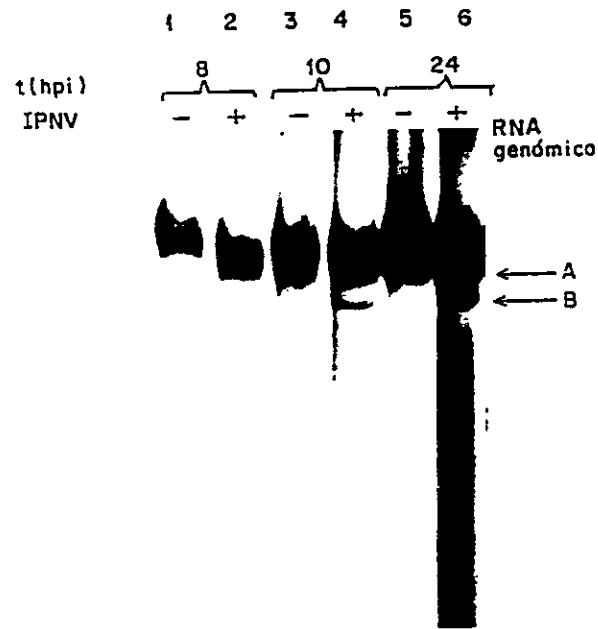


FIGURA 12

#### 4.3. SINTESIS DEL RNA MENSAJERO VIRAL.

Como se mencionó anteriormente, a diferencia del RNA genómico no se logró detectar los mensajeros del IPNV al marcar radiactivamente el RNA sintetizado en un bajo número de células, probablemente debido a una baja producción relativa de los mensajeros virales durante la infección. Se probó diferentes protocolos de extracción del RNA y no se obtuvo resultados positivos. Por esto se desarrolló la técnica de Northern para el IPNV y se utilizó una sonda de DNA de aproximadamente 809 pares de bases, la que se obtuvo a partir del DNA complementario de una región del segmento de RNA genómico A del IPNV y se marcó con [ $\alpha$   $^{32}$ P]-dCTP tal como se indica en los métodos. Se infectó monocapas de células CHSE-214 y a las 10 horas post infección se realizó la extracción del RNA total con el propósito de identificar la migración electroforética del RNA mensajero viral. En paralelo se precipitó selectivamente el RNA de simple hebra, con LiCl 4 M y etanol y luego se realizó el ensayo de Northern en dos condiciones; sometiendo las muestras a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5 % - urea 8 M y la posterior electrotransferencia a una membrana de nylon (figura 13) y muestras paralelas se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa-formaldehído las que se transfirieron a la membrana de nylon por capilaridad (figura 14). En ambos casos se utilizó el mismo protocolo de prehibridación, hibridación con la sonda y lavado de las membranas. En la figura 13 vemos el resultado de la detección del RNA mensajero mediante la técnica de Northern al someter el RNA extraído de la monocapa celular a una electroforesis en un gel de poliacrilamida 5 % - urea 8 M. En la parte A de la figura se muestra una autorradiografía del gel y en la parte B la autorradiografía de la membrana de nylon hibridada con la sonda radiactiva. Se observa en la figura 13 B que al

**FIGURA 13**  
**DETECCION DEL RNA MENSAJERO DEL VIRUS IPN MEDIANTE LA**  
**TECNICA DE NORTHERN. ANALISIS DEL RNA EN ELECTROFORESIS EN**  
**GEL DE POLIACRILAMIDA-UREA.**

A) Se infectó monocapas de células CHSE-214 con virus IPN, a las 0 hpi se les agregó 50  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^{32}\text{P}$ ]- ácido ortofosfórico y se incubó a 15°C. A las 10 hpi se extrajo el RNA el que se precipitó con LiCl 4 M y etanol (carriles 1 a 3) o sólo con etanol (carriles 4 a 6). Las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5 %- urea 8 M, a 180 V durante 22 horas y posteriormente se realizó una autorradiografía.

B) Muestras paralelas no marcadas radiactivamente, extraídas y procesadas como en A, se traspasaron posteriormente a una membrana de nylon a 290 mA durante 2 horas la que se hibridó con una sonda de 809 pares de bases del segmento A marcada con [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]-dCTP como se indica en los métodos.

control +: corresponde a RNA genómico del IPNV (carril 7 en A y en B).

En A) se señala la migración correspondiente a los segmentos A y B de RNA genómico del IPNV y en B) la señal de hibridación correspondiente al RNA mensajero .

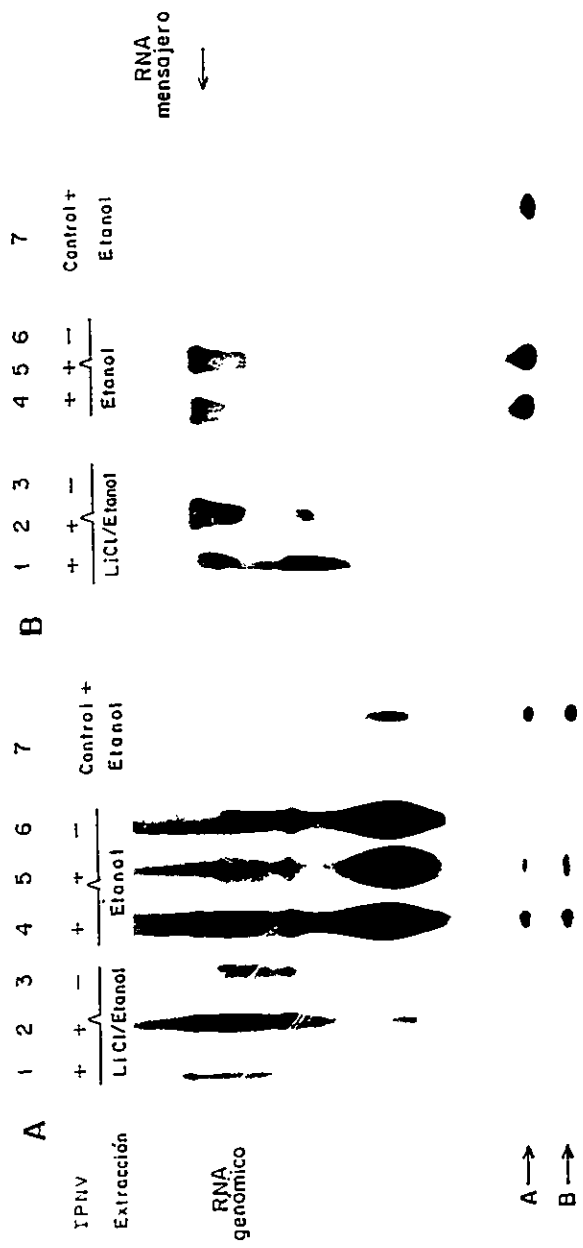


FIGURA 13

**FIGURA 14**  
**DETECCION DEL RNA MENSAJERO DEL VIRUS IPN MEDIANTE LA**  
**TECNICA DE NORTHERN. ANALISIS DEL RNA EN ELECTROFORESIS EN GEL**  
**DE AGAROSA- FORMALDEHIDO.**

A) Se infectó monocapas de células CHSE-214 y se incubó a 15 °C, a las 10 hpi se extrajo el RNA el que se precipitó con LiCl 4 M y etanol (carriles 1 y 2) o sólo con etanol (carriles 3 a 5). Las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa-formaldehído, a 80 V durante 5 horas. El gel teñido con bromuro de etidío se fotografió bajo la luz UV de un transiluminador.

B) Muestras paralelas se traspasaron posteriormente a una membrana de nylon por capilaridad durante 18 horas, la que se hibridó con una sonda de 809 pares de bases del segmento A marcada con [ $\alpha$   $^{32}$ P]-dCTP, como se indica en los métodos. En A se señala la migración de los RNA ribosomales 28 y 18 S y en B la señal de hibridación correspondiente al mensajero del IPNV.



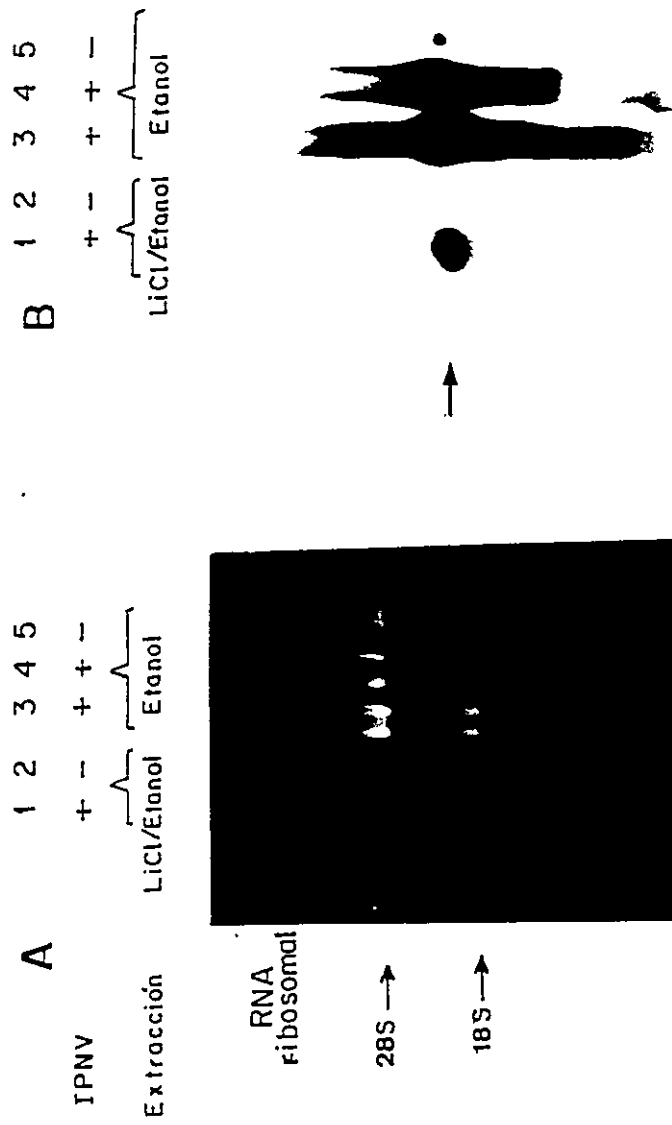


FIGURA 14

hibridar con la sonda radiactiva las muestras de RNA precipitado con etanol se detectan claramente al menos dos señales, una cuya migración corresponde a la migración del segmento de RNA genómico A (carril 7) y otra que aparece en la parte superior (carriles 4 y 5). Ambas señales son específicas del virus ya que no se observan en el control de las células no infectadas (carriles 3 y 6). En presencia de LiCl sólo aparece la señal que se ubica en la parte superior de la membrana y correspondería al RNA mensajero codificado por el segmento A (figura 13 B, carriles 1 y 2). Como se esperaba al precipitar con LiCl no aparece la señal que corresponde al segmento de RNA genómico A el que por ser de doble hebra es soluble en LiCl. Si lo comparamos con lo obtenido en la parte A, es decir el RNA marcado radiactivamente, vemos que la señal inferior corresponde efectivamente a la migración del segmento de RNA genómico de mayor peso molecular, segmento A, (carriles 4, 5 y 7) y que la señal superior aparece como una banda de muy baja intensidad (carriles 1, 2, 4 y 5). En la figura 14 vemos los resultados de la detección del RNA mensajero mediante la técnica de Northern al someter el RNA extraído a una electroforesis en un gel de agarosa al 1 % - formaldehído. En la parte A se muestra una foto del gel teñido con bromuro de etidio bajo la luz ultravioleta de un transiluminador y en la parte B, la autorradiografía de la membrana de nylon hibridada con la sonda radiactiva. Se aprecia (en la figura 14A) dos bandas cuya migración corresponde a los RNA ribosomales 18 y 28 S. En la figura 14B se observa claramente una señal de hibridación específica del virus (carriles 3 y 4) ya que esta no aparece en las células no infectadas (carriles 2 y 5), corresponde al RNA de simple hebra, precipitable con LiCl (carril 1) cuya migración respecto de los RNA ribosomales coincide con lo esperado para el mensajero del virus IPN, aproximadamente 24S

(Somogyi y Dobos, 1980). Para identificar el momento en que se inicia la síntesis del RNA mensajero se realizaron experimentos similares, sin embargo no se obtuvo el resultado esperado ya que a pesar de utilizar Northern no logramos detectar una menor concentración del mensajero. Previamente Somogyi (Somogyi y Dobos, 1980) en experimentos donde detectó el RNA mensajero marcado radiactivamente a partir de la infección un número elevado de células, determinó que la síntesis de mensajeros del IPNV en las células CHSE-214 se iniciaba entre las 3 y las 4 horas post infección.

##### **5. EVALUACION DEL EFECTO DE EICAR SOBRE LA REPLICACION DEL RNA Y LA TRANSCRIPCION DEL VIRUS IPN EN CULTIVO CELULAR.**

A continuación se determinó si el efecto inhibitorio del EICAR observado en esta tesis como la inhibición de la formación de placas del virus IPN se debía efectivamente a un efecto sobre la replicación del RNA y la transcripción viral. Se decidió evaluar el efecto del EICAR sobre la transcripción del IPNV a través del análisis de la síntesis de los polipéptidos virales como una manera de medir la presencia de RNA mensajero viral, basándonos en que en otras líneas celulares se determinó que a la concentración de EICAR utilizada en nuestros experimentos (0,5 µg/ml) no se afecta la síntesis de proteínas, ya que para inhibir la síntesis de proteínas celular en un 50 % se requirió de concentraciones superiores a los 200 µg/ml (De Clercq y col., 1991). Efectivamente, cuando se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de EICAR sobre la síntesis de proteínas de las células CHSE-214, para lo cual se incubó la monocapa celular en presencia de EICAR desde 0,1 a 5 µg/ml y de 20 µCi/ml de [<sup>35</sup>S]- metionina durante 19 horas y se midió la incorporación de radiactividad

a material ácido insoluble, se determinó que la síntesis de proteínas comienza a afectarse a partir de una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  de EICAR, observándose a esa concentración alrededor de un 10 % de disminución de la síntesis respecto del control sin el antiviral. Además, cuando se analizó los polipéptidos mediante electroforesis no se observó diferencia en la síntesis de los polipéptidos celulares en ausencia (figura 18, carril 1) y en presencia de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de EICAR (figura 18, carriles 3, 5 y 7), que corresponde a la concentración de antiviral usada en este estudio.

### **5.1. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EICAR SOBRE LA SÍNTESIS DEL RNA GENÓMICO VIRAL EN CELULAS CHSE-214.**

El efecto de EICAR sobre la síntesis del RNA genómico viral se evaluó determinando el RNA genómico sintetizado en presencia y ausencia de EICAR hasta alrededor de las 10 hpi, ya que este RNA se sintetiza entre las 8 a 10 hpi (figura 12). Con este fin se infectó monocapas de células CHSE-214 y posterior a la adsorción viral se agregó al medio de cultivo diferentes concentraciones de EICAR y 50  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^{32}\text{P}$ ]-ácido ortofosfórico incubando hasta las 12 hpi. Posteriormente, se extrajo el RNA de la monocapa celular y las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7 %. En la figura 15 se muestra una autorradiografía del gel donde se observa el efecto de la concentración de EICAR sobre la replicación del RNA viral (carriles 3 a 8). Vemos que, efectivamente, el antiviral inhibe la síntesis de RNA genómico incluso a una concentración de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  (carril 3), la inhibición aumenta a medida que aumenta la concentración de EICAR (carriles 3, 5, y 7) y a una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  no se detecta síntesis de RNA

**FIGURA 15**  
**EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EICAR SOBRE LA SINTESIS DE RNA GENOMICO DEL VIRUS IPN.**

Se infectó monocapas de células CHSE-214 con IPNV en ausencia (carriles 1 y 2) o en presencia de 0,1; 0,5 y 1  $\mu\text{g/ml}$  de EICAR (carriles 3 y 4; 5 y 6; 7 y 8 respectivamente) el que se agregó a las 0 hpi junto con 50  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^{32}\text{P}$ ]-ácido ortofosfórico. Se incubó a 15 °C y a las 12 hpi (carriles 1, 3, 5 y 7) o a las 26,5 hpi (carriles 2, 4, 6 y 8) se retiró el medio de cultivo, se extrajo el RNA y se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7 %, a 50 V durante 20 horas. El gel se secó y se realizó una autorradiografía. Se señala la migración correspondiente a los segmentos A y B de RNA genómico del IPNV.

hpi: horas post infección.

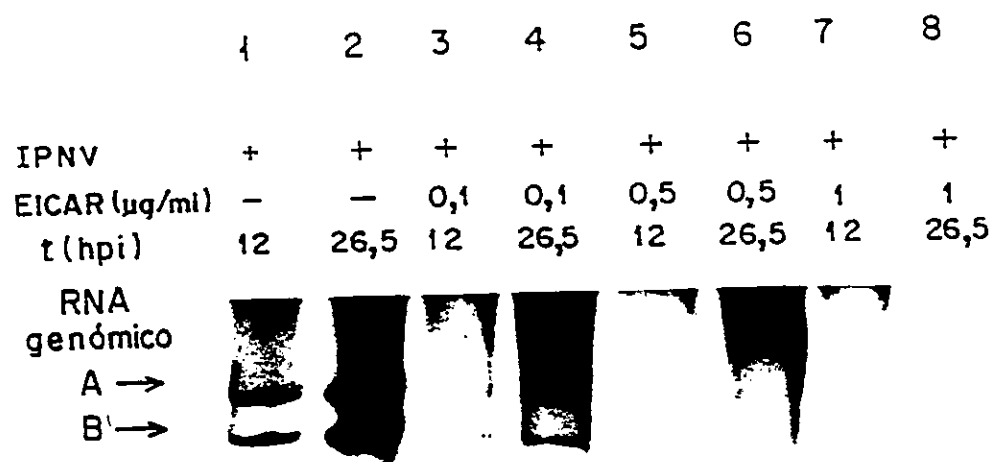


FIGURA 15

genómico (carril 7). En las muestras que se incubaron a tiempos más prolongados (26,5 hpi) se observa que la inhibición de la síntesis del RNA genómico viral también aumenta a medida que aumenta la concentración del antiviral (carriles 4, 6 y 8), a pesar que se aprecia cierto nivel de síntesis de RNA (carriles 4 y 6) respecto de lo observado a las 12 hpi (carriles 3 y 5). Es probable que corresponda a la acumulación de una mínima cantidad de RNA sintetizado en presencia de estas concentraciones de EICAR ya que a una concentración de  $1\mu\text{g/ml}$  tampoco se detecta síntesis (carril 8).

## **5.2. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EICAR SOBRE LA EXPRESION DE LOS POLIPEPTIDOS VIRALES EN CELULAS CHSE-214.**

Se evaluó el efecto de EICAR sobre la expresión de los polipéptidos virales como una manera de inferir el efecto del antiviral sobre la transcripción viral, ya que como se discutió anteriormente el EICAR a la concentración utilizada no afecta la síntesis de proteínas de las células CHSE-214. Los experimentos se realizaron siguiendo los protocolos establecidos para determinar la aparición de los polipéptidos virales, sin embargo en estos experimentos no se aplicó UV a la monocapa celular porque se observó que disminuía la cantidad de los polipéptidos virales sintetizados. Se utilizaron diferentes concentraciones de EICAR a tiempo 0 hpi y se evaluó el efecto sobre la síntesis de los polipéptidos marcándolos mediante un pulso radiactivo entre las 6 y las 8 hpi. En la figura 16 se observa los resultados de estos experimentos, en el carril 2 se observa con claridad la migración de los polipéptidos virales VP2, VP3 y VP4 y al agregar EICAR vemos una disminución en la síntesis de estos polipéptidos incluso a una concentración de  $0,1\mu\text{g/ml}$  (carril 3), la inhibición es mayor al

**FIGURA 16**  
**EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EICAR SOBRE LA**  
**EXPRESION DE LOS POLIPEPTIDOS DEL VIRUS IPN.**

Se infectó monocapas de células CHSE-214 con IPNV en ausencia (carril 2) o en presencia de 0,1; 0,5 y 1  $\mu\text{g/ml}$  de EICAR (carriles 3, 4 y 5 respectivamente) el que se agregó a las 0 hpi. Se incubó a 15 °C, a las 4 hpi se agregó MEM deficiente en metionina y a las 6 hpi se aplicó un pulso radiactivo de 50  $\mu\text{Ci/ml}$  de trans- $^{35}\text{S}$ -label por 2 horas. A las 8 hpi se retiró el medio de cultivo y se agregó 100  $\mu\text{l}$  de solución disruptora de proteínas a la monocapa celular. Las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-SDS, a 50 V por 20 horas. El gel se secó y se realizó una autorradiografía. En el carril 1 se incluyó el control de células sin infectar. Se señala la migración correspondiente a los polipéptidos del IPNV  
hpi: horas post infección.



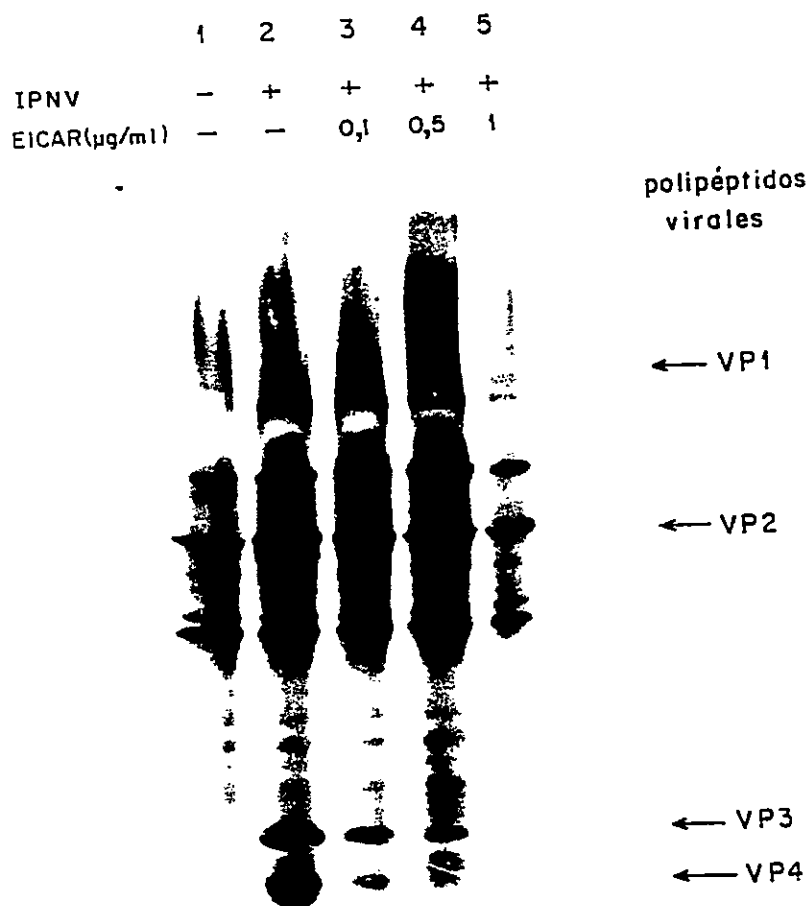


FIGURA 16

aumentar la concentración del antiviral (carriles 4 y 5) respecto del control en ausencia de EICAR (carril 2). Sin embargo incluso con 1  $\mu\text{g/ml}$  del antiviral se observa una pequeña cantidad de polipéptidos virales (carril 5).

En función de estos resultados se decidió utilizar en los siguientes experimentos una concentración de EICAR de 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , ya que concentraciones cercanas a 1  $\mu\text{g/ml}$  se encuentran en el límite de aquella que afecta la síntesis de DNA en las células CHSE-214, como se determinó previamente midiendo la  $\text{IC}_{50}$  (resultados, 2.2.).

### **5.3. EFECTO DE EICAR SOBRE LA SINTESIS DEL RNA GENOMICO Y SOBRE LA EXPRESION DE LOS POLIPEPTIDOS VIRALES AL AGREGARLO A DIFERENTES TIEMPOS DE LA INFECCION.**

Se estudió el efecto del antiviral sobre la síntesis de RNA genómico y sobre la expresión de los polipéptidos virales al agregar el antiviral a diferentes tiempos relacionados con el momento en que ocurre la síntesis de las macromoléculas del IPNV. Según lo establecido en los experimentos anteriores los polipéptidos virales se detectan a partir de las 6 a 8 hpi (figura 10, carril 4) y el RNA genómico entre las 8 a las 10 hpi (figura 12, carril 4). Ya que estos resultados son similares a lo descrito anteriormente tanto para la síntesis de polipéptidos (Dobos, 1977) como la de RNA genómico (Somogyi y Dobos, 1980), es posible asumir que la síntesis de RNA mensajero viral se iniciaría alrededor de las 3 a 4 horas post infección como se estableció anteriormente (Somogyi y Dobos, 1980).

### 5.3.1. EFECTO DE EICAR SOBRE LA SINTESIS DEL RNA GENOMICO VIRAL AL AGREGARLO A DIFERENTES TIEMPOS DE LA INFECCION.

Estos experimentos se realizaron en forma similar a los anteriores (resultados 5.1 y 5.2) y se evaluó el efecto de EICAR sobre la síntesis del RNA genómico hasta las 10 hpi. En el presente caso se agregó 0,5 µg/ml de EICAR a la monocapa celular a los tiempos indicados: 1) -3 hpi, 3 horas previo a que se infectara con el virus IPN de modo de adicionar el antiviral varias horas previo a que ocurra la transcripción viral; 2) 0 hpi, inmediatamente después de la adsorción del inóculo viral; 3) 4 hpi, cercano al inicio de la transcripción viral y 4 horas antes de que se inicie la replicación del RNA viral y finalmente 4) a las 7 hpi, muy próximo al inicio de la replicación del RNA viral con el propósito de observar si el EICAR tiene efecto sobre las macromoléculas involucradas en la replicación del RNA como se describió previamente para la ribavirina (Wray y col. 1985; Gilbert and Vernon, 1986). En la figura 17 se observa los resultados de estos experimentos. Vemos que la replicación del RNA viral es inhibida al aplicar el compuesto en los tiempos previos a la infección (carril 1), inmediatamente después de la adsorción viral (carril 2) y a las 4 hpi (carril 3), en cambio cuando se agregó el EICAR a las 7 hpi cercano al momento en que se inicia la replicación del RNA no se observó inhibición (carril 4), ya que como se vió en el experimento analizado en la figura 12 el RNA genómico es detectable solamente después de las 8 hpi. Esto se confirma en las muestras analizadas a las 24 hpi, la inhibición también se produce al agregar el EICAR varias horas previo a que ocurra la replicación del RNA, no se observa síntesis de RNA genómico cuando el antiviral se agrega previo a la infección (carril 6) e inmediatamente después de la adsorción viral (carril 7)

**FIGURA 17**  
**EFFECTO DE EICAR SOBRE LA SINTESIS DE RNA GENOMICO DEL VIRUS IPN**  
**AL AGREGARLO A DIFERENTES TIEMPOS DE LA INFECCION .**

Se infectó monocapas de células CHSE-214 en ausencia (carriles 5 y 10) o en presencia de 0,5 µg/ml de EICAR el que se agregó a diferentes tiempos, como se indica en la figura: 3 horas previo a la infección (carriles 1, 6) y a las 0 hpi (carriles 2, 7); 4 hpi (carriles 3, 8) y 7 hpi (carriles 4, 9). A las 0 hpi se agregó 50 µCi/ml de [<sup>32</sup>P]-ácido ortofosfórico y se incubó a 15 °C. A las 10 hpi (carriles 1a 5) o a las 24 hpi (carriles 6 a 10) se retiró el medio de cultivo y se extrajo el RNA el que se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7 %, a 50 V por 20 horas. El gel se secó y se realizó una autorradiografía. Se señala la migración correspondiente a los segmentos A y B del RNA genómico del IPNV.

hpi: horas post infección.

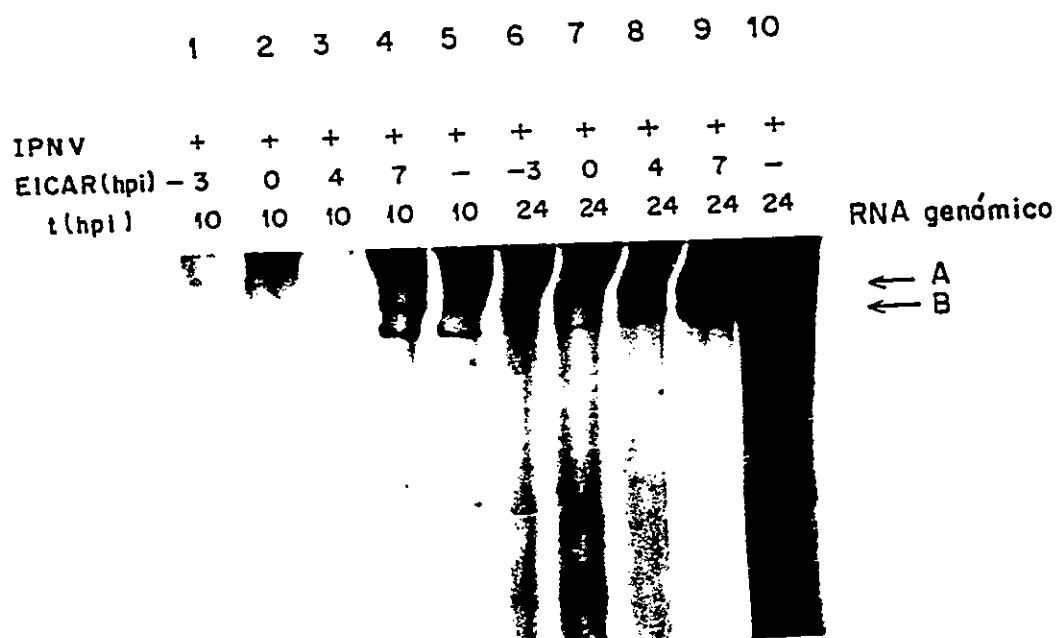


FIGURA 17

### 5.3.2. EFECTO DE EICAR SOBRE LA EXPRESION DE LOS POLIPEPTIDOS VIRALES AL AGREGARLO A DIFERENTES TIEMPOS DE LA INFECCION .

En este análisis, se adicionó 0,5 µg/ml de EICAR a las -3, 0, 4 hpi sobre la monocapa celular y se evaluó el efecto sobre la expresión de los polipéptidos virales sintetizados entre las 6 y las 8 hpi. Como se observa en la figura 18 la mayor inhibición de la síntesis de los polipéptidos virales se produce al agregar el EICAR en el momento de la infección (carril 6), o incluso a tiempos previos a la infección (carril 4), pero al agregarlo a las 4 hpi se detecta la presencia de VP3 y VP4 (carril 8). Este resultado es el esperado ya que el efecto inhibitor se relaciona con la transcripción viral, se observa que el efecto inhibitorio requiere la presencia del antiviral antes de las 4 hpi, el punto en el cual es probable que ya se ha iniciado la transcripción viral. En experimentos similares se observó que al agregar el antiviral a las 2 hpi se detectó síntesis de los polipéptidos virales y para inhibirla era necesario agregar el antiviral a las 0 hpi o incluso previo a la infección (datos no mostrados). Esto se observó claramente en la figura 15 donde era posible detectar polipéptidos virales al agregar 0,5 o incluso 1 µg/ml de EICAR a las 0 horas post infección (carriles 4 y 5 respectivamente). Además estos resultados sugieren que el efecto de inhibición de la replicación del RNA no es una consecuencia de la inhibición de la transcripción viral, ya que al agregar el EICAR de 2 a 4 hpi se inhibe la síntesis de RNA genómico y en cambio no la transcripción viral ya que se observa síntesis de los polipéptidos virales.

En resumen, estos resultados indican que el EICAR inhibe la síntesis de RNA tanto genómico como mensajero del virus IPNV, como se esperaba, y sugieren que probablemente la inhibición no se debe a un efecto directo del antiviral sobre las macromoléculas

**FIGURA 18**  
**EFFECTO DE EICAR SOBRE LA EXPRESION DE LOS POLIPEPTIDOS DEL VIRUS IPN AL AGREGARLO A DIFERENTES TIEMPOS DE LA INFECCION.**

Monocapas de células CHSE-214 infectadas con IPNV (carriles 2, 4, 6, 8 y 10) o sin infectar (1, 3, 5, 7 y 9) se les agregó 0,5 µg/ml de EICAR: 3 horas previo a la infección (carril 3, 4); a las 0 hpi (carril 5, 6); a las 4 hpi (carriles 7, 8) y las 7 hpi (carriles 9, 10). A las muestras de los carriles 1 y 2 no se les agregó EICAR. Se incubó a 15 °C y a las 4 hpi se le agregó MEM deficiente en metionina, luego a las 6 hpi se aplicó un pulso radiactivo de 50 µCi /ml de trans-<sup>35</sup>S-label y finalmente a las 8 hpi se retiró el medio de cultivo y a la monocapa se le agregó 100 µl de solución disruptora de proteínas. Las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-SDS, a 50 V por 20 horas. El gel se secó y se realizó una autorradiografía. Se señala la migración de los polipéptidos del IPNV.

hpi: horas post infección.

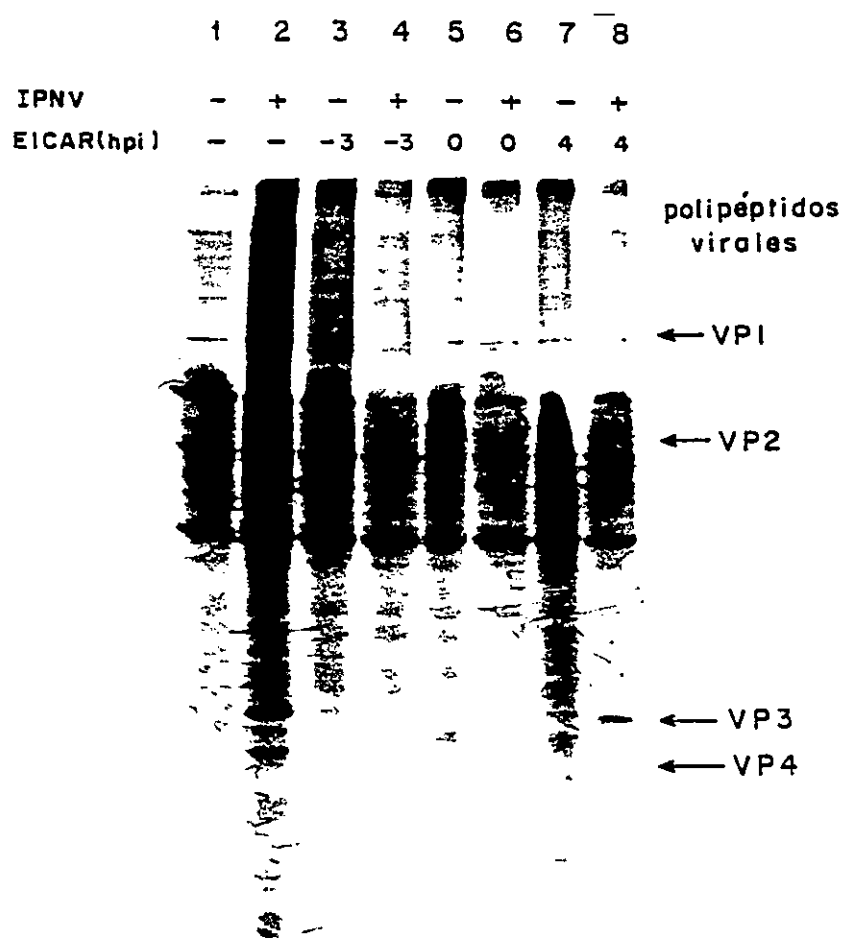


FIGURA 18



involucradas en la síntesis de RNA viral.

#### **5.4. REVERSION DE LA INHIBICION DEL IPNV POR EICAR MEDIANTE LA ADICION DE NUCLEOSIDOS.**

Se ha demostrado que el efecto inhibitor de la ribavirina y EICAR se revierte por la adición específica de algunos nucleósidos (Scholtissek, 1976; De Clercq y col., 1991; Balzarini y col., 1993). Como se mencionó en la introducción se ha propuesto que estos compuestos antivirales inhiben la síntesis de los nucleótidos de guanina, ya que bloquean la reacción catalizada por la IMP deshidrogenasa que convierte la inosina monofosfato a xantosina monofosfato, y que es esta disminución en el nivel del "pool" de GTP celular lo que causa la inhibición de la transcripción y replicación del RNA viral. Por lo tanto la inhibición viral se revierte al agregar guanosina y xantosina a partir de los que se sintetizaría los nucleótidos de guanina y en cambio la inhibición persiste al agregar otros nucleósidos como adenosina, citosina, inosina, con los que no se puede sintetizar estos nucleótidos. Con el propósito de determinar si la inhibición por EICAR sobre el virus IPN ocurre a través de un mecanismo similar se realizaron experimentos para evaluar el efecto de la guanosina, adenosina y citosina sobre la inhibición viral producida por EICAR.

#### 5.4.1. EFECTO DE LA ADICION DE GUANOSINA EN LA INHIBICION DE EICAR SOBRE LA SINTESIS DEL RNA GENOMICO Y LA EXPRESION DE LOS POLIPEPTIDOS VIRALES.

Se analizó el efecto de agregar guanosina en forma exógena para revertir la inhibición producida por EICAR sobre la síntesis del RNA genómico y sobre la expresión de los polipéptidos virales, para lo cual se realizaron ensayos en que a la monocapa infectada se les agregó a tiempo 0 hpi EICAR 0,5 µg/ml en ausencia y en presencia de guanosina 5, 10, 50 µg/ml. Al igual que en los demás experimentos se determinó el nivel de la síntesis del RNA genómico (analizado hasta las 10 y las 26 hpi), como el de los polipéptidos virales (analizados entre las 6 y las 8 hpi). Los resultados de los ensayos para evaluar el efecto sobre la replicación del RNA viral se muestran en la autorradiografía de la figura 19. Vemos que al agregar la guanosina junto con el EICAR se revierte la inhibición de la síntesis del RNA genómico del IPNV producida por el antiviral, en las tres concentraciones ensayadas (carriles 3, 4 y 5 respectivamente), respecto del control sin el nucleósido (carril 2). A tiempos más prolongados se observa que al agregar guanosina a cualquiera de las tres concentraciones probadas la síntesis del RNA genómico es significativamente mayor que en ausencia del nucleósido (carriles 8, 9 y 10 respecto de carril 7) y la síntesis es similar a la del control sin el inhibidor (carril 6). Además, al observar al microscopio monocapas de células infectadas en presencia de EICAR y compararlas con aquellas que contenían EICAR más guanosina se distinguía claramente en éstas últimas la recuperación del efecto citopático característico del virus IPN, el que no se observa en cambio en presencia de EICAR.

Los resultados de los ensayos en los que se determinó la síntesis de los polipéptidos

**FIGURA 19**  
**EFFECTO DE LA ADICION DE GUANOSINA EN LA INHIBICION DE EICAR**  
**SOBRE LA REPLICACION DEL RNA DEL VIRUS IPN.**

Se infectó monocapas de células CHSE-214, a las 0 hpi se agregó 0.5 µg/ml de EICAR y 50 µCi/ml de [<sup>32</sup>P]-ácido ortofosfórico en ausencia (carriles 2 y 7) o en presencia de guanosina: 5 µg/ml (carriles 3 y 8); 10 µg/ml (carriles 4 y 9) o 50 µg/ml (carriles 5 y 10). Se incluyó además monocapas infectadas en ausencia de EICAR y guanosina (carriles 1 y 6) y en ausencia de EICAR pero en presencia de guanosina (carriles 11 a 14). Las muestras se incubaron 15 °C y a las 10 hpi (carriles 1 a 5) o a las 26 hpi (carriles 6 a 14), se retiró el medio, se extrajo el RNA y se sometió a una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7 %, a 50 V por 20 horas. El gel se secó y se realizó una autoradiografía. Las flechas señalan la migración de los segmentos A y B de RNA genómico del IPNV.  
hpi: horas post infección.

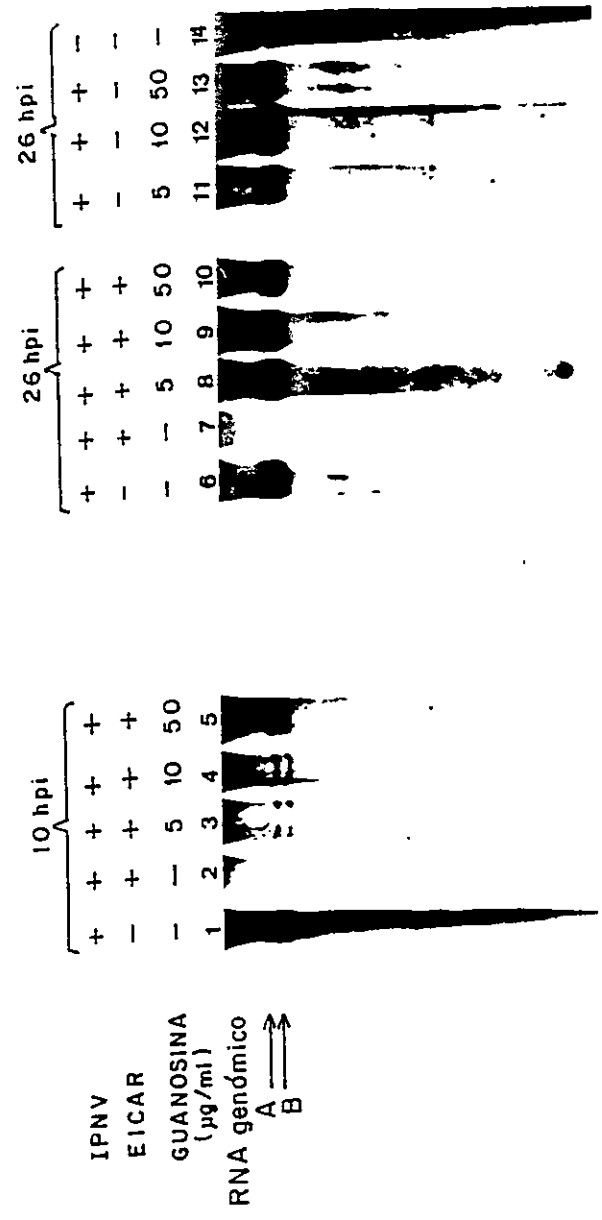


FIGURA 19

virales en presencia de EICAR y de EICAR más guanósina se muestran en la figura 20, siguiendo la síntesis de los polipéptidos virales a través de VP3 vemos que al agregar 10 o 50  $\mu\text{g/ml}$  de guanósina (carriles 2 y 3) se recupera la síntesis respecto del control en que sólo se agregó EICAR (carril 1). La recuperación de la expresión de los polipéptidos virales observada en estos ensayos se debe al efecto de la guanósina sobre la inhibición de la transcripción viral similar al efecto sobre la síntesis de RNA genómico, ya que según se demostró anteriormente el EICAR inhibió la síntesis de RNA mensajero y en cambio no afectó la síntesis de proteínas.

Los resultados analizados en la figura 19 y 20 muestran que al agregar guanósina es posible revertir la inhibición de la síntesis de RNA viral producida por EICAR .

#### **5.4.2. EFECTO DE LA ADICION DE ADENOSINA Y CITOSINA EN LA INHIBICION DE EICAR SOBRE LA SINTESIS DEL RNA GENOMICO VIRAL.**

Debido que la guanósina revierte la inhibición producida por EICAR se realizaron ensayos para determinar la especificidad de la reversión, para lo cual se realizó experimentos similares a los descritos pero utilizando los nucleósidos adenosina y citosina. Se agregó diferentes concentraciones de uno de estos nucleósidos junto con el EICAR y se determinó la síntesis de RNA genómico viral. Los resultados de estos experimentos se observan en la figura 21 donde vemos que a diferencia de lo que ocurre con la guanósina (carril 9), al agregar adenosina o citosina 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  (carriles 3 a 5 y 6 a 8; respectivamente), no hubo síntesis de RNA genómico viral, es decir no se revirtió la inhibición de la replicación del RNA viral. Lo mismo se observó al analizar la síntesis de los polipéptidos virales (datos

**FIGURA 20**  
**EFFECTO DE LA ADICION DE GUANOSINA EN LA INHIBICION DE EICAR**  
**SOBRE LA EXPRESION DE LOS POLIPEPTIDOS DEL VIRUS IPN.**

Se infectó monocapas de células CHSE-214, a las 0 hpi se agregó 0,5 µg/ml de EICAR en ausencia (carril 1) o en presencia de 10 o 50 µg/ml de guanosina (carril 2 y 3 respectivamente). Se incubó a 15 °C, a las 4 hpi se agregó MEM deficiente en metionina y a las 6 hpi se aplicó un pulso radiactivo de 50 µCi/ml de trans-<sup>35</sup>S-label y a las 8 hpi se retiró el medio de cultivo y se agregó 100 µl de solución disruptora de proteínas. Las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 %-SDS, a 50 V por 20 horas. El gel se secó y se realizó una autorradiografía. Se señala la migración de los polipéptidos del IPNV.

hpi: horas post infección.

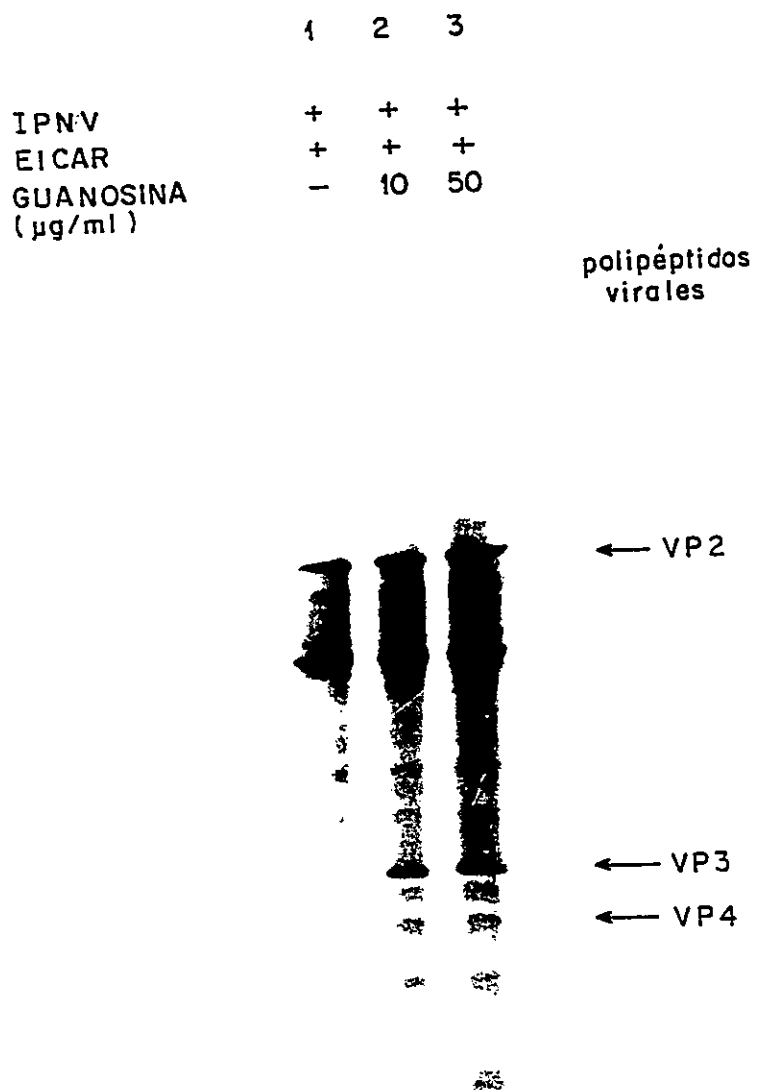


FIGURA 20

**FIGURA 21**  
**EFFECTO DE LA ADICION DE ADENOSINA O CITOSINA EN LA INHIBICION DE EICAR SOBRE LA REPLICACION DEL RNA DELVIRUS IPN.**

Se infectó monocapas de células CHSE-214, a las 0 hpi se agregó 50  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^{32}\text{P}$ ]- ácido ortofosfórico y 0.5  $\mu\text{g/ml}$  de EICAR (carril 2); EICAR más 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  de adenosina (carriles 3, 4, 5 respectivamente) o citosina (carriles 6, 7, 8 respectivamente) o 10  $\mu\text{g/ml}$  de guanosina (carril 9), en este carril se cargó la mitad de la muestra. El carril 1 corresponde a la monocapa infectada en ausencia de EICAR. Se incubó a 15 °C y a las 10 hpi se retiró el medio, se extrajo el RNA y se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%, a 50 V por 20 horas. El gel se secó y se realizó una autorradiografía. Se señala la migración de los segmentos A y B de RNA genómico del IPNV.  
hpi: horas post infección



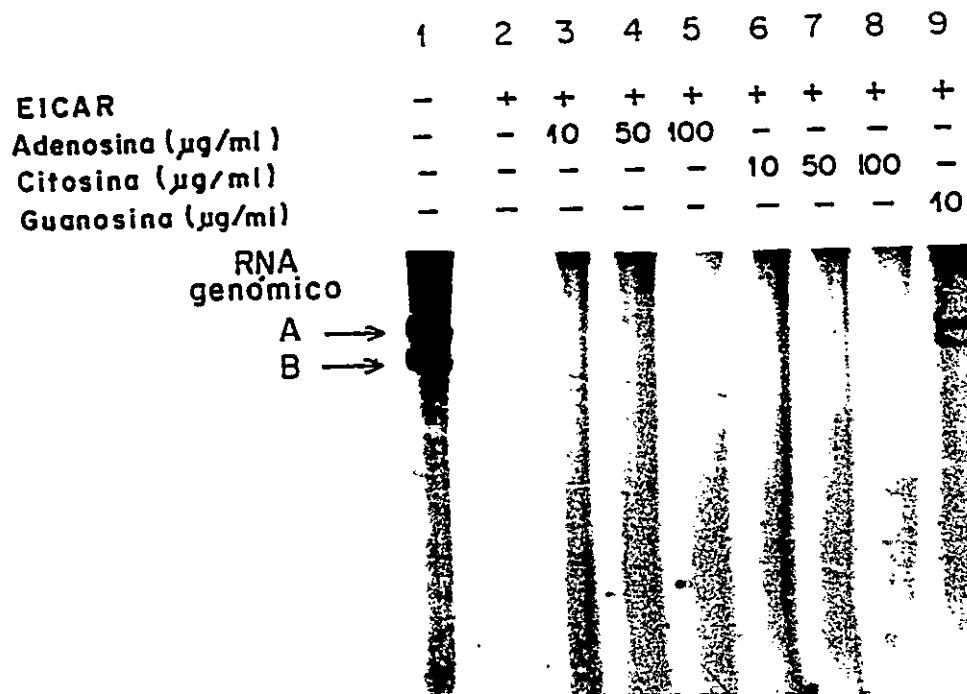


FIGURA 21

no mostrados). Además al observar al microscopio la monocapa infectada a las 26 hpi se comprobó que efectivamente al infectar con IPNV en presencia de EICAR y de EICAR más adenosina o citosina no se produce el efecto citopático característico de este virus, en cambio si se observa cuando la infección se realiza en presencia de EICAR y guanosina.

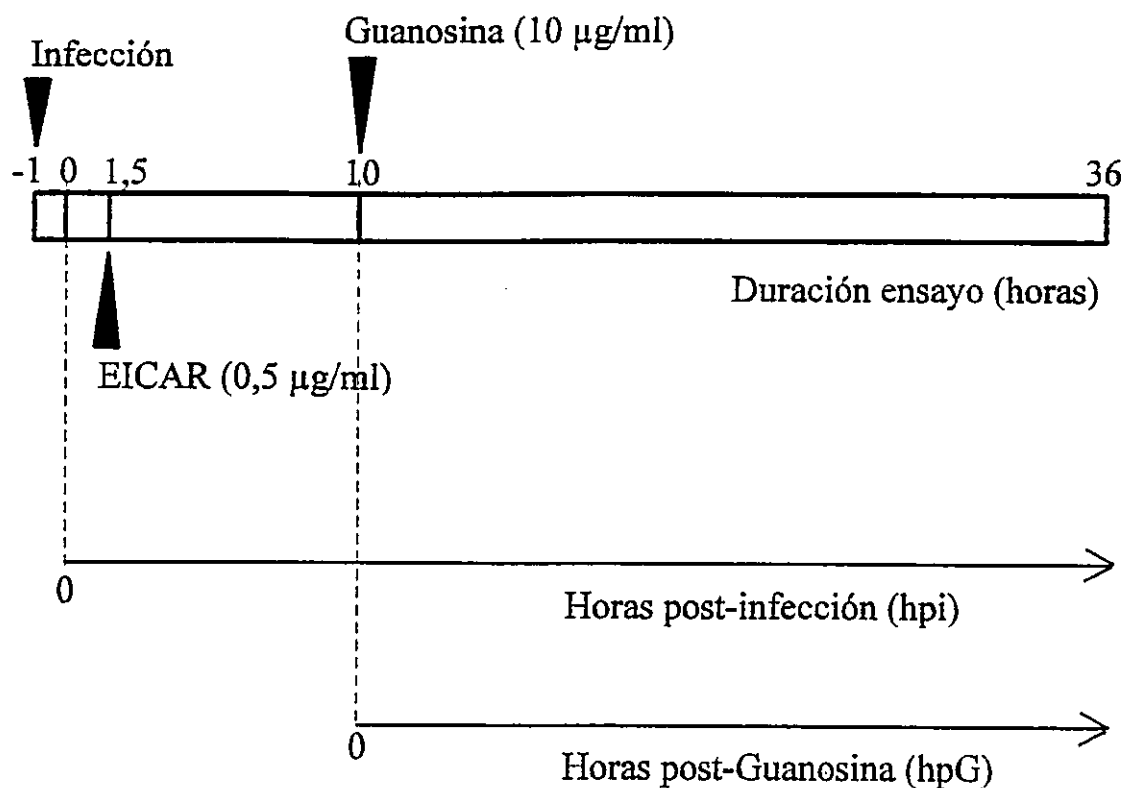
Estos resultados sugieren que la inhibición de EICAR sobre la replicación del RNA y la transcripción del virus IPN ocurriría principalmente por el efecto del antiviral sobre la disponibilidad de los nucleótidos de GTP intracelular, como se ha observado en otros sistemas biológicos tanto con ribavirina como con EICAR (Streeter y col., 1973; Stridh, 1983; De Clercq y col., 1991; Balzarini y col., 1993).

#### **5.5. UTILIZACION DE EICAR Y GUANOSINA PARA ESTUDIAR EL INICIO DE LA REPLICACION DEL RNA DEL VIRUS IPN.**

Paralelamente a los experimentos destinados a identificar los mensajeros virales (descritos en los resultados 4.3) se diseñó un ensayo cuyo propósito era estudiar el requerimiento del RNA mensajero del IPNV como templado para la síntesis de RNA de doble hebra viral, lo que no se pudo concretar debido a la dificultad para detectar los mensajeros virales en un bajo número de células, como se discutió anteriormente. Sin embargo, como se describe a continuación, mediante estos ensayos se analizó el inicio de la replicación del RNA en relación al requerimiento de la síntesis de los polipéptidos virales.

Aprovechando las características de la inhibición por EICAR se usó este antiviral con el propósito de inhibir selectivamente la replicación del RNA viral y permitir la síntesis de transcritos y proteínas virales, luego agregar guanosina para revertir la inhibición de la

síntesis de RNA producida por el EICAR y determinar que sucede con la síntesis del RNA genómico en presencia de proteínas y por ende también transcritos virales previamente sintetizados. A través de experimentos similares a los descritos en los resultados 5.3.1. y 5.3.2. se determinó que al agregar 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de EICAR a las 1,5 hpi se inhibía selectivamente la síntesis de RNA genómico y en cambio ocurría síntesis de los polipéptidos virales y por lo tanto no se inhibía la transcripción viral (datos no mostrados). En la figura 22 se muestra un esquema de estos ensayos. Se infectó monocapas de células CHSE-214, se adicionó EICAR 0,5  $\mu\text{g/ml}$  a las 1,5 hpi, se continuó con la incubación y a las 10 hpi se agregó guanosina 10  $\mu\text{g/ml}$ , momento que se denominó como tiempo 0 horas post guanosina (hpG). Se analizó en paralelo la síntesis del RNA genómico y la transcripción, a través de la expresión de los polipéptidos virales, para lo cual se tomó muestras a diferentes tiempos de la infección previo y posterior a la adición de guanosina. Para seguir el RNA genómico sintetizado después de la adición del nucleósido se agregó el radioisotopo junto con la guanosina (0 hpG) y en el caso de los polipéptidos se marcó radiactivamente a partir de las 0 hpG mediante pulsos radiactivos de 2 horas a diferentes tiempos post guanosina. Los resultados de este ensayo se observan en las figuras 23 y 24. En la figura 23 se muestra lo que sucedió con la síntesis de los polipéptidos del IPNV, en primer lugar se puede verificar que al agregar EICAR a las 1,5 hpi no se observó inhibición de la transcripción, ya que hubo síntesis de los polipéptidos virales como se puede comprobar al comparar la síntesis de los polipéptidos (principalmente por la presencia de VP3 y VP4) entre la 1 y las 9 horas post infección en ausencia (carril 1) y en presencia de EICAR (carril 2), síntesis que continúa en ausencia de guanosina (carriles 3, 4 y 5). Al agregar guanosina (carriles 6 a 10), el



**FIGURA 22**  
**USO DE EICAR Y GUANOSINA PARA ESTUDIAR LOS REQUERIMIENTOS DEL INICIO DE LA REPLICACION DEL RNA DEL VIRUS IPN.**

Se muestra un esquema de estos experimentos. Monocapas de células CHSE-214 se infectaron con IPNV, a las 1,5 hpi se agregó EICAR 0,5 µg/ml y se continuó con la incubación a 15 °C hasta las 10 hpi en que se adicionó guanósina 10 µg/ml. Se analizó la síntesis de los polipéptidos y del RNA genómico para lo cual se tomó muestras tanto de RNA como de los polipéptidos virales a los diferentes tiempos pre y post guanósina. Para determinar la síntesis de RNA genómico después de la adición del nucleósido se agregó el radioisotopo junto con la guanósina (0 hpG) y en el caso de los polipéptidos se marcó radiactivamente a partir de las 0 hpG mediante pulso radiactivos de 2 horas.

**FIGURA 23**  
**CINETICA DE LA SINTESIS DE LOS POLIPEPTIDOS DEL VIRUS IPN AL REVERTIR MEDIANTE GUANOSINA LA INHIBICION VIRAL PRODUCIDA EICAR.**

Se infectó monocapas de células CHSE-214, a las 1,5 hpi se agregó 0,5 µg/ml de EICAR y se incubó a 15 °C hasta las 10 hpi, en ese momento se agregó 10 µg/ml de guanosina a las muestras correspondientes a los carriles 6 a 10; en cambio, las de los carriles 1 a 5 permanecieron sin guanosina. Se continuó la incubación y a diferentes tiempos se marcó radiactivamente los polipéptidos mediante un pulso radiactivo de 50 µCi/ml de trans-<sup>35</sup>S-label de 2 horas: 2-4 (carril 6); 4-6 (carriles 3,7); 6-8 (carriles 4, 8); 8-10 (carriles 5, 9); 10-12 hpG (carril 10). Al finalizar la marcación, se retiró el medio de cultivo y se agregó 100 µl de solución disruptora de proteínas. Las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% -SDS, a 50 V por 20 horas. El gel se secó y se realizó una autoradiografía. Los carriles 1 y 2 corresponden a las polipéptidos sintetizados entre las 1 y las 9 hpi, en ausencia (carril 1) y en presencia de EICAR (carril 2) previo a la adición de guanosina. En ambos se agregó trans-<sup>35</sup>S-label desde 1 hpi hasta las 9 hpi. Se señala la migración de los polipéptidos del IPNV.

hpi: horas post infección ; hpG: horas post guanosina, 0 hpG corresponde a las 10 hpi.

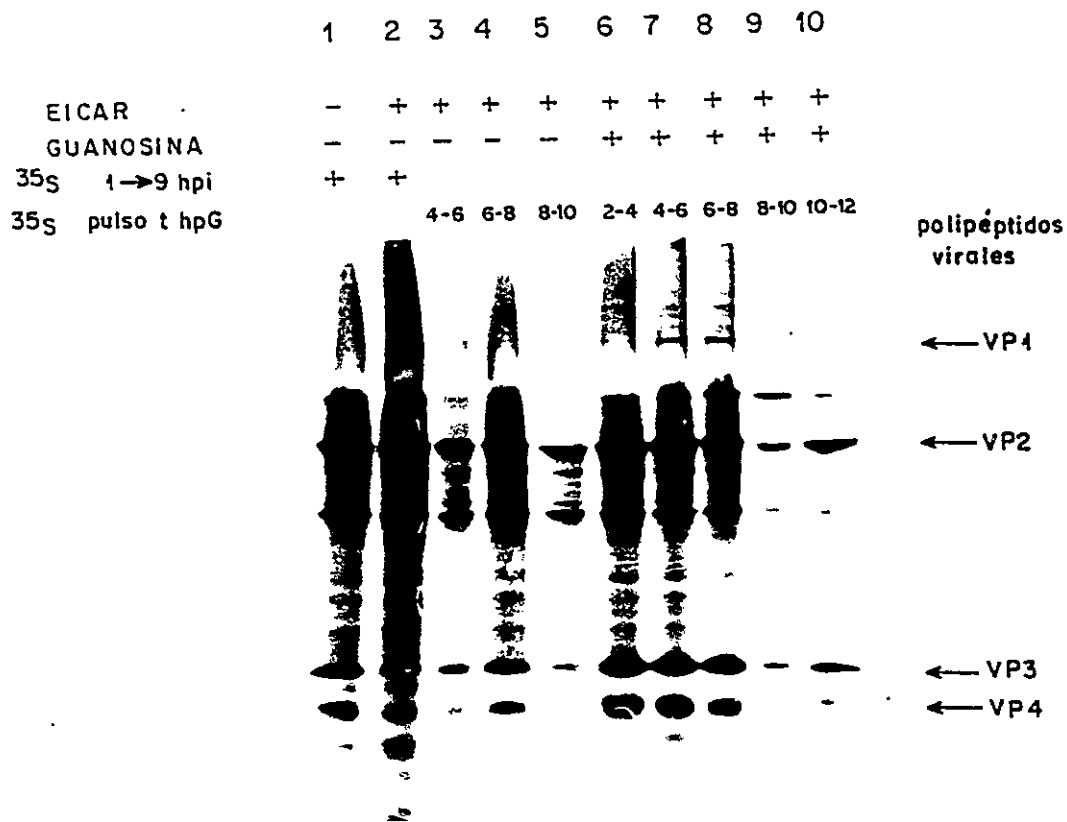


FIGURA 23

**FIGURA 24**

**CINETICA DE LA SINTESIS DE RNA GENOMICO DEL VIRUS IPN AL REVERTIR MEDIANTE GUANOSINA LA INHIBICION VIRAL PRODUCIDA POR EICAR**

Se infectó monocapas de células CHSE-214, a las 1,5 hpi se agregó 0,5 µg/ml de EICAR (carriles 4 a 17) y se incubó a 15 °C hasta las 10 hpi, en ese momento se adicionó 10 µg/ml de guanosina a las muestras correspondientes a los carriles 11 a 17, en cambio las de los carriles 1 a 10 permanecieron sin guanosina. A las muestras correspondientes a los carriles 7 a 17 se agregó además 50 µCi/ml de [<sup>32</sup>P]- ácido ortofosfórico. Se incubó a 15 °C y a las 2 (carril 11); 4 (carriles 7, 12); 6 (carril 13); 8 (carril 14); 10 (carril 15); 12 (carril 16) y 26 hpG (carriles 10, 17) se retiró el medio de cultivo y se extrajo el RNA, él que se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%, a 50 V por 20 horas. El gel se secó y se realizó una autorradiografía.

Los carriles 1 a 6 corresponden al RNA sintetizado en ausencia de guanosina desde las 0 hpi hasta las 10 (1 y 4), 24 (2 y 5) y 36 hpi (3 y 6) en ausencia (1,2,3) o en presencia (4,5,6) de EICAR.

En estas muestras se agregó 50 µCi/ml de [<sup>32</sup>P]- ácido ortofosfórico desde las 0 hpi. Las flechas señalan la migración de los segmentos A y B de RNA genómico del IPNV.  
hpi: horas post infección; hpG: horas post guanosina, 0 hpG corresponde a las 10 hpi.

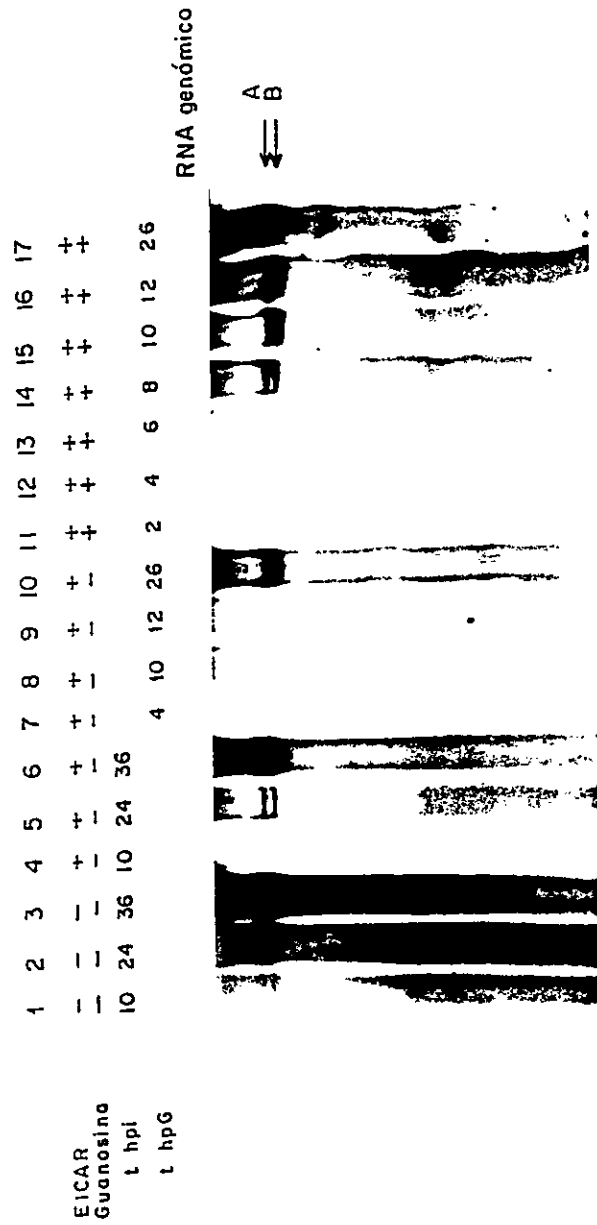


FIGURA 24



nucleósido que revierte la inhibición de la síntesis de RNA viral (figuras 19 y 20), se observó un rápido aumento de la síntesis de los polipéptidos virales ( carriles 6,7 y 8 ) reflejo de la rápida estimulación de la transcripción viral, la que si bien aparentemente no se había inhibido en forma significativa al agregar el EICAR (carril 2) al transcurrir la infección estaba limitada probablemente debido a la baja disponibilidad de los nucleótidos de guanina. En la figura 24 se observa lo que sucedió con la replicación del RNA viral analizada en paralelo. Se comprobó que al agregar el EICAR a las 1,5 hpi se inhibió la replicación del RNA viral (carril 4), inhibición que se mantuvo en ausencia de guanosina (carriles 7 a 9). En presencia de guanosina (carriles 11 a 17) se detectó la síntesis de RNA genómico como se esperaba, sin embargo la replicación del RNA ocurrió solamente varias horas después de adicionar el nucleósido, alrededor de 6 a 8 horas (carriles 13 y 14), y aparentemente posterior al aumento de la síntesis de los polipéptidos virales (figura 23, carril 8). En función de estos resultados es posible sugerir que para iniciar la síntesis de RNA genómico se requirió nueva síntesis de los polipéptidos virales aún cuando, según lo observado, en la célula había una síntesis significativa de los polipéptidos del IPNV.

#### **5.6. UTILIZACION DE CICLOHEXIMIDA PARA ESTUDIAR EL REQUERIMIENTO DE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN EL INICIO DE LA REPLICACION DEL RNA VIRAL.**

Se utilizó cicloheximida para comprobar si en los ensayos anteriores para iniciar la replicación del RNA se requería una nueva síntesis de los polipéptidos virales posterior a la adición de guanosina. Se realizaron ensayos similares y se analizó la síntesis de RNA

genómico al inhibir mediante cicloheximida la síntesis de proteínas posterior a la adición de guanosina. Previamente se realizaron experimentos para determinar la concentración óptima de cicloheximida para inhibir la síntesis de proteínas en las CHSE-214, la que resultó ser de 40  $\mu\text{g/ml}$  y además se comprobó que esta inhibición ocurría al menos 1 hora después de agregar la cicloheximida (datos no mostrados). Por esto al igual que en los experimentos anteriores a la 1,5 hpi se agregó EICAR 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , a las 10 hpi a una serie de muestras se les agregó cicloheximida 40  $\mu\text{g/ml}$  y a las 11 hpi se agregó guanosina 10  $\mu\text{g/ml}$ , momento que se consideró como las 0 hpG. En la figura 25 se observa la cinética de aparición de los polipéptidos virales al agregar guanosina (carriles 3 a 10) en ausencia y en presencia de cicloheximida, donde se ve claramente la inhibición de la síntesis de los polipéptidos al agregar la cicloheximida (carriles 7 a 10) respecto del control en que se observa gran cantidad de los polipéptidos virales VP3 y VP4 (carriles 3 a 6). En la figura 26 se muestra lo que ocurrió en paralelo con la replicación del RNA viral, donde se observa que cuando se inhibió la síntesis de los polipéptidos posterior a la adición de guanosina no se detectó síntesis de RNA genómico (carriles 7 a 11), a diferencia de lo que ocurre en ausencia de cicloheximida (carriles 4 a 6). Además en este ensayo se observa, nuevamente, que en ausencia de cicloheximida se detecta la síntesis de RNA genómico posterior al alza de la síntesis de los polipéptidos, en este caso alrededor de las 6 hpG (figura 26, carril 4 y figura 25, carril 6).

Según estos resultados al agregar guanosina se requirió de nueva síntesis de proteínas para que se iniciara la replicación del RNA pese a la síntesis significativa de proteínas virales (figura 22, carriles 2 a 5), lo que sugiere que durante el ciclo infeccioso del IPNV se necesita

de una síntesis continua de los polipéptidos para que ocurra la replicación del RNA viral.

**FIGURA 25**  
**UTILIZACION DE CICLOHEXIMIDA EN EL ENSAYO EICAR /GUANOSINA.**  
**EFFECTO SOBRE LA SINTESIS DE LOS POLIPEPTIDOS DEL VIRUS IPN.**

Se infectó monocapas de células CHSE-214, a las 1,5 hpi se agregó 0,5 µg/ml de EICAR y se incubó a 15 °C hasta las 10 hpi. A las 10 hpi se agregó 40 µg/ml de cicloheximida a las muestras correspondientes a los carriles 7 a 10 y a las 11 hpi se agregó 10 µg/ml de guanosina a las muestras correspondientes a los carriles 3 a 10. A diferentes tiempos se aplicó un pulso radiactivo de trans-<sup>35</sup>S-label de 2 horas, entre las 0-2 (carriles 3, 7); 2-4 (carriles 4, 8); 4-6 (carriles 5, 9); 6-8 (carriles 6, 10). Al finalizar la marcación se retiró el medio de cultivo y se agregó 100 µl de solución disruptora de proteínas. Las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 %-SDS, a 50 V por 20 horas. El gel se secó y se realizó una autorradiografía. Los carriles 1 y 2 corresponden a los polipéptidos sintetizados en ausencia (carril 1) o en presencia de EICAR (carril 2) desde las 1,5 hasta las 10 hpi previo a la adición de guanosina. Las flechas señalan la migración de los polipéptidos del IPNV. hpi: horas post infección; hpG: horas post guanosina, 0 hpG corresponde a las 11 hpi.

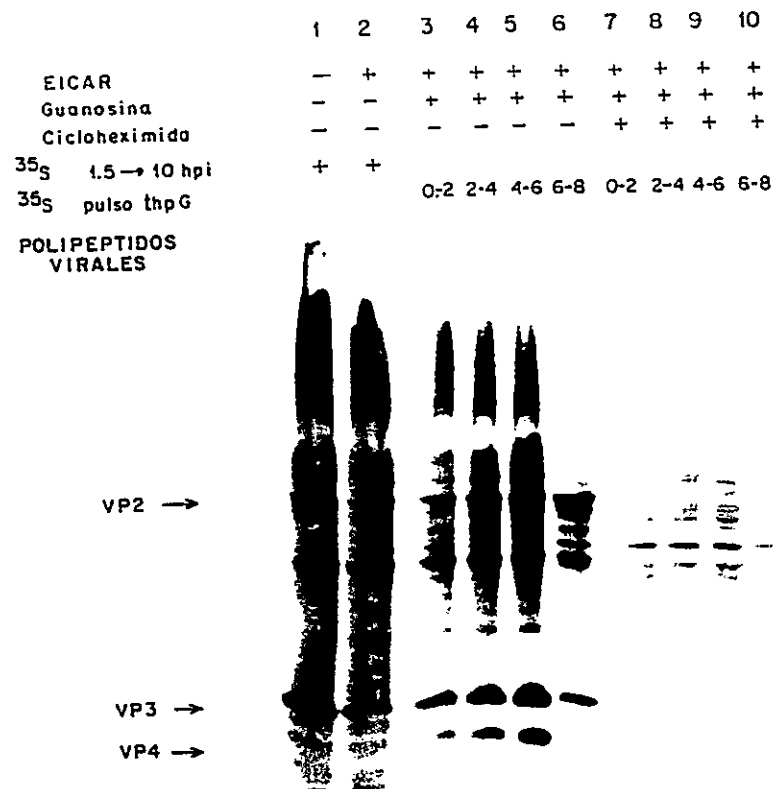


FIGURA 25

**FIGURA 26**  
**UTILIZACION DE CICLOHEXIMIDA EN EL ENSAYO EICAR/GUANOSINA.**  
**EFFECTO SOBRE LA SINTESIS DEL RNA GENOMICO DEL VIRUS IPN.**

Se infectó monocapas de células CHSE-214, a las 1,5 hpi se agregó 0,5 µg/ml de EICAR y se incubó a 15° C hasta las 10 hpi momento en que se agregó 40 µg/ml de cicloheximida a las muestras 8 a 12 y a las 11 hpi se agregó 10 µg/ml de guanosina a las muestras correspondientes a los carriles 3 a 12 y junto con 50 µCi/ml de [ <sup>32</sup>P ]-ácido ortofosfórico. Se incubó a 15 °C y a las 2 hpG (carriles 3, 8); 4 hpG (carriles 4, 9); 6 hpG (carriles 5, 10); 8 hpG (carriles 6, 11); 10 hpG (carriles 7, 12) se retiró el medio y se extrajo el RNA él que se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7 %, a 50 V por 20 horas. El gel se secó y se realizó una autorradiografía.

Los carriles 1, 2 corresponden al RNA sintetizado desde las 0 hasta las 10 hpi en ausencia de guanosina y en ausencia (carril 1) o presencia (carril 2) de EICAR.

hpi: horas post infección; hpG: horas post guanosina, 0 hpG corresponde a las 11 hpi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
EICAR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Guanosina	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Cicloheximida	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
t hpi	10											10
t hpG	-	2	4	6	8	10	2	4	6	8	10	-

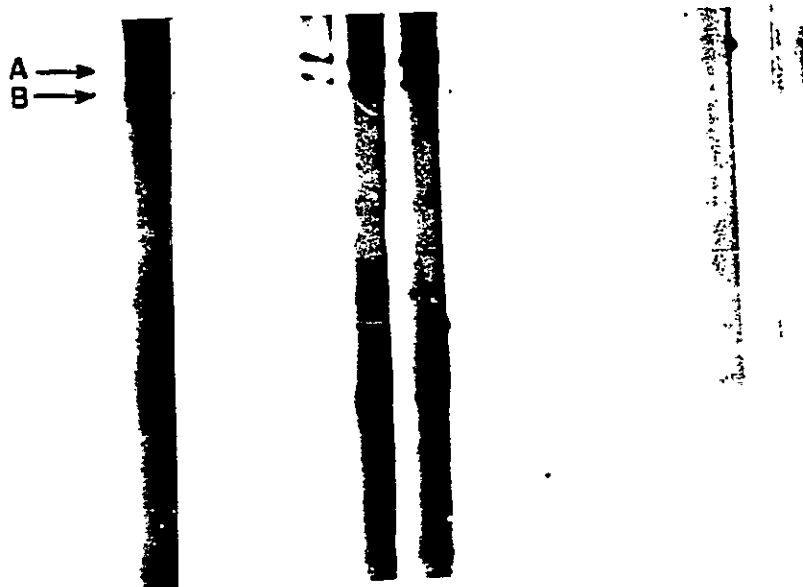


FIGURA 26

## DISCUSION

Evidentemente el estudio del virus IPN es importante no sólo por el aporte al conocimiento de la biología molecular de los virus animales, sino también desde el punto de vista económico debido a la magnitud de las pérdidas que la infección puede generar en una piscicultura. Considerando que nuestro país es uno de los principales exportadores de salmón y trucha del mundo y además debido a la poca información que hay respecto del ciclo infectivo del IPNV, en esta tesis se propuso buscar compuestos inhibidores del IPNV con el propósito de usarlos para estudiar el ciclo replicativo del virus y a la vez encontrar un antiviral que pudiera ser utilizado en el control de la necrosis pancreática infecciosa. Siguiendo con esta estrategia se evaluó una serie de compuestos antivirales y se seleccionó, en general, compuestos que tienen una actividad antiviral de amplio espectro para los virus RNA y en algunos casos, aquellos cuyas características permitieran dilucidar alguna interrogante específica respecto del ciclo replicativo del IPNV.

En la tabla 5 se observa un resumen del efecto de los compuestos antivirales sobre el virus IPN y sobre las células CHSE-214 (Jashés y col., 1996). Tres de los compuestos evaluados inhibieron eficientemente la formación de placas del IPNV: ribavirina, EICAR y pirazofurina. Para la ribavirina, análogo de la guanosina, se obtuvo una  $EC_{50}$  de 0,53  $\mu\text{g/ml}$ , similar a lo anteriormente descrito en células RTG-2 infectadas con el IPNV (Hudson y col., 1988). Se determinó que la concentración requerida para inhibir en un 50 % la formación de



TABLE 5  
EFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIVIRALES SOBRE EL VIRUS IPNV EN CELULAS CHSE-214

COMPUESTO ANTIVIRAL	ENSAYO DE INHIBICION DE LA FORMACION DE PLACAS EC <sup>a</sup> (µg/ml)	ENSAYOS CITOTOXICOS	
		VIABILIDAD CELULAR CC <sup>b</sup> (µg/ml)	SINTESIS DE DNA CELULAR IC <sup>c</sup> (µg/ml)
Ribavirina	0,53 ± 0,14	100	0,49 ± 0,11
EICAR	0,014 ± 0,008	50	0,86 ± 0,16
Pirazofurina	0,56 ± 0,1	>50	>50
5'-Noraristeromicina	N.I.	N.D.	N.D.
6'-β-Fluoroaristeromicina	N.I.	N.D.	N.D.
3-Deazaneplanocina A	N.I.	N.D.	N.D.
Foscarnet	N.I.	N.D.	N.D.
Brelaldina A	N.I.	N.D.	N.D.
Carbenoxolona de sodio	N.I.	N.D.	N.D.
Polisacáridos sulfatados de <i>D. antarctica</i>	30 % de inhibición	>400	N.D.
Polisacáridos sulfatados de <i>D. menziessii</i>	N.I.	N.D.	N.D.
F-11folmol	N.I.	N.D.	N.D.

<sup>a</sup>Concentración del antiviral requerida para inhibir la formación de placas del IPNV en un 50%. Los valores son el promedio ± la desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados por duplicado.

<sup>b</sup>Concentración del antiviral requerida para reducir la viabilidad celular en un 50%. Se obtuvo el mismo valor en los 3 experimentos independientes realizados por triplicado

<sup>c</sup>Concentración del antiviral requerida para reducir la incorporación del <sup>3</sup>H]imidina a material ácido insoluble en un 50%. Los valores son el promedio ± la desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados por triplicado

N.I.: No hubo inhibición; N.D.: No determinado

placas del IPNV es aproximadamente 40 veces menor para el EICAR que para la ribavirina, el EICAR resultó un inhibidor del IPNV considerablemente más potente que la ribavirina lo concuerda con lo descrito para otros virus (De Clercq y col., 1991). Para el EICAR se obtuvo una  $EC_{50}$  de  $0,014 \mu\text{g/ml}$  ( $0,05 \mu\text{M}$ ) aproximadamente 15 a 300 veces menor que la  $EC_{50}$  descrita para este compuesto con otros virus RNA, la que fluctúa alrededor de 0,2 y  $4 \mu\text{g/ml}$  (De Clercq y col., 1991). Los resultados que se obtuvieron respecto de la citotoxicidad de estos compuestos sobre las células CHSE-214 fueron muy interesantes. En el caso de la ribavirina y el EICAR se determinó que la concentración requerida para reducir la viabilidad celular en un 50 % ( $CC_{50}$ ) es bastante superior que la inhibitoria ( $EC_{50}$ ); aproximadamente 200 veces para ribavirina y 3.500 veces para EICAR. Sin embargo cuando se evaluó la citotoxicidad como el efecto sobre la síntesis de DNA celular, en que las células se mantuvieron en crecimiento activo, se observó diferencias importantes entre ambos compuestos; para ribavirina la concentración que afectó el crecimiento celular ( $IC_{50}$ ) resultó de la misma magnitud que la requerida para inhibir el IPNV ( $EC_{50}$ ), lo que estaría de acuerdo con resultados publicados previamente, donde se determinó que la concentración de ribavirina requerida para reducir los títulos del IPNV en células CHSE-214 también afectaba la síntesis de DNA celular (Migus y Dobos, 1980). En cambio, para el EICAR la  $IC_{50}$  correspondió a  $0,86 \mu\text{g/ml}$ , aproximadamente 60 veces mayor que la  $EC_{50}$ , concentración que se encuentra en el rango de la  $IC_{50}$  descrita para el EICAR en una variedad de líneas celulares, entre 0,2 y  $0,9 \mu\text{g/ml}$  (De Clercq y col., 1991). Esta alta selectividad es una señal del futuro promisorio de EICAR como antiviral de uso terapéutico en peces.

Otro compuesto que resultó inhibir eficientemente la formación de placas del IPNV

fue la pirazofurina, un inhibidor de la OMP descarboxilasa, el cual además no tuvo efecto sobre la viabilidad celular incluso a concentraciones de 50  $\mu\text{g/ml}$  y tampoco se afectó la síntesis de DNA celular a concentraciones 100 veces mayores que la  $\text{EC}_{50}$ . Aparentemente, el IPNV se comporta frente a este compuesto de modo similar al virus respiratorio sincicial, influenza A, B, C y sarampión, en los que la actividad antiviral supera tanto en potencia como en selectividad a varios compuestos antivirales, incluyendo la ribavirina (Hosoya y col., 1985; De Clercq, 1993).

Los compuestos inhibidores de la S-adenosilhomocisteína hidrolasa no tuvieron efecto sobre la replicación del IPNV en las diferentes condiciones ensayadas. Ya que la actividad antiviral de estos compuestos se traduce en la inhibición de la formación del 5' cap del RNA mensajero viral, estos resultados confirman que los mensajeros del IPNV carecen de una estructura cap, tal como se sugirió previamente a partir de los estudios *in vitro* destinados a evaluar el efecto de SAM sobre la transcripción del IPNV (Mertens y col., 1982) y aquellos realizados para identificar una actividad guaniltransferasa (Dobos, 1993).

La brefeldina A (BFA) resultó ser citotóxica en las condiciones del ensayo de inhibición de la formación de placas, lo que impidió determinar mediante este ensayo si inhibía o no la replicación del IPNV. Por este motivo se evaluó el efecto de la BFA sobre la síntesis del RNA genómico viral en células CHSE-214, en las condiciones experimentales de estos ensayos no se observó alteración de la monocapa celular en presencia de BFA, y se determinó que concentraciones superiores a los 2  $\mu\text{g/ml}$  de BFA inhiben la replicación del RNA viral. Esto sugiere que el ciclo replicativo del IPNV depende de la integridad de alguna estructura de membrana celular en una etapa posterior a la entrada del virus, para lo cual

deberá comprobarse que el efecto de la BFA sobre las células CHSE-214 corresponde al descrito en otras líneas celulares (Pelham, 1991). Estos resultados son muy interesantes y estarían de acuerdo con lo observado al utilizar agentes lisosomotrópicos como el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para estudiar la penetración viral, en estos experimentos la replicación del IPNV se inhibió no sólo al bloquear el ingreso del virus a la célula, sino también cuando se agregó el compuesto una vez que el virus ya había ingresado a la célula (Farias y col., 1988). Un efecto similar se ha descrito en poliovirus, donde la BFA inhibe la replicación viral ya que afecta la integridad de vesículas de membranas que se requieren para la replicación del RNA (Irurzun y col., 1992; Maynell y col., 1992). En función de nuestros resultados se evaluó el efecto de la carbenoxolona de sodio (CBX), un triterpeno utilizado en terapia antiviral cuyo efecto es similar al de la BFA, sin embargo este compuesto no inhibió la formación de placas del IPNV en el rango de concentración ensayado. No se pudo probar concentraciones mayores de CBX, como las que se requieren para inhibir la replicación de otros virus (Dargan y Subak-Sharpe, 1992), pues el compuesto resultó citotóxico a concentraciones superiores a 300  $\mu\text{g/ml}$ . En este contexto sería interesante evaluar la ciclooxolona de sodio (CCX), un compuesto similar a la CBX que posee mayor potencia antiviral y menor citotoxicidad (Dargan y Subak-Sharpe, 1992).

Los resultados obtenidos con los polisacáridos sulfatados extraídos a partir de algas chilenas concuerdan con lo esperado, ya que estas sustancias polianiónicas inhiben preferentemente la entrada a la célula de los virus que tienen envoltura porque interactúan con proteínas de la superficie viral cargadas positivamente involucradas en el reconocimiento del receptor celular. La inhibición de un 30 % de la formación de placas del IPNV que se

observó con los polisacáridos sulfatados de *D. antarctica* se obtuvo sólo al incubar las células con el compuesto en presencia de DMSO o al usar un hidrolizado parcial de estos polisacáridos, lo sugiere que la inhibición ocurre por un efecto intracelular. Los resultados obtenidos al evaluar este compuesto mediante el ensayo de transcripción *in vitro* apoyan este planteamiento y sugieren que el efecto observado en cultivo celular es consecuencia, probablemente, del efecto sobre la RNA polimerasa viral (Matsuhira y col., 1996) como se ha descrito para el HIV (Neushul, 1990).

A partir de estos resultados dos compuestos se perfilan como buenos candidatos para ser evaluados *in vivo*: el EICAR y la pirazofurina, ya que ambos compuestos presentaron una alta selectividad, interrumpiendo el ciclo replicativo viral sin afectar significativamente la célula huésped.

Un aporte interesante de esta tesis fue el desarrollo de los ensayos para evaluar el efecto del antiviral *in vivo*, en los cuales se demostró la efectividad del tratamiento con EICAR frente a la infección del IPNV. Los resultados obtenidos muestran claramente que el tratamiento con EICAR protege a los peces de la muerte por IPNV y además se observa que existe correlación entre la protección y la concentración de EICAR; a la menor concentración del antiviral (0,2 µg/ml) la muerte acumulada en los 12 días correspondió sólo a un 12,5 %, respecto de un 50 % de mortalidad observada en el grupo no tratado, y a la mayor concentración ensayada (1 µg/ml) no hubo mortalidad. Estos resultados difieren considerablemente respecto de los obtenidos anteriormente en un ensayo *in vivo* para el IPNV, donde se evaluó el efecto de la ribavirina sobre truchas arcoiris infectadas con IPNV y sin embargo no se observó una disminución de la mortalidad al administrar por inmersión

dosis únicas de ribavirina entre 5 y 400  $\mu\text{g/ml}$  (Savan y Dobos, 1980). En relación al tratamiento antiviral que se aplicó en nuestro estudio es interesante destacar que éste consistió solamente en la inmersión de los peces en una solución de EICAR por 2 horas diariamente, y aún en estas condiciones el resultado que se obtuvo es mejor al descrito en otro estudio realizado con EICAR *in vivo*, donde se evaluó el efecto de este antiviral sobre la infección del virus vacuna en ratones, y se observó protección al administrarles en forma intraperitoneal una dosis diaria de 10 a 25 mg de EICAR por kilo de peso (De Clercq y col., 1991). Esto tiene gran importancia desde el punto de vista práctico, ya que el ideal como terapia en el caso de los peces en cultivo es un tratamiento en que el antiviral se administre por inmersión o junto con el alimento. Nuestros resultados son muy alentadores y será importante realizar estudios para evaluar si el tratamiento es efectivo cuando el antiviral se aplica una vez que aparecen los signos de la enfermedad, estudiar la duración del efecto del antiviral es decir analizar si la infección recrudece cuando se retira el antiviral, y determinar si el tratamiento con EICAR logra erradicar el virus en los peces tratados, o si estos se convierten en portadores del IPNV. También estudios para evaluar si el EICAR tiene algún efecto negativo en los peces, principalmente establecer si afecta su crecimiento. Otro aspecto interesante de destacar respecto de los estudios *in vivo* es el hecho que las condiciones en que se realizó la infección viral fueron óptimas, la enfermedad desarrollada en los peces presentó las características descritas en la literatura y en la práctica al cuarto día de la infección experimental aparecieron los primeros signos de la enfermedad y al quinto día se produjeron los primeros casos de muerte.

En relación al efecto del EICAR sobre el IPNV observado en esta tesis, tanto en el

cultivo celular como en la infección experimental, es esperable en base a lo descrito en la literatura que éste corresponda a la inhibición de la transcripción y la replicación del RNA viral. A pesar que no se ha establecido aún el mecanismo antiviral del EICAR se ha propuesto que sería similar al de la ribavirina, cuyo efecto sobre el virus ocurre principalmente a consecuencia de la disminución del "pool" de GTP intracelular. Esta relación se basa en el estudio realizado por De Clercq (De Clercq y col., 1991) donde se evaluó la capacidad antiviral del EICAR y el efecto de nucleósidos sobre la inhibición viral a través de ensayos de inhibición de la formación de placas, y también en el estudio realizado por Balzarini (Balzarini y col., 1993) donde se analizó el efecto del EICAR sobre células tumorales, en que se evaluó a través de estudios bioquímicos su efecto sobre la enzima blanco de esta inhibición (IMP deshidrogenasa) en cultivo celular e *in vitro*. Por lo tanto, ya que uno de los objetivos de esta tesis era utilizar el EICAR para estudiar la replicación del RNA del IPNV fue necesario en primer lugar determinar si el compuesto efectivamente afectaba la síntesis del RNA viral y conocer algunas características de la inhibición. Con este fin se estableció previamente, en nuestras condiciones experimentales, la cinética de la síntesis de los polipéptidos y el RNA viral en las células CHSE-214. La síntesis de los polipéptidos del IPNV se estableció principalmente en función de la detección de VP1 y de VP3 y ya que la síntesis de los polipéptidos del IPNV es sincrónica, VP2, VP3 y VP4 se sintetizan a partir del procesamiento de una poliproteína, se asume la presencia de los polipéptidos virales que no se detectaron claramente en las condiciones del ensayo. Se observó la aparición de estos polipéptidos virales a partir de las 6 a las 8 hpi, lo que no difiere significativamente de lo descrito anteriormente en la línea celular RTG-2 (células de

gónadas de trucha arcoiris), donde se detectaron entre las 5 y las 6 hpi (Dobos, 1977). En relación a la síntesis de RNA genómico, se detectó la presencia de ambos segmentos de RNA entre las 8 y las 10 hpi, coincidiendo también con lo descrito previamente en células CHSE-214 (Somogyi y Dobos, 1980). Sin embargo, en las condiciones en que se realizó los experimentos de esta tesis, tanto los destinados a establecer la síntesis de macromoléculas así como en el estudio con el antiviral, se logró detectar los mensajeros virales solamente a las 10 hpi y mediante la técnica de Northern. Debido a que el genoma del IPNV es RNA de doble hebra no se pudo usar la técnica de PCR para amplificar los mensajeros virales sintetizados durante la infección. Ya que nuestros resultados concuerdan con lo descrito previamente para la síntesis de las macromoléculas del IPNV es posible suponer que la síntesis de los mensajeros del IPNV comenzaría alrededor de las 3 y las 4 hpi como se describió en el trabajo de Somogyi (Somogyi y Dobos, 1980). En este trabajo se logró detectar el RNA mensajero ya que se utilizó un número elevado de células, a diferencia de nuestros experimentos, y además como inóculo se empleó una cepa de IPNV denominada Jasper. La ventaja de utilizar esta cepa es que el ciclo infeccioso tiene las mismas características que al usar la cepa VR-299 pero se obtiene una mayor producción de progenie viral. Posteriormente, una vez establecida la síntesis de las macromoléculas virales en nuestras condiciones de trabajo, se realizaron experimentos para determinar el efecto del EICAR sobre la síntesis de RNA viral, sin embargo como no se pudo medir directamente la síntesis de RNA mensajero el efecto del antiviral sobre la transcripción se evaluó a través de la síntesis de los polipéptidos virales, como una manera de medir la presencia de transcritos virales. Esto fue posible ya que el EICAR no afecta la síntesis de proteínas de las células



CHSE-214 en las concentraciones usadas en este estudio, 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . Mas aún, se estableció que en las células en crecimiento activo la síntesis de proteínas comienza a afectarse a una concentración de EICAR de 5  $\mu\text{g/ml}$ , es decir concentraciones 10 veces superior a la utilizada en nuestros ensayos. Al incubar las células con 5  $\mu\text{g/ml}$  de EICAR durante 19 horas se determinó que la síntesis de proteínas disminuía en un 10 %, lo que estaría de acuerdo con lo descrito en otras líneas celulares (De Clercq y col., 1991). En el estudio con el antiviral se determinó que el EICAR inhibe la síntesis de RNA genómico y mensajero del IPNV y además esta inhibición es dependiente de la concentración y del tiempo al que se adiciona el antiviral, en relación al momento en que se inicia la síntesis de mensajero y RNA genómico (figuras 15 a 18). Los resultados que se obtuvieron al agregar EICAR a diferentes tiempos de la infección (figura 18) dejaron en evidencia que este compuesto afecta una etapa previa a la síntesis de los polipéptidos virales (6 a 8 hpi), ya que se observó que la mayor inhibición de los polipéptidos virales se produce cuando el antiviral se agregó al finalizar la adsorción viral (0 hpi) o previo a la infección (-3 hpi), es decir horas previo al momento en que se inicia la transcripción viral (3 a 4 hpi). Por otra parte, se obtuvo un resultado similar con respecto del efecto sobre la síntesis del RNA genómico, ya que se observó que para inhibir su síntesis también se debe agregar el antiviral varias horas previo al momento en que se inicia la replicación del RNA (figura 17). Al agregar el antiviral a las 7 hpi (carril 4) no se inhibió la síntesis de RNA genómico, la que comienza después de las 8 hpi. A pesar que no se ha descrito en la literatura un estudio del metabolismo del EICAR al ingresar a la célula, se ha observado que este compuesto se comporta en forma similar a la ribavirina (Balzarini y col., 1993; comunicación personal De Clercq, E.), la que según lo descrito es rápidamente

metabolizada a la forma fosforilada; mono-, di- y trifosfato (Zimmerman y Deepröse, 1978; Stridh, 1983), lo que suponemos también ocurriría con EICAR. Nuestros resultados sugieren que la inhibición observada sobre la replicación del RNA y también sobre la transcripción viral no es consecuencia de un efecto del EICAR directamente sobre las macromoléculas involucradas en la síntesis del RNA viral. Sin embargo ya que en estos ensayos se utilizó una concentración de 0,5 µg/ml (1,8 µM) de EICAR no se puede descartar que a una mayor concentración el EICAR afecte a la RNA polimerasa viral, como se ha descrito en el caso del virus influenza (Wray y col., 1995; Gilbert y Vernon, 1985). En relación a esto sería interesante establecer si el EICAR afecta la transcripción del IPNV en el ensayo de transcripción *in vitro*, lo que no se pudo determinar ya que no contamos con el derivado trifosforilado del compuesto. Posteriormente al estudiar el efecto de nucleósidos sobre la inhibición producida por el EICAR en la síntesis de RNA viral se determinó que concentraciones de 5 a 50 µg/ml de guanosina revierten la inhibición viral y en cambio la inhibición no se afectó al agregar adenosina o citosina en concentraciones de 10 a 100 µg/ml. Estos resultados sugieren que el mecanismo por el cual el EICAR inhibe el IPNV se relaciona con la vía sintética de los nucleótidos de guanina y en función de los estudios con EICAR realizados por Balzarini (Balzarini y col., 1993) es probable que también en este caso el EICAR cause una reducción del "pool" de GTP intracelular, como consecuencia de la inhibición de la IMP deshidrogenasa. Por lo tanto la reversión de la inhibición viral observada al agregar guanosina se debería a la síntesis de los nucleótidos de guanina, necesarios para la transcripción y replicación del RNA viral, a partir de este nucleósido. Para confirmar este mecanismo habría que determinar los niveles intracelulares de los nucleótidos de guanina e

IMP en las células CHSE-214, y también establecer si en presencia de EICAR se inhibe la actividad de la IMP deshidrogenasa. Con respecto al mecanismo por el cual se sintetizaría los nucleótidos de guanina a partir de la guanosina, es probable que la síntesis ocurra a través de la vía de rescate o vía alternativa. De tal modo que la guanosina primero debe ser degradada a guanina a través de una actividad nucleósido fosforilasa, y luego se sintetizaría guanosina monofosfato mediante la actividad de la enzima hipoxantina/guanina fosforibosiltransferasa (Lehninger y col., 1993). Sin embargo otra posibilidad es que en las células exista una actividad guanosina quinasa similar a la de *E. coli* (Mori y col., 1995) que monofosforile a la guanosina directamente, del mismo modo como ocurre con la ribavirina y el EICAR, ya que ambos según lo descrito son monofosforilados principalmente por una actividad adenosina quinasa celular (Zimmerman y Deepröse, 1978; Balzarini y col., 1993).

A partir de nuestros resultados es evidente que la inhibición del EICAR sobre el IPNV tiene relación con los nucleótidos de guanina, independiente si la inhibición por EICAR ocurre solamente debido a una menor disponibilidad de estos nucleótidos o si el EICAR también actúa directamente sobre la polimerasa viral. En función de estos resultados es posible que la alta sensibilidad del IPNV al EICAR observada en el ensayo de inhibición de la formación de placas, donde se obtuvo una  $EC_{50}$  15 a 300 veces menor que la  $EC_{50}$  descrita para otros virus, se relacione con la importancia que tiene el GTP en el inicio de la síntesis de RNA del IPNV. Según lo descrito a partir de ensayos *in vitro* durante la síntesis de RNA la proteína VPg actuaría como un partidor y uniría GMP en forma secuencial y dependiente del templado dando origen así a complejos VP1pGpG (Dobos, 1993; Dobos, 1995). Al respecto, además se ha descrito que el extremo 5' del RNA genómico está unido

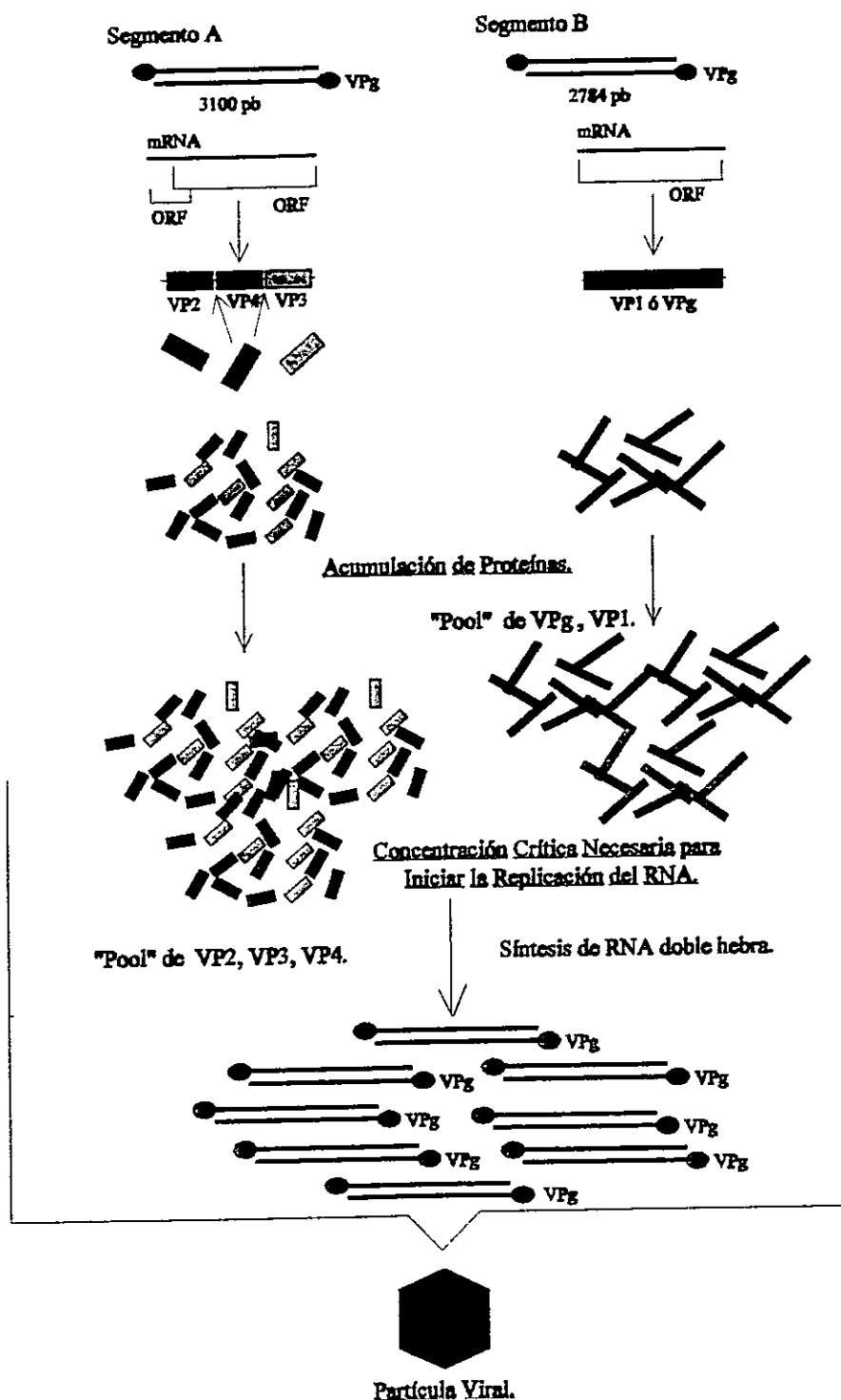
a VPg a través de un GMP (Calvert y col., 1991) y que el extremo 5' de las hebras positiva y negativa comienza con dos y cuatro guaninas respectivamente (Duncan y col., 1991).

No existen antecedentes respecto del mecanismo por el cual el RNA del IPNV se replica y estamos lejos de contar con un ensayo *in vitro* que permita estudiar la replicación del RNA de este virus. Por este motivo pese a las dificultades que tiene el estudio del IPNV en cultivo celular, como se comprobó en esta tesis, principalmente porque la producción viral es muy baja y además ya que el virus no inhibe la síntesis de las macromoléculas celulares, es importante usar el cultivo celular para establecer los aspectos básicos de los requerimientos de la replicación del IPNV. Esto probablemente ayudará a implementar en el futuro los ensayos *in vitro*. Con este propósito se diseñó un ensayo mediante el uso de EICAR y guanosina que permitía estudiar el inicio de la replicación del RNA viral, inicialmente con el fin de establecer el requerimiento de los mensajeros como templado de la síntesis de RNA de doble hebra y que finalmente se utilizó para analizar el requerimiento de los polipéptidos virales en la replicación del RNA. El análisis de los resultados de estos ensayos, figura 23 y 24, sugería que había una relación entre el inicio de la síntesis de RNA genómico (figura 24, carriles 13 y 14) y el requerimiento de una nueva síntesis de los polipéptidos virales (figura 23, carril 8) aún cuando, según lo observado, en la célula había una síntesis significativa de los polipéptidos del IPNV (principalmente a través de VP3 y VP4) (figura 23, carriles 2 al 5). Mediante la utilización de cicloheximida (figura 25 y 26) se demostró que en el ensayo anterior efectivamente se requería de nueva síntesis de proteínas para que se iniciara la replicación del RNA. Sin embargo esta necesidad de nueva síntesis de proteínas no parece corresponder solamente al requerimiento de proteínas recién

sintetizadas, ya que en los controles en ausencia de guanosina se detectó la síntesis de polipéptidos virales. Además, no se detectó un aumento en la síntesis de polipéptidos celulares o la aparición de alguna proteína celular que explicara este requerimiento. Los resultados indican que al agregar EICAR a las 1,5 hpi se inhibió la replicación del RNA tal como se esperaba, debido probablemente a la alteración en la disponibilidad de los nucleótidos de guanina necesarios para la síntesis de RNA, sin embargo además la síntesis de los polipéptidos virales si bien era significativa no era la necesaria para iniciar la replicación del RNA. Esto sugiere que probablemente durante el ciclo infeccioso del IPNV se requiere de una síntesis continua de los polipéptidos virales para que ocurra la replicación del RNA viral, similar a lo que se observa en otros virus como los Rabdovirus (Barnerjee, 1987). Una posibilidad es que este requerimiento se relacione con la necesidad de una determinada concentración del polipéptido VP1, ya que según lo descrito VP1 cumpliría una doble función en la síntesis del RNA; como la RNA polimerasa viral y también como partidor el que permanece unido a ambas hebras de los segmentos de RNA genómico (VPg). En este último caso habría un requerimiento estequiométrico de VP1 respecto de cada hebra de RNA genómico. Por otra parte en estudios realizados recientemente en nuestro laboratorio con el propósito de caracterizar las partículas del IPNV durante la infección en cultivo celular, se determinó que existe una estrecha relación entre el momento en que aparece la partícula viral y el momento en que se detecta la aparición del RNA genómico. Durante el ciclo infeccioso la primera partícula viral (virión) se detectó junto con la aparición del RNA genómico, si se atrasa o adelanta el momento en que aparece el RNA genómico también se atrasa o adelanta la aparición de la partícula viral, sugiriendo que

ambos son eventos prácticamente simultáneos. Al analizar esta partícula se observó que contenía todas las proteínas virales y también RNA genómico, sin embargo no era infectiva, 2 a 3 horas después se puede detectar además una segunda partícula similar a la primera, pero infectiva (Villanueva, 1996). Si se considera estos antecedentes en relación con los resultados obtenidos en esta tesis es posible sugerir que el requerimiento de la síntesis de proteínas para iniciar la replicación del RNA podría relacionarse con la acumulación de todos los polipéptidos virales y no solamente de VP1 como se discutió anteriormente, lo que explicaría que la formación de la partícula viral sea concomitante con la síntesis del RNA genómico. También se ha observado en otros virus, como el poliovirus, una unión estrecha entre la síntesis y el empaque del RNA genómico. Se ha postulado que durante la morfogénesis de poliovirus ocurriría la formación de una procápside a la que luego se incorporaría el RNA genómico y sufriría maduraciones que darían origen a la partícula infectiva (Fields y Knipe, 1990; Hellen y Wimmer, 1992).

En función de los resultados obtenidos y de los antecedentes discutidos, es posible plantear un modelo como hipótesis de trabajo para futuros estudios relacionados con la replicación del RNA y la morfogénesis del IPNV, este se esquematiza en la figura 27. En él se plantea que el inicio de la replicación del RNA del IPNV dependería de la disponibilidad de una concentración crítica de VP1 (VPg) y de los otros polipéptidos estructurales VP2, VP3 y VP4, de tal manera que previo (formación de procápside) o prácticamente simultáneo a la interacción entre VPg y el RNA para iniciar la replicación del RNA se originaría la cápside proteica, obteniendo de este modo RNA de doble hebra y las partículas virales (provirión). En este esquema posiblemente VPg tendría además un rol regulador de la



**FIGURA 27**  
**ESQUEMA PROPUESTO PARA EL INICIO DE LA REPLICACION DEL RNA DEL VIRUS IPN.**

síntesis de RNA/ empaque viral, basándonos en que se ha propuesto que las proteínas VPgs tienen un rol importante no sólo como partidores en la síntesis del genoma viral, sino también en la morfogénesis (Wimmer, 1982; Salas, 1991). En función de esta proposición será importante en el futuro comprobar si el requerimiento de proteínas observado corresponde a la necesidad de una concentración crítica de los polipéptidos virales y establecer su relación con VPg y con el resto de los polipéptidos virales. A corto plazo analizar la síntesis de las partículas virales en los ensayos con EICAR/guanosina, lo que permitirá determinar si la necesidad del aumento de la síntesis de los polipéptidos virales para iniciar la replicación del RNA tiene o no relación con la formación de la partícula viral. Además utilizar estos ensayos para determinar si en ausencia de RNA genómico se forma una partícula viral vacía (sin genoma) y analizar durante el ciclo infectivo la existencia de procápsides .

Desde los inicios de los estudios el IPNV parecía como un miembro más de la familia *Reoviridae* principalmente en base a la naturaleza de su genoma, sin embargo en esta tesis se planteó como hipótesis que la presencia de una proteína VPg unida al genoma y la síntesis de una poliproteína sugieren que el IPNV tendría mecanismos de replicación del RNA y morfogénesis radicalmente diferentes a los de la familia *Reoviridae*. A diferencia de lo observado para el IPNV, en la replicación del rotavirus miembro de la familia *Reoviridae* no se observa una asociación temporal entre la replicación del RNA genómico viral y la aparición del virión, la síntesis de RNA de doble hebra ocurre en el interior de las subpartículas virales precore y core viral, luego se origina el virus de cubierta simple el que al parecer amplificaría la transcripción y la síntesis de polipéptidos virales para finalmente dar



origen a la partícula viral (Helmberger-Jones y Patton, 1986; Gallegos y Patton, 1989). Se demostró que la replicación del RNA de rotavirus depende solamente de la síntesis de algunos polipéptidos virales, tanto estructurales como no estructurales, que forman la subpartículas viral "precore" y "core" con actividad replicativa, los que se sintetizan tempranamente en el ciclo infectivo. Si se agrega cicloheximida a diferentes tiempos de la infección después que estos polipéptidos se sintetizan no se afecta la replicación del RNA viral, aún cuando se inhibe completamente la síntesis de los polipéptidos virales (Sandino y col., 1988).

A través del análisis de los resultados de esta tesis se ha sugerido similitud en aspectos del ciclo infectivo entre IPNV y poliovirus, lo que estaría totalmente de acuerdo además con lo propuesto por Wimmer (Wimmer, 1982), quién postula que los virus que tienen VPg deben tener estrategias de replicación común e incluso propone para polio y adenovirus un ancestro común. Es interesante destacar que si bien el IPNV y polio difieren en el genoma viral, ya que poliovirus tiene como genoma RNA de simple hebra +, ambos comparten además de VPg la síntesis de polipéptidos virales a través del procesamiento de una poliproteína lo que implica la presencia de proteinasas virales las que tienen un rol fundamental no sólo en la síntesis de los polipéptidos virales a partir de una poliproteína, sino también un rol en el ensamblaje y la maduración viral (Hellen y col., 1989; Hellen y Wimmer, 1992).

En resumen, a partir de los resultados de esta tesis se sugiere el requerimiento de la síntesis continua de los polipéptidos virales, probablemente para la acumulación de los polipéptidos virales, lo que junto a otras evidencias como la aparición concomitante del RNA

genómico y la partícula viral apunta a que puede existir una regulación entre el armado viral y el inicio de la replicación del RNA. Un aspecto importante de destacar es que a partir de esta tesis se plantea una serie de interrogantes respecto de la replicación viral en las que se deberá trabajar a futuro. Finalmente entre las proyecciones de este trabajo es importante destacar el éxito de los ensayos realizado *in vivo* con el EICAR, los que aproximan al establecimiento de una terapia antiviral para el control de la necrosis pancreática infecciosa y abre el camino para el estudio de otros antivirales con este mismo propósito.

## CONCLUSIONES

- A partir de los ensayos de inhibición de la formación de placas del IPNV se determinó que los compuestos antivirales ribavirina, EICAR y pirazofurina inhiben eficientemente la replicación del virus IPN.
- En el caso de EICAR y pirazofurina se determinó que la concentración citotóxica medida como el efecto sobre la viabilidad celular es bastante superior que la concentración que inhibe al virus IPN; aproximadamente 3.500 veces en el caso de EICAR y al menos 100 veces para pirazofurina. Mas aún, la concentración que afecta la síntesis de DNA celular es 60 veces mayor que la inhibitoria para el EICAR y 100 veces mayor para la pirazofurina. Por lo tanto, ambos compuestos surgen como buenos candidatos para ser evaluados *in vivo* con fines terapéuticos.
- Los resultados de los ensayos *in vivo* en que se evaluó el efecto del EICAR sobre la infección experimental del virus IPN en alevines de trucha arcoiris, muestran que el EICAR protege eficientemente a los peces de la muerte causada por el IPNV.

- Los resultados indican que el EICAR inhibe la síntesis de RNA tanto genómico como mensajero del IPNV y sugieren que el efecto corresponde a una alteración en la disponibilidad de precursores para la síntesis de GTP intracelular.
- Utilizando EICAR/guanosina se diseñó un ensayo que permitió estudiar el inicio de la replicación del RNA viral. Los resultados de estos ensayos sugieren que se requiere de una nueva síntesis de polipéptidos virales para iniciar la replicación del RNA, aún cuando en la célula había síntesis significativa de estos polipéptidos. Este requerimiento se comprobó mediante el uso de cicloheximida.
- A partir de estos resultados se sugiere que para iniciar la replicación del RNA del virus IPN se requiere de la síntesis continua de los polipéptidos virales, probablemente para alcanzar una concentración crítica de estos polipéptidos.

## BIBLIOGRAFIA

- Baba, M., Pauwels, R., Balzarini, J., Arnout, J., Desmyter, J. and De Clercq, E. (1988) Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 6132-6136.
- Balzarini, J., Karlsson, A., Wang, L., Bohman, C., Horská, K., Votruba, I., Fridland, A., Van Aerschot, A., Herdewijn, P. and De Clercq, E. (1993) EICAR(5-Ethynyl-1- $\beta$ -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide). A novel potent inhibitor of inosinate dehydrogenase activity and guanylate biosynthesis. J. Biol. Chem. **268**, 24591-24598.
- Banerjee, A. (1987) Transcription and replication of rhabdoviruses. Microbiol. Rev. **51**, 66-87.
- Barrie, R.J., Mason, C.L., and Leong, J.C. (1992) Identification of a conserved antigenic domain in the major capsid protein of infectious pancreatic necrosis virus. NOAA Technical Reports NHFS, **111**, 15-19.
- Bernard, J. (1980) Drosophila X virus RNA polymerase: Tentative model for *in vitro* replication of the double-stranded virion RNA. J. Virol. **33**, 717-723.
- Calvert, J.G., Nagy, E., Soler, M. and Dobos, P. (1991) Characterization of the VPg-dsRNA linkage of infectious pancreatic necrosis virus. J. Gen. Virol. **72**, 2563-2567.
- Chang, N., MacDonald, R.D. and Yamamoto, T. (1978) Purification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and comparison of polipeptide composition of different isolates. Can. J. Microbiol. **24**, 19-27.
- Cohen, J., Poinard, A. and Scherrer, R. (1973) Physico-chemical and morphological features of infectious pancreatic necrosis virus. J. Gen. Virol. **21**, 485-498.
- Couve, E., Kiss, J. and Kuznar, J. (1992) Infectious pancreatic necrosis virus internalization and endocytic organelles in CHSE-214 cells. Cell Biol. Intern. Rep. **16**, 899-906.
- Crumpacker, C.S. (1992) Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. Am. J. Med. **92** (suppl 2A), 3S-7S.

Dargan, D.J. and Subak-Sharpe, J.H. (1985) The effect of triterpenoid compounds on uninfected and herpes simplex virus-infected cells in culture. I. Effect on cell growth, virus particles and virus replication. *J. Gen. Virol.* **66**, 1771-1784.

Dargan, D.J. and Subak-Sharpe, J.H. (1992) The antiviral activity of triterpenoid compounds. *Seminars in Virology* **3**, 31-40

Dargan, D.J., Galt, C.B. and Subak-Sharpe, J.H. (1992) The effect of cicloxolone sodium on the replication in cultured cells of adenovirus type 5, reovirus type 3, poliovirus type 1, two bunyaviruses and Semliki Forest virus. *J. Gen. Virol.* **73**, 407-411

De Clercq, E. (1985) Antiviral and antimetabolic activities of Neplanocins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**, 84-89.

De Clercq, E. (1993) Antiviral agents: Characteristic activity spectrum depending on the molecular target with which they interact. *Adv. Vir. Res.* **42**, 1-55.

De Clercq, E. and Cools, M. (1985) Antiviral potency of adenosine analogues: Correlation with inhibition of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129**, 306-311.

De Clercq, E., Cools, M., Balzarini, J., Marquez, V.E., Borchering, D.R. Borchardt, R.T., Drach, J.C., Kitaoka, S. and Konno, T. (1989) Broad-spectrum antiviral activities of neplanocin A, 3-deazaneplanocin A, and their 5'-nor derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1291-1297.

De Clercq, E., Cools, M., Balzarini, J., Snoeck, R., Andrei, G., Hosoya, M., Shigeta, S., Ueda, T., Minakawa, N. and Matsuda, A. (1991) Antiviral activities of 5-ethynyl-1- $\beta$ -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide and related compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 679-684.

Dixon, P.F. and Hill, B.J. (1983 ) Inactivation of infectious pancreatic necrosis virus for vaccine use. *J. Fish. Dis.* **6**, 399-409.

Dobos, P. (1977) Virus-specific protein synthesis in cell infected by infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* **21**, 242-258.

Dobos, P. (1993) *In vitro* guanylation of infectious pancreatic necrosis virus polypeptide VP1. *Virology* **193**, 403-413.

Dobos, P. (1995) Protein-primed RNA synthesis *in vitro* by the virion-associated RNA polymerase of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* **208**, 19-25.

- Dobos, P., Hill, B.J., Hallett, R., Kells, D.T.C., Becht, H. and Teninges, D. (1979) Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol.* **32**, 593-605.
- Dobos, P. and Roberts, T.E. (1983) The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus: a review. *Can. J. Microbiol.* **29**, 377-384.
- Dorson, M., Chevassus, B. and Torhy, C. (1991) Comparative susceptibility of three species of char and of rainbow trout x char triploid hybrids to several pathogenic salmonid viruses. *Dis. Aquat. Org.* **11**, 217-224.
- Duncan, R. and Dobos, P. (1986) The nucleotide sequence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) dsRNA segment A reveals one large ORF encoding a precursor polyprotein. *Nucl. Acids Res.* **14**, 5934.
- Duncan, R., Nagy, E., Krell, P.J. and Dobos, P. (1987) Synthesis of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions. *J. Virol.* **61**, 3655-3664.
- Duncan, R., Mason, C.L., Nagy, E. Leong, J. and Dobos, P. (1991) Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: A putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the gly-asp-asp motif. *Virology* **181**, 541-552.
- Estay, A., Farias, G., Soler, M. and Kuznar, J. (1990) Further analysis on the structural proteins of infectious pancreatic necrosis virus. *Virus Res.* **15**, 85-96.
- Farias, G., Navarrete, E., Kiss, J. and Kuznar, J. (1988). Effect of ammonium chloride on the multiplication of infectious pancreatic necrosis virus. *Arch. Virol.* **98**, 155-162.
- Gallegos, C. and Patton, J.T. (1989) Characterization of rotavirus replication intermediates: A model for the assembly of single-shelled particles. *Virology.* **172**, 001-010.
- Gilbert, B.E. and Knight, V. (1986) Biochemistry and clinical applications of ribavirin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**, 201-205.
- Hasobe, M. and Saneyoshi, M. (1985) On the approach to the viral chemotherapy against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) *in vitro* and *in vivo* on salmonid fishes. *Fish Pathol.* **20**, 343-351.
- Hasobe, M. and Saneyoshi, M. and Isono, K. (1985) Antiviral activity and its mechanism of guanine 7-N-oxide on DNA and RNA viruses derived from salmonid. *J. Antibiot.* **38**, 1581-1587.

- Havarstein, L.S., Kalland, K.H., Christie, K.E. and Endresen, C. (1990) Sequence of the large double-stranded RNA segment of the N1 strain of infectious pancreatic necrosis virus: a comparison with other *Birnaviridae*. *J. Gen. Virol.* **71**, 299-308.
- Hedrick, R.P., Fryer, J.L., Chen, S.N. and Kou, G.H. (1983) Characteristic of four birnaviruses isolated from fish in Taiwan. *Fish Pathol.* **18**, 91-97.
- Hedrick, R.P., Eaton, W.D., Fryer, J.L., Hah, Y.C., Park, J.W. and Hong, S.W. (1985) Biochemical and serological properties of birnaviruses isolated from fish in Korea. *Fish Pathol.* **20**, 463-468.
- Hellen, C.U.T. and Wimmer, E. (1992) The role of proteolytic processing in the morphogenesis of virus particles. *Experientia* **48**, 201-215.
- Hellen, C.U.T., Kräusslich, H-G. and Wimmer, E. (1989) Proteolytic processing of polyproteins in the replication of RNA viruses. *Biochemistry*, **28**, 9881-9890.
- Helmberger-Jones, M. and Patton, J.T. (1986) Characterization of subviral particles in cells infected with simian rotavirus SA11. *Virology* **155**, 655-665.
- Heppel, J., Berthiaume, L., Tarrab, E., Lecomte, J. and Arella, M. (1992) Evidence of genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus strains determined by restriction fragment profiles. *J. Gen. Virol.*, **73**, 2863-2870.
- Heppel, J., Esther, T., Berthiaume, L., Lecomte, J. and Arella, M. (1995) Characterization of the small open reading frame on genome segment A of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* **76**, 2091-2096.
- Hirsch, M.S. and Kaplan, J.C. (1990) Antiviral agents. *Virology*, second edition (edited by Fields, B.N. Knipe, D.M., et al.) Raven Press. New York. Capitulo 18, 441-467.
- Hsu, Y.L., Chen, B.S., and Wu, J.L. (1993) Demonstration of infectious pancreatic necrosis virus strain VR-299 in Japanese eel, *Anguilla Japonica*. *J. Fish Dis.* **19**, 25-33.
- Hudson, J.B., Graham, E. A. and Simpson, M.F. (1988) The efficacy of amantadine and other antiviral compounds against two salmonid virus *in vitro*. *Antivir. Res.* **9**, 379-385.
- Irurzun, A., Perez, L. and Carrasco, L. (1992) Involvement of membrane traffic in the replication of poliovirus genomes: Effects of brefeldin A. *Virology* **191**, 166-175.
- Jagadish, M.N., Station, V.J., Hudson, P.J. and Azad, A.A. (1988) Birnavirus precursor polyprotein is processed in *Escherichia coli* by its own virus-encoded polypeptide. *J. Virol.* **62**, 1084-1087.



- Jashés, M., Gonzalez, M., López-Lastra, M., De Clercq, E. and Sandino, A. (1996) Inhibitors of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) Antivir. Res. **29**, 309-312.
- Jofré, J. ( 1988 ) Aspectos generales de patología infecciosa. En : J. Espinosa de los Monteros, J. y Labarta, U. (ed) Patología en Acuicultura, Industrias gráficas, España, S.L., 1-36.
- Kusuda, R., Nishi, Y., Hosono, N., Suzuki, S. (1993) Serological comparison of birnaviruses isolated from several species of marine fish in south west Japan. Gyoby kenkyu **28**, 91-92.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685.
- Lannan, C.N., Winton, J.R. and Fryer, J.L. (1984) Fish cell lines: Establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. In vitro **20**, 671-676.
- Lawrence, W.R., Nagy, E., Duncan, R., Krell, P. and Dobos, P. (1989) Expression in *Escherichia coli* of the major outer capsid protein of infectious pancreatic necrosis virus. Gene **79**, 369-374.
- Lehninger, A., Nelson, D., and Cox, M. (1993). Principles of Biochemistry. Second Edition. Worth Publishers, Inc. páginas 715-733.
- MacDonald, R. and Yamamoto, T. (1977) The structure of infectious pancreatic necrosis virus RNA. J. Gen Virol. **34**, 235-247.
- MacDonald, R.D. and Dobos, P. (1981) Identification of the proteins encoded by each genome segment of infectious pancreatic necrosis virus. Virology **114**, 414-422.
- MacDonald, R.D., Moore, A.R. and Souter, B.W. (1983) Three new strains of infectious pancreatic necrosis virus isolated in Canada. Can. J. Microbiol. **29**, 137-141.
- Magyar, G. and Dobos, P. (1994) Evidence for the detection of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and the 17-kDa polypeptide in infected cells and of the NS protease in purified virus. Virology **204**, 580-589.
- Marsden, H.S. (1992) Seminars in Virology. Volumen 3, páginas 31-40.
- Matsuhiro, B., Zuñiga, E., Jashes, M. Guacucano, M. (1996) Sulfated polysaccharides from *Durvillaea antarctica*. Hydrobiologia **321**, 77-81.
- Maynell, L.A., Kirkegaard, K. and Klymkowsky, M.W. (1992) Inhibition of poliovirus RNA synthesis by brefeldin A. J. Virol. **66**, 1985-1994

- McAllister, P. E. (1988) Infecciones víricas de peces cultivados. En : J. Espinosa de los Monteros, J. y Labarta, U. (ed) Patología en Acuicultura, Industrias gráficas, España, S.L., 83-107.
- McAllister, P. E. and Owens, W.J. (1992) Recovery of infectious pancreatic necrosis virus from the faeces of wild piscivorous birds. *Aquaculture*. **106**, 227-232.
- McAllister, P. E. and Reyes, X. (1984) Infectious pancreatic necrosis virus: Isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, imported into Chile. *J. Fish Dis.* **7**, 319-322.
- Mertens, P.P.C., Jamieson, P.B. and Dobos, P. (1982) *In vitro* RNA synthesis by infectious pancreatic necrosis virus-associated RNA polymerase. *J.Gen. Virol.* **59**, 47-56.
- Mígus, D.O. and Dobos, P. (1980) Effect of ribavirin on the replication of infectious pancreatic necrosis virus in fish cell cultures. *J. Gen. Virol.* **47**, 47-57.
- Mori, H., Iida, A., Teshiba, S. and Fujio, T. (1995) Cloning of guanosine- inosine kinase gene of *Escherichia coli* and characterization of the purified gene product. *J. Bacteriol.* **177**, 4921-4926.
- Müller, H and Nitschke, R. (1987) The two segments of IBDV genome are circularized by a 90,000 Da protein. *Virology* **159**, 147-177.
- Neushul, M. (1990) Antiviral carbohydrates from marine red algae. *Hydrobiologia* **204/205**, 99-104.
- Novoa, B., Figueras, A., Puentes, C.F., Ledo, A. and Toranzo, A.E. (1993) Characterization of a birnavirus isolated from diseased turbot cultured in Spain. *Dis. Aquat. Org.* **15**, 163-169.
- Novoa, B., Toranzo, A.E., Dopazo, C.P., Barja, J.L. and Figueras, A. (1993) Isolation of IPN virus serotype VR-299 from turbot in Europe. *Dis. Aquat. Org.*, **17**, 61-65.
- Pelham, H.R.B. (1991) Multiple targets for brefeldin A. *Cell* **67**, 449-451.
- Persson, R.H. and Macdonald, R.D. (1982) Evidence that infectious pancreatic necrosis virus has a genome-linked protein. *J. Virol.* **44**, 437-443.
- Pilcher, K.S. and Fryer, J.L. (1980) The viral diseases of fish: A review through 1978. *CRC Critical Rev. Microbiol.* **7**, 287- 364.
- Salas, M. (1991) Protein-priming of DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 39-71.

- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Samil, D. M., Munro, A.L.S. (1989) The virology of teleosts. En: Roberts, R.J. (ed) *Fish Pathol.* 153-241.
- Sandino, A.M., Pizarro, J., Fernandez, J., Fellay, M.C. and Spencer, E. (1988) Involvement of structural and nonstructural polypeptides on rotavirus RNA synthesis. *Arch. Biol. Med. Exp.* 21, 381-192.
- Sanjuan, M.L., Yus, E., Simarro, I., Castro, J.M., Fernández, G. and Solana, A. (1993) The polypeptides of infectious pancreatic necrosis virus isolated from salmonid fish in Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 13, 150-153.
- Savan, M. and Dobos, P. (1980) Effect of virazole on rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson fry infected with infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.* 3, 437-440.
- Scholtissek, C. (1976) Inhibition of influenza RNA synthesis by virazole (ribavirin) *Arch. Virol.* 50, 349-352.
- Shigeta, S. Mori, S., Baba, M., Ito, M., Honzumi, K., Nakamura, K., Oshitani, H., Numazaki, Y., Matsuda, A., Obara, T., Shuto, S. and De Clercq. (1992) Antiviral activities of ribavirin, 5-ethynyl-1- $\beta$ -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide, and 6'-(R)-6'-C-methylneplanocin A against several ortho- and paramyxoviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 435-439.
- Somogyi, P. and Dobos, P. (1980) Virus-specific RNA synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* 33, 129-139.
- Spies, U., Müller, H. and Becht, H. (1987) Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Vir. Res.* 8, 127-140.
- Streeter, D.G., Witkowski, J.T., Khare, G.P. Sidwell, R.W., Bauer, R.J., Robins, R.K. and Simon, L.N. (1973) Mechanism of action of 1- $\beta$ -D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole), a new broad-spectrum antiviral agent. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70, 1174-1178.
- Stridh, S. (1983) Determination of ribonucleoside triphosphate pools in influenza A virus-infected MDCK cells. *Arch. Virol.* 77, 223-229.
- Stridh, S., Ekström, C. and Datema, R. (1989) Comparison of foscarnet and foscarnet esters as anti-influenza virus agents. *Chemotherapy* 35, 69-76.

Torres, R., Villarreal, L., Urzua, A., Delle Monache, F., Delle Monache, G. and Gacs-Baitz, E. (1994) Filifolinol, a rearranged geranyl aromatic derivate from the resinous exudate of *Heliotropium filifolium*. *Phytochemistry*. **36**, 249-250.

Villanueva, R. (1996). Tesis para optar al título de Bioquímico: Identificación, aislamiento y caracterización molecular de las partículas del virus de la necrosis pancreática infecciosa, IPNV, obtenidas durante el ciclo infectivo en células CHSE-214

Wimmer, E. (1982) Genome-linked proteins of viruses. *Cell* **28**, 199-201.

Wolf, K. (1988) Infectious pancreatic necrosis. En Comstock Publishing Associate (ed) *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*, Cornell University Press. 115-157.

Wray, S.K., Gilbert, B.E., Noall, M.W. and Knight, V. (1985) Mode of action of ribavirin: effect of nucleoside pool alterations on influenza virus ribonucleoprotein synthesis. *Antiviral Res.* **5**, 29-37.

Zimmerman, T.P. and Deepro, R.D. (1978) Metabolism of 5-amino-1- $\beta$ -D-Ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide and related five-membered heterocycles to 5'-triphosphates in human blood and L5178Y cells. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 709-716.