

## Trabajos originales

### **Acción del interferón linfoblastoide humano frente a la infección por virus herpes simplex tipo 1**

ALBERTO MUÑOZ Y LUIS CARRASCO

Departamento de Microbiología, Centro de Biología Molecular  
Universidad Autónoma de Madrid, Canto Blanco, Madrid-34

#### RESUMEN

Las bases moleculares de la acción antiherpética del interferón no son bien conocidas.

Nuestro trabajo está orientado hacia el estudio de las bases moleculares de la acción del interferón linfoblastoide humano sobre el virus *herpes simplex* tipo 1 en células HeLa. Se demuestra que la síntesis de proteínas y de ADN virales no son bloqueadas durante las fases tempranas de la infección.

Se estudia también las características de las partículas virales producidas en las células tratadas con interferón.

Los resultados obtenidos demuestran que la acción del interferón se ejerce en alguna de las etapas tardías del ciclo de replicación viral.

#### SUMMARY

The molecular basis of the interferon antiherpetic action are not well known.

Our work is directed toward the study of the molecular basis of the antiviral action of human lymphoblastoid interferon on *herpes simplex* type 1 in HeLa cells.

The results of this work show that viral proteins and DNA synthesis are not inhibited by interferon during the early steps of virus replication.

The characteristics of viral particles produced in cells treated with interferon are also studied.

It is demonstrated that interferon's action on *herpes simplex* virus type 1 is exerted in some of the late steps of the viral replication cycle.

## INTRODUCCION

Los interferones son una familia de proteínas producidas y secretadas al medio por las células de animales superiores en respuesta a distintos estímulos que son capaces de ejercer diversas actividades biológicas (Stewart II, 1981). Entre éstas se encuentra su capacidad para inhibir la replicación de un amplio rango de virus. La etapa del ciclo viral que es bloqueada por el tratamiento de las células con interferón varía de un virus a otro. En la mayoría de los casos parece tratarse de una fase temprana, la transcripción o la traducción (Sen, 1982; Lengyel, 1982).

La acción antiherpética del interferón es hoy bien conocida. Sin embargo, poco es lo que se sabe por el momento acerca de su mecanismo molecular. Nuestro trabajo se ha orientado al estudio de las bases moleculares del bloqueo que el interferón linfoblastoide humano (HuIFN- $\alpha$  (Ly)) ejerce sobre el virus *herpes simplex* tipo 1 (HSV-1).

## MATERIALES Y METODOS

### Materiales

El interferón linfoblastoide humano (HuIFN- $\alpha$  (Ly);  $1,6 \times 10^6$  U/mg de proteína) fue generosamente cedido por los Drs. Finter, Fantes y Johnston de los Laboratorios Wellcome, Beckenham, Inglaterra. Los productos radiactivos fueron suministrados por The Radiochemical Centre, Amersham (Inglaterra). Los medios de cultivo y el material de plástico para el crecimiento de células fueron adquiridos a Gibco Biocult y Falcon Plastics respectivamente.

### Células y virus

Las células humanas HeLa fueron crecidas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (E4D) suplementado con un 10% de suero de ternera recién nacida (E4D10).

Los virus *herpes simplex* tipos 1 y 2 (HSV-1, HSV-2) fueron crecidos en monocapas de células HeLa en el medio mencionado suplementado con un 2% de suero de ternera (E4D2).

### Condiciones de la infección viral y medida de la síntesis de proteínas

Las células HeLa crecidas en placas de 24 pocillos de 16 mm de diámetro (Linbros) fueron infectadas con el virus correspondiente a la multiplicidad de infección descrita en cada experimento; después de 1,5 h de incubación a 37°C se eliminó el medio, añadiéndose 0,5 ml de medio E4D2 fresco. Para marcar las proteínas las células fueron incubadas durante períodos de una hora en 0,5 ml de medio carente de metionina suplementado con un 1% de suero de ternera y 0,1-0,2  $\mu$  Ci de ( $^{35}$ S) metionina (1100 Ci/mmol; 5,4 mCi/ml). Una vez finalizado el período de marcaje el medio fue eliminado y las células lavadas con solución salina tamporada con fosfato (PBS), precipitadas con ácido tricloroacético al 5% y lavadas tres veces con etanol. Las monocapas fueron a continuación secadas bajo una lámpara de rayos infrarrojos y disueltas en 225  $\mu$ l de NaOH 0,1 N con dodecilsulfato sódico (SDS) al 1%. La radiactividad presente en alícuotas de 125  $\mu$ l fue estimada usando líquido de Brays en un contador de centelleo líquido Intertechneque.

### **Análisis de las proteínas sintetizadas en células infectadas por virus**

Al finalizar el período de marcaje con el isótopo correspondiente las células se lavaron con tampón fosfato y se disolvieron en 200  $\mu$ l de NaOH 0,02N con SDS al 1% y 200  $\mu$ l de tampón de electroforesis (glicerol al 17%, ditiotretitol 0,1 M, Tris-ClH 0,37 M, pH 6,8, SDS al 1% y azul de bromofenol 0,024% como indicador). Las muestras fueron a continuación sonificadas con objeto de reducir su viscosidad y calentadas a 90°C durante 5 min. 10  $\mu$ l de cada muestra fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% a 30 V durante toda la noche. Una vez secos, los geles fueron sometidos a autorradiografía según el método previamente descrito (Muñoz y Carrasco, 1981). La digitalización de los autorradiogramas se realizó mediante un microdensitómetro digital Optronics P1700 conectado en líneas con un microordenador PDP 11/45.

### **Medida de la glicosilación de proteínas en células en cultivo**

El nivel de glicosilación de las proteínas se estimó mediante pulsos de 15  $\mu$  Ci/ml de (<sup>3</sup>H) glucosamina de la duración indicada en un medio carente de glucosa y suplementado con una cantidad de ácido pirúvico diez veces superior a la normal y 2% de suero de ternera dializado previamente frente a PBS. El procesamiento y análisis electroforético de las muestras fue el mismo que el empleado en el caso de marcaje de proteínas con (<sup>35</sup>S) metionina.

### **Medida de la fosforilación de proteínas en células en cultivo**

El nivel de fosforilación de las proteínas se estimó mediante pulsos de 25  $\mu$  Ci/ml de (<sup>32</sup>P) fosfato de la duración indicada en un medio sin fosfato con 10 mM Hepes pH 7,4 y suplementado con un 2% de suero fetal de ternera dializado frente a medio de Hanks sin fosfato. El procesamiento y análisis electroforético de las muestras fue el mismo que el empleado en el caso de marcaje de proteínas con (<sup>35</sup>S) metionina.

### **Obtención y análisis de viriones marcados radiactivamente**

Con objeto de disponer de viriones de HSV-1 marcados radiactivamente en el ADN se infectaron monocapas confluentes de células HeLa control y tratadas con interferón (400 U/ml durante las 18 horas anteriores a la infección), crecidas en placas Petri de 100 mm de diámetro, con HSV-1 a una mdi de 5 ufp/célula. Para marcar el ADN se añadió a la tercera hora de infección (<sup>3</sup>H) timidina (20  $\mu$  Ci/ml) al medio E4D2, continuándose el marcaje hasta el final de la infección. Al concluir la infección se recolectó el medio con las células, dándose diez pases por un Potter estéril con objeto de romper los restos celulares. A continuación se llevó a cabo una centrifugación a 6.000 r.p.m. durante 15 minutos en un rotor SS34 a 2°C. El sobrenadante se centrifugó posteriormente en tampón fosfato sobre un colchón de sacarosa al 10% en tampón fosfato a 30.000 r.p.m. durante 90 minutos en un rotor SW50, precipitando los virus en el fondo del tubo, que fueron resuspendidos en tampón fosfato.

Los viriones así obtenidos marcados radiactivamente en su ADN fueron analizados mediante cromatografía en columna de Sepharose 6B de 4 x 0,5 cm previamente equilibrada con tampón fosfato. Se recogieron fracciones de 200  $\mu$ l en tubos de polipropileno, cuya radiactividad fue estimada añadiendo 2 ml de líquido de Bray.

### Tinción negativa de viriones

Con el fin de llevar a cabo la tinción negativa de viriones producidos en células control y tratadas con interferón, tras su crecimiento y recolección se colocó una gota de la suspensión viral correspondiente sobre rejillas de 400 mesh recubiertas por una película de carbón y colodión. Después de 30 segundos de adsorción se retiró el líquido con papel de filtro y se tiñeron con ácido fosfotúngstico al 2% en agua destilada llevado al pH 7 con NaOH.

### Entrada de virus en células en cultivo

El análisis de la capacidad de los virus de penetrar en el interior celular se llevó a cabo mediante cinéticas de incorporación de los componentes víricos (ADN) a la fracción de material intracelular insoluble en ácido tricloroacético (TCA) tras la adición de viriones marcados radiactivamente a cultivos celulares a 37°C. Como control de la cantidad de virus que es capaz de absorberse a las células pero no de pasar a su interior se realizaron cinéticas paralelas a 4°C. A los tiempos indicados en cada caso después de la adición del virus a las monocapas celulares se eliminó el no absorbido mediante sucesivos lavados de las monocapas con 1 ml de PBS frío, 0,5 ml de medio E4D sin suero y 0,5 ml de medio E4D con tripsina al 0.0025%. A continuación se añadió TCA al 5% y, transcurridos cinco minutos, se lavó dos veces con etanol. Las monocapas fueron disueltas en 220 µl de NaOH 0,1 N con 1% de SDS, estimándose la radiactividad presente en 150 µl utilizando líquido de Bray.

## RESULTADOS

### Inhibición de la replicación del HSV-1 en células humanas HeLa

En primer lugar estudiamos el efecto que tiene el tratamiento de células HeLa con interferón sobre la multiplicación del HSV-1. Como se muestra en la Tabla I, el pretratamiento

Tabla I

INHIBICION DE LA REPLICACION DEL HSV-1 EN CELULAS HeLa POR HuIFN- $\alpha$ (Ly)				
Exp.	mdi	HuIFN- $\alpha$ (Ly) (U/ml)	Producción de virus infectivo (u.f.p/ml $\times 10^{-7}$ )	%control
I	1	—	8,0	100
	1	4	1,6	20
	1	40	0,72	9
	1	400	0,36	4
	1	1000	0,16	2
II	0,01	—	1,4	100
	0,01	400	0,02	2
	0,1	—	1,8	100
	0,1	400	0,08	5
	1	—	2,4	100
	1	400	0,20	8
	10	—	3,6	100
10	400	0,44	12	

El interferón fue añadido a las células 18 h antes de la infección. El virus producido fue recolectado 48 h después de ésta.

De modo análogo se estudió el efecto que el tratamiento con interferón pudiera tener sobre la fosforilación de las proteínas virales. Tampoco se observaron en este caso (figura 3) diferencias respecto a las células no tratadas.

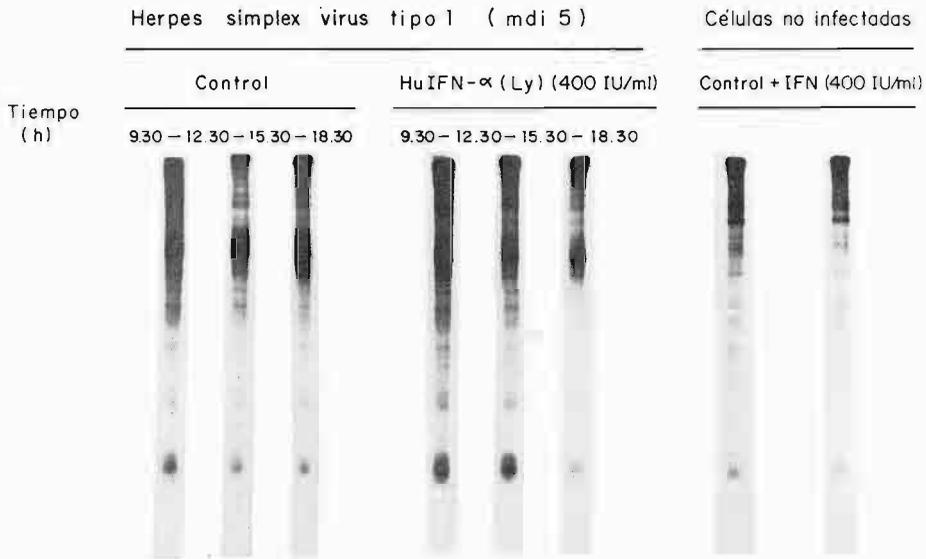


FIG. 3. Efecto del interferón sobre la fosforilación de las proteínas de HSV-1. El interferón fue añadido a las células 18 h antes de la infección. Las células fueron marcadas con 25  $\mu$  Ci/ml de ( $^{32}$ P) fosfato a los tiempos indicados y las proteínas analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida seguida de autorradiografía.

### Efecto del tratamiento con interferón sobre el estado de la membrana plasmática de las células infectadas por HSV-1

Con objeto de conocer si el pretratamiento con interferón provoca alguna alteración de la integridad de la membrana plasmática de las células infectadas por HSV-1, se llevó a cabo una cinética de los niveles celulares de  $^{86}\text{Rb}^+$  como marcador interno del contenido iónico (Resultados no publicados). Observamos cómo durante las primeras horas de infección no hay diferencias en los niveles de  $^{86}\text{Rb}^+$  entre células tratadas y no tratadas con interferón. Estos niveles comienzan a descender a partir de la hora sexta-octava de infección, siendo el descenso ligeramente más acusado a partir de la hora décima en las células tratadas con interferón, aunque no es probable que este hecho tenga significación en la inhibición de la producción de virus infectivo.

### Efecto del interferón sobre la síntesis de ADN viral

El estudio de la síntesis de ADN en las células tratadas con interferón reveló que si bien hay una marcada diferencia en la incorporación de timidina tritiada en DNA en células tratadas con interferón respecto a las no tratadas, el perfil de la síntesis es en ambos tipos de células similar, siendo probablemente atribuible dicha diferencia al conocido efecto inhibitorio del interferón sobre el transporte de dicho precursor al interior celular (Hilfenhaus *et al.*, 1976; Gewert *et al.*, 1981).

### Efecto del interferón sobre el ensamblaje e integridad de los viriones

Dada la imposibilidad de detectar modificaciones en la síntesis de los diferentes componentes que forman parte de los viriones se pasó a continuación a estudiar si, como parecía posible, el interferón afectaba alguno de los procesos finales del ciclo vírico (ensamblaje o liberación) tal como ha sido descrito en el caso de retrovirus (Friedman, 1977).

Con este objeto las células infectadas se marcaron con ( $^3\text{H}$ )-timidina desde la hora 3 a la 22 de la infección. Los viriones fueron extraídos y analizados mediante cromatografía en columna de Sepharose 6B. En la figura 4 se observa cómo la cantidad de partículas virales producidas en células control y en células tratadas con interferón es comparable, lo que sugiere que la síntesis de ADN vírico no está afectada.

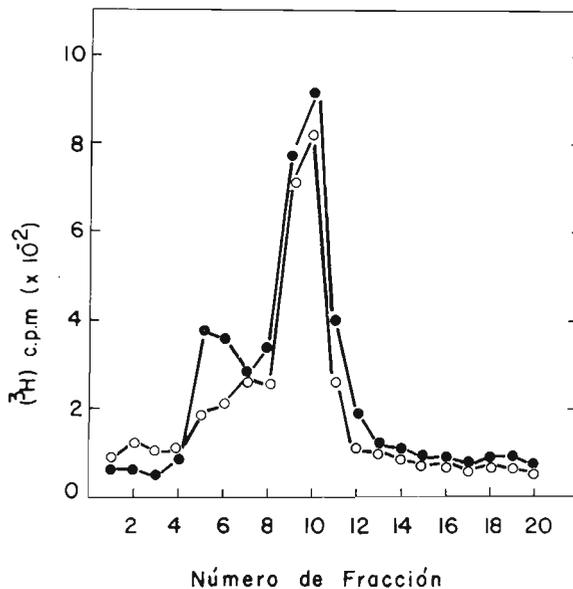


FIG. 4. Contenido de ADN de viriones formados en células HeLa tratadas y no tratadas con interferón.

Las células se crecieron en placas de 100 mm de diámetro. El interferón (400 U/ml) fue añadido a las células 18 h antes de la infección por HSV-1 a una multiplicidad 5. Tres horas después de ésta se adicionaron al medio 20  $\mu\text{Ci/ml}$  de ( $^3\text{H}$ )-timidina. Los viriones fueron extraídos a las 22 h de la infección y pasados a través de columnas de 2,5 ml Sepharose 6B. Se representa la radiactividad presente en fracciones de 250  $\mu\text{l}$ . (o - o) Virus extraídos de células tratadas con 400 U/ml de HuIFN- $\alpha$  (Ly); (● - ●) virus extraídos de células no tratadas.

A fin de analizar con más detalle si pudiera existir algún defecto en el ensamblaje de los viriones en células tratadas con interferón (carencia de envuelta...), los viriones obtenidos en células control y células tratadas con interferón fueron analizados mediante microscopía electrónica.

La tinción negativa de los viriones reveló la existencia de cuatro tipos diferentes de partículas virales en ambas preparaciones (Figura 5): partículas llenas de ADN con envuelta (a), partículas llenas sin envuelta (b), partículas sin ADN con envuelta (c) y partículas también vacías sin envuelta (d). No se observan diferencias ni en la morfología ni en el porcentaje de cada clase de viriones formados en ambos tipos de células. Sobre un número de 300 partículas en cada caso se obtuvieron las siguientes proporciones: 8% del tipo a, 7% del tipo b, 68% del tipo c y 17% del tipo d (células sin tratar), y 8% del tipo a, 4% del tipo b, 76% del tipo c y 12 del tipo d (células tratadas con IFN). El porcentaje de viriones conteniendo ADN es muy similar en células control y tratadas, lo que de nuevo sugiere la ausencia de inhibición de la síntesis de ADN viral en células tratadas con interferón.

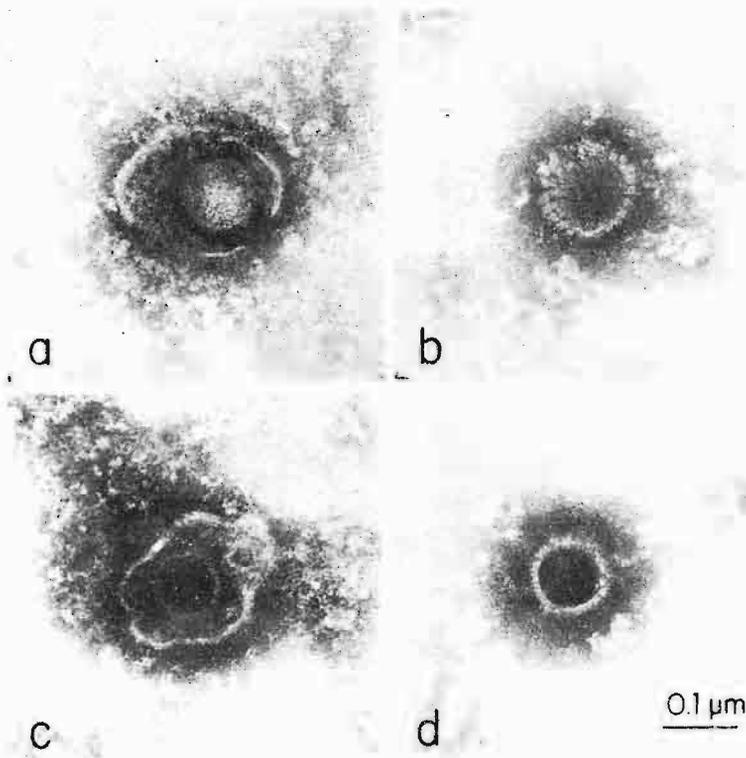


FIG. 5. Tipos morfológicos de partículas virales formados en células HeLa tratadas o no con interferón infectadas por HSV-1.

El tratamiento con Interferón fue llevado a cabo 18 h antes de la infección (5 u.f.p./célula). Los viriones fueron extraídos 22 h después de ésta y teñidos negativamente con ácido fosfotúngstico.

El estudio mediante microscopía electrónica de inclusiones de células infectadas por HSV-1 pretratadas o no con interferón tampoco ha permitido observar diferencias en la formación de partículas víricas, en el ciclo viral, ni en el efecto que dicha infección provoca en las células HeLa (desintegración del o de los nucleolos, desagregación de la cromatina y su distribución por la periferia nuclear, vacuolización del citoplasma...).

Se examinó a continuación la naturaleza y contenido de las proteínas incorporadas en viriones con objeto de comprobar si existen diferencias que puedan explicar la reducida infectividad de aquellos producidos en células tratadas con interferón. Para ello se obtuvieron viriones crecidos en células control y tratadas con interferón que habían sido marcados con ( $^{35}\text{S}$ )-metionina en sus proteínas analizándose posteriormente éstas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. La figura 6 pone de manifiesto diferencias en el contenido de proteínas entre los viriones crecidos en células control y los crecidos en células tratadas con interferón, hecho que revela la existencia de alguna alteración del proceso de ensamblaje de las proteínas virales en éstas, que puede ser la responsable del descenso de la infectividad de los viriones formados.

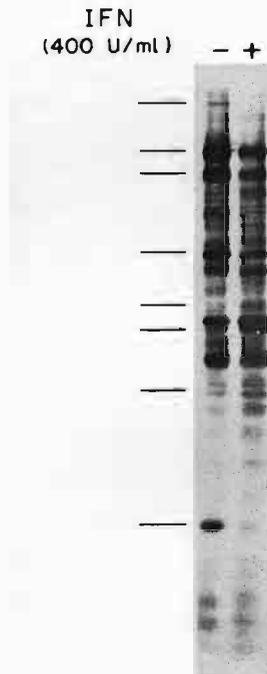


FIG. 6. Efecto del interferón sobre el ensamblaje de las proteínas de HSV-1 en viriones. Las células fueron tratadas e infectadas como en el caso de la figura anterior. Al final del período de incubación con el virus y a las 2, 4, 6 y 8 h de éste se añadieron al medio carente de metionina  $5 \mu\text{Ci/ml}$  de ( $^{35}\text{S}$ )-metionina y sus proteínas analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

### Efecto del interferón sobre el segundo ciclo de replicación

Una vez establecido que en las células tratadas con interferón se produce un número de viriones similar al de células control, los cuales tienen además una morfología y contenido de ADN análogos, diferenciándose sólo en el contenido de algunas proteínas, se inició el estudio de la infectividad de dichos viriones.

Se examinó en primer lugar el efecto citopático producido por viriones crecidos en células control y tratadas con interferón (resultados no mostrados) en nuevas células HeLa control en un segundo ciclo infectivo como en células pretratadas con interferón. Se observó una reducción

de alrededor del 90% en la infectividad de los viriones crecidos en células tratadas, resultado que concuerda con los obtenidos en términos de unidades formadoras de placa (Tabla 1). Esta diferencia se mantiene cuando las células son pretratadas con interferón. Este hecho es importante pues indica que la replicación de los viriones infectivos producidos en células tratadas es inhibida cuando infectan en un segundo ciclo células tratadas con interferón, es decir, que los virus infectivos producidos en un primer ciclo de replicación en células tratadas no son intrínsecamente resistentes al interferón y, por tanto, seleccionados, puesto que su replicación es bloqueada en células tratadas con interferón en el que sería el segundo ciclo de infección.

Se estudió a continuación la posibilidad de que los virus formados en células tratadas con interferón pudieran ser defectivos en el reconocimiento, unión o entrada en células HeLa. Con este objeto se obtuvieron viriones marcados en el ADN o en sus proteínas, analizándose la cinética de entrada de su marca radiactiva en células HeLa utilizando como control virus crecido en células no tratadas (figura 7). Se observa sólo una ligera reducción de alrededor del 10-30% en la internalización, resultado que sugiere que los viriones formados en células tratadas con interferón tienen capacidad de unirse y penetrar en una segunda célula para iniciar un nuevo ciclo de infección similar a la de virus formados en células control.

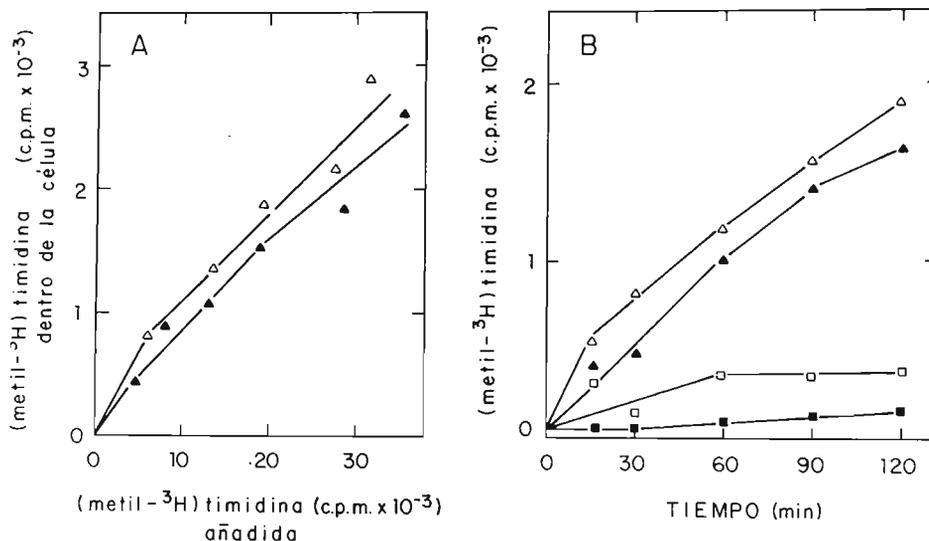


FIG. 7. Entrada en nuevas células de HSV-1 crecido en células HeLa tratadas o no con interferón. Se añadieron viriones marcados en el ADN a monocapas de células HeLa crecidas en Linbros de 24 pocillos, siendo su paso al interior celular analizado según se describe en Materiales y Métodos (  $\Delta$  ) Entrada de virus crecido en células tratadas con 400 U/ml de HuIFN- $\alpha$  (Ly). (  $\blacktriangle$  ) Entrada de virus crecido en células no tratadas. A) Curvas de concentración de la entrada de virus marcado en el ADN B) Cinética de la entrada de virus marcado en el ADN: las líneas continuas representan la entrada a 37°C y las líneas discontinuas la entrada a adsorción a 4°C.

Finalmente, dada la ausencia de efecto citopático observada cuando se emplean viriones crecidos en células tratadas, se analizó la síntesis de proteínas a lo largo de la infección de células HeLa por HSV-1 crecido en células control o tratadas. La figura 8 muestra cómo en el caso de virus crecido en células tratadas con interferón no se detecta la síntesis de proteínas víricas durante el período normal de infección, siendo aparente sólo la síntesis de proteínas

celulares. Este resultado está de acuerdo con la inhibición del efecto citopático e indica que aunque los viriones crecidos en células tratadas con interferón son capaces de entrar en células HeLa, el segundo ciclo de replicación está bloqueado en una etapa temprana, puesto que no tiene lugar la síntesis de proteínas virales.

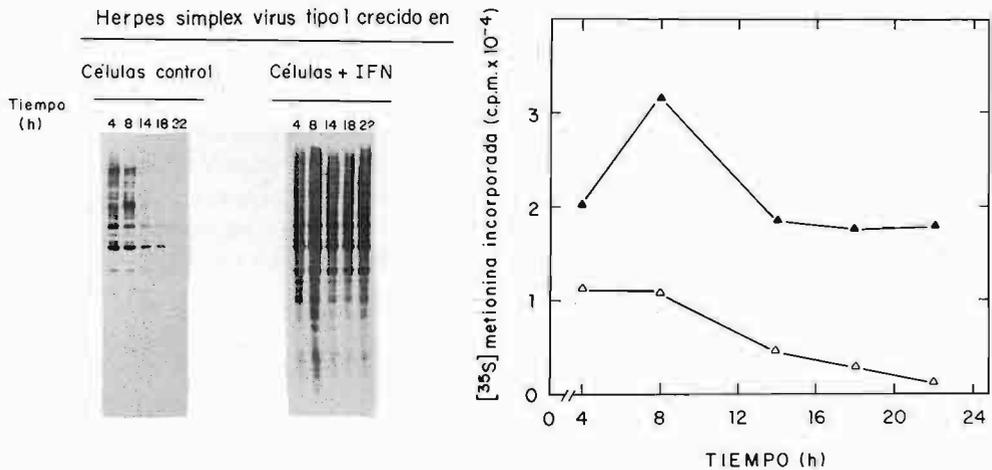


FIG. 8. Síntesis de proteínas en células HeLa infectadas por HSV-1 crecido en células control o en células tratadas con interferón. Células HeLa crecidas en placas p35 fueron infectadas con el mismo volumen de HSV-1 crecido en control o tratadas con 400 U/ml de interferón. (▲ - ▲) células infectadas por HSV-1 crecido en células tratadas; (△ - △) células infectadas por HSV-1 crecido en células control.

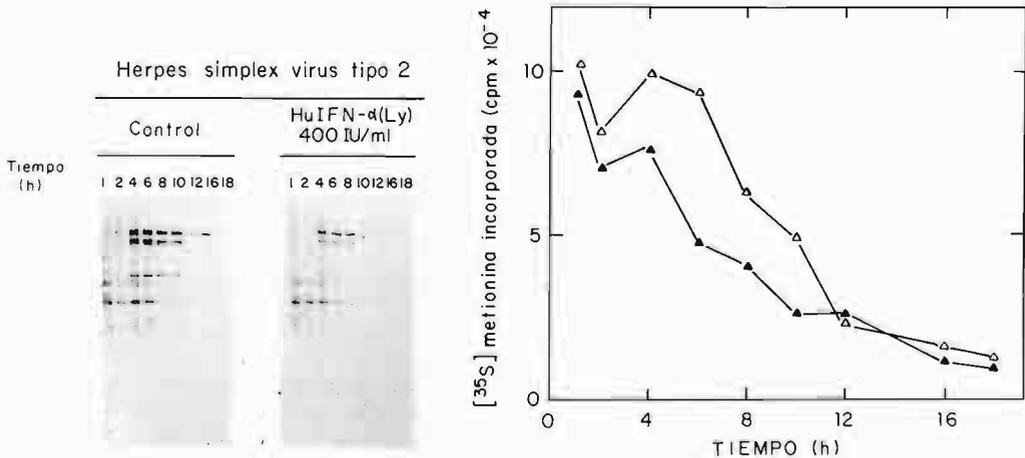


FIG. 9. Efecto del interferón sobre la síntesis de proteínas en células HeLa infectadas por HSV-2. El interferón fue añadido 18 h antes de la infección con 5 u.f.p./célula de HSV-2. El nivel de la síntesis de proteínas y el análisis de éstas se llevó a cabo a los tiempos después de la infección indicados según ya se ha descrito (△ - △). Células no tratadas. (▲ - ▲) Células tratadas con 400 U/ml HuIFN-α (Ly).

Con objeto de comprobar si los resultados obtenidos eran generalizables a otro de los herpesvirus de más importancia médica, el virus *herpes simplex* tipo 2 (HSV-2), llevamos a cabo un estudio del efecto del interferón sobre la síntesis de proteínas en células HeLa infectadas por HSV-2. De acuerdo con los resultados observados en la figura 9, el HuIFN-  $\alpha$  (Ly) es más efectivo contra el HSV-2 que en el caso del HSV-1. Estos resultados son, además, corroborados por el análisis de la producción de unidades formadoras de placa. Como en el caso del HSV-1, la inhibición de la síntesis de proteínas celular no es evitada por el tratamiento con el interferón. Es posible también detectar la mayor parte de las proteínas virales. Sin embargo, alguna de éstas en particular es más drásticamente inhibida que en el caso del HSV-1.

## DISCUSION

Debido a su posible potencial clínico, la investigación sobre el interferón ha sido muy intensa durante los últimos años. Hoy en día han quedado establecidos los efectos del interferón sobre la queratitis herpética, herpes labial y, posiblemente, herpes genital (Merigan, 1981). Sin embargo, son aún escasos los datos conocidos sobre la base molecular de la inhibición de los herpesvirus por el interferón. Nuestros estudios han revelado que, a diferencia de lo que ocurre en el caso de la mayoría de los virus cuyo material genético es ARN (Muñoz y Carrasco, 1981), el interferón no bloquea la síntesis de los componentes virales (ADN y proteínas) durante las fases tempranas de la infección. En las células tratadas con interferón se forma un número de partículas virales comparable al de células control, la mayor parte de las cuales son, sin embargo, no infectivas. La comparación de ambos tipos de viriones indica la existencia de algunas diferencias en el contenido de cierto número de proteínas. Estos viriones alterados son capaces, sin embargo, de penetrar en nuevas células, en las cuales no pueden replicarse, estando bloqueada su síntesis de proteínas. El efecto del interferón tiene lugar, por tanto, a nivel de alguna etapa tardía del ciclo de desarrollo de los herpesvirus, probablemente del ensamblaje de las proteínas virales, lo que origina la formación de partículas virales defectivas.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a la Srta. Ma. Angeles Ramos por su excelente asistencia técnica, y a la Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer, CAICYT y Plan Concertado de Investigación No. 5/78 por su ayuda económica.

## REFERENCIAS

- BAGLIONI, C. (1979). *Interferon induced enzymatic activities and their role in the antiviral states*. Cell, **17**, 255-264.
- FRIEDMAN, R. M. (1977). *Antiviral activities of interferons*. Bacteriol. Rev. **41**, 543-567.
- GEWERT, D. R.; S. SHAH y M. J. CLEMENS (1981). *Inhibition of cell division by interferons: changes in the transport and intracellular metabolism of thymidine in human lymphoblastoid cells*. Eur. J. Biochem. **116**, 487-492.
- HILFENHAUS, H.; H. DAMM; H. E. KARGES y K. F. HANTLEY (1976). *Growth inhibition of human lymphoblastoid daudi cells in vitro by interferon preparations*. Arch. Virol. **51**, 87-97.

- LENGYEL, P. (1982). *Biochemistry of interferons and their actions*. Ann. Rev. Bioch. **51**, 251-282.
- MERRIGAN, T. C. (1981). *Present appraisal of and future hopes for the clinical utilization of human interferon*. En: Interferon **3**. Editor: I. Gresser, Academic Press 135-154.
- MUÑOZ, A. y L. CARRASCO (1981). *Protein synthesis and membrane integrity in interferon-treated HeLa cells infected with encephalomyocarditis virus*. J. Gen. Virol. **56**, 153-162.
- SEN, G.C. (1982). *Mechanism of interferon action: progress towards its understanding*. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. **27**, 105-156.
- STEWART, W. E. (1981). *The Interferon System*. Editado por Springer Verlag.
- WILLIAMS, B. R. y I. M. KERR (1980). *The 2-5a (ppa2'-p5'-a2'-p5'-a) system in interferon-treated and control cells*. Trends Bioch. Sci. **5**, 138-140.