

Efecto de la cepa atenuada (TC-83) del virus de la Encefalitis Equina Venezolana sobre la transcripción nuclear en las células cerebrales de ratas.

Nereida Valero-Fuenmayor, Florencio Añez y María Emelina Teruel-López.

Instituto de Investigaciones Clínicas. Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 1151, Maracaibo, Venezuela.

Palabras claves: TC-83, RNA Polimerasas, Encefalitis Equina Venezolana, transcripción.

Resumen. En el presente estudio fué evaluado el efecto que produce la cepa atenuada TC-83 del virus de la Encefalitis Equina Venezolana (E.E.V.) sobre la transcripción nuclear en células cerebrales de ratas. La actividad transcriptiva de las enzimas ARN polimerasas dependientes de ADN (tipos I y II) fué determinada en los núcleos aislados de cerebros de ratas infectadas y controles por medición de la incorporación del [3H] UTP. Simultáneamente se estudió la curva de replicación viral en el cerebro y el suero de las mismas por el método de plaqueo en cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo. La actividad de la polimerasa I sólo disminuyó significativamente después de 25 horas de la infección ($p < 0.05$) con respecto a los valores de los controles, mientras que la actividad de la polimerasa II se redujo progresiva y significativamente desde los estadios iniciales de la infección a las 10, 15, 20 y 25 horas post-infección, en comparación con los controles. El virus no se detectó en el cerebro sino después de 25 horas de la infección, con títulos muy bajos ($< 0.7 \text{ Log}_{10} \text{ U.F.P./ml}$), mientras que en sangre se demostró la presencia viral desde las 10 horas. Nuestros resultados demuestran un marcado efecto temprano (primeras 25 horas) de la cepa atenuada sobre la transcripción nuclear, aún antes que el virus fuera detectado en el cerebro de las ratas infectadas. Este hallazgo sugiere un mecanismo de acción que amerita la realización de estudios complementarios que puedan aclarar la respuesta metabólica cerebral y la patogénesis de las infecciones por el virus de la Encefalitis Equina Venezolana.

Effect of the attenuated strain (TC-83) of the Venezuelan Equine Encephalitis virus on the nuclear transcription of rat brain cells
Invest Clin 37(1): 5-15, 1996

Key words: TC-83, RNA polymerases, Venezuelan equine Encephalitis, transcription.

Abstract. In the present study the effect of the attenuated strain TC-83 of the Venezuelan Equine Encephalitis virus on the nuclear transcription in brain cells of rats was assessed. The transcription activity of the DNA depending RNA polymerases (types I and II) in the isolated nuclei of brain of infected rats and controls was determined by incorporation of the [3H] UTP. Simultaneously a viral replication curve in the brain and the serum was carried out by plaque forming method in chicken embryo cell cultures. RNA polymerase I activity was only significantly reduced after 25 hours of infection, respect to control values, while polymerase II activity was progressive and significantly diminished from inicial stages of the viral infection at 10, 15, 20 y 25 hours post-infection compared to control values. The virus was not detected in the brain but after 25 hours post-infection with very low titers (<0.7 log₁₀ P.F.U./ml.), while the viral presence in the blood was demonstrated after a 10 hour period. Our results demonstrated a marked effect of the attenuated strain on the brain nuclear transcription, although the presence of the virus was not detected in the brain of the infected rats. This finding suggest a mechanism of action which deserves further studies to elucidate the cerebral metabolic response and the pathogenesis of the Venezuelan Equine Encephalitis infection.

Recibido: 31-1-95. Aceptado: 18-10-95

INTRODUCCION

El virus de la Encefalitis Equina Venezolana , muestra en la naturaleza un espectro de cepas virulentas y avirulentas formando un complejo, entre las que se encuentran cuatro subtipos (I, II, III, IV), y cinco variantes antigénicas (IA a IE) dentro del subtipo I (2, 33). La patogénesis de dichas variantes ha sido ampliamente estudiada a nivel experimental con diversos animales. Los numerosos reportes, (1, 12, 13,

15, 16, 17, 21, 26, 28, 29, 32, 34) que comparan , las curvas de crecimiento e histopatología de las cepas virulenta (63Z21) y atenuada (TC-83) del virus de la Encefalitis Equina Venezolana, demuestran que la cepa virulenta causa enfermedad y muerte en los animales dentro de los 3 a 5 días después de la inoculación, y causa lesiones como hemorragia cerebral y daño en las células de Purkinje; mientras que la infección con la TC-83 provoca inflamación de las células gliales en la corteza cerebral.

El desarrollo de las lesiones histopatológicas se correlaciona con el grado de virulencia de la cepa viral, medido por su letalidad y período de incubación (1, 29), al reportar menos del 20% de mortalidad con la cepa atenuada, aún cuando el título máximo de esta cepa es similar en el cerebro, nódulos linfáticos, bazo y médula ósea de los animales estudiados, sólo que los picos de la curva de crecimiento de la cepa atenuada se producen casi un día después que la cepa virulenta (28).

Otros estudios anatomopatológicos reportan cambios en las células de la corteza cerebral, desmielinización de los tractos olfatorios laterales y necrosis de las neuronas del bulbo olfatorio, durante la fase aguda de infección con las cepas atenuadas TC-83 y Fe3-7c del virus de la Encefalitis Equina Venezolana en hamsters infectados experimentalmente (7, 18). Así mismo han sido ampliamente documentadas la tasa de crecimiento celular y la de adsorción en cultivos celulares de las cepas virulenta y atenuada del mismo virus, al encontrar grandes variaciones dependientes de la célula huésped más que de la especie, en vista de que en cultivo primario embrionario de hamsters, la cepa virulenta crece más rápido que la atenuada, y alcanzan ambas cepas concentraciones iguales en el período inicial (aproximadamente a las 12 horas) del ciclo de reproducción viral, en contraste, en cultivo celular de riñón de hamsters bebé (BHK-21), la cepa atenuada muestra un rápido crecimiento y título de mayor con-

centración que el mostrado por la cepa virulenta (28).

Por otra parte, en cuanto a cambios bioquímicos que se suceden por la multiplicación de la cepa virulenta del virus de la Encefalitis Equina Venezolana en un huésped determinado, está bien establecido que se producen cambios en la síntesis de ARN celular, proteínas y aminoácidos, (5, 14, 25, 26). Además se producen alteraciones enzimáticas en diferentes vías metabólicas, como es el caso de las enzimas tirosina hidroxilasa (23) y colina acetil transferasa (4), cuyas actividades disminuyen en las regiones cerebrales de ratas y ratones infectados con la cepa Goajira del virus de E.E.V.. De igual forma se ha reportado la susceptibilidad de las enzimas nucleares ARN polimerasas a ser alteradas desde la etapa inicial de la enfermedad (30, 31) y el aumento en la actividad de la fosfatasa ácida en el cerebro de ratones recién nacidos infectados con el mismo virus (11).

Hasta el presente, existen pocos reportes sobre alteraciones bioquímicas en animales infectados con la cepa atenuada TC-83 y los mismos indican modificaciones en la tasa de recambio de las catecolaminas, no así en los niveles de las mismas en el sistema nervioso central en ratones infectados experimentalmente (24). Las investigaciones han centrado su atención en estudios histológicos y curvas de crecimiento de dicha cepa (10, 13, 17, 18) y si se toma en cuenta que la misma es utilizada a nivel mundial para realizar inmunización contra la Encefa-

litis Equina Venezolana en humanos y équidos expuestos se hace prioritario la necesidad de realizar estudios que suministren datos al respecto. En base a esta escasa información el presente trabajo se propone determinar la actividad de las enzimas ARN polimerasas tipo I y II en los núcleos cerebrales de ratas infectadas con la cepa TC-83 del virus de E.E.V., al tiempo que se estudia la curva de replicación del virus tanto en cerebro como en suero.

MATERIAL Y METODOS

Virus: Se utilizó la cepa atenuada TC-83, derivada originalmente de 83 pasajes seriados de la cepa virulenta Trinidad-Donkey en cultivo de células de corazón de feto de cobayo (8); donada por el Laboratorio de Biología de Virus del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C.)

Animales: Se emplearon 120 ratas Sprague-Dawley adultas machos de 200-250 gramos de peso, alimentadas "*ad libitum*". Se inocularon por vía intraperitoneal con 0,3 ml. de una suspensión viral de 1000 DL₅₀ de la cepa, diluida en solución borato salina pH 9,0 con albúmina bovina al 0,4% p/v estéril (BABS 0,4%)(22). Los animales de los grupos controles recibieron un volumen igual de diluyente empleado, y fueron sometidos a condiciones experimentales similares a los infectados.

Titulación viral: La DL₅₀ se calculó por el método de Reed-Muench

(27), y la curva de replicación viral en suspensión cerebral y suero de los animales infectados se cuantificó siguiendo la técnica de Bergold y cols. (3), en cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo.

Se congelaron todas las muestras a -70°C hasta su procesamiento.

Medición de la actividad enzimática: A las 10, 15, 20, 25 horas de post-infección los animales controles e infectados en grupos de tres fueron sacrificados, se extrajeron los hemisferios cerebrales para homogeneizarlos en una solución de sacarosa 2,2 M, fosfato de potasio 1 mM pH 7,6 y cloruro de magnesio 1 mM. Posteriormente el material se centrifugó a 90.000 xg en centrifuga Sorvall OTD-65. El precipitado de núcleos puros se suspendió en una solución tampón fría de 50 mM buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,0 con 20% v/v de glicerol, e inmediatamente utilizados para la determinación de la actividad de las ARN polimerasas según el método de Krawiec y cols. (20), realizando simultáneamente determinaciones en presencia de alfa amanitina (Sigma Chemical Co.) en una concentración de 2 ug/ml. con el fin de discriminar la actividad de la polimerasa I (alfa amanitina resistente) de la polimerasa II (alfa amanitina sensible). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, con controles apropiados de tiempo cero en cada una de ellas. El ADN se realizó por el método de Burton (6). Los resultados se expresan en pmoles de UMP incorporados por mg de ADN.

Análisis Estadístico: La significación estadística de los resultados fué valorada mediante el análisis de varianza (ANOVA) utilizando límites de significación de distribución de F para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Tal como se describe en la Tabla I, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad transcritiva de la polimerasa I en los grupos controles e infectados a las 10, 15 y 20 horas de post-infección, sin embargo los resultados indican una disminución significativa ($p < 0,05$) en la actividad de la misma a las 25 horas con respecto a los controles, en los cuales no se demostraron alteraciones de las enzimas ensayadas, en los tiempos estudiados.

En la Tabla II se presentan los resultados correspondientes a la actividad de la polimerasa II en la cual se observa disminución progresiva y significativa ($p < 0,01$) de la actividad enzimática, desde las 10 horas hasta las 25 horas post-infección.

En la Fig. 1 se observa con claridad un aumento en la inhibición de la actividad enzimática en los tiempos seleccionados, que en el caso de la polimerasa II fué inhibida en el 59,9% de su actividad, con respecto a los controles.

En la Fig. 2 se pueden apreciar los títulos (\log_{10} U.F.P./ ml.) de la cepa TC-83 en el suero y cerebro de las ratas infectadas en los mismos periodos de post-infección utilizados en la determinación de la activi-

dad enzimática, es notoria la aparición del virus en sangre desde estadios tempranos de la infección, aumentando progresivamente hasta alcanzar un valor máximo de 2,3 en el primer día de la infección. La multiplicación del virus en el cerebro no fué detectable hasta las 25 horas, no observándose en los animales signos visibles de enfermedad durante el tiempo estudiado.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente estudio hacen evidente que bajo las condiciones experimentales descritas, el virus atenuado TC-83 de la Encefalitis Equina Venezolana produce un indiscutible efecto sobre la transcripción nuclear, dada la inhibición mostrada por las enzimas ARN polimerasas I y II en los tiempos estudiados, hallazgo que concuerda con los obtenidos por Teruel y col. (30) con la cepa virulenta del mismo virus, sólo que el tiempo requerido para alterar la actividad enzimática fué mayor con la cepa atenuada. Este hecho se correlaciona además con lo reportado por Mecham y col. (26) al comparar, la tasa de síntesis de proteínas en cultivos celulares infectados por una cepa virulenta y la atenuada, en el cual se inhibió más tardíamente la síntesis proteica en las células infectadas con la cepa atenuada, lo que sugiere que tanto "*in vitro*" como "*in vivo*", las células infectadas con TC-83 producen virus por un tiempo más prolongado pero a una tasa menor.

TABLA I
ACTIVIDAD DE LA ARN POLIMERASA I EN NUCLEOS DE
CELULAS CEREBRALES DE RATAS

Horas Postinfección	Controles	Infectados	P
10	95,76 ± 1,69 ^a	87,93 ± 1,39	NS**
15	89,37 ± 1,73	84,05 ± 2,76	NS
20	92,66 ± 2,10	84,49 ± 1,82	NS
25	92,83 ± 1,29	82,59 ± 1,29	<0,05

* Cada valor representa el promedio ± el error estandar de 6 determinaciones.

** No significativo.

^a pmol UMP/mg ADN/15 min

TABLA II
ACTIVIDAD DE LA ARN POLIMERASA II EN NUCLEOS DE
CELULAS CEREBRALES DE RATAS

Horas Postinfección	Controles	Infectados	P
10	101,76 ± 1,80 ^a	88,79 ± 2,50	<0,05
15	100,82 ± 0,82	60,73 ± 1,40	<0,01
20	99,18 ± 1,96	57,02 ± 1,82	<0,01
25	104,93 ± 1,51	58,67 ± 1,54	<0,01

* Cada valor representa el promedio ± el error estandar de 6 determinaciones.

^a pmol UMP/mg ADN/15 min

Se han formulado posibles mecanismos de inhibición tanto para el proceso de transcripción como para la síntesis de proteínas en sistemas de replicación "*in vitro*" en los cuales se sugiere la presencia de un factor inhibidor sintetizado probablemente por el virus como tal, o como respuesta a una reacción inflamato-

ria (25, 26, 31), nuestros resultados, no obstante, no parecen evidenciar alguno de los mecanismos propuestos, y aún queda por determinar la causa del descenso en la actividad transcriptiva y precisar si la vulnerabilidad de las enzimas obedece a patrones de sensibilidad diferentes ante la infección por el virus o si la

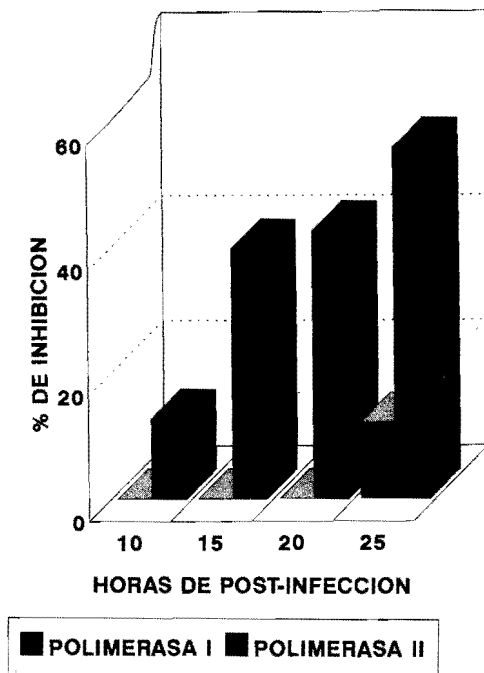


Fig. 1. Variaciones en porcentaje de inhibición en la actividad de las ARN polimerasas en núcleos celulares aislados del cerebro de ratas infectadas, con respecto a los controles.

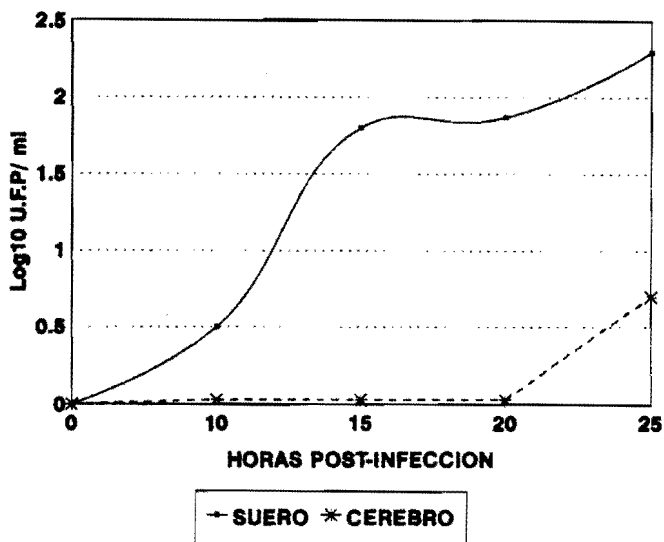


Fig. 2. Replicación viral en suero y cerebro de ratas infectadas en los distintos períodos de pots-infección. Determinación del título viral en cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo. Los puntos indican el promedio de tres ratas para cada tiempo.

cinética de síntesis y especies de ARN viral involucra la utilización de polimerasas virus específicas o por el contrario, se utilizan polimerasas celulares en la replicación viral tal como se ha descrito para otros virus de ARN en homogenados nucleares (9).

En cuanto a la viremia y replicación viral en el cerebro de los animales infectados, nuestros datos concuerdan con los obtenidos por otros autores (15, 16, 21, 34) según la especie de animal utilizado, no así con lo reportado por Austin y col. (1) para la cepa TC-83 cuya multiplicación en el cerebro de hamsters fué alta, comparada con la obtenida en este estudio en ratas, explicándose que esta diferencia, probablemente, sea debida a la mayor sensibilidad del hamster a ser infectado con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana.

Llama mucho la atención que aún cuando el virus no se mostró en el cerebro hasta las 25 horas, la actividad enzimática de la polimerasa II se inhibió desde las 10 horas de post-infección, lo que sugiere que la cantidad de partículas virales en el cerebro, necesarias para alterar la actividad de la polimerasa II, no parece ser factor crítico dentro del mecanismo de acción del virus. Se destaca además como un hecho muy significativo el alto porcentaje de inhibición que no se esperaba fuera tan marcado al tratarse de una cepa atenuada que por su misma naturaleza, su proceso de fijación a las células se supone menos eficiente que en las cepas virulentas y como

consecuencia debería afectar el tropismo tisular y reducir la virulencia de la misma (19).

No sabemos si el esquema antes descrito, se mantiene por períodos mayores a los ensayados en este estudio, por lo cual recomendamos se prolonguen los tiempos de infección a fin de caracterizar exhaustivamente el patrón de sensibilidad de las ARN polimerasas, en la infección con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana, como enzimas claves del metabolismo nuclear, así como la posible inclusión de otras enzimas presentes en el sistema nervioso central, por que aún cuando los resultados obtenidos en este estudio hacen obvio que la cepa atenuada TC-83 del virus de la E. E. V. es capaz de alterar la transcripción nuclear, se necesitan otros estudios que enfatizen en la correlación de la virulencia con la producción y alteraciones de metabolitos específicos, así como también en la identificación de los ácidos nucleicos, proteínas virales y celulares involucradas que pudieran proveer bases para definir con precisión la respuesta metabólica del huésped y la patogénesis de las infecciones por el virus de la Encefalitis Equina Venezolana.

AGRADECIMIENTO

Este proyecto de investigación ha sido subvencionado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia, (CONDES). Nuestro agradecimiento al Dr. Jesús Estévez por la

gran receptividad y colaboración prestada.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- AUSTIN F., SCHERER W.: Studies of viral virulence. I. Growth and histopathology of virulent and attenuated strain of Venezuelan Encephalitis Virus in hamsters. *Amer J Path* 62(2): 195-204, 1971.
- 2- BELLARD M., LEVINE S., BONILLA E.: Encefalitis Equina Venezolana. Revisión. *Invest Clfn* 30(1):31-58, 1989.
- 3- BERGOLD G., MAZZALI R.: Plaque formation by arboviruses. *J Gen Virol* 2:273-283, 1968.
- 4- BONILLA E., HERNANDEZ H., SALAZAR M., RANGEL P.: Effect of Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus infection on brain choline acetiltransferase and acetylcholinesterase activities. *Brain Res* 253:330-333, 1982.
- 5- BONILLA E., PRASAD A., ESTEVEZ J., HERNANDEZ H., ARRIETA A.: Changes in serum and striatal free amino acids after Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus infection. *Experimental Neurology* 99:647-654, 1988.
- 6- BURTON K.: Characterization of nucleic acids. In: *Methods in enzymology*. XII. p. 163. Grossman and Moldave, eds. Academic Press, New York, 1968.
- 7- DILL G., PEDERSON C., STOOKEY J.: A comparison of the tissue lesions produce in adult hamsters by two strains of avirulent Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus. *Amer J Path* 72(1):13-24, 1973.
- 8- FREITES F., GARCES A., GARCIA-TAMAYO J.: Alteraciones fetoplacentarias inducidas en ratas por la cepa TC-83 del virus de la Encefalitis Equina Venezolana. *Invest Clfn* 27(1):25-48, 1986.
- 9- FU T., TAYLOR J.: The RNAs of Hepatitis delta virus are copied by RNA polymerase II in nuclear homogenates. *J Virol* 67(12):6965-72, 1993.
- 10- GARCIA-TAMAYO J. Desarrollo del virus de la Encefalitis Equina Venezolana en el tejido nervioso de ratones recién nacidos. *Ultraestructura e Histoquímica*. *Invest Clfn* 37:7-63, 1971.
- 11- GARCIA-TAMAYO J.: Acid phosphatase activity in mouse brain infected with Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus. *J Virol* 8(2):232-241, 1971.
- 12- GARCIA-TAMAYO J., CARREÑO G., ESPARZA J.: Central nervous system alterations as sequelae of Venezuelan Equine Encephalitis virus infection in the rat. *J Path* 128:87-91, 1979.
- 13- GARCIA-TAMAYO J.: E.E.V. Experimental. Estudio histológico, histoquímico y ultraestructural. *Invest Clfn* 21(4):277-371, 1980.
- 14- GLASSER S., SPELSBERG I.: Mammalian RNA polymerases I and II: Independent diurnal variations in activity. *Biochem Biophys Res Common* 47:951-958, 1972.
- 15- GLEISER C., GOCHENOUR W., BERGE T., TIGERTT.: The comparative pathology of experimental Venezuelan Equine Encephalomyelitis

- infection in different animal host. *J Inf Dis* 110:80-97, 1962.
- 16- GORELKIN L.: Venezuelan equine encephalomyelitis in an adult animal host. *Amer J Path* 73: 425-442, 1973.
 - 17- JAHRLING P., SCHERER W.: Histopathology and distribution of viral antigens in hamsters infected with virulent and benign Venezuelan Encephalitis viruses. *Amer J Path* 72(1):25-34, 1973.
 - 18- JAHRLING P., DENDY E., EDDY G.: Correlates to increased lethality of attenuated Venezuelan Equine Encephalitis virus vaccine for immunosuppressed hamsters. *Inf Immunity* 9:924- 930, 1974.
 - 19- KINNEY R., CHANG G., TSUCHIYA K., SNEIDER J., ROEHRIG J., WOODWARD T., TRENT D.: Attenuation of Venezuelan equine encephalitis virus strain TC-83 is encoded by the 5' -noncoding region and the E2 envelope glycoprotein. *J Virol* 67(3):1269-1277, 1993.
 - 20- KRAWIEC L., MONTALBANO C., GOMEZ C.: Influence of neonatal hypotiroidism upon transcription in isolated rat, brain and liver nuclei. *J Neurochem* 26:1181-1188, 1976.
 - 21- LeBLANC P., SCHERER W., SUSSDORF D.: Infection of congenitally athymic (nude) and normal mice with avirulent and virulent strains of Venezuelan encephalitis virus. *Inf Immunity* 21 (3):779-785, 1978.
 - 22- LENNETTE E., SCHIMDT N.: Arboviruses in Diagnostic procedures for viral, rickettial and chlamydial infections. 5th ed. American public health association. Inc, Washington D.C., pag. 227, 1979.
 - 23- LEVINE S., BONILLA E., RYDER S., SALAZAR M., RANGEL P.: Tyrosine Hydroxylase activity in Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus infection. *Neurochem Res* 6(6):691-696, 1981.
 - 24- LIMA L., DIAZ J., WALDER R.: Influence of Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus on catecholamine metabolism in mouse CNS: early changes in turnover rates and content. *J Neurosci Res* 10(1):61-71, 1983.
 - 25- LUST G.: Effect of infection on protein and nucleic acid synthesis in mammalian organs and tissues. *Federation Proceedings* 25:1688-1694, 1966.
 - 26- MECHAN J., TRENT D.: A biochemical comparison of the in vitro replication of a virulent strain of Venezuelan Encephalitis virus. *J Gen Virol* 64:1111-1119, 1983.
 - 27- REED L., MUENCH H.: A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer J Hyg* 27:493- 494, 1938.
 - 28- SCHERER W., ELLSWORTH C., VENTURA A.: Studies of viral virulence. Growth and adsorption curves of virulent and attenuated strains of Venezuelan Encephalitis virus in cultured cells. *Amer J Path* 62(2):211-219, 1971.
 - 29- SCHERER W., CHIN J.: Responses of guinea pigs to infections with strains of Venezuelan Encephalitis Virus and correlations with equine virulence . *Amer J Trop Med Hyg* 26(2):307-312, 1977.
 - 30- TERUEL E.: Alteración de las ARN polimerasas de núcleos de células

- cerebrales en ratones infectados con el virus de la E.E.V.. *Invest Clfn* 25(1):25-31, 1984.
- 31- TERUEL E., RANGEL P.: RNA polymerase type I: Activity in rat brain cell nuclei and peripheral blood mononuclear cells after Venezuelan equine encephalomyelitis virus infection. *Neurochem Res* 16(1):79-82, 1991.
- 32- VICTOR J., SMITH D., POLLACK A.: The comparative pathology of venezuelan equine encephalomyelitis. *J Inf Dis* 98:55-66, 1956.
- 33- YOUNG N., JOHNSON K.: Antigenic variants of Venezuelan Equine Encephalitis virus. Their geographic distribution and epidemiologic significance. *Amer J Epidemiol* 89(3):286-307, 1969.
- 34- YOUNG N., JOHNSON K., GAULD L.: Viruses of the Venezuelan Encephalomyelitis complex. Experimental infection of panamanian rodents. *Amer J Trop Med Hyg* 18:290-296, 1969