

## ALTERACION DE LAS ARN-POLIMERASAS DE NUCLEO DE CELULAS CEREBRALES EN RATONES INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA EEV

**María Emelina Teruel de López\***

*Instituto de Investigaciones Clínicas, Sección de Bioquímica. Apartado Postal 1151. Universidad del Zulia. Maracaibo 4001-A, Venezuela.*

### RESUMEN

La infección de ratones jóvenes (3-4 semanas de edad) con 100 DL<sub>50</sub> del virus de la Encefalitis Equina Venezolana, por vía intraperitoneal, produce una inhibición de las enzimas nucleares ARN-polimerasas dependientes de ADN, tipo I y II. La determinación enzimática efectuada en la fracción nuclear, en condiciones de baja fuerza iónica, demostró que las 2 enzimas tienen un patrón de sensibilidad diferente en las primeras 15 horas posteriores a la infección: la ARN-polimerasa tipo II presentó un 50% de inhibición contra solo un 25% de inhibición de la tipo I; sin embargo, a las 24 horas, esta diferencia desapareció por aumento en el nivel de inhibición de la última igualándose los valores de ambas enzimas en un 50% de inhibición. Estos valores se mantuvieron hasta las 48 horas después de la infección. Durante el período de determinaciones enzimáticas, ninguno de los animales del grupo infectado mostró signos clínicos de la enfermedad pero al cabo de 5 días, todos murieron con parálisis del tren posterior.

## INTRODUCCION

Se ha establecido, por estudios realizados a nivel de cultivos celulares infectados con diferentes tipos de virus (4, 11), que las ARN-polimerasas nucleares sufren una fuerte inhibición en la que resulta principalmente afectada la ARN-polimerasa tipo II. Estudios realizados por Koizumi y col (6) han demostrado, en cultivos celulares infectados con el virus de la Encefalitis Equina del Oeste, la síntesis de inhibidores de origen viral, cuyo nivel de acción es sobre los deoxinucleótidos que son utilizados para la síntesis del ADN celular.

A pesar de la gran cantidad de trabajos realizados en cultivos celulares referentes a los diversos elementos sintetizados durante una infección viral (5, 8, 12) es muy escasa la información proveniente de animales, por la dificultad que representa la identificación del material en estudio. En el caso del virus de la Encefalitis Equina Venezolana (EEV), Lust (11) reporta el efecto que la infección tiene sobre la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos en cerebro e hígado de ratones jóvenes y Bonilla y col (1, 2, 10) encuentran en cerebro de ratas infectadas con el mismo virus, ciertas alteraciones enzimáticas al cabo de 7 días de infección.

En vista de la existencia de muchos puntos todavía oscuros para aclarar el conjunto de eventos y mecanismos que se suceden en el animal infectado, se decidió estudiar en la fracción nuclear de tejido cerebral, las alteraciones que las ARN-polimerasas pueden experimentar como consecuencia de la infección viral, pues las evidencias acumuladas a nivel de cultivos celulares (4) sugieren que sean éstas las primeras en experimentar los efectos de la infección.

## MATERIAL Y METODOS

Se emplearon 10 ratones albinos suizos, de 3-4 semanas de edad, los cuales fueron inoculados por vía intraperitoneal con 100 DL<sub>50</sub> del virus de la Encefalitis Equina Venezolana (EEV) (13) subtipo I, diluido en solución borato-salina con albúmina bovina al 0.4% (9). Los 10 ratones controles recibieron una inyección con el mismo volumen y diluyente.

### **Obtención de los núcleos cerebrales.**

A las 15, 24 y 48 horas de post-infección (pi), se extrajeron los hemisferios cerebrales a los grupos de animales controles e infectados, para homogeneizarlos en una solución 2.2 M de sacarosa, 1 mM fosfato de potasio pH 7,6 y 1 mM Cl<sub>2</sub>Mg siguiendo la técnica descrita por Krawiec y

col (7). El material es centrifugado a 90.000 x g por 1 hora, usando el rotor SW-25, en una ultracentrífuga SPINCO modelo L.

El precipitado (núcleos puros) se suspendió en una solución con 20% de glicerol en 0.05 M Tris-HCL, pH 8,0 y fué usado inmediatamente para la reacción enzimática.

#### **Determinación de la ARN-polimerasa endógena.**

El medio de incubación contenía: 40 mM Tris-HCL, pH 8,0; 1,6 mM 2-mercaptoetanol; 0,6 mM de cada uno de los nucleósidos de trifosfato no marcado (ATP, CTP, GTP) y 0,1 mM (1  $\mu$ Ci)  $^3$ H-UTP (New England Nuclear, Boston, Ma. USA, act. esp. 23,7 Ci/mmol), en un volumen final de 250  $\mu$ l. La determinación enzimática para la ARN-polimerasa tipo I se llevó a cabo a baja fuerza iónica con 5 mM  $Cl_2Mg$  y 50 mM NaCl. Para la ARN-polimerasa tipo II, se realizó en 1,6 mM  $Cl_2Mn$ , 8 mM KCl y 50 mM NaCl. Se incubó a 15°C por 15 minutos bajo agitación continua. Se usó 2  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -amanitina (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA) para diferenciar la sensibilidad entre las dos enzimas. La reacción se detuvo con 2 ml de ácido tricloroacético al 10% y 600  $\mu$ g de albúmina bovina siguiendo el procedimiento de lavados descrito anteriormente por Krawiec (7). El residuo final se suspendió en 0,4 ml de ácido fórmico y se transfirió a botellas de contaje que contenían 10 ml de AQUASOL-2 para contar la radioactividad incorporada. Esta se midió en un espectrómetro LKB Wallac con una eficiencia de 51%.

Cada determinación enzimática se realizó por duplicado con sus respectivos controles tiempo 0 y la cantidad de nucleótido incorporado se calculó a partir de la actividad específica del precursor, determinada en condiciones similares de contaje siguiendo el método de Krawiec (7).

El contenido de ADN se determinó por el método de Burton (3).

## **RESULTADOS**

En la Fig. N° 1 se puede observar la actividad enzimática en el período temprano de la infección viral, expresándose los valores en porcentaje de incorporación con respecto a los controles. Se puede observar a las 15 horas después de la infección la disminución en un 50% en la actividad de la ARN-polimerasa II, la cual es más susceptible a la acción viral, continuando con este valor durante las 24 y 48 horas después de la inoculación. La ARN-polimerasa I no fué tan afectada a las 15 horas de pi sino que se inhibió solo en un 25% y al cabo de 24 horas alcanzó una disminución del

50% igualando a la ARN-polimerasa II y mantuvo estos valores hasta las 48 horas.

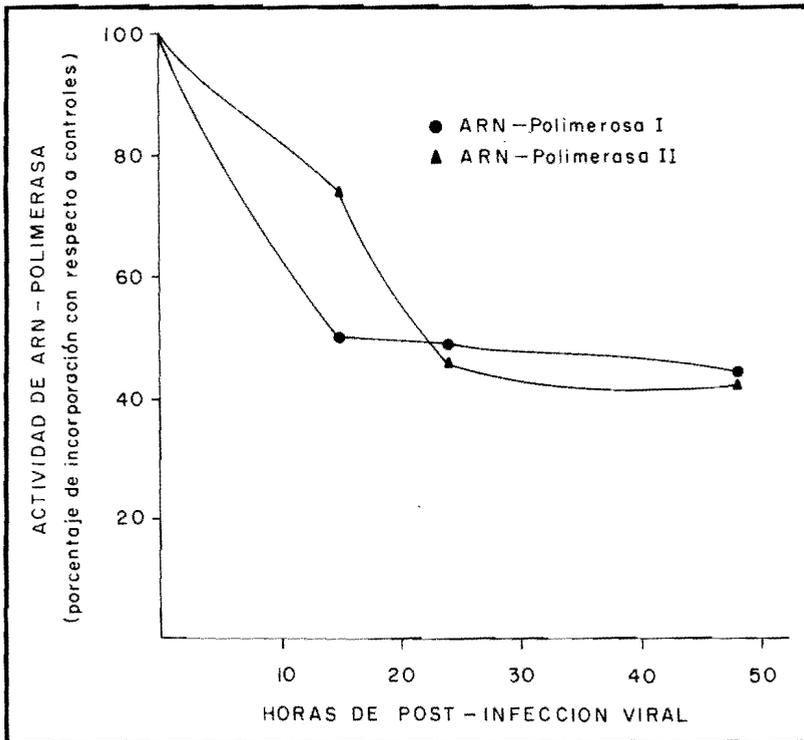


Fig. 1.— Actividad de las ARN-polimerasas I y II en núcleos celulares, a diferentes horas de pi, calculada a partir de los pmoles de UMP incorporados por mg de ADN presente en la incubación/15 min, siguiendo las instrucciones especificadas en material y métodos (100% = 151 pmoles para polimerasa I y 113 pmoles para polimerasa II). Los valores representan el promedio de 3-4 experimentos.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos con ambas enzimas en ratones infectados con el virus de la EEV permite estudiar una posible vía de acción en las etapas que sigue el virus en su multiplicación.

Como la ARN-polimerasa II, es afectada en un 50% de su actividad a las 15 horas de pi, mientras que la ARN-polimerasa I lo es solo en un 25%, ésto habla en favor de mecanismos que comienzan a actuar aún a

más tempranas horas después de la infección y la razón que origina esta diferencia en la actividad enzimática no es desconocida en estos momentos, pudiendo ser consecuencia del efecto directo o indirecto de un inhibidor específico del virus cuyo mecanismo desconocemos. Koisumi y col (6) describen las propiedades de un inhibidor para la ADN-polimerasa en cultivos celulares infectados con el virus de la Encefalitis Equina del Oeste y que actúa como una nucleotidasa (NTPasa). No sabemos si este inhibidor es también sintetizado en los ratones, por lo que se hace necesario tratar de dilucidar esta incógnita. Es conveniente señalar que estos resultados enzimáticos contrastan con los obtenidos en síntesis de proteínas y ácidos nucleicos por Lust (11) en ratones infectados con el virus de la EEV, en los cuales él consiguió en hígado, variaciones en los valores de la síntesis de proteínas al segundo y tercer día, recuperando sus valores normales al cuarto día, mientras que en cerebro no se producía ninguna modificación.

Las alteraciones enzimáticas reportadas por Bonilla y col (1, 2) y Levine y col (10) en ratas infectadas por este virus tienen dos variantes que es necesario aclarar: la primera sería que las determinaciones son realizadas a los 7 días de pi y segundo, que las enzimas estudiadas no estarían muy relacionadas con el mecanismo inmediato empleado por el virus para su replicación. En el presente trabajo las enzimas nucleares estudiadas permiten obtener una visión del comportamiento viral en una etapa más temprana de la infección y prepara el camino para conocer mejor la función de elementos precursores virales en núcleos celulares.

## ABSTRACT

**Cellular RNA-polymerases alterations in brain nuclei in EEV virus infected mice.** Teruel de López E. (*Instituto de Investigaciones Clínicas, Sección de Bioquímica, Apartado Postal 1151, Maracaibo, Venezuela*) *Invest Clín* 25(1): 25-31, 1984.— Young adult mice (3-4 weeks) inoculated IP with 100 LD<sub>50</sub> of the Venezuelan Equine Encephalomyelitis (VEE) virus showed an inhibition of DNA-dependent RNA polymerases, I and II. The enzymes activities display a different pattern of sensitivity in the early hours of post-infection, when the determinations were performed with pure nuclei in low ionic strength. Fifteen hours after infection, RNA-polymerase II showed 50% inhibition while RNA-polymerase I was inhibited only 25%; at 24 hours inhibition was 50% in both enzymes remaining the same until the 48 hours. No evident symptoms of the disease were seen in the animals during the period of enzyme determinations and the death occur after 5 days of the infection.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- BONILLA E., RYDER E., RYDER S.: GABA metabolism in Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus infection. *Neurochem Res* 5 (2): 209-215, 1980.
- 2- BONILLA E., HERNANDEZ H., SALAZAR M., RANGEL P.: Effect of Venezuelan Equine Encephalomyelitis infection on brain choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities. *Brain Res* 252: 330-333, 1982.
- 3- BURTON K.: Characterization of nucleic acids. In: *Methods in Enzymology*, Vol XII, p. 163. Grossman and Moldave, eds. Acad Press, 1968.
- 4- CAMPADELLI-FIUME G., COSTANZO F., FOA-TOMASI L., LA PLACA M.: Modifications of cellular RNA-polymerase II after infection with frog virus 3. *J Gen Virol* 27: 391-394, 1975.
- 5- CLEGG JC., KENNEDY IT.: In vitro synthesis of structural proteins of Semliki Forest virus directed by isolated 26S RNA from infected cells. *FEBS LETTERS* 42(3): 327-330, 1974.
- 6- KOIZUMI S., SIMIZU B., HASHIMOTO K., OYA A., YAMADA A.: Inhibition of DNA synthesis in BHK cells infected with Western Equine Encephalitis Virus. 2. Properties of the inhibitory factor of DNA polymerase induced in infected cells. *Virology* 98: 439-447, 1979.
- 7- KRAWIEC L., MONTALBANO C., GOMEZ C.: Influence of neonatal hypothyroidism upon transcription in isolated rat brain and liver nuclei. *J Neurochem* 26: 1181-1188, 1976.
- 8- LACHMI B., KAARIAINEN L.: Sequential translation of nonstructural proteins in cells infected with a Semliki Forest virus mutant. *Proc Nat Acad Sci* 73(6): 1936-1940, 1976.
- 9- LENNETTE EH.: General principles underlying laboratory diagnosis of viral and rickettsial infections. In: *Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections*. Lennette EH, Schmidt NJ, eds., p 47-49, American Public Health Association, Inc., 1969.
- 10- LEVINE S., BONILLA E., RYDER S., SALAZAR M., RANGEL P.: Tyrosine hydroxylase activity in Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus infection. *Neurochem Res* 6(6): 691-697, 1981.
- 11- LUST G.: Effect of infection on protein and nucleic acid synthesis in mammalian organs and tissues. *Fed Proc* 25: 1688-1694, 1966.

- 12- SIMMONS D., STRAUS J.: Replication of Sindbis virus. II. Multiple forms of double-stranded RNA isolated from infected cells. *J Mol Biol* 71: 615-631, 1972.
  - 13- SOTO A., FINOL T., RYDER S.: Estudio de un brote de encefalitis venezolana en el Distrito Páez, Estado Zulia, en Octubre de 1968. *Invest Clín* Vol 10(31): 45-47, 1969.
-