

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castello, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Estos trabajos abarcan las siguientes especialidades: Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas; Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales; Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía; Física; Geología; Historia; Ingeniería; Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina, Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología. A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares, que se reparte gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Este trabajo fue realizado con una Beca en el Extranjero, 1975, individual. Departamento de Medicina, Farmacia y Veterinaria. Centro de trabajo: Imperial Cancer Research Fund. Laboratories. Londres.

Fundación Juan March



FJM-Uni 57-Car
Estudios sobre la expresión genética
Carrasco Llamas, Luis.
1031778



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Estudios sobre la expresión genética de virus animales

Luis Carrasco Llamas

FJM
Uni-
57
Car

57

Estudios sobre la expresión genética de virus animales/Luis Carrasco Llamas

57

Fundación Juan March
Serie Universitaria



57

Estudios sobre la expresión genética de virus animales

Luis Carrasco Llamas



Fundación Juan March
Castelló, 77. Teléf. 225 44 55
Madrid - 6

*La Fundación Juan March no se solidariza
necesariamente con las opiniones de los
autores cuyas obras publica.*

Depósito Legal: M - 17529 - 1978

I.S.B.N. 84 - 7075 - 088 - 7

Ibérica, Tarragona, 34.- Madrid-7

I N D I C E

	Página
1.— INTRODUCCION	1
2.— RESULTADOS Y DISCUSION	3
2.1. El modelo de la modificación de la membrana	3
2.2. Efecto del incremento iónico sobre la síntesis de proteínas virales y celulares	8
2.3. Alteraciones de la membrana producidas después de la infección viral	11
2.4. El uso de inhibidores impermeables como prueba para medir la modificación de la membrana	14
2.5. Estudios en otros sistemas virales	23
REFERENCIAS	32

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. A.E.Smith por sus valiosas sugerencias y apoyo a todo lo largo de este trabajo. Asimismo, quiero agradecer la ayuda técnica prestada por R. Harvey y C.Blanchard en alguno de los experimentos aquí descritos.

1. INTRODUCCION

En la consideración de un virus hemos de tener presentes dos conceptos fundamentales, el de la simplicidad y la economía. Los virus representan los seres vivos más simples que conocemos, algunos de ellos codifican para un número muy reducido de genes, encontrándonos incluso en el caso de los picornavirus con el hecho de que el genoma viral codifica para un único gen monocistrónico; más aún, al ser este genoma RNA de sentido positivo, es a su vez el único RNA mensajero que el virus posee. A pesar de esta simplicidad genómica los virus son tremendamente efectivos en todos los procesos de su ciclo vital y por lo tanto en su reproducción. Con la simple expresión de uno o muy pocos genes son capaces de inducir profundas modificaciones en el metabolismo de las células que infectan. En algunos casos la infección viral va a inducir la transformación y proliferación celular (virus oncogénicos), mientras que en otros casos, la expresión del genoma viral es capaz de interferir con gran número de funciones celulares, que conducirán finalmente a la muerte celular (virus líticos).

Un hecho observado prácticamente desde los comienzos de la Virología fué, que los virus líticos son capaces de inducir profundas alteraciones morfológicas y bioquímicas en la célula huésped (1) inhibiendo la síntesis de macromoléculas celular y haciendo que la célula infectada tome un aspecto redondeado y se desprenda del soporte sólido al que está fijada (2). A estas alteraciones se las conoce con el nombre genérico de efecto citopático, estando muy extendido en el mundo viral, ya que se observa tanto en bacteriófagos, como en prácticamente todas las familias de virus animales que conocemos (3).

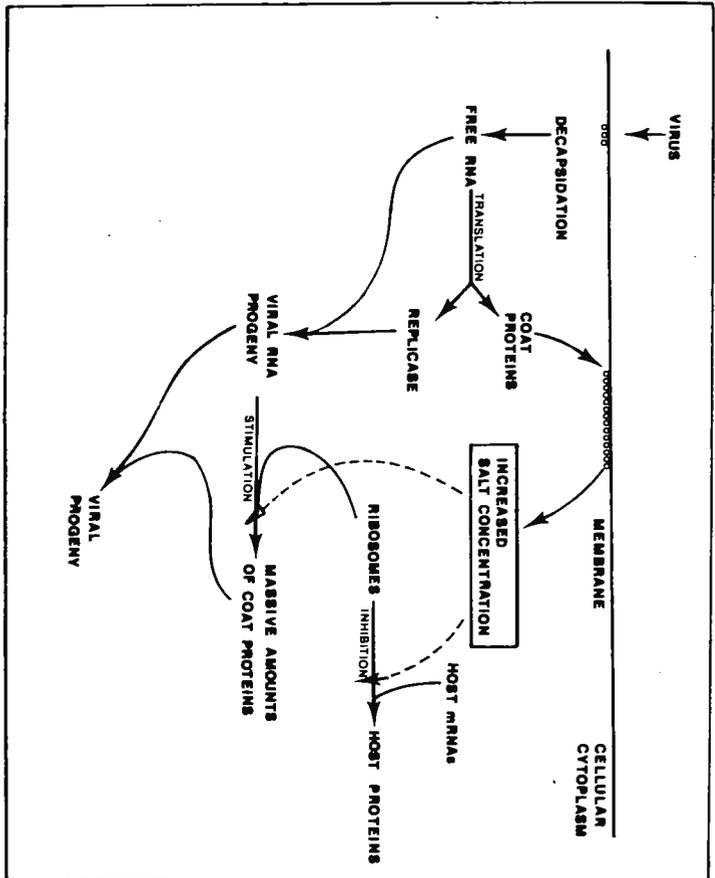


Figura 3. Modelo propuesto para explicar algunos de los cambios observados en la célula huésped después de la infección por un picornavirus.

A pesar de haberse conocido y estudiado este fenómeno durante largo tiempo, permanecen aún inexplicadas las bases moleculares por las que un virus es capaz de interferir en toda una serie de funciones celulares de manera paralela. El objeto de nuestro trabajo se centró primeramente en el estudio del efecto que tiene la infección viral en la síntesis de proteínas de la célula huésped. Teniendo en cuenta la definición de efecto citopático antes citada, se comprende que el estudio de la inhibición de la traducción producida por la infección viral, entra dentro del capítulo más amplio comprendido por el efecto citopático.

2. RESULTADOS Y DISCUSION

2.1. El modelo de la modificación de la membrana

Recientemente hemos revisado los modelos hasta ahora propuestos para la explicación del fenómeno de la parada de la síntesis de proteínas (4). Vamos a pasar ahora directamente a exponer los puntos fundamentales del modelo de trabajo que nosotros hemos considerado (ver Fig. 1):

(a) Primeramente supusimos que la infección viral es capaz de interferir con la membrana plasmática, produciendo una serie de modificaciones no sólo en las funciones que la membrana lleva a cabo directamente, sino también en todas aquellas funciones celulares dependientes directa o indirectamente de la integridad funcional de la membrana.

(b) Como consecuencia de esta interferencia el gradiente de iones monovalentes que la membrana mantiene, se vería alterado, de tal manera que los iones sodio pasarían hacia el interior del citoplasma celular, mientras que los iones potasio saldrían hacia el exterior.

(c) Postulamos que este incremento progresivo de los iones en el citoplasma tendría un efecto diferencial sobre la síntesis de proteínas celulares y virales. Haciendo que la traducción de los mRNAs celulares se inhiba, mientras que la síntesis de proteínas virales se llevará a cabo en condiciones óptimas.

(d) La inserción progresiva de proteínas virales en la membrana celular sería la responsable no sólo de la inhibición de la síntesis de proteínas, sino también del efecto citopático en general, siendo finalmente la causa de la muerte celular.

Este modelo tal y como queda enunciado está de acuerdo con toda la evidencia experimental anterior, ya que al proponer que es una proteína viral la responsable indirecta de la inhibición de la síntesis de proteínas, está en correlación con el hecho de que se necesite expresión viral cuando se utilizan bajas multiplicidades de infección. Mientras que, si utilizamos alta MI y por lo tanto añadimos un gran número de proteínas virales por célula, entonces no se necesita síntesis nueva de proteínas para conseguir el efecto citopático. Además, recientemente se han encontrado mutantes de poliovirus incapaces de llevar a cabo la inhibición de la síntesis de proteínas, estos mutantes mapean en la región del genoma que codifica para las proteínas estructurales (4). Por otra parte, los sistemas S-30 obtenidos de células normales o células infectadas por picornavirus, son igualmente activos en su capacidad para traducir mRNAs celulares o virales (5,6). Este hecho indica que la especificidad observada in vivo desaparece al romper las células y además está en contradicción con la posible existencia en las células infectadas de un inhibidor macromolecular específico de la síntesis de proteínas celulares.

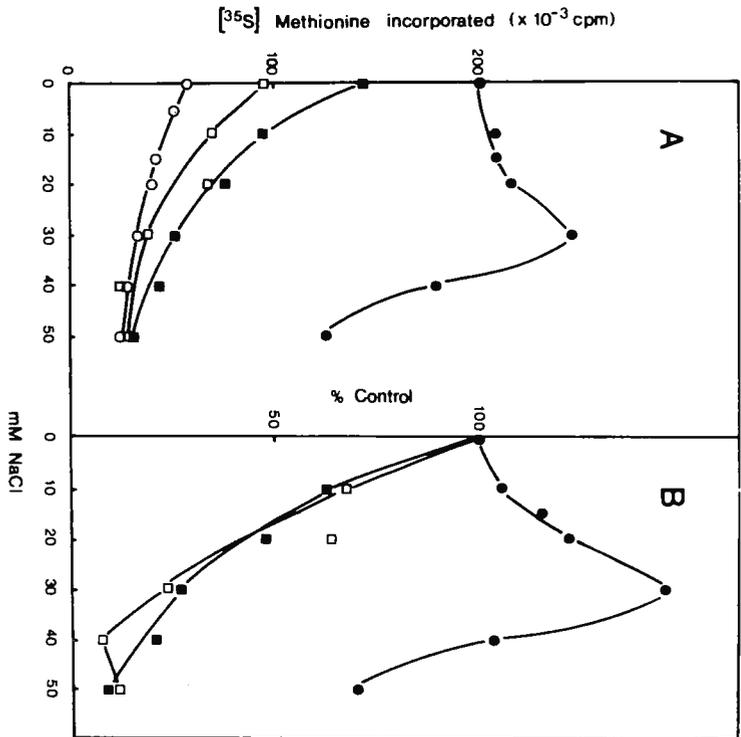


Figura 2. Efecto del NaCl en la síntesis de proteínas celulares (cuadrados) y virales (círculos llenos). Sistema S-30 de células ascíticas (para detalles ver Ref. 13).

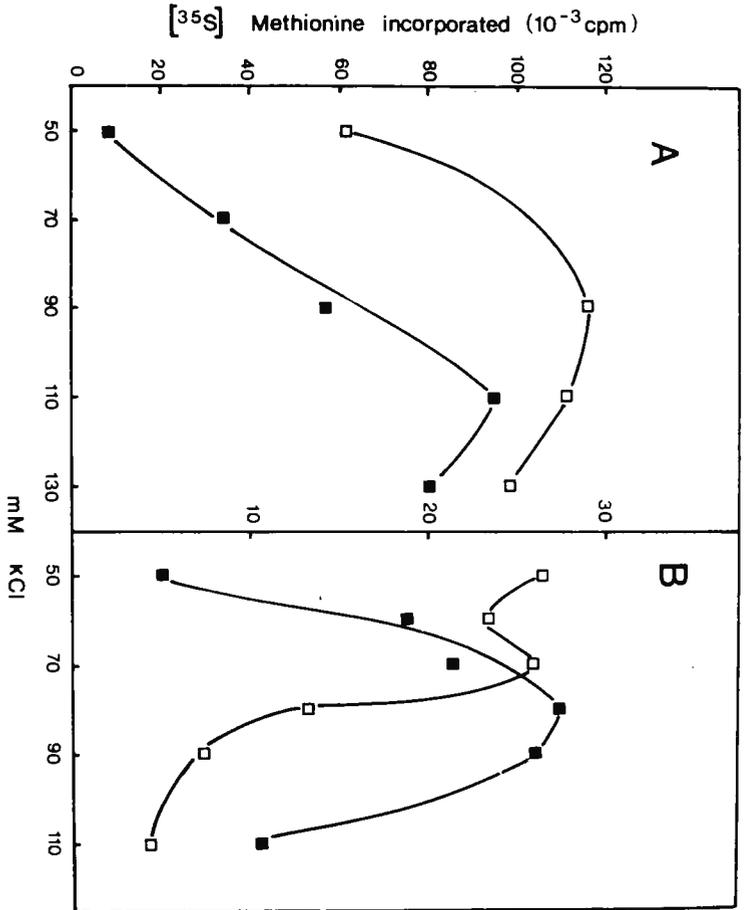
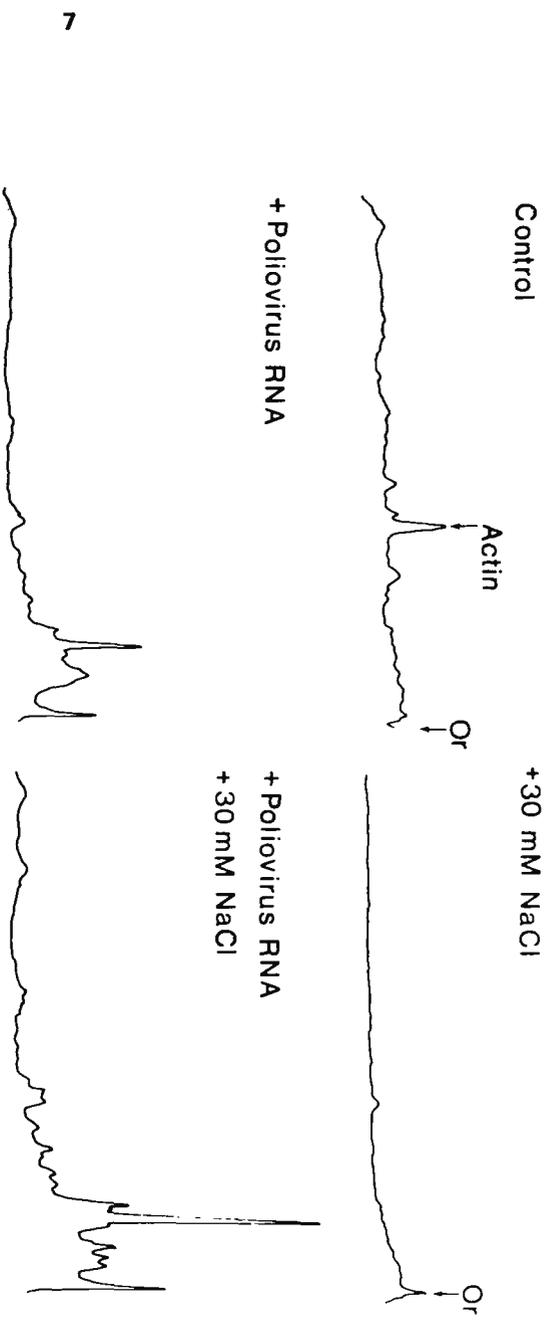


Figura 3. Efecto de la concentración del KCl en la síntesis de proteínas virales (panel A) y celulares (panel B), en condiciones normales (■) y más 30 mM NaCl (□).



7

Figura 4. Análisis densitométrico de los productos sintetizados in vitro en respuesta al RNA de poliovirus.

Sin embargo, para soportar el modelo expuesto deberían de cumplirse al menos, los siguientes hechos:

(a) El incremento iónico ha de afectar diferencialmente la traducción de los mRNAs celulares y virales.

(b) Tiene que haber un momento en la infección viral, en el cual la membrana celular se modifique.

(c) Después de esta modificación, el potasio intracelular ha de salir al exterior celular, mientras que la concentración de sodio en el citoplasma ha de incrementarse progresivamente.

2.2. Efecto del incremento iónico sobre la síntesis de proteínas virales y celulares

El primer punto que quisimos probar fué el efecto que tendría la adición de sodio a un sistema in vitro de traducción de mRNAs celulares y virales. Para ello utilizamos un sistema S-30 desarrollado de células ascíticas, al que añadimos bien RNA del virus de la encefalomiocarditis (EMC) o mRNAs celulares. Según puede observarse en la Figura 2 la adición de cloruro sódico produce una clara inhibición en la síntesis de proteínas celulares, mientras que la traducción del mRNA viral se vió claramente estimulada. Queremos señalar el hecho de que la síntesis máxima de proteínas virales se da en condiciones iónicas en las cuales la traducción de los mRNAs celulares está profundamente inhibida.

El paso siguiente consistió en averiguar si este efecto diferencial observado in vitro era específico del NaCl o si lo que realmente importa es un incremento en la concentración iónica. La Figura 3 indica que esto último es quizás lo que ocurre, ya que el NaCl puede sustituirse por KCl. En la Figura 4 mostramos que este efecto no es específico para el RNA del virus EMC, sino que también se observa con el RNA del virus de la polio. En este

experimento mostramos además como el análisis de los productos sintetizados corresponden con los que normalmente se producen en respuesta a la adición del RNA de un picornavirus (7,8).

Se sabe que la inhibición de la síntesis de proteínas celulares después de la infección viral ocurre a nivel de la iniciación (9). Así pues, quisimos estudiar si el efecto diferencial observado in vitro, ejercido por los iones monovalentes se daba a nivel de la iniciación de la traducción. Para ello utilizamos el ensayo de la esparsomicina que ya ha sido descrito (10). En la Figura 5 podemos observar como la adición de NaCl a este sistema, sigue ejerciendo la misma discriminación entre la iniciación de mRNAs celulares o virales, cuando medimos únicamente la formación de dipéptido o de tripéptido.

Después de haber realizado estos experimentos in vitro, nos preguntamos, qué efecto produciría el incremento de iones monovalentes en condiciones más fisiológicas. Con este propósito, analizamos la síntesis de proteínas a distintos tiempos después de la infección en células 3T6 infectadas con virus EMC en presencia de medio normal, hipotónico o hipertónico. La Figura 6 muestra como a partir de la cuarta hora después de la infección comienza a observarse la síntesis de proteínas virales en presencia de medio de cultivo normal. En condiciones hipertónicas la supresión de la síntesis de proteínas celulares ocurre más rápida y claramente, mientras que en condiciones hipotónicas no observamos la aparición de proteínas virales, incluso después de ocho horas de infección.

La conclusión que sacamos de estos experimentos es que las condiciones iónicas afectan diferencialmente la síntesis de proteínas virales y celulares, tanto in vivo como in vitro.

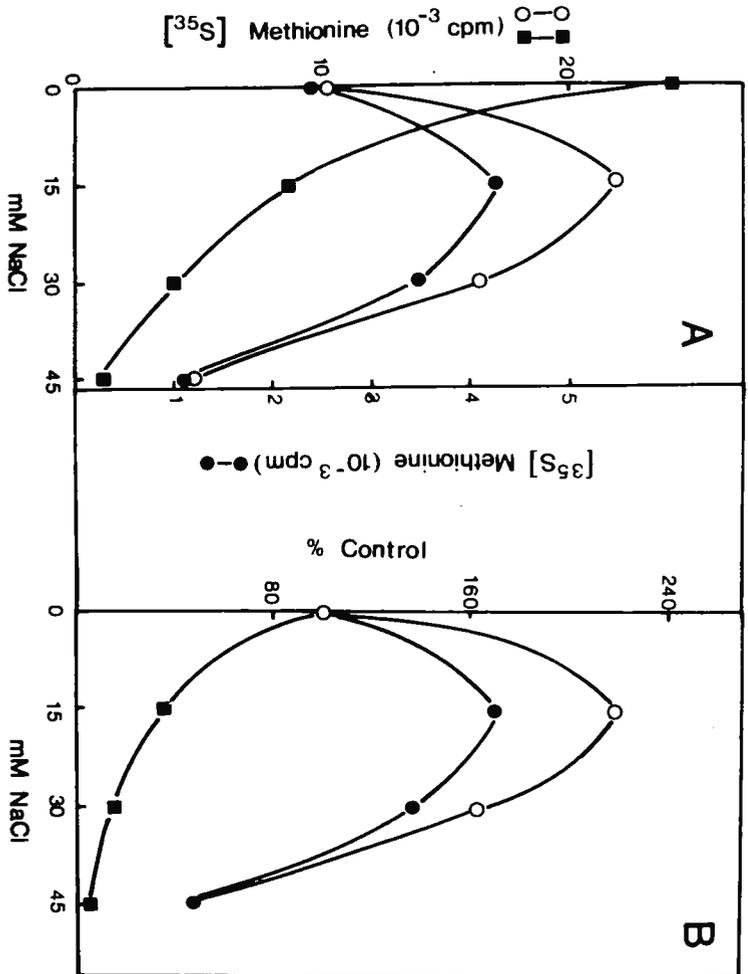


Figura 5. Efecto del NaCl en la formación del dipéptido de la globina (○—○), del dipéptido y tripéptido iniciales del EMC (■—■) (ver Ref. 13).

Si consideramos que la concentración de iones sodio en el medio de cultivo es de 150 mM, mientras que la concentración efectiva de iones potasio en el citoplasma celular es de 80 mM y considerando además, que en un momento dado de la infección la membrana plasmática comienza a dejar pasar iones libremente, el incremento de sodio más potasio en el citoplasma seguiría la curva indicada en la Figura 7. Esto produciría una clara inhibición sobre la síntesis de proteínas celulares mientras que la síntesis de proteínas virales se vería estimulada durante cierto tiempo después de la modificación de la membrana, pasando a ser inhibida posteriormente, esta inhibición se ejercería sobre la iniciación haciendo que los ribosomas terminasen la lectura del RNA viral, este acabaría desnudo y preparado para comenzar los procesos de morfogénesis virales. Estas curvas naturalmente, serían distintas en presencia de un medio hipertónico.

2.3. Alteraciones de la membrana producidas después de la infección viral

El segundo punto que quisimos analizar consistió en saber si en algún momento determinado en la infección viral, la membrana plasmática sufre realmente cambios funcionales. Para ello analizamos la capacidad de las células para retener ^{86}Rb (un análogo de potasio), a distintos tiempos después de la infección. La Figura 3 muestra como a partir de la cuarta hora después de la infección las células comienzan a dejar pasar libremente ^{86}Rb y posiblemente otros iones monovalentes. Este efecto sólo ocurrió en las células infectadas con virus EMC. Además hemos de hacer notar que es en este momento cuando comenzamos a observar la síntesis de proteínas virales (ver Fig. 6).

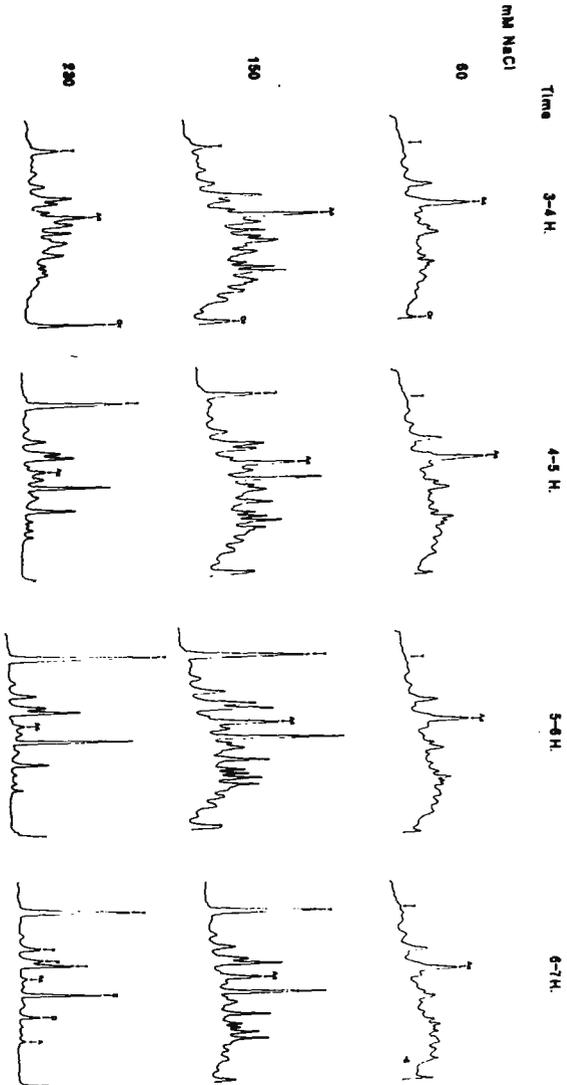


Figura 6. Análisis densitométrico de las proteínas sintetizadas en células 3T6 infectadas por virus EMC, a distintos tiempos después de la infección y en presencia de distintos medios.

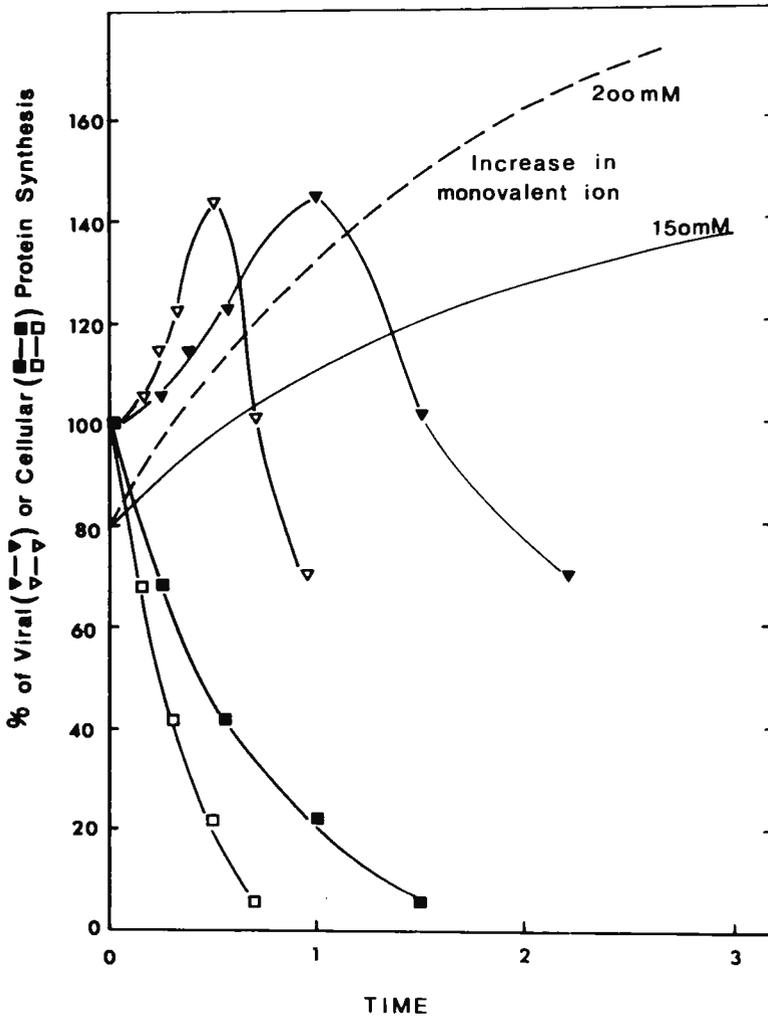


Figura 7. Representación del posible incremento con el tiempo de iones sodio más potasio después de que la membrana se averíe y efecto en la síntesis de proteínas viral o celular. Se consideran también los cambios que ocurrirían en presencia de un medio hipertónico (símbolos vacíos).

También hemos observado que en este momento después de la infección las células no sólo dejan pasar libremente iones, sino también otras moléculas de mayor tamaño. Así, el pool de aminoácidos comienza a disminuir a partir del mismo momento en que la membrana deja pasar iones (resultados no mostrados). Lo mismo sucede con el pool de nucleótidos (Fig. 9). Estos experimentos están de acuerdo con los resultados encontrados por otros investigadores (11,12).

En conexión con el tercer punto que habíamos enumerado en el apartado 2.1., recientemente se han publicado las medidas directas de la concentración de iones sodio y potasio en células infectadas por mengo virus (12) (un cariovirus, al igual que el virus EMC). Estos resultados están en perfecto acuerdo con la teoría por nosotros formulada anteriormente (13,14).

La conclusión de estos experimentos es que la membrana plasmática se modifica de tal manera que deja pasar no sólo iones, sino también otros compuestos de bajo peso molecular.

2.4. El uso de inhibidores impermeables como prueba para medir la modificación de la membrana

Una técnica muy extendida entre los virólogos y biólogos celulares ha sido el uso de colorantes impermeables como indicación de la muerte celular. De hecho, se supone que si una célula es capaz de teñirse por uno de estos colorantes impermeables en un momento dado después de la infección, indica que esa célula ha muerto y todos los procesos bioquímicos en ella han acabado ya. Esta prueba ha sido criticada recientemente al encontrarse que células CV1 infectadas con virus SV40 a pesar de teñirse en la fase tardía de la infección están aún funcionando en una serie de procesos bioquímicos (15).

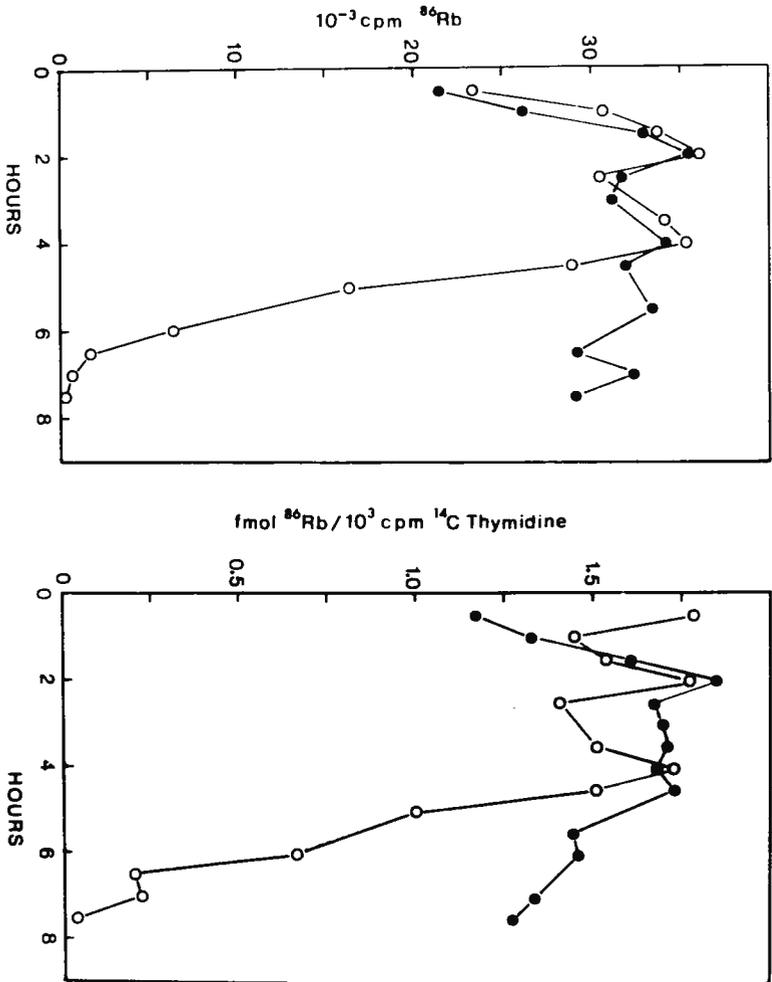


Figura 8. Dependencia con el tiempo de células 3T6 a retener ^{86}Rb . Control (●), + EMC (○).

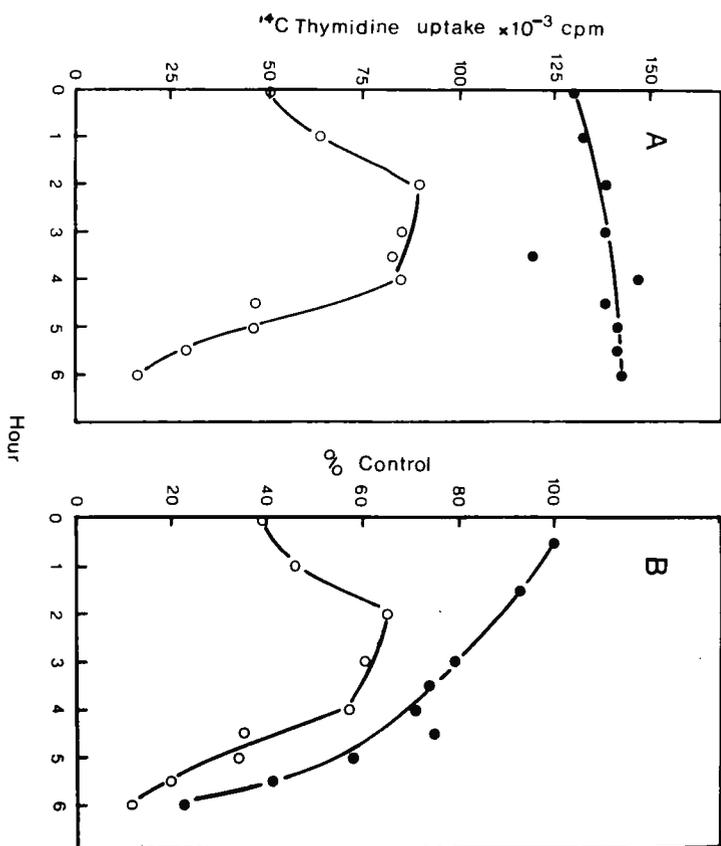


Figura 9. Efecto de la infección por virus EMC sobre el pool de nucleótidos.

Podríamos pensar pues, que en nuestro caso concreto la membrana plasmática de las células 3T6 infectadas por picornavirus se avería en el momento en que la célula muere y todos los procesos virales han acabado ya. Sin embargo, el hecho fundamental indicado en el modelo descrito en el apartado 2.1. era que la síntesis de proteínas virales ocurriría en una célula que tiene la membrana averiada. Para analizar este hecho directamente pensamos que el experimento más directo sería el uso de un inhibidor de la síntesis de proteínas, que fuera impermeable para las células normales. Si este inhibidor es de bajo peso molecular, será capaz de penetrar en las células que tengan la membrana averiada. Observando por lo tanto, la síntesis de qué proteínas es inhibida por este compuesto, podremos deducir qué células hay sintetizando proteínas virales y cuáles poseen además la membrana plasmática modificada.

Como inhibidor impermeable pensamos usar el GppCH₂p, ya que sabemos que inhibe la síntesis de proteínas in vitro y que es impermeable para las células normales, al ser un compuesto muy polar. El experimento que llevamos a cabo consistió en añadir distintas concentraciones de este compuesto en células 3T6 normales y en células 3T6 infectadas con virus EMC en un momento después de la infección, en el que la síntesis de proteínas virales es máxima (ver esquema de la Fig. 10). En la Figura 11 observamos como el GppCH₂p inhibió de manera altamente específica la síntesis de proteínas únicamente en las células infectadas. Posteriormente, comprobamos que esta inhibición ejercida por el GppCH₂p comenzó en el momento en que observamos la aparición de síntesis de proteínas virales (Fig. 12).

La conclusión que nosotros sacamos de estos experimentos es que la síntesis de proteínas virales tiene lugar de hecho en una célula que posee una membrana plasmática que deja pasar libremente compuestos de bajo peso molecular.

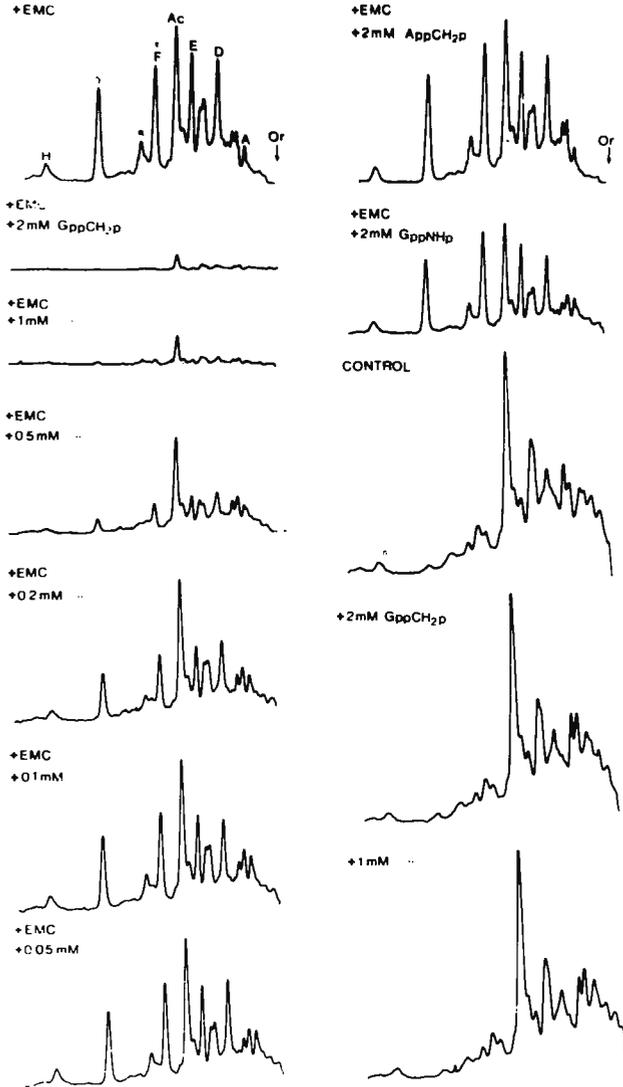


Figura 11. Análisis densitométrico de la síntesis de proteínas en células normales e infectadas. Efecto de algunos análogos de nucleótidos.

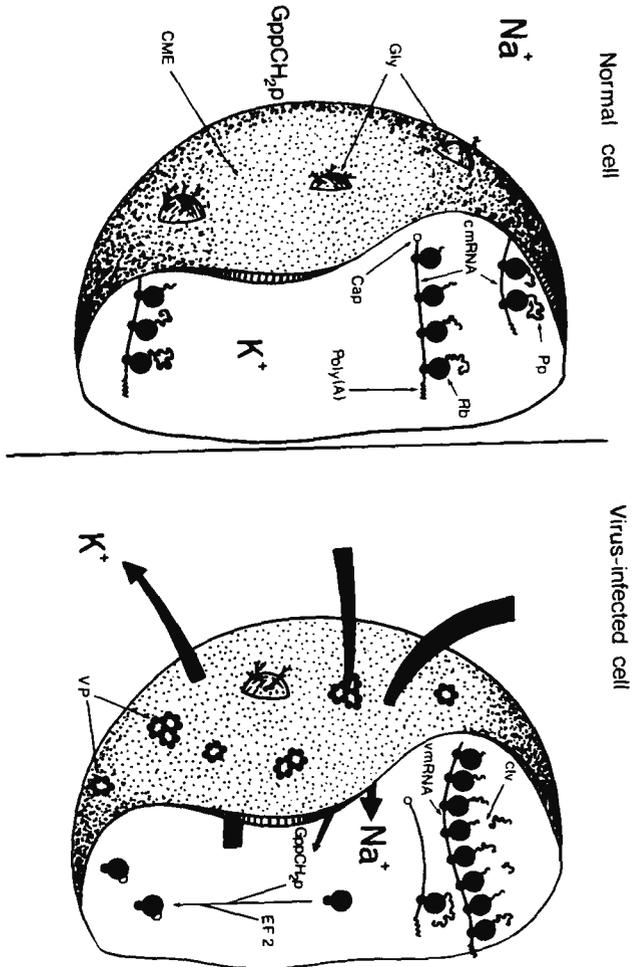


Figura 10. Representación esquemática de los acontecimientos que ocurrirían a nivel de membrana y en la síntesis de proteínas después de la infección vírica. Panel A: célula normal. Panel B: célula infectada. En este último caso las proteínas virales se disolverían en la membrana, originando poros que dejarían pasar compuestos de pequeño tamaño, impermeables para las células normales.

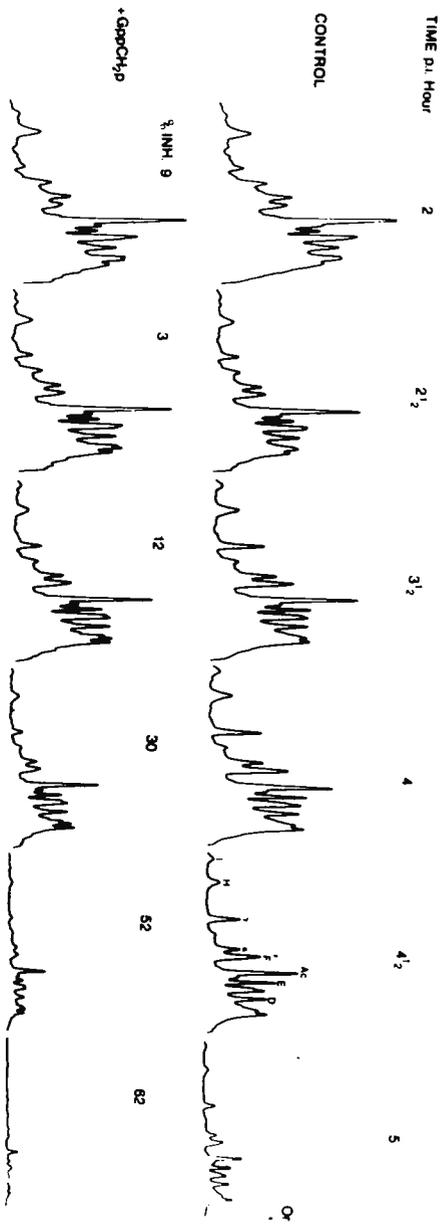


Figura 12. Curso de tiempo de la síntesis de proteínas en células infectadas y efecto del GppCH₂P.

Después de observar que existía una relación temporal entre la modificación de las propiedades de permeabilidad de la membrana y la iniciación de la síntesis de proteínas virales, quisimos saber si para tal modificación se necesita expresión genética y si tal expresión está codificada por el genoma viral o el celular. Para ello, inmediatamente después de la infección tratamos las células con cicloheximida (un inhibidor de la síntesis de proteínas) o con actinomicina D (un inhibidor de la síntesis de RNA celular, pero no viral). Después de revertir la inhibición de estos compuestos, probamos la modificación de la membrana medida mediante el ensayo del GppCH₂p. Los resultados de la Figura 13 indican que para que la membrana se modifique necesitamos que haya expresión genética a nivel de la traducción. Además, en favor de la idea de que es un producto viral el implicado en tal modificación, observamos que la actinomicina D no tuvo efecto en la prevención de tal modificación. El hecho de que exista un mRNA celular enmascarado que codifique para la proteína implicada en la modificación de la membrana y cuya traducción se desencadene por la infección viral, no queda descartado por los experimentos expuestos anteriormente. Sin embargo, a nuestro juicio tal posibilidad nos parece altamente improbable.

El hecho de que no exista especificidad con respecto al inhibidor impermeable utilizado, junto con el resultado indicando que la membrana probablemente se modifica por una proteína viral nos induce a suponer, que la base molecular de esta modificación de la membrana se debe al hecho de que un tipo, o varios, de proteínas virales son capaces de insertarse en la membrana plasmática formando allí agrupaciones especiales, que dejarían poros de un diámetro aproximado de 10Å (16), a través de los cuales podrían pasar moléculas de bajo peso molecular.

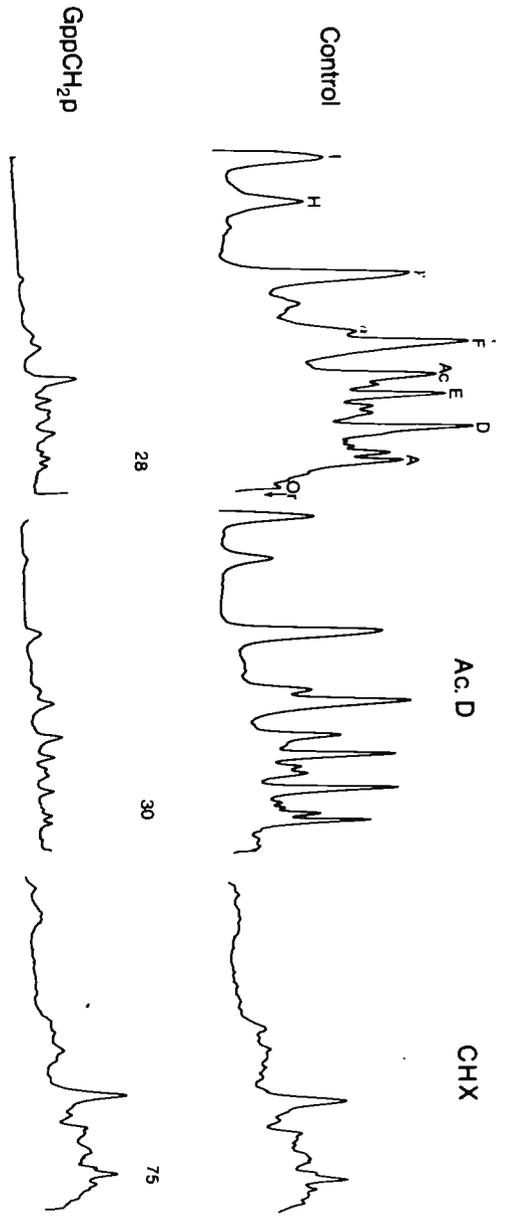


Figura 13. Efecto de la cicloheximida y la actinomicina D sobre la permeabilidad de las células infectadas al GppCH₂P.

2.5. Estudios en otros sistemas virales

Después de haber comprobado en el sistema de picornavirus toda una serie de hechos que están de acuerdo con el modelo anteriormente enunciado, quisimos extender estos estudios a otras familias de virus (ver clasificación en la Figura 14). Como primer criterio indicador de que el desarrollo de un virus determinado va a inducir modificaciones funcionales en la membrana, ensayamos el efecto in vitro que tienen los iones monovalentes en la traducción de los mRNAs procedentes de distintos sistemas virales. La lógica de estos experimentos consiste en asumir que si la traducción de un mRNA determinado requiere un óptimo de ión monovalente superior al óptimo para la traducción de los mRNAs celulares, eso podría indicar que el mRNA indicado se traduce cuando existe una mayor concentración de iones en el citoplasma celular debido a las modificaciones producidas en las propiedades de la membrana.

Un sistema adecuado para probar este punto lo constituye el virus Senlikí Forest (un Togavirus). El RNA genómico de este virus se expresa en la etapa temprana del ciclo viral, cuando no hay inhibición de la síntesis de proteínas, dando lugar a las proteínas no estructurales. En la fase tardía de la infección el mRNA subgenómico 26S comienza a sintetizar las proteínas estructurales del virión observándose a la vez una inhibición paralela en la síntesis de proteínas celulares y en la traducción del RNA genómico 42S (ver esquema de la Figura 15). Según nuestro modelo, la predicción en este caso sería que la traducción del mRNA 26S tendría un óptimo de iones monovalentes superior al de los mRNAs celulares y al mRNA 42S, ya que el mRNA 26S se traduce en la célula infectada cuando hay inhibición de la síntesis de proteínas celular y esto será debido a un incremento en la concentración iónica del citoplasma.

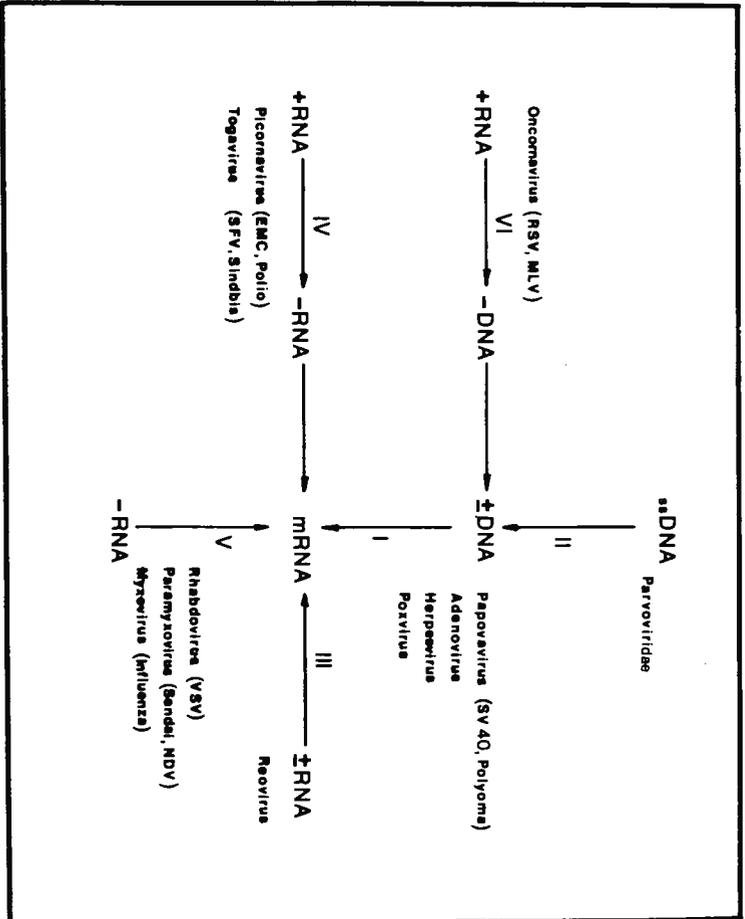


Figura 14. Clasificación de los virus animales con respecto al modo en que llevan a cabo su expresión genética (ver Ref. 3).

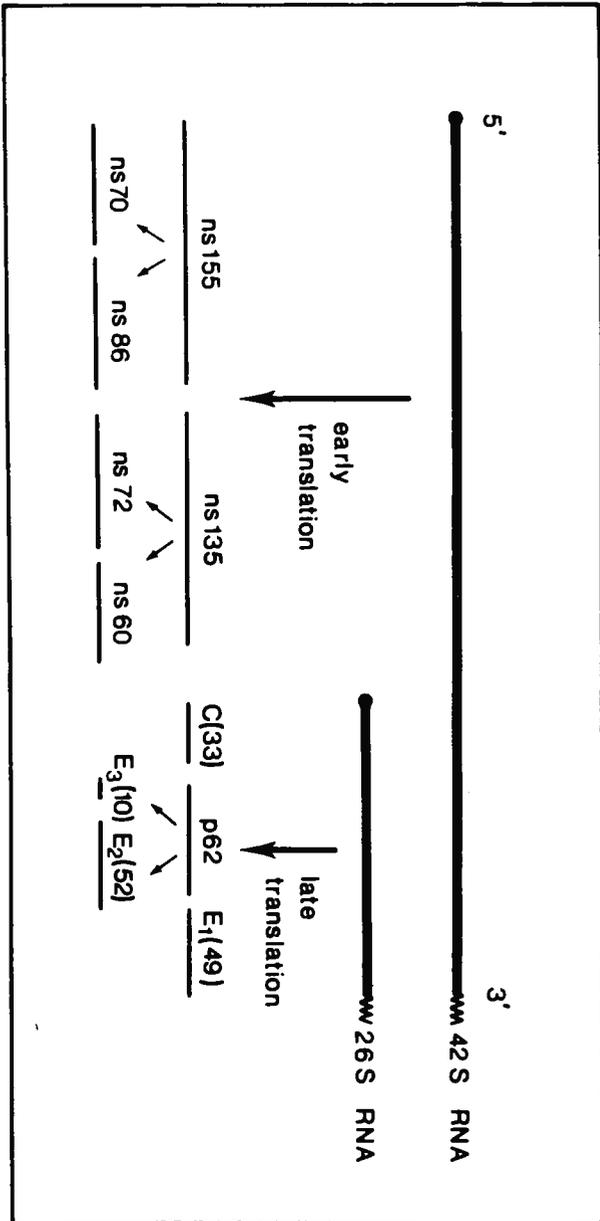


Figura 15. Representación esquemática de la expresión genética en Togavirus.

La Figura 16 muestra como realmente existe una clara diferencia entre los óptimos iónicos para la traducción de los mRNAs 26S y 42S. Queremos destacar de nuevo, que en las condiciones óptimas para la traducción del mRNA 26S (100 mM KCl) no se da apenas síntesis de proteínas dirigida por el mRNA 42S. Una consecuencia fisiológica de este hecho es que el RNA genómico quedaría desnudo y dispuesto para la morfogénesis viral en el momento en que comienzan a sintetizarse las proteínas de la cubierta del virión.

Un hecho similar al anterior se encontró con el mRNA 16S del virus del polioma (un Papovavirus) que codifica para la síntesis de la proteína mayoritaria de la cubierta VP1. Este experimento se ilustra en las Figuras 17 y 18. En este caso hemos añadido al sistema de traducción in vitro todos los mRNAs que existen en el citoplasma de una célula 3T6 infectada por el virus del polioma. Es importante observar como variando simplemente la concentración de KCl en el sistema in vitro hacemos que cambie totalmente el tipo de proteínas sintetizadas.

De manera análoga a lo anteriormente descrito ocurre en el caso de virus con genoma RNA negativo, tales como el virus de la estomatitis vesicular y el virus de la influenza (Fig. 19)

Después de llevar a cabo estos estudios in vitro, ensayamos si habría cambios en las propiedades de la permeabilidad de la membrana en células infectadas por Togavirus o Papovavirus. Para ello utilizamos el método de los inhibidores impermeables descrito en el apartado anterior. Hemos observado que el GppCH₂p produce el efecto inhibitor selectivo en células infectadas por mengo virus y por virus del Senliki Forest (Fig. 20). Este efecto no se observó en células CV1 infectadas por SV40, sin embargo, utilizando otros inhibidores impermeables de síntesis de proteínas, que son más potentes in vitro que el GppCH₂p, se ha comprobado que incluso en este último sistema hay una clara modificación

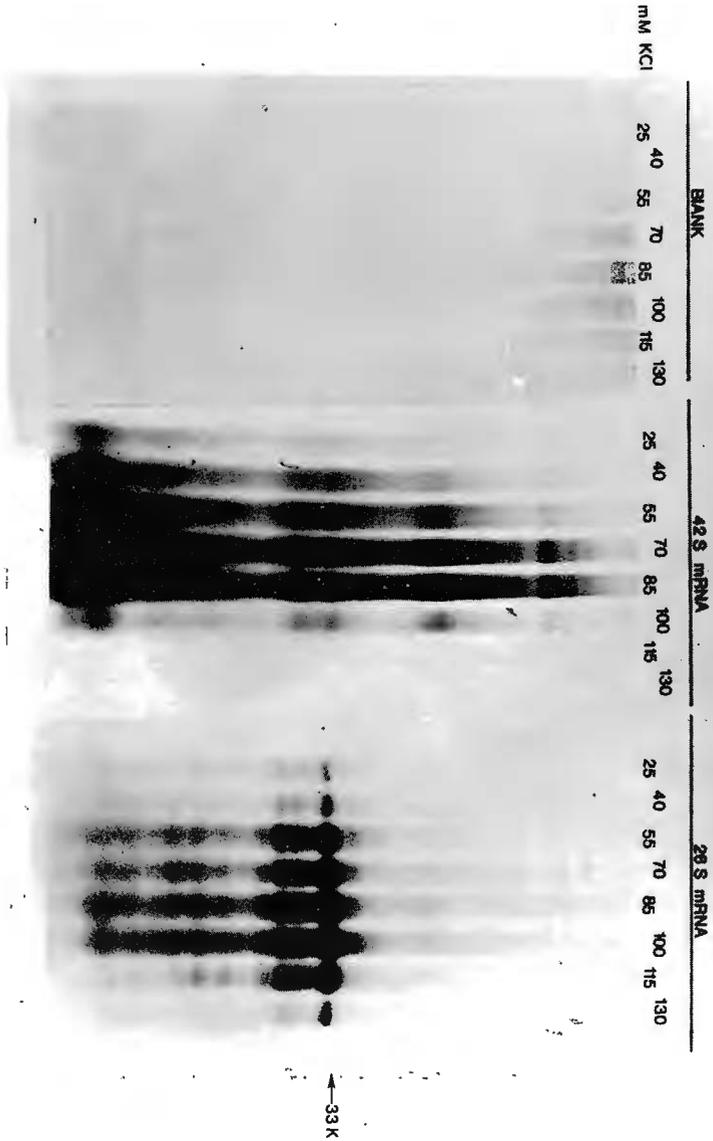


Figura 16. Dependencia de la concentración de KCl en la traducción de los mRNAs 26S y 42S.

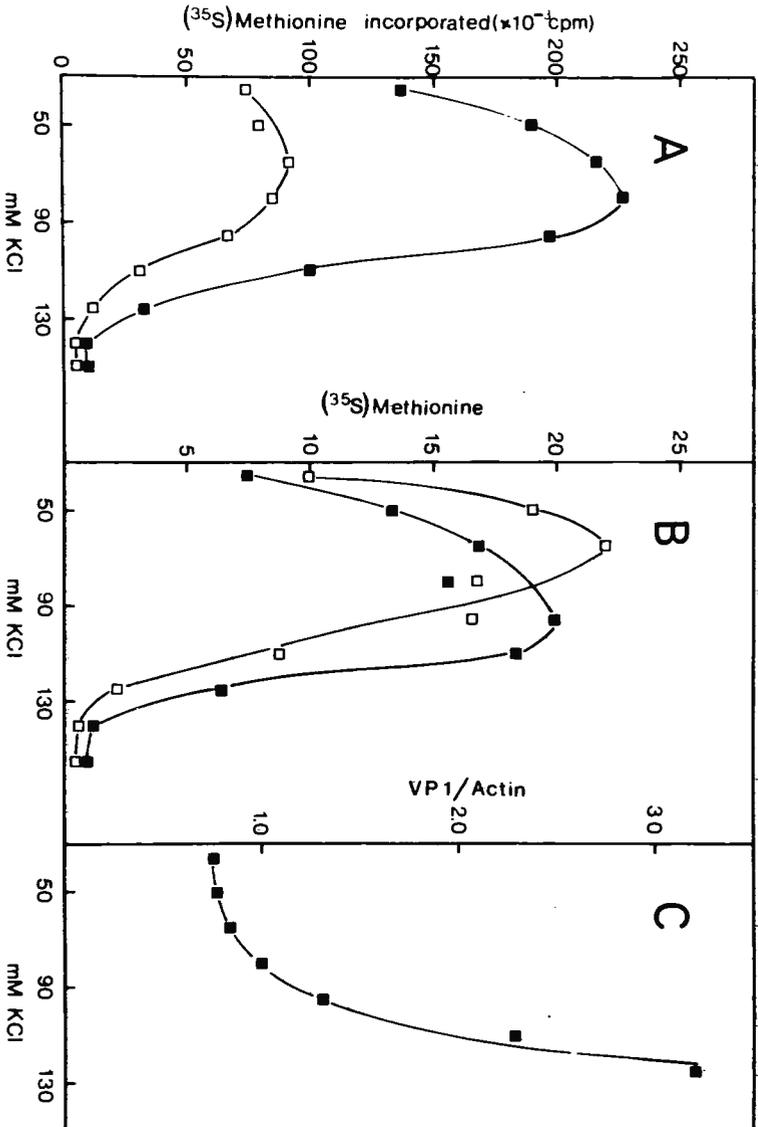


Figura 17. Dependencia de la concentración de KCl en la traducción de los mRNAs de células 3T6 infectadas con virus del poliovirus.

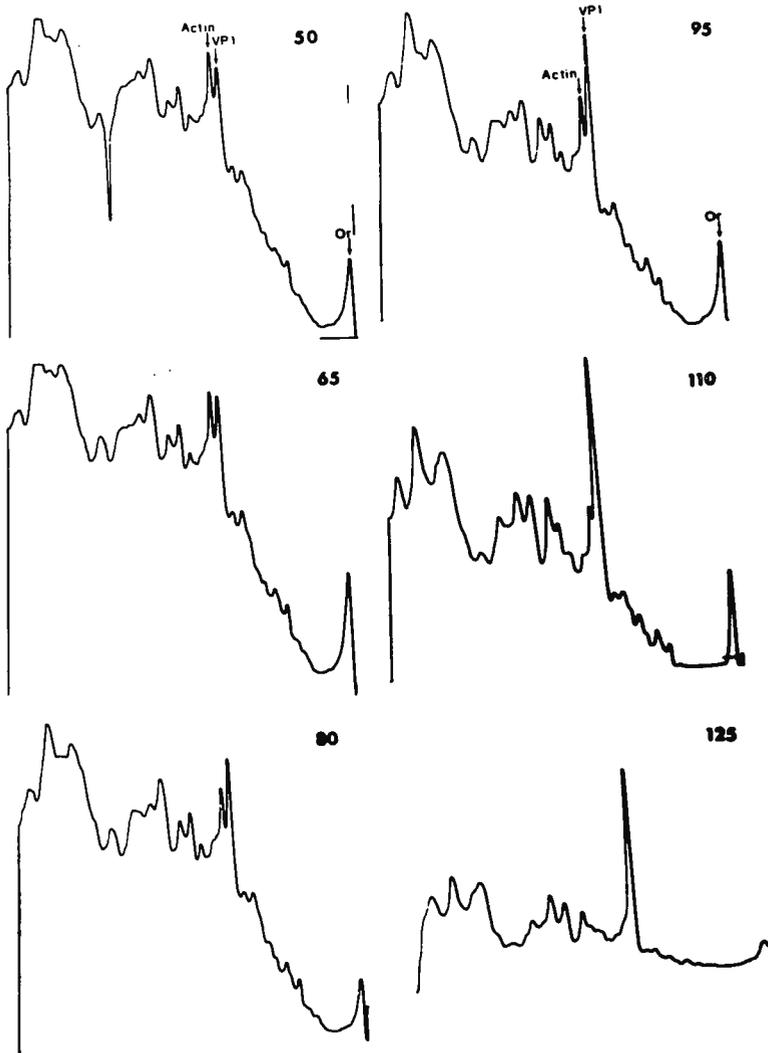


Figura 18. Análisis densitométrico de las proteínas sintetizadas en el sistema de germen de trigo, en respuesta a los mRNAs de células 3T6 infectadas por poliovirus. Efecto de distintas concentraciones de KCl.

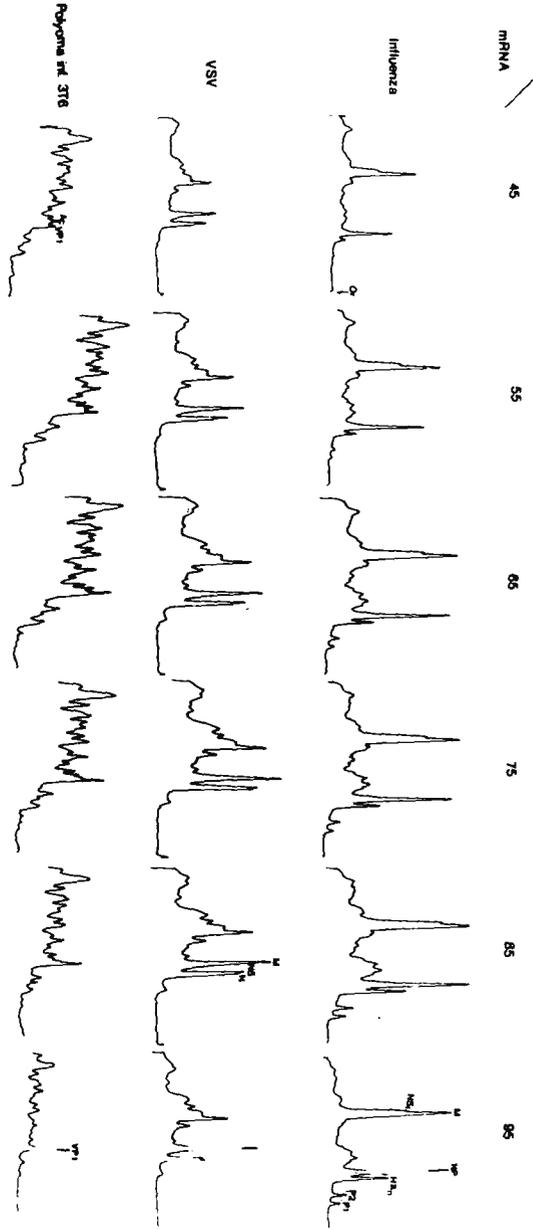


Figura 19. Análisis de las proteínas sintetizadas en respuesta a la adición de mRNAs del virus de la influenza, del virus de la estomatitis vesicular y del virus del polio.

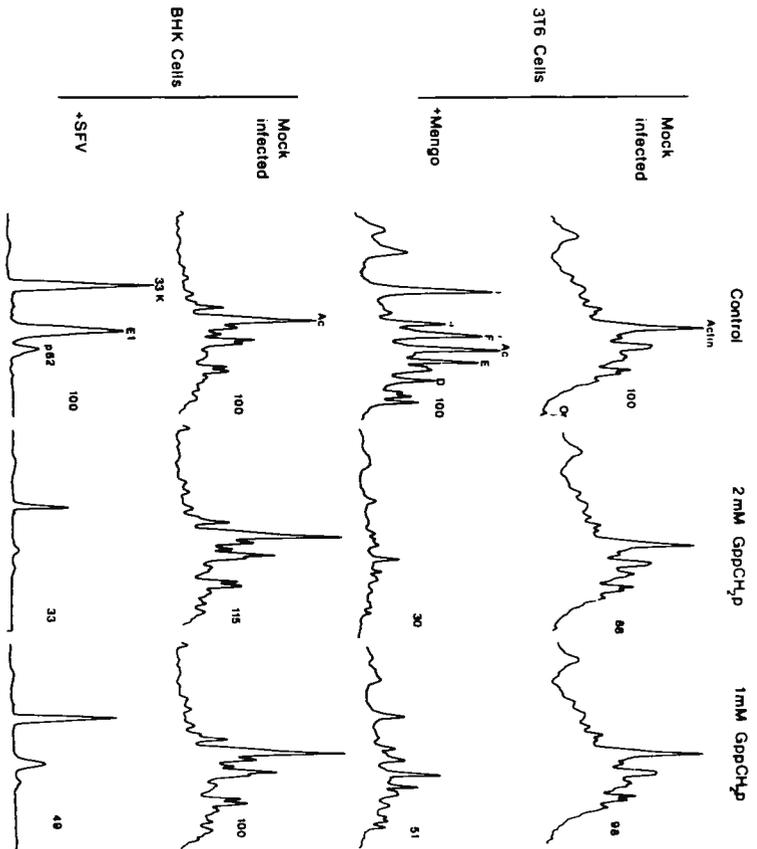


Figura 20. Efecto del GpCH₂P en la síntesis de proteínas en células normales e infectadas por mengovirus y por virus Seniliki Forest.

en las propiedades de permeabilidad de la membrana a compuestos inhibidores.

3. REFERENCIAS

- 1.- Comprehensive Virology. Vols. 2-7 (Fraenkel-Conrat, H. y Wagner, R.R., eds.), Plenum Press.
- 2.- R.Bablanian. Prog.Med.Virol., 19, 40 (1975).
- 3.- A.E.Smith y L.Carrasco. En "MTP Intern.Rev.Sci.Biochem. Series II (en prensa).
- 4.- A.Steiner-Pryor y P.O.Cooper. J.Gen.Virol. 21, 215 (1973).
- 5.- F.Golini, S.S.Thach, C.H.Birge, B.Safer, W.C.Merrick y R.E.Thach. Proc.Nat.Acad.Sci. USA 73, 3040 (1976).
- 6.- S.L.Abreu y J.Lucas-Lenard. J.Virol. 18, 182 (1976).
- 7.- M.Esteban y I.M.Kerr. Eur.J.Biochem. 45, 567 (1974).
- 8.-L.Villa-Komaroff, M.McDowell, D.Baltimore y H.F.Lodish. Methods Enzymol. 30, 709 (1974).
- 9.-M.Willems y S.Penman. Virology 30, 355 (1966).
- 10.-A.E.Smith. Eur.J.Biochem. 33, 301 (1974).
- 11.-A.E.Farnham y W.Epstein. Virology 21, 436 (1963).
- 12.-E.Egberts, P.B.Hackett y P.Traub. J.Virol. 22, 591 (1977).
- 13.-L.Carrasco y A.E.Smith. Nature 264, 807 (1976).
- 14.-L.Carrasco. FEBS Letters 76, 11 (1977).
15. L.C.Norkin. J.Virol. 21, 872 (1977).
- 16.-T.Hatta y R.E.F.Mathews. Virology 73, 1 (1976).



FUNDACION JUAN MARCH
SERIE UNIVERSITARIA

Títulos Publicados:

- 1.— *Semántica del lenguaje religioso / A. Fierro*
(Teología. España, 1973)
- 2.— *Calculador en una operación de rectificación discontinua/A. Mulet*
(Química. Extranjero, 1974)
- 3.— *Skarns en el batolito de Santa Olalla/F. Velasco*
(Geología. España, 1974)
- 4.— *Combustión de compuestos oxigenados/J.M. Santiuste*
(Química. España, 1974)
- 5.— *Películas ferromagnéticas a baja temperatura/José Luis Vicent López*
(Física. España, 1974)
- 6.— *Flujo inestable de los polímeros fundidos/José Alemán Vega*
(Ingeniería. Extranjero, 1975)
- 7.— *Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental*
José Antonio Salva Lacombe (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1973)
- 8.— *Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos/José Plá Carrera*
(Matemáticas. España, 1974)
- 9.— *El fenómeno de inercia en la renovación de la estructura urbana.*
Francisco Fernández-Longoria Pinazo (Urbanización del Plan Europa 2.000
a través de la Fundación Europea de la Cultura)
- 10.— *El teatro español en Francia (1935–1973) / F. Torres Monreal*
(Literatura y Filología. Extranjero, 1971)
- 11.— *Simulación electrónica del aparato vestibular/J.M. Drake Moyano*
(Métodos Físicos aplicados a la Biología. España, 1974)
- 12.— *Estructura de los libros españoles de caballerías en el siglo XVI.*
Federico Francisco Curto Herrero (Literatura y Filología. España, 1972)
- 13.— *Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos*
M. Paloma Fernández García (Geología. España, 1975)
- 14.— *La obra gramatical de Abraham Ibn c Ezra/Carlos del Valle Rodríguez*
(Literatura y Filología. Extranjero, 1970)

15. – *Evaluación de Proyectos de Inversión en una Empresa de producción y distribución de Energía Eléctrica.*
Felipe Ruíz López (Ingeniería. Extranjero, 1974)
16. – *El significado teórico de los términos descriptivos/Carlos Solís Santos*
(Filosofía. España, 1973)
17. – *Encaje de los modelos econométricos en el enfoque objetivos-instrumentos relativos de política económica./ Gumersindo Ruíz Bravo*
(Sociología. España, 1971)
18. – *La imaginación natural (estudio sobre la literatura fantástica norteamericana).* / Pedro García Montalvo
(Literatura y Filología. Extranjero, 1974)
19. – *Estudio sobre la hormona Natriurética.* / Andrés Purroy Unanua
(Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1973)
20. – *Análisis farmacológico de las acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-Adrenérgicos./ José Salvador Serrano Molina*
(Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1970)
21. – *El hombre y el diseño industrial./Miguel Durán-Lóriga*
(Artes Plásticas. España, 1974)
22. – *Algunos tópicos sobre teoría de la información./ Antonio Pascual Acosta*
(Matemáticas. España, 1975)
23. – *Un modelo simple estático. Aplicación a Santiago de Chile*
Manuel Bastarache Alfaró (Arquitectura y Urbanismo. Extranjero, 1973)
24. – *Moderna teoría de control: método adaptativo-predictivo*
Teoría y realizaciones. /Juan Manuel Martín Sánchez
(Ingeniería. España, 1973)
25. – *Neurobiología (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
26. – *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
27. – *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
28. – *Investigación y desarrollo de un analizador diferencial digital (A.D.D.) para control en tiempo real.* /Vicente Zugasti Arbizu
(Física. España, 1975)
29. – *Transferencia de carga en aleaciones binarias./ Julio A. Alonso*
(Física. Extranjero, 1975)
30. – *Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.* / José Luis Sebastian Franco.
(Física. Extranjero, 1974)

31. – *Estudio de los transistores FET de microondas en puerta común.* Juan Zapata Ferrer. (Ingeniería. Extranjero, 1975).
32. – *Estudio sobre la moral de Epicuro y el Aristóteles esotérico.* / Eduardo Acosta Mendez (Filosofía. España, 1973)
33. – *Las Bauxitas Españolas como mena de aluminio.* / Salvador Ordoñez Delgado (Geología. España, 1975).
34. *Los grupos profesionales en la prestación de trabajo: obrero y empleados.* / Federico Durán López (Derecho. España, 1975)
35. – *Obtención de Series aneuploides (monosómicas y ditelosómicas) en variedades españolas de trigo común.* / Nicolás Jouve de la Barreda. (Ciencias Agrarias. España, 1975).
36. – *Efectos dinámicos aleatorios en túneles y obras subterráneas.* / Enrique Alarcón Alvarez. (Ingeniería. España, 1975).
37. – *Lenguaje en periodismo escrito.* / Fernando Lázaro Carreter, Luis Michelena Elissalt, Robert Escarpit, Eugenio de Bustos, Víctor de la Serna, Emilio Alarcos Llorach y Juan Luis Cebrián. (Seminario organizado por la Fundación Juan March los días 30 y 31 de mayo de 1977).
38. – *Factores que influyen en el espigado de la remolacha azucarera, Beta vulgaris L.* / José Manuel Lasa Dolhagaray y Antonio Silván López. (Ciencias Agrarias. España, 1974).
39. – *Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos. Productos finitos de espacios con topologías proyectivas de funciones reales.* / José Luis Blasco Olcina (Matemáticas. España, 1975).
40. – *Estructuras de la épica latina.* / M^a. del Dulce Nombre Estefanía Alvarez. (Literatura y Filología, España, 1971).
41. – *Comunicación por fibras ópticas.* / Francisco Sandoval Hernandez (Ingeniería. España, 1975).
42. – *Representación tridimensional de texturas en chapas metálicas del sistema cúbico.* / José Antonio Pero-Sanz Elorz (Ingeniería. España, 1974).
43. – *Virus de insectos: Multiplicación, aislamiento y bioensayo de baculovirus.* / Cándido Santiago-Alvarez. (Ciencias Agrarias. Extranjero, 1976).
44. – *Estudio de mutantes de saccharamyces cerevisiae alterados en la biosíntesis de proteínas.* / Lucas Sanchez Rodriguez. (Biología. España, 1976).

45. – *Sistema automático para la exploración del campo visual.*
José Ignacio Acha Catalina (Medicina, Farmacia y Veterinaria.
España, 1975).
46. – *Propiedades físicas de las variedades de tomate para recolección
mecánica/ Margarita Ruiz Altisent (Ciencias Agrarias. España 1975).*
47. – *El uso del ácido salicílico para la medida del p^H intracelular en
las células de Ehrlich y en escherichia coli/ Francisco Javier
García-Sancho Martín. (Medicina, Farmacia y Veterinaria.
Extranjero, 1974).*
48. – *Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación
de noradrenalina en la neurona adrenérgica periférica./
Antonio García García. (Medicina, Farmacia y Veterinaria.
España, 1975).*
49. – *Introducción a los espacios métricos generalizados.*
Enrique Trillas y Claudi Alsina. (Matemáticas. España, 1974).
50. – *Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados./ Enrique
Pando Ramos (Química, España, 1975).*
51. – *Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la
mejora./ Fernando Orozco y Carlos López-Fanjul (Biología
Genética. España, 1973).*
52. – *Mecanismos neurales de adaptación visual a nivel de la capa
plexiforme externa de la retina./ Antonio Gallego Fernández
(Biología Neurobiología. España, 1975).*
53. – *Compendio de la salud humana de Johannes de Ketham./ M^a.
Teresa Herrera Hernández. (Literatura y Filología. España 1976).*
54. – *Breve introducción a la historia del Señorío de Buitrago./ Rafael
Flaquer Montequí. (Filosofía y Letras. España, 1975).*
55. – *Una contribución al estudio de las teorías de cohomología
generalizadas./ Manuel Castellet Solanas. (Matemáticas.
Extranjero, 1974).*
56. – *Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación
por proteasas lisosomales./ Pedro Sánchez Lazo. (Medicina,
Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1975).*

