

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Actividad antiviral de distintos quimioterápicos y su efecto
en la inducción de interferón**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Fernando Mínguez Mínguez

Madrid, 2015

T 615.281
MIN
act

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID

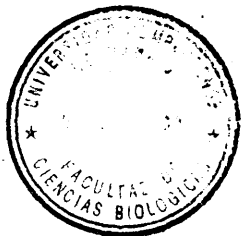
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGICAS

BIBLIOTECA UCM



5305314196

ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE DISTINTOS QUIMIOTERAPICOS
Y SU EFECTO EN LA INDUCCION DE INTERFERON



M E M O R I A

QUE, PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, PRESENTA

R.- 20.348

FERNANDO MINGUEZ MINGUEZ

MADRID
MARZO, 1979

A MIS PADRES

Quiero, ante todo, expresar mi infinito agradecimiento al Dr. D. Emilio Ronda Laín, director de esta Tesis, por sus continuos desvelos y paciente enseñanza en mi formación sin los cuales no hubiera sido posible la realización de esta Memoria.

Asimismo, agradezco al Instituto de Inmunología y Biología Microbiana, en la persona de su director Prof. Dr. D. Antonio Portolés Alonso, los medios y sus consejos puestos a mi alcance.

Asimismo me complace agradecer al Prof. Dr. D. Dimas Fernandez Galiano la amable y atenta acogida en el patrocinio de esta Tesis; ni quiero dejar de expresar un reconocido afecto a mis compañeras la Dra. María Luisa Alonso, Srta. María del Pilar Moya Esteve.

No quiero terminar, sin antes agradecer a la Srta. María del Carmen Granado Crespo su inapreciable ayuda técnica y a la Srta. María Luisa del Pozo su colaboración en el mecanografiado del original.

INTRODUCCION	1
PARTE BIBLIOGRAFICA	
I. RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCION EN LOS VIRUS	4
1. <u>Aspecto general del problema</u>	4
1.1. <u>Estructura de las partículas víricas</u>	5
1.1.1. El nucleoide viral	7
1.1.2. La capsida viral	9
1.1.3. En cuanto a la envoltura o cubierta membranosa	10
1.2. <u>Función de las partículas víricas</u>	10
2. <u>Taxonomía y posible sistematización del estudio de los mixovirus</u>	17
3. <u>Estudio de algunos caracteres diferenciales</u>	23
3.1. <u>Diferencias entre FPV e influenza con NDV y Sendai</u>	23
3.2. <u>Diferencias entre Paramixovirus clásicos y el grupo sarampion, peste bovina y mo- quillo</u>	25
II. ESTUDIO BIOLOGICO DE ORTHOMIXOVIRUS Y PARAMIXO- VIRUS.	27.
1. <u>Ortomixovirus</u>	29
1.1. <u>Estudio particular del Virion Influenza</u>	31
1.1.1. En relación con su estructura y morfología	31.

1.1.2. En cuanto a la estructura submicroscópica y composición molecular.	33
1.2. <u>Ciclo vital o replicación del virus</u>	
<u>Influenza</u>	46
1.2.1. En cuanto a la Adsorción	46
1.2.2. Durante la Penetración	47
1.2.3. En relación con la Biosíntesis de los Componentes Virales	49
1.2.4. Durante el Ensamblado	57
1.2.5. Finalmente, en el proceso de Liberación.	60
2. <u>Paramixovirus</u>	60
2.1. <u>Morfología y Estructura.</u>	62
2.2. <u>Composición química</u>	65
2.3. <u>Ciclo vital o replicación de los paramixovirus</u>	70
3. <u>Analogías y diferencias entre los Mixovirus.</u>	76
3.1. <u>Propiedades comunes entre orthomixovirus y Paramixovirus</u>	76
3.1.1. Modificaciones durante las biosíntesis celulares	77
3.1.2. Formación de Virus incompletos.	79
3.1.3. Variación efectos citopáticos	84
3.1.4. Aglutinabilidad con lectinas.	85
3.2. <u>Características diferenciales entre Orthomixovirus y Paramixovirus</u>	86

3.2.1. Variación antigenica	87
3.2.2. Fusión celular	88
3.2.3. Infecciones persistentes	88
III. RESPUESTA DEL HUESPED FRENTE A LA INFECCION VIRAL.	90
1. <u>Los virus como antígeno</u>	91
1.1. <u>Antígenos de neutralización</u>	92
1.2. <u>Alteraciones de la superficie celular inducidas por las infecciones virales</u>	93
1.3. <u>Análisis antigénico de las proteínas estructurales del virus influenza</u>	94
2. <u>Mecanismos de la neutralización viral</u>	97
3. <u>Inmunorrespuesta humoral frente a la infección viral</u>	102
3.1. <u>Respuesta primaria en las inmunoglobulinas séricas</u>	104
3.2. <u>Respuesta secundaria en las inmunoglobulinas séricas</u>	106
3.3. <u>La resistencia anti-viral del huesped mediante los anticuerpos</u>	107
4. <u>Producción de Interferon</u>	109
4.1. <u>Inducción de interferón en fibroblastos de pollo por Mixovirus</u>	116
4.2. <u>Inducción de interferón en pollos por Mixovirus</u>	118
4.3. <u>Inducción de interferón en presencia de diversos inhibidores metabólicos y quimioterápicos</u>	120

IV. ALGUNOS ASPECTOS DE LA QUIMIOTERAPIA ANTIVIRAL.	122
1. <u>Posibilidades de interferir la multiplicación viral.</u>	123
1.1 <u>Substancias que interfieren con la adsorción del virus</u>	124
1.2. <u>Substancias que interfieren con la penetración viral</u>	124
1.3. <u>Substancias que interfieren con las enzimas asociadas al virión y a la transcripción del genoma parental.</u>	124
1.4. <u>Substancias que interfieren con el proceso de traslación del RNA mensajero (mRNA) viral.</u>	125
1.5. <u>Substancias que interfieren con la síntesis del genoma de los virus con RNA.</u>	126
1.6. <u>Substancias que inhiben la replicación del DNA viral.</u>	127
1.7. <u>Substancias antivirales que afectan a los RNA mensajeros tardíos y proteínas virales tardías.</u>	128
1.8. <u>Substancias que inhiben la formación de membranas virales en células infectadas.</u>	128
2. <u>Metodología de las Investigaciones en Quimioterapia Antiviral.</u>	132
2.1. <u>Ensayo de antivirales sobre cultivos celulares</u>	134
2.1.1. <u>Titulación de infectividad viral</u>	138
2.1.2. <u>Los métodos de valoración basados en estudiar las curvas de viabilidad.</u>	140
2.1.3. <u>En relación con los métodos basados en la inhibición de placas o marcas infectivas.</u>	141

2.1.4. También existen métodos basados en la hemaglutinación.	145
2.1.5. Los métodos basados en la hemadsorción	147
2.1.6. Métodos basados en la actividad neuraminidásica	149
2.1.7. Mediante técnicas inmunofluorescentes	149
2.1.8. Los métodos basados en medir la incorporación de los ácidos nucleicos de precursores marcados radioactivamente	152
2.2. <u>Ensayo de antivirales sobre huevos fértiles</u>	152
2.3. <u>Ensayo de compuestos antivirales sobre animales de laboratorio</u>	156
2.4. <u>Ensayos para conocer el modo de acción de una sustancia antiviral</u>	156
V. ESTADO ACTUAL DEL TEMA	165

PARTE EXPERIMENTAL

I. PROTOCOLO	174
II. MATERIAL Y MEDIOS	177
1. <u>Virus</u>	177
2. <u>Células huésped</u>	178
3. <u>Animales de experimentación</u>	178
4. <u>Sueros</u>	178
5. <u>Medios nutritivos para cultivos celulares.</u>	179

6.	<u>Quimioterápicos antivirales</u>	180
7.	<u>Tampones y soluciones varias</u>	184
III.	TECNICAS	186
1.	<u>Preparación de fibroblastos</u>	186
2.	<u>Obtención de hematies</u>	190
3.	<u>Prueba de la hemaglutinación (HA)</u>	190
4.	<u>Pruebas de inhibición de la hemaglutinación (IHA)</u>	192
5.	<u>Observación y recuento de las células huésped</u>	194
6.	<u>Determinaciones de toxicidad y curvas de viabilidad celular</u>	195
7.	<u>Obtención de FPV, NDV, Sendai e influenza en líquido alantoideo y de VSV en fibroblastos</u>	196
8.	<u>Titulación de virus por su efecto citopático sobre fibroblastos</u>	198
9.	<u>Determinaciones de toxicidad en embriones de pollo</u>	199
10.	<u>Control del efecto "in vitro" de los diferentes quimioterápicos sobre los virus.</u>	200
11.	<u>Titulación de virus por medida de la letalidad sobre huevos embrionados</u>	203
12.	<u>Efecto protector de los quimioterápicos en huevos embrionados.</u>	204
13.	<u>Control del efecto antiviral sobre fibroblastos.</u>	206
14.	<u>Determinación de la tolerancia crónica de los pollos para los quimioterápicos</u>	208
15.	<u>Control de la inmuno-respuesta humoral anti-virus (NDV, FPV, influenza y Sendai)</u>	209

16.	<u>Inducción y titulación de interferón sobre cultivos celulares tratados con los quimioterápicos y antibióticos</u>	211
17.	<u>Inducción y titulación de interferón en pollo tratados con quimioterápicos y antibióticos</u>	214
IV.	RESULTADOS	216
1.	<u>Estudios previos acerca de los sistemas biológicos</u>	216
1.1.	<u>Curvas de viabilidad celular</u>	217
1.2.	<u>Determinaciones de toxicidad</u>	221
1.3.	<u>Ensayos de infectividad viral</u>	227
1.4.	<u>Control del sistema para una interacción virus-quimioterápico</u>	228
2.	<u>Estudios sobre actividad antiviral</u>	233
2.1.	<u>Ensayo de quimioterápicos actuando en estados tempranos de la infección viral</u>	233
2.2.	<u>Ensayo de quimioterápicos que actúan a nivel de revestimiento del virión</u>	246
2.3.	<u>Ensayos comparativos de acción quimioterápica antiviral a distinto nivel bioquímico</u>	253
3.	<u>Estudios relativos a la respuesta del huésped</u>	270
3.1.	<u>Acción de los quimioterápicos antivirales sobre la respuesta inmune</u>	277
3.2.	<u>Acción de los quimioterápicos sobre la producción de interferón</u>	283
V.	CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS	307
1.	<u>Criterios en la selección de métodos para evaluación de quimioterápicos antivirales</u>	308

2. <u>Variabilidad de efectos del quimioterápico en función de los caracteres bioquímico-estructurales del virus.</u>	310
3. <u>El efecto antiviral en función de la naturaleza del quimioterápico y su nivel de acción bioquímica.</u>	312
4. <u>Actividad antiviral en función de distintos parámetros biológicos</u>	319
5. <u>Respuesta del huésped en presencia de algunos antibióticos y quimioterápicos antivirales.</u>	321
VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES	325
VII. BIBLIOGRAFIA	335

I N T R O D U C C I O N

Resulta obligado admitir que, durante las cuatro últimas décadas, una nueva disciplina científica haya sido desarrollada a partir de diversos campos de investigación: La Quimioterapia. Efectivamente, desde que DOMAGK (1935) empleara por primera vez las sulfonamidas como agentes anti-infecciosos hasta hoy, cientos de antibióticos y quimioterápicos se han descubierto y sintetizado y se han fijado las bases experimentales que permiten estudiar nuevos mecanismos de acción antiinfecciosa e incluso diseñar modernos fármacos de síntesis con una actividad antimicrobiana. Pese a todos estos resultados positivos, en el campo de la Biología de Infecciones, existe un reto a la investigación que los científicos estudiosos de la Biología y de la Medicina, estamos obligados a atender: las infecciones virales.

Prueba decisiva es que en EE.UU., en 1974, junto a cientos de antibióticos antibacterianos y quimioterápicos anti-protozoarios, tan sólo existían tres fármacos antivirales para uso clínico. Poco han variado las cosas en estos últimos cuatro años, cuando en un resumen sobre la actualidad de los medicamentos antivirales que hace WERNER (1977) comentando los avances sobre quimioterapia antiviral presentados en el X Congreso Internacional de Quimioterapia, tan sólo retiene la atención sobre el

arabinósido de adenina (Ara-A ó Vidorabina), la iodoxuridina (IDU), el ribofuranosil-triazol-carboxamida (Virazol) y el clorhidrato de amino-1-adamantanol (amantadina).

En este mismo Congreso, ALBERT SABIN se pronunció varias veces contra la filosofía y la metodología de las investigaciones en el campo de la Quimioterapia antiviral. Según él, nos estamos esforzando vanamente en buscar una actividad terapéutica en productos que no son más que unos inhibidores de la replicación viral y no pueden actuar por tanto más que en un estadio inicial de la infección.

El hecho de que, subsiguientemente a la Antibioterapia, apareciera la antibioco-resistencia, obligó a los científicos a poner en juego toda una extraordinaria mecánica investigadora para conocer la intimidad de los distintos mecanismos de antibiosis y resistencia en la Biología de Infecciones Microbianas. Sin embargo, en el campo de la Virología, los acontecimientos observables en la Quimioterapia no guardaron ningún paralelismo con los observados en bacterias, hongos y protozoos. En el caso de los virus, las mayores dificultades residen en el peculiar estado de parasitismo intracelular del agente infeccioso que le hace más inaccesible al fármaco; en su peculiar morfogénesis y estructura difícil de vulnerar desde el exterior sin alterar el propio mecanismo de la célula huésped; en que, prácticamente, tan sólo, son posibles dos vías de aproximación en la Quimioterapia antiviral, la síntesis de proteínas y la de ácidos nucleicos. Es curioso observar que aunque entre los virus no pueda aún hablarse de quimio-resistencia como sucede con las bacterias, sin embargo sea muy difícil conseguir progresos en el campo de la Terapia antiviral.

Esta situación, derivada de las muchas dificultades que entraña el estudio de los virus, unido al hecho de que existan graves problemas de oncogénesis que han de resolverse a través de un mayor conocimiento de la infección viral y de sus posibilidades de control, han atraído nuestra atención hacia este interesante y prometedor campo de la Investigación Biológica, con el buen deseo de que nuestros resultados experimentales puedan constituir una aportación más al mejor conocimiento de la actividad de las sustancias antivirales.

Así, en esta Memoria de Tesis, nos proponemos -en primer lugar- actualizar la problemática científica relacionada con el aspecto particular del tema y estudiar, después, un sistema biológico que nos permita controlar la actividad antivírica de distintas moléculas actuando a diferentes niveles de la multiplicación viral para, ultimamente, investigar sobre las variaciones que estas sustancias pueden condicionar sobre los distintos parámetros de una interacción virus-huesped-fármaco.

PARTE BIBLIOGRAFICA

I. RELACIONES ESTRUCTURA- -FUNCION EN LOS VIRUS

Parece lógico que antes de revisar la bibliografía mas particularmente relacionada con nuestro trabajo experimental recopilemos una serie de datos que nos den ideas de lo que son y representan los virus como entidad biológica, ya que tanto el control de la infección viral como la posible resistencia del virion a un fármaco antagonista, van a depender de la composición y estructura de estos agentes infecciosos considerados como los elementos genéticos más simples capaces de alternar entre dos estados distintos intracelular y extracelular (BROCK, 1973). Posteriormente iremos precisando particularidades que corresponden a la estructura y función de los virus sobre los que hemos de realizar nuestro trabajo experimental.

1. Aspecto general del problema

Desde nuestro punto de vista de biólogo, los virus -de acuerdo con CURTIS (1972)- pueden quedar clasificados dentro del reino de las Moneras, en tanto no se pueda definir exactamente su origen. Evolutivamente considerado existen diferentes teorías sobre el origen de los virus, que dependen tanto del punto de vista del autor que lo considera como de la vertiente biológica considerada, hasta el punto que para algunos todavía permanece en discusión el dilema de si los virus

son las formas de vida más sencillas o son sustancias químicas inanimadas. Puesto que los virus aparecieron relativamente tarde en la evolución y son entes parásitos estrictos, habrá que pensar que se originaron de forma análoga a las bacterias y que después perdieron sus facultades metabólicas o bien, interpretarlos como partículas de células que han iniciado una existencia independiente. Parece que lo más generalmente aceptado en la actualidad, es que los virus son formas abortivas de células degeneradas; de todas maneras resulta más difícil explicar el origen de los RNA-virus, puesto que el RNA nunca presenta autoreplicación en las células normales.

Aunque en la presente memoria utilicemos exclusivamente virus pertenecientes a dos grupos de virus animales (ORTHOMIXOVIRUS y PARAMIXOVIRUS), cuyo genoma está constituido por RNA, consideramos conveniente dar una visión panorámica de los distintos grupos de virus animales y dejar establecidas las relaciones que entre todos ellos puedan existir.

1.1. Estructura de las partículas víricas

En la actualidad se tienen perfectamente determinadas la estructura y composición química de diferentes viriones. Para ello fue necesario disponer de cuidadosos métodos de purificación semejantes a los que se utilizan en la química de proteínas.

Generalmente hablando y aunque las estructuras de los virus son muy diversas, podemos decir que el virión o partícula vírica completa consta de una porción central -conocida como

CORE o NUCLEOIDE- en el que se localiza el ácido nucleico, que se rodea de una cubierta proteínica denominada CAPSIDA; las proteínas individuales o unidades morfológicas que forman la envuelta viral se llaman CAPSOMEROS y pueden estar dispuestos aisladamente como monómeros o agruparse formando unidades oligoméricas. En muchos casos las estructuras son más complicadas, y el complejo nucleo-cápsida puede aparecer rodeado de una ENVOLTURA membranosa externa cuyos componentes pueden tener su origen en las estructuras periféricas de la célula huésped. Asimismo existen virus de mayor complejidad aún, presentando ESPICULAS fijadoras en su cápsida; o también como sucede en los bacteriófagos, que disponen no sólo de una cabeza con estructura semejante a los citados, sino que también tienen una cola más o menos compleja (sin ácido nucleico) y unas formas de anclado o fijación a la superficie del huésped.

Como puede verse, la actividad funcional y biológica del propio virus irá estrechamente ligada a su estructura. Así mientras que los ácidos nucleicos se encargan de transmitir la información para la síntesis de nuevos virus, la cápsida constituye un dispositivo de empaquetamiento que asegura la estabilidad de las moléculas automultiplicables durante la perpetuidad de la especie y facilita la adsorción y penetración en la célula huésped. En esta primera fase de contacto entre el virus y la célula huésped, la envuelta membranosa del virus (cuando existe) o las formaciones espiculares como en el caso de los mixovirus, o bien los dispositivos de fijación de la cola de los fagos, tienen una influencia decisiva en el reconocimiento de la célula huésped.

1.1.1. *El nucleóide viral*, según hemos dicho, está formado por una sola molécula de ácido nucleico y esto condiciona un carácter taxonómico entre los virus, permitiendo clasificarlos en dos grandes grupos, según se trate de DNA-virus ó RNA-virus. La longitud y peso molecular de cada ácido nucleico -constituyendo el nucleóide- permanece invariable para cada tipo de virus; ello hace inalterable la información que codifican, aunque también estén sujetos a evolución por alteraciones genéticas de carácter mutacional o por recombinación. De esta forma pueden originarse nuevos tipos de virus e irse transformando progresivamente; es más, también pueden producirse hibridaciones entre genes de dos virus distintos y quedar juntos constituyendo un nuevo virus, aunque conservando la presencia exclusiva de DNA ó RNA según al grupo al que pertenezcan. Dentro de los virus animales, por los cuales tenemos especial interés, los DNA-virus, -salvo el caso particular de los parvovirus que es monocatenario- poseen un DNA bicatenario y por tanto un genoma con mayor peso molecular que los RNA-virus que son monocatenarios, excepto los reovirus que poseen un RNA bicatenario. Estos ácidos nucleicos pueden estar dispuestos en forma circular o lineal y su longitud variar de 1 a 100 nm aproximadamente.

En cuanto a la estructura molecular del ácido nucleico viral no consideramos oportuno entrar en una descripción detallada, pero a continuación reproducimos un esquema de la estructura del DNA que, aparte de completar este estudio general servirá para interpretar mejor el mecanismo de acción de algunos fármacos (Fig. 1).

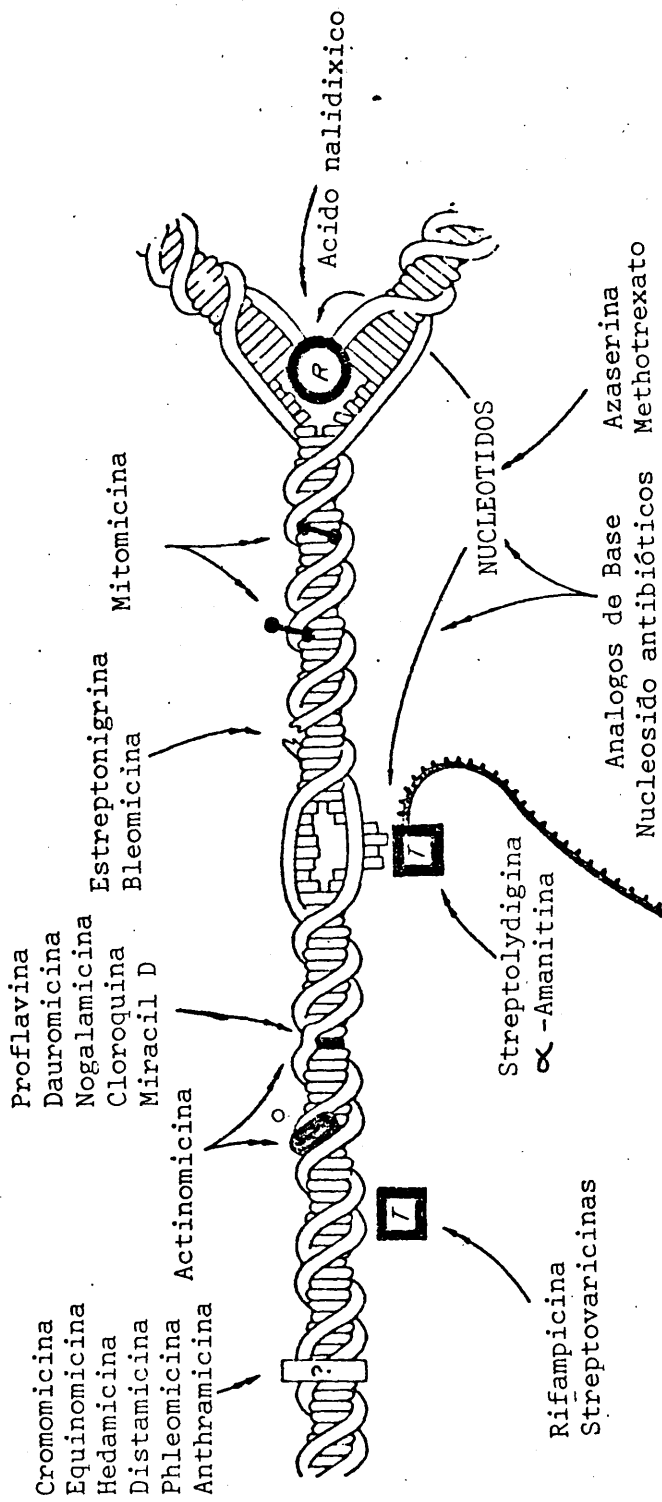


Fig. 1.- Esquema de una molécula de DNA bicatenario mostrando los sitios de acción de distintos antibióticos y quimioterápicos (según GALE y cols, 1972).

1.1.2. *La cápsida viral*, que condiciona el empaquetamiento de la información genética mantenida en el nucleoide, puede ser de diversas formas según que su simetría sea helicoidal, isométrica, pleomórfica o binaria. En el primer caso, cápsida helicoidal, se incluyen la mayoría de los virus vegetales en los que los capsómeros (monómeros o subunidades protéicas) aparecen ordenados de forma helicoidal alrededor del nucleoide que también presenta esta disposición y condiciona una morfología tubular semirígida. Las cápsidas isométricas presentan caras triangulares, equiláteras, que condicionan la formación de poliedros deltaédricos que, al agruparse, originan icosaedros regulares con tres ejes de simetría; este tipo de envuelta existe en algunos fagos y virus vegetales y en la mayor parte de los virus animales. Las cápsidas pleomórficas son de mayor complejidad porque en ellas pueden entrar dos o mas orientaciones simétricas mezcladas, como sucede en los poxvirus que tienen una simetría helicoidal entrecruzada (LWOFF y cols, 1962) o en el virus vacunal (EASTERBROOK, 1966) de complejas estructuras en forma de ladrillo. Por último, las cápsidas de simetría binaria, que aparecen en bacteriófagos, son todavía mas complicadas ya que en ellas se puede distinguir una cabeza (isométrica alargada) y una cola, de longitud variable, que puede estar protegida o no con una vaina.

El número de capsómeros es muy variable dependiendo del tipo de simetría: puede ser muy numeroso en los helicoidales (dependiendo del peso molecular del ácido nucleico, de la estructura terciaria de la proteína viral y del diámetro de la nucleocápsida); es finito y constante en los isométricos, pu-

diendose calcular su número por la fórmula de VASQUEZ y TOURNIER (1962); y es variable en las pleomórficas, sin conocerse qué constituyentes químicos pueden condicionar el entrecruzamiento (LWOFF y cols. 1962).

Una idea de los tipos fundamentales de estructura viral se presentan a continuación siguiendo los modelos de MATTERN (1977) y de HUCK (1964) (Fig. 2).

1.1.3. *En cuanto a la envoltura o cubierta membranosa,* que presentan algunos virus y bacteriófagos, principalmente, se forma casi siempre a partir de las estructuras periféricas del huésped y, por tanto, pueden entrar en su composición moléculas de lípidos, proteínas y, ocasionalmente, glúcidos. Pese a la comunidad de origen entre la membrana del virión y la del huésped, pueden existir algunas diferencias de composición como ocurre en la hemaglutinina y neuraminidasa de los mixovirus que no se presentan en las membranas de la célula huésped (SCHEIDT, 1972) o en algunos lípidos que aparecen en el fago Dp-1 de pneumococos LOPEZ y cols. (1977). En casos particulares, como sucede en los herpes virus, la membrana del virión tiene su origen en la membrana nuclear de la célula huésped y se forma antes de pasar a la cisterna perinuclear.

1.2. Función de las partículas víricas

Si partimos del condicionante general de que los virus sólo pueden multiplicarse dentro de células vivas que, consecuentemente, son dañadas o destruidas en función del grado de parasitismo al que han llegado evolutivamente por pérdida de otras estructuras y funciones biológicas, habrémos de admitir que las estructuras actuales -de las que hemos dado una idea general- darán origen a funciones específicas que

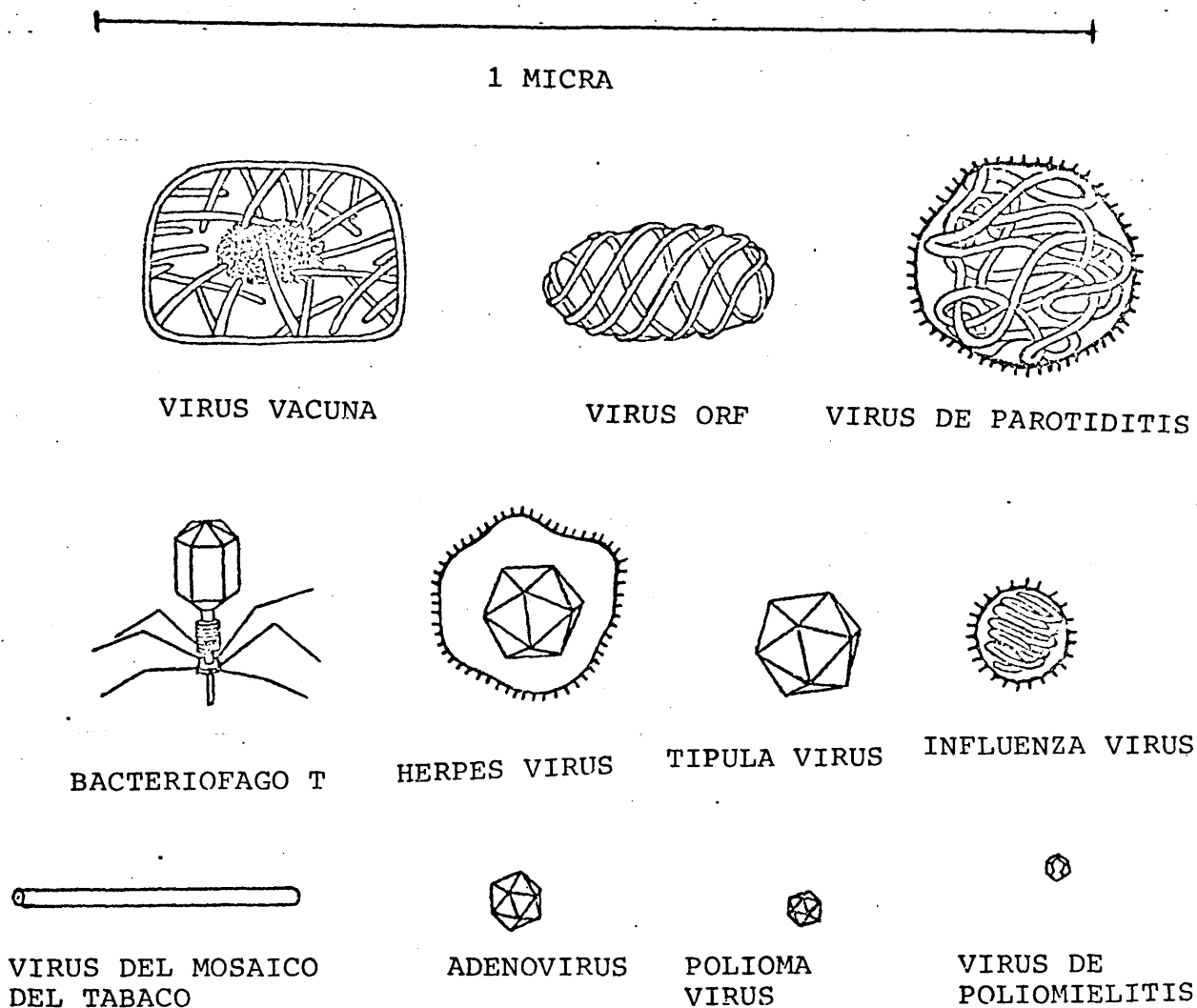


Fig. 2.- Los cinco virus con estructura poliedrica presentan simetría cúbica; el virus del mosaico del tabaco y los componentes internos de los virus del sarampión y parotiditis son de simetría helicoidal, mientras que los otros virus muestran una simetría compleja.

aseguran la automultiplicación de estas partículas virales submicroscópicas y que estas funciones, a su vez, guardarán estrecha relación con la particularidad estructural en cada caso, modificando las relaciones parásito-huesped. Por principio, en esta situación de parasitismo estricto, habremos de admitir que las estructuras menos virulentas encontrarán mas facilidad en la selección natural hasta llegar al equilibrio adecuado. De aquí que resulte lógico examinar las relaciones estructura-función en cuanto que son capaces de favorecer la multiplicación vírica por inducir a la célula viva a sintetizar los propios componentes esenciales de la partícula viral y a ensamblarlos ordenadamente hasta dar lugar a un nuevo agente infeccioso.

Los diversos ESTADIOS DEL CICLO VITAL de un virus pueden resumirse en 6 etapas:

i) Adsorción o fijación del virión a la célula susceptible a través de receptores específicos situados en la membrana del huesped.

ii) Penetración del virus o de su nucleoide en la célula; en el caso de los fagos, existen enzimas localizados en la cola del mismo que degradan pequeñas porciones de la pared celular bacteriana, originando poros a través de los cuales se inyecta el ácido nucleico a la célula.

iii) Replicación del ácido nucleico viral produciendo una subversión de todo el metabolismo de la célula huesped en provecho del parásito; según se trate de DNA ó RNA-virus, el proceso replicativo tiene distintas variantes. En esta fase se codifican una serie de enzimas que son necesarios tanto para degradar los ácidos nucleicos del huesped como para sintetizar las proteínas propias del virus.

iv) Producción de los distintos componentes separados de la partícula viral, tanto los capsómeros como otros constituyentes esenciales del virus.

v) Maduración, durante la que se combinan los distintos elementos aislados, para dar lugar a la progenie infectiva de viriones maduros.

vi) Liberación del virus mediante concurso de diversos enzimas líticos, como se produce en la lisis por fagos, o por un proceso de evaginación a nivel de membrana nuclear (en unos casos) y a nivel de membrana citoplásmica. A continuación se representan esquemáticamente la replicación de un RNA virus paratifo con cubierta (Fig. 3) y de otro que carece de esta envoltura (Fig. 4).

En cuanto a la función del nucleoide viral, está claro que constituye la reserva de toda la información molecular necesaria para la síntesis de nuevos viriones. Una idea resumida del proceso de replicación de los RNA virus, de los que nos ocupamos, se indica en los esquemas que siguen mas adelante. La cantidad de información almacenada depende del grado de polifuncionalidad del virus (6-7 regiones en el DNA de polioma, 11 regiones en el RNA de reovirus y mas aún en el DNA de adenovirus).

Parece suficientemente claro que los DNA-virus se replican en el nucleo de la célula huésped, excepto los poxvirus que lo hacen en el citoplasma. Los RNA-virus, sin embargo, se replican generalmente en el citoplasma, aunque existan algunos grupos (especialmente mixovirus) en los que no se descarta la

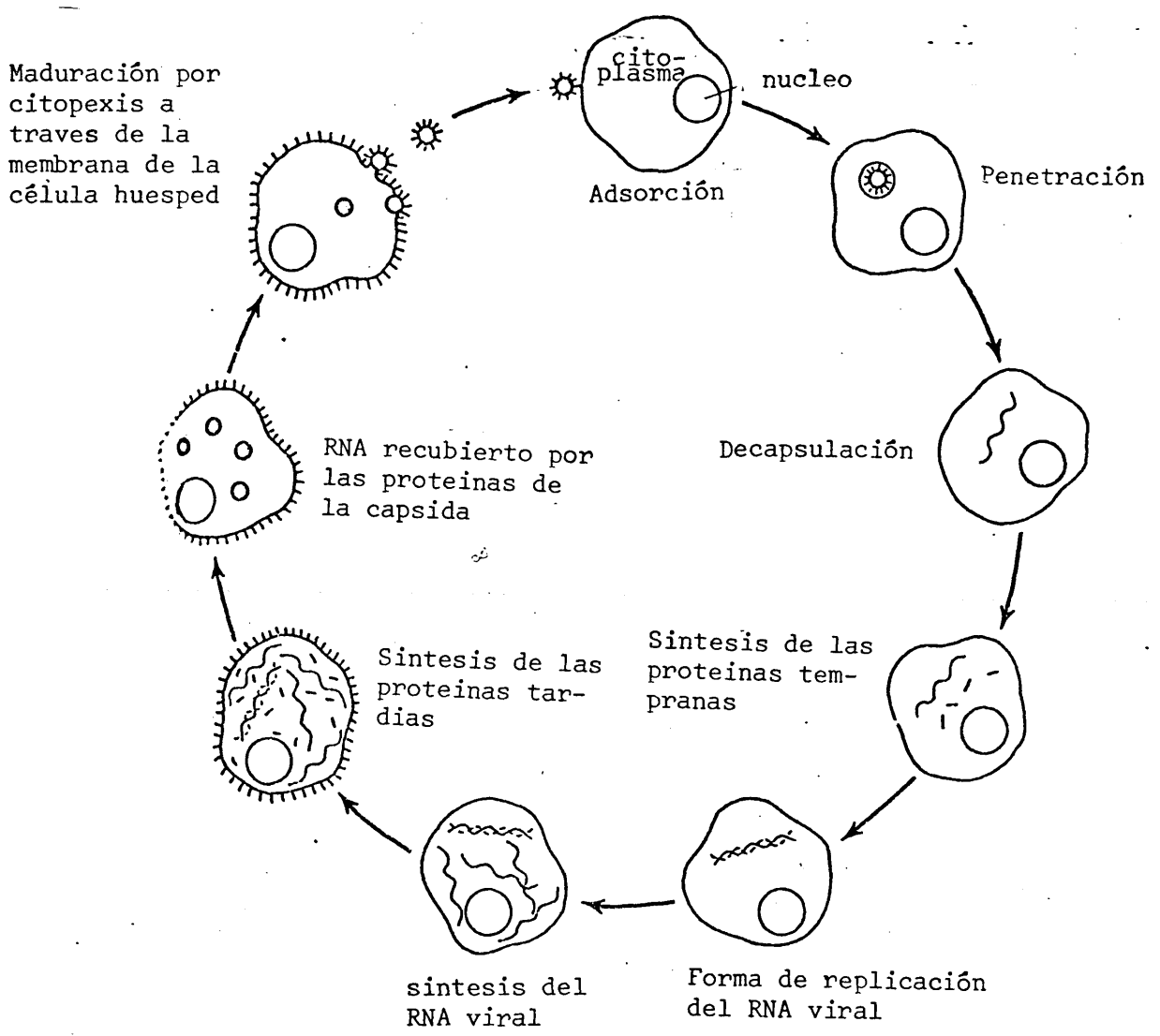


Fig. 3.-Replicación de un RNA virus monocatenario
Virus envuelto, influenza

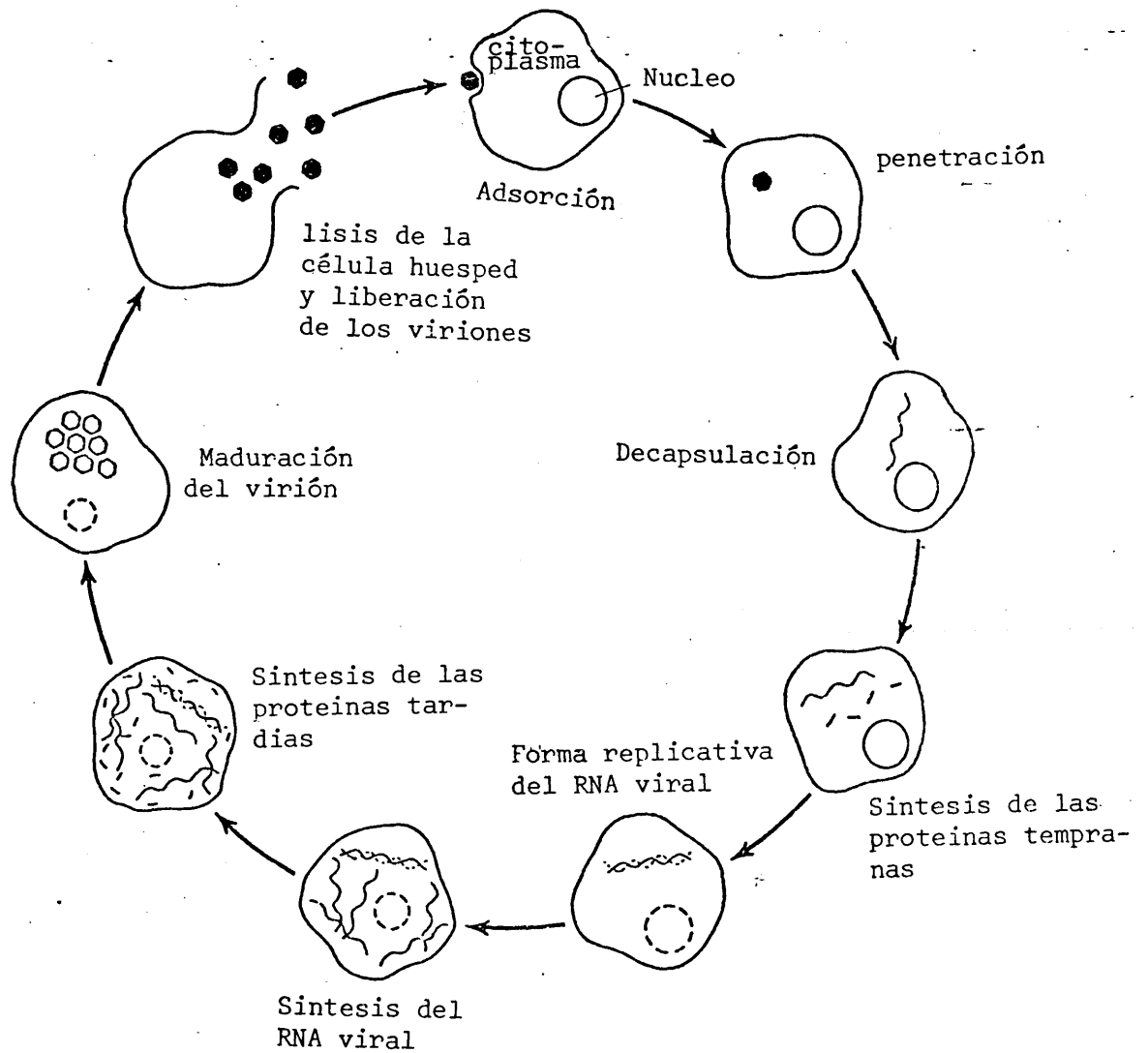


Fig. 4 Replicación de un RNA virus monocatenario. Virus desnudo, poliovirus

posibilidad de que también lo puedan hacer en el núcleo de la célula huésped.

Existe la duda de si el nucleóide lleva también la información que emite el ensamblado, al ordenar las diferentes síntesis proteicas en un orden fijo, cuya estructura podría tener puntos específicos de contacto que continuaran como factores morfogenéticos o bien se sintetizan proteínas específicas capaces de modular este ensamblado especialmente.

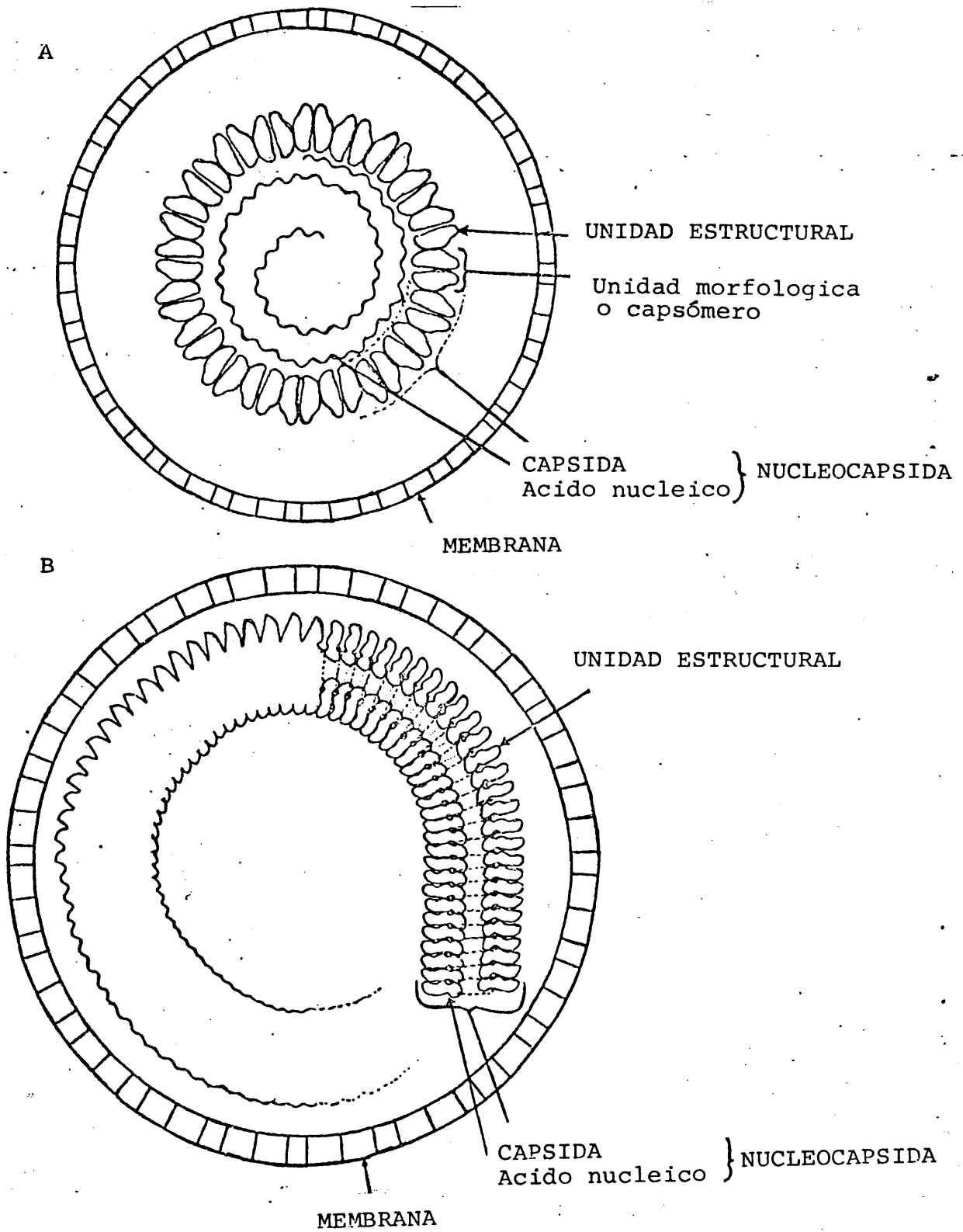
Por otra parte, la cápsida -donde se localizan caracteres antigénicos diferenciales del virus- tiene como principal función el proporcionar protección a la información que está codificada en el nucleóide, empaquetando los ácidos nucleicos con el mayor ahorro de energía y con la máxima estabilidad desde el punto de vista termodinámico y evitando, además, que sean destruidos por las nucleasas del huésped. Asimismo, esta cápsida interviene en el proceso de adsorción y fijación del virus a la célula huésped, participando también -en el caso de los fagos- en el mecanismo de inyección del ácido nucleico viral durante el proceso de infección.

Finalmente, en los virus, pueden existir envolturas membranosas o membranas cuyo origen puede deberse al huésped, o pueden tener proteínas cuya síntesis está codificada en el nucleóide; así sucede con la hemaglutinina y neuraminidasa de las espículas de los mixovirus. Estas espículas específicas tienen la función de localizar y fijarse a los receptores de la célula huésped.

Se sabe que los DNA-virus son resistentes al eter y otros disolventes, lo que implica que no poseen envoltura lipídica, excepto los DNA-virus mas complejos, como son los poxvirus y herpesvirus que si la poseen; sin embargo, entre los RNA-virus se encuentran muchos grupos que son acusadamente sensibles al eter y disolventes lipídicos, a excepción de los picornavirus y reovirus. Según parece admitirse por algunos autores (HAMPARIAN y cols. 1963), los virus con envoltura membranosa no poseen nucleocápsida icosaédrica, excepto los virus herpes y encefalíticos. Para una mejor comprensión de la disposición estructural que se puede encontrar en los virus con membrana se presenta un esquema de secciones transversales de un virión con capsida icosaedrica y de otro con capsida helicoidal (Fig. 5).

2. Taxonomía y posible sistematización del estudio de los Mixovirus.

En cuanto a criterios para taxonomia de estos virus, cuyo nombre "Mixovirus" es relativamente nuevo y que fué introducido en la terminología por ANDREWS, BANG y BURNET (1955), habrémos de señalar que las enfermedades producidas por ellos son conocidas y padecidas desde hace siglos. Ello constituyó una primera clasificación en función de la enfermedad, pudiendo decirse que en su origen, este grupo, contaba con seis miembros: Influenza A, B y C; FPV; NDV y parotidítico. Posteriormente, estos virus, fueron divididos en dos grupos basándose en la naturaleza del virión.



A = virión con nucleocapsida icosaédrica }
 B = virión con nucleocapsida helicoidal } Sección esquemática

Fig. 5.- Diagrama de dos viriones de diferente estructura

Estos dos grupos (que en la actualidad se conocen como Orthomixovirus y Paramixovirus) se asemejan sólo en la posesión de la ribonucleoproteína helicoidal y en una cubierta lipídica derivada de la célula huésped, que tiene una gran capacidad de unión con las mucoproteínas. Esta membrana está revestida de glucoproteínas codificadas por el virus y difieren entre sí en algunos otros aspectos según la estirpe viral.

Más tarde, el grupo de Paramixovirus se ha visto ampliado en tres virus más, tales como sarampión, peste bovina y moquillo, que guardan una cierta relación con los del grupo y que morfológicamente son iguales. Los Mixovirus no sólo son un excelente modelo para el estudio de los RNA virus en general, sino que también son un magnífico instrumento en campos tales como el estudio de las infecciones por virus lentogénicos, de los virus tumorales RNA y para un mejor conocimiento de la membrana de las células animales.

A continuación exponemos un esquema (Fig. 6) que puede ilustrar sobre las relaciones que existen entre los distintos virus anteriormente reseñados en función de la morfología de la partícula viral y de la membrana, por una parte, así como de los receptores para mucoproteínas y presencia de neuraminidasa, por otra.

Más recientemente, y con los datos sobre la arquitectura viral -antes indicados- que condicionan un determinismo característico para las relaciones huésped-parásito, se ha podido asimismo establecer una ordenación taxonómica que -utilizando los criterios de FENNER (1976)- se recoge en los traba-

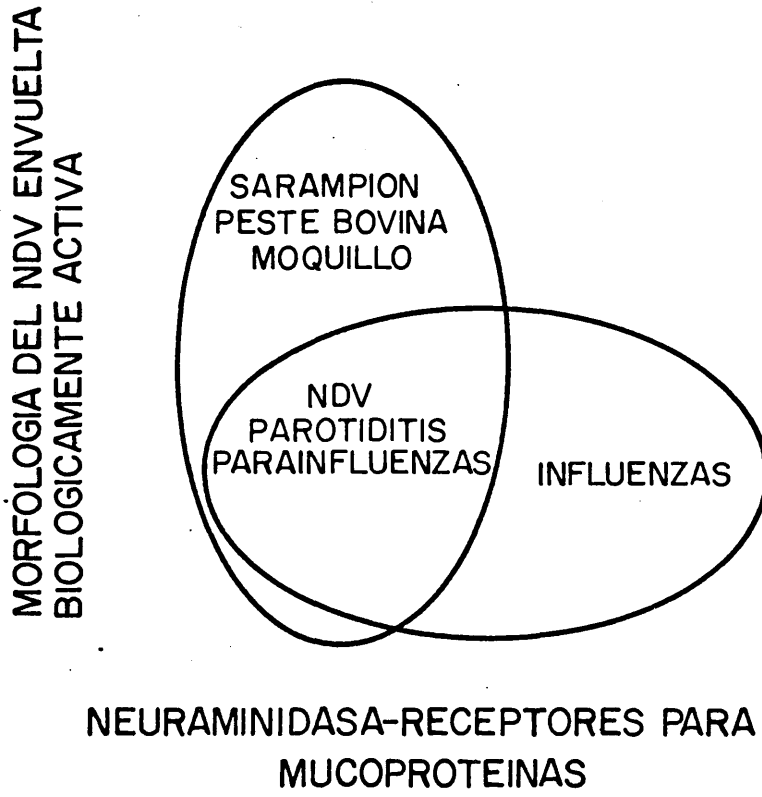


Fig. 6.- Relación existente entre los distintos Mixovirus

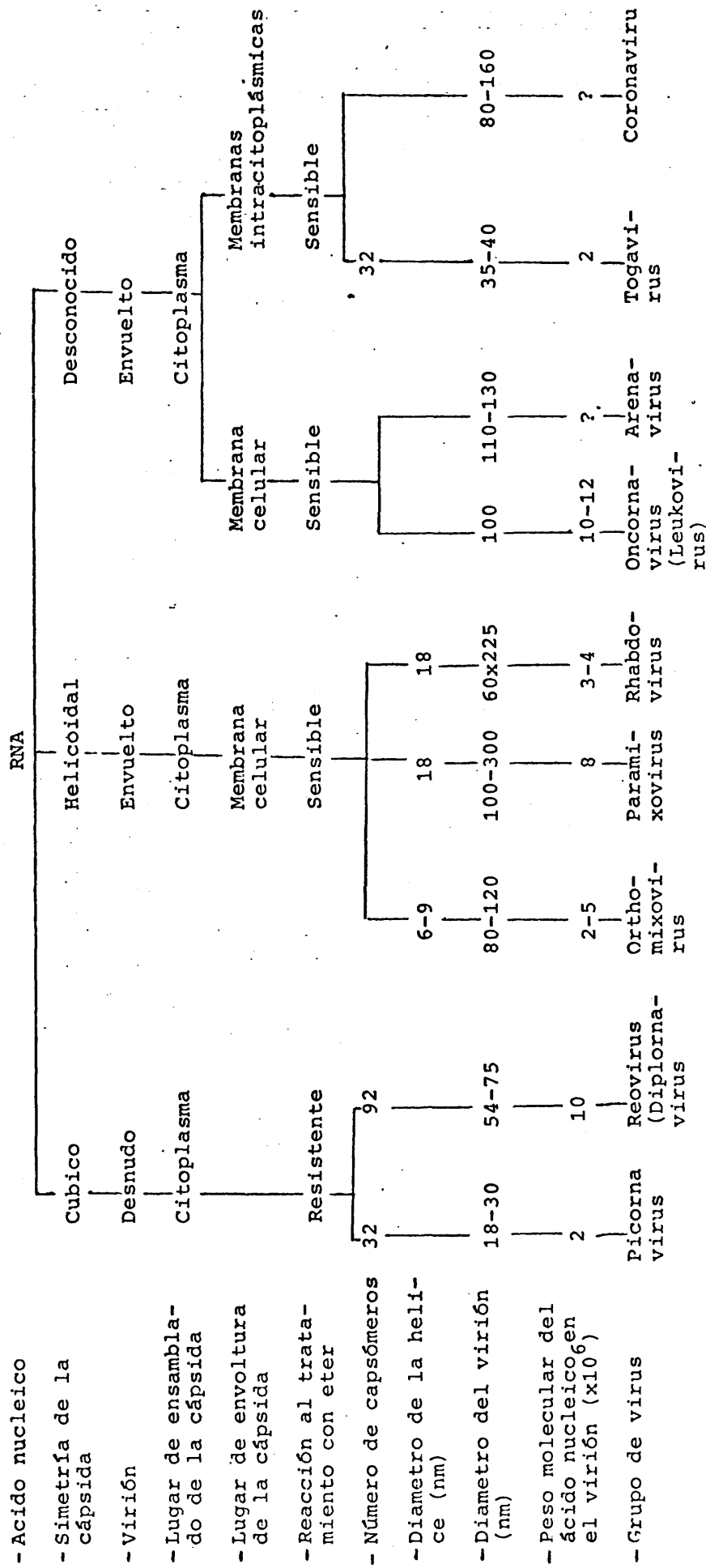
jos del Comité Internacional de Taxonomía de Virus y precisamente en los Symposia mantenidos en Madrid en 1975 con motivo del III Congreso Internacional de Virología. Según las decisiones aquí tomadas, todos los virus fueron agrupados en cinco grupos según que incluyan:

- A) Especies que se multiplican en mas de una de las 4 clases de huéspedes que han sido considerados (B-C-D-E).
- B) Especies que se multiplican sólo en vertebrados
- C) Especies que se multiplican sólo en plantas
- D) Especies que se multiplican sólo en bacterias
- E) Especies que se multiplican sólo en invertebrados

A partir de estos 5 grandes grupos, se hizo una subdivisión, dentro de cada uno, (por familias) según el ácido nucleico del virión; después, dentro de cada tipo de ácido nucleico se dividen también en mono y bicatenarios. A partir del anterior criterio sigue otra división que atiende a la relación peso molecular del ácido nucleico/concentración porcentual de ácido nucleico en las partículas infectivas. Además de todo ello pueden establecerse subdivisiones según la forma de la partícula viral y presencia de envoltura proteica, forma de la nucleocápsida o, por último, en función de la naturaleza del huésped infectado, del modo o modos de transmisión y del huésped transmisor.

Una somera idea del estado de clasificación de los virus se da en el Cuadro I con datos tomados de MELNICK (1971). Para los interesados en el tema remitimos a la clasificación actual de FENNER (1976)

CUADRO I.- Clasificación de los RNA virus que se multiplican en vertebrados



A la vista de la clasificación previamente señalada, cabe particularizar a partir del gran grupo B de FENNER a los mixovirus, por ser objeto del presente trabajo. Estos virus, que solamente se multiplican en vertebrados, puede ser dividido en las familias: ORTOMYXOVIRIDAE y PARAMIXOVIRIDAE; de ellas, la primera, con un sólo género (Influenza virus) y la segunda con tres géneros (Paramixovirus, Morbillivirus y Pneumovirus). Todos estos virus del gran grupo B, tienen un gran interés por su significación patógena y posibilidades de mutagénesis (especialmente en el influenza humano), lo que dificulta su control inmunológico. Ello hace que nuestro estudio se centre en este tipo de virus y empezemos por revisar y actualizar los datos que sobre su biología existen.

3. Estudio de algunos caracteres diferenciales

A la vista de cuanto hasta aquí llevamos dicho en relación con las particularidades estructurales de los virus y después de considerar en la Figs 6,7 las posibles relaciones de parentesco biológico entre algunos de ellos. Parece indicado precisar aquí, de un modo resumido, las diferencias substanciales que se pueden detectar entre distintos individuos de los dos grupos que particularmente mas nos interesan.

3.1. Diferencias entre FPV e Influenza con NDV y Sendai

En particular, la morfología a nivel molecular entre estos virus, revela que mientras el FPV es idéntico a otras cepas de influenza puede quedar claramente separado del NDV.

3.2. Diferencias entre Paramixovirus clásicos y el grupo sarampión, peste bovina y moquillo.

Todos estos virus son morfológicamente idénticos y producen fusión celular desde fuera de la célula, pero aunque los virus del sarampión, moquillo y peste bovina estén relacionados serológicamente entre sí, el del sarampión, sin embargo, es capaz de aglutinar los eritrocitos de mono y los otros no. Los tres primeros virus de la serie poseen neuraminidasa.

El grado de analogías y diferencias entre estos virus aparece representado esquemáticamente a continuación en la Fig. 7.

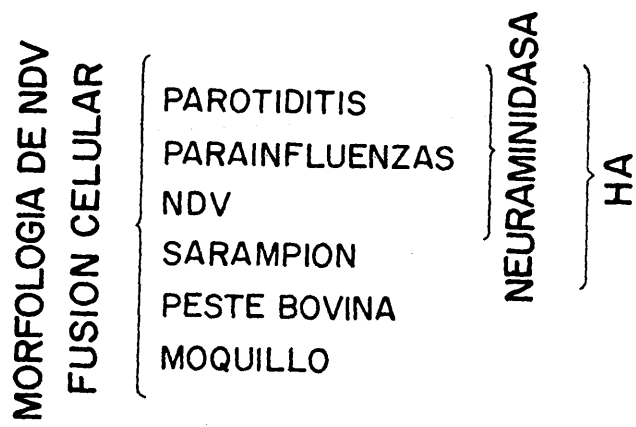


Fig. 7.- Diferencias esenciales entre los paramixovirus

II. ESTUDIO BIOLÓGICO DE ORTHOMIXOVIRUS Y PARAMIXOVIRUS

En principio, se consideró que ambos grupos constituían uno sólo, ya que todos los pertenecientes al grupo orthomixovirus, al igual que, los virus parotiditis y NDV de paramixovirus poseían una glicoproteína con la actividad hemaglutinante y el enzima neuraminidasa característicos de los virus influenza; después se ha visto, que, si bien en los orthomixovirus, ambas actividades están separadas morfológicamente, en NDV y parotiditis no lo están. Esto quedó perfectamente claro al aplicarse la microscopía electrónica al estudio de los virus, así como otras técnicas más precisas y complejas, pudiéndose separar los distintos tipos de virus influenza (orthomixovirus), por una parte, y por otra los virus NDV, parotiditis y otros (paramixovirus).

Aunque nos proponemos estudiar monográficamente, por separado, cada una de estas dos interesantes familias de virus, creemos será de utilidad señalar previamente las diferencias más importantes que, según criterios de CHOPPIN y COMPANS (1974) existen entre ambos grupos (CUADRO II).

CUADRO II.- Principales diferencias entre orthomixovirus y paramixovirus

Orthomixovirus	Paramixovirus
<p>i) Presentan actividad hemaglutinante y neuraminidásica</p>	<p>Las actividades hemaglutinantes y neuraminidásica sólo aparecen en los virus parainfluenzae 1-5, ND y parotiditis.</p>
<p>ii) Nucleocápsida helicoidal pequeña</p>	<p>Nucleocápsida helicoidal grande</p>
<p>iii) Genoma segmentado, pudiendo poseer una alta frecuencia de recombinación y producción de virus "incompletos".</p>	<p>Genoma no segmentado</p>
<p>iv) La replicación viral puede inhibirse por Actinomicina D, si esta se añade inmediatamente después de la infección.</p>	<p>La replicación viral no se inhibe por Actinomicina D.</p>

1. Orthomixovirus

Hace tiempo que ANDREWES y cols. (1955) definieron a este grupo como virus con un genoma constituido por un RNA monocatenario y provisto de una membrana. Por su gran contenido de lípidos en la envoltura eran sensibles al eter; aglutinaban los eritrocitos de varias especies, eluyendose de ellos enzimáticamente, y causaban enfermedades con predominio de cuadros respiratorios.

Entre los polipéptidos presentes en los viriones de este grupo, se destacan dos que se localizan en la superficie y poseen actividades hemaglutinante y neuraminidásica, existiendo además una ribonucleoproteína interna. La antigenicidad de estos polipéptidos dan lugar a la clasificación en tipos, subtipos y cepas. Así se distinguen 3 tipos serológicos A, B y C; y dentro de ellos, subtipos debidos a cambios antigénicos de la hemaglutinina y neuraminidasa.

De la clasificación de los orthomixovirus (virus influenza), tal como se admite en la actualidad (COMPANS y CHOPPIN, 1975), da idea el Cuadro III advirtiendole que, hasta ahora, los tipos B y C, tan sólo se han encontrado en infecciones humanas.

CUADRO III.- Idea de la clasificación de los orthomixovirus diferenciándolos en tipos y subtipos, según su ribonucleoproteína (RN), hemaglutininas (HA) y neurominidasa (NA).

Especies sensibles	Tipo (RN)	Subtipo (HA)	Subtipo (NA)	Cepas de laboratorio
Humana	A	H ₁	N ₁	FM1
		H ₂	N ₂	RI/5 ⁺ , JAP/305
		H ₃	N ₂	Hong-Kong 1968
B			Lee ^a	
C			1233	
Suina	A	H _{sw1}	N ₁	15
Equina	A	H _{eq1}	N _{eq1}	
		H _{eq2}	N _{eq2}	
Aviar	A - FPV	H _{av1}	N _{eq1}	Rostock
			N _{av3}	
		H _{av2}	N _{eq1}	
		H _{av3}	N _{av1}	
		H _{av4}	N _{av1}	
		H _{av5}	N _{av2}	
		H _{av6}	N ₂	
		H _{av7}	N _{eq2}	
H _{av8}	N _{av4}			

1.1. Estudio particular del Virión Influenza

Después de definir las características generales de los orthomixovirus pasaremos a estudiar la biología del virión tipo, actualizando distintos datos acerca de su morfología y estructura, tanto como de composición química y ciclo vital.

1.1.1. *En relación con su estructura y morfología* habrémos de señalar que, al microscopio electrónico, los viriones de este grupo aparecen con simetría pleomórfica, aunque normalmente son esferas irregulares con un diámetro medio de 800 a 1.000 Å (TAYLOR y cols, 1943) o también como formas filamentosas con un diámetro parecido y una longitud media de 4 Å.

CHOPPIN y cols. (1960) demostraron que, en pases seriados, particularmente en embriones de pollo, se producía un cambio de formas filamentosas a esféricas. Quizá ello sea debido a que con este procedimiento de replicación, al cabo de un cierto tiempo, pierden la capacidad de sintetizar alguna proteína que intervienen en la orientación de los capsómeros durante la maduración.

Al aplicar técnicas de tinción negativas, se encontró que el nucleoide era de forma helicoidal, en tanto que en la superficie de la partícula viral aparecían una serie de proyecciones o espículas con una longitud aproximada de 100 Å. (HOYLE y cols. 1961). Cuando estos viriones se sometieron a tratamiento con eter, se producían roturas con separación de su componente interno (ribonucleoproteína), por un lado, y las espículas por otro (HOYLE, 1952). Así se pudo comprobar

que la hemaglutinina estaba materializada en una especie de espícula de aproximadamente 140 Å de longitud y 40 Å de anchura, que en ausencia de dodecil-sulfato sódico (SDS) (utilizado en la técnica) se agrupaba en rosetas; ello permitió sugerir que uno de los extremos de la espícula era de carácter hidrofóbico y hacía que se orientaran y unieran entre sí las distintas unidades espiculares.

También, mediante tratamiento con SDS, se aislaron otras subunidades morfológicas que eran semejantes a alfileres de cabezas redondeadas, de unos 85 x 50 Å y con una varilla central de 100 Å; ésta última, parecía tener en su extremo un pequeño botón de 40 Å (LAVER y VALENTINE, 1969) y según fue comprobado después, en estas subunidades, residía la actividad neuraminidásica. Ultimamente al tratar la cepa B/Lee con tripsina se observó que dicha subunidad, con actividad neuraminidásica, constaba de 4 esferas con un diámetro aproximado de 40 Å (WRIGLEY y cols. 1973); las cuales, estaban situadas en un mismo plano y observadas desde un extremo correspondían a la formación botonosa (85 x 50 Å). Estas recientes observaciones sugieren que las espículas superficiales de los viriones son de dos tipos; uno de los cuales lleva asociada la actividad neuraminidásica, mientras que al otro le corresponde la actividad hemaglutinante.

También, por otra parte, se ha observado que sustentando a estas espículas, existen envolturas membranosas con morfología similar a la unidad de membrana de la superficie de las células huéspedes; esta membrana parece tener un espesor de unos 75 Å y está constituida por una bicapa de lí-

pidos. Por debajo de esta envoltura viral, siguiendo este orden de fuera hacia dentro, NERMUT (1972) encontró una membrana de 30-40 Å de espesor, que estaba constituida por una proteína estructural y que aparecía separada de la envoltura membranosa por una zona de unos 10 Å. Finalmente, por debajo de la capa anterior se encuentra la nucleocápsida o ribonucleoproteína (RNP). Estas son estructuras alargadas de aproximadamente 90-100 Å de diámetro y con una longitud media de 600 Å (HOYLE y cols. 1961).

1.1.2. En cuanto a la estructura submicroscópica y composición molecular que dá lugar a la característica morfológica de estos virus, examinándolos a través de las diversas subunidades, se pueden distinguir:

i) ESPICULAS

Según se ha comprobado, en estas formaciones periféricas residen ciertos mecanismos de virulencia, ya que al tratar los viriones con proteasas (bromelina, quimotripsina o pronasa) pierden su capacidad infectiva por falta de sus actividades hemaglutinante y neuraminidásica.

La hemaglutinina (HA) es una glicoproteína que, dependiendo de la cepa viral, célula huésped y condiciones de crecimiento, se puede escindir (en mayor o menor proporción) en 2 polipéptidos HA₁ y HA₂ que se unen por enlaces bisulfuro.

El peso molecular de la espícula HA intacta es aproximadamente 150.000 d (LAVIER y VALENTINE, 1969). Dado que el polipéptido HA (compuesto de HA₁ + HA₂) tiene un peso molecular de aproximadamente 75.000 daltons, ello parece significar

que la espícula está compuesta por dos polipéptidos de HA (2 de HA₁ + HA₂). Ahora bien, vistas al microscopio electrónico y desde un extremo, las espículas hemaglutinantes tienen forma triangular lo que hace sugerir a GRIFFITH (1974) que estén compuestas de 3 polipéptidos HA.

La neuraminidasa (NA), que fue aislada por KENDAL y cols. (1968) es también una glicoproteína, sobre la que mas tarde BUCHER y KILBOURNE (1972) comprobó (mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y por sedimentación en gradientes de sacarosa) que el peso molecular de la espícula NA era de 200.000 - 250.000 d. Cuando este enzima se disocia, se obtienen subunidades proteicas de 50.000 a 60.000 d., lo que parece sugerir que la espícula es un tetrámero. WRIGLEY y cols. (1973) observaron al microscopio electrónico que las subunidades tienen unas dimensiones de 40 x 40 x 40 Å y que la partícula intacta es un agregado que forma un tetrámero dentro de un mismo plano.

ii) BICAPA LIPIDICA

LANDSBERGER y cols. (1973) demostraron, mediante técnicas físicas, que los lípidos del virus influenza forman una estructura en bicapa, en la que los glicolípidos ocupan la parte mas externa y por tanto pueden interactuar con diversas lectinas específicas (KLENK y cols. 1972). Asimismo, otros estudios bioquímicos y de electromicroscopía por criofractura, realizados previo tratamiento con enzimas proteolíticos y en presencia de reactivos marcados específicos para las proteínas de las superficies mas externas, han demostrado otras particularidades de la estructura fina de la envoltura del virus influenza, tales como: a) que la bicapa es continua y no está

atravesada por moléculas proteicas, ya que las enzimas proteolíticas degradaron tan sólo las glicoproteínas de la superficie pero no afectaron a la capa lipídica; b) que los polipeptidos conocidos como (P) y (NP) permanecen asociados a la ribonucleoproteína (RNP) mientras que otro polipéptido (M) aparece asociado con la superficie interna de la membrana viral (WHITE y cols, 1970; COMPANS y cols, 1970); y c) que, finalmente, el polipéptido (M) no atraviesa la capa lipídica, puesto que no resulta afectado por las enzimas proteolíticas (COMPANS y cols. 1970; KLENK y cols. 1972).

iii) RIBONUCLEOPROTEINA

Este constituyente se compone de 10-12% de RNA y, partiendo de un extracto de RNP viral (previo proceso de sedimentación en gradientes de glicerina), se distinguieron tres fracciones de ribonucleoproteínas (RNP) (COMPANS, y cols. 1972): la RNP I, con una longitud de 90 a 120 nm que contiene un RNA cuyo peso molecular es de $0,9$ a 1×10^6 d.; la RNP II con una longitud de 60 a 90 nm que contiene un RNA cuyo peso molecular es de $0,6$ a $0,8 \times 10^6$ d.; y, finalmente, la RNP III con una longitud de 30 a 50 nm, que contiene un RNA cuyo peso molecular es de $0,3$ a $0,4 \times 10^6$ d. Estas tres moléculas de RNP son del mismo diámetro.

La estructura de la RNP sugirió que estaba compuesta de una cadena de RNA, doblada sobre si misma y empaquetada dentro de una doble hélice regular en la que existían de 20-26 subunidades de proteína por cada vuelta de la doble hélice y 20 nucleótidos por cada subunidad de proteína.

Hasta aquí la estructura submicroscópica de este importante grupo de virus, pero antes de entrar en el estudio detallado de su ciclo biológico parece lógico hacer una ligera mención de las diversas funciones biológicas desempeñadas por los distintos componentes virales, según se resume a continuación junto con algunos datos de su composición:

a) La hemaglutinina (HA) se une a los receptores de superficie de las células susceptibles que contienen ácido neuramínico y con ello se inicia el proceso de infección. Si previamente a la infección tratamos los viriones con anticuerpos específicos para esta (HA), la infección no tiene lugar.

b) La neuraminidasa (NA), por otra parte, rompe los residuos de ácido neuramínico existentes en las glicoproteínas y gangliósidos de los receptores específicos localizados en las células susceptibles de infección y con los que han entrado en contacto mediante el elemento anterior (HA).

c) La bicapa lipídica y la capa de proteína (M) son componentes estructurales que resultan necesarios para el ensamblado y mantenimiento de la estructura viral y probablemente también para la penetración y decapsulación viral.

d) La ribonucleoproteína (RNP) contiene toda la información genética necesaria para la replicación viral y una RNA polimerasa que ha de catalizar la síntesis del RNA, que resulta complementario para el RNA del virión. No se sabe a ciencia cierta, si la actividad viral se debe al polipeptido (P), al polipéptido (NP) o a ambos juntos.

e) Según datos de distintos autores (ADA y PERRY, 1954 FROMMHAGEN y cols, 1959), completados mas tarde por BLOUGH y cols (1967), estos virus influenza tienen una composición global de 0,8 - 1% de RNA, con 70% de proteína, 20% de lípidos y 5 - 8% de carbohidratos. Estos datos no resultan muy exactos para la partícula normal infecciosa, ya que se estimaron sobre grandes concentraciones de virus y sabido es que, en estas poblaciones, existen muchos virus incompletos.

Por otra parte no parece existir acuerdo para el peso de estas partículas virales; considerando el "fowl plague virus" (FPV) como un caso particular y utilizando técnicas de sedimentación y microscopía electrónica, se obtuvo un peso de $270 - 290 \times 10^6$ d. (SHARP y cols. 1945), mientras que cuando se calculaba por medio de coeficientes de sedimentación y difusión se obtenían pesos aproximados a los 151×10^6 d. (SCHAFER y cols, 1952).

iv) ACIDO NUCLEICO

En cuanto a las características del ácido nucleico, podemos decir que está unido a la proteína mas interna, llamándose al conjunto ribonucleoproteína o nucleocápsida. SKEHEL (1971) y BISHOP y cols. (1971) -mediante electroforesis en gel de poliacrilamida- han estimado para este RNA un peso molecular de 4 a 5×10^6 d. El virión contiene toda la información genética necesaria para codificar todos los polipéptidos estructurales y no estructurales específicos del virus, y para ello se requiere que su genoma tenga por lo menos un peso molecular de aproximadamente 4×10^6 d.

El que este virus posea un ácido nucleico sensible a la ribonucleasa (RNasa) y que, además, sus valores de coeficiente de sedimentación esten condicionados por la concentración de sales, sugirió que el genoma del virus influenza era un RNA monocatenario posiblemente fragmentado, ya que presenta una frecuencia de recombinación extremadamente alta (HIRST, 1962, DUESBERG y ROBINSON, 1967).

Este RNA fue analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida (DUESBERG, 1968; CHOPPIN y PONS, 1970) y así se pudieron distinguir 6 especies diferentes de RNA, cuyo tamaño oscilaba de 3,4 a $9,8 \times 10^5$ según se puede comprobar en el CUADRO IV según datos tomados de SKEHEL, (1971) y LI y SETO, (1970).

El detalle molecular de que este RNA monocatenario está fragmentado se revela, además de por su elevada frecuencia de recombinación, por tres tipos de pruebas cuyos resultados se resumen a continuación:

a) La RNA polimerasa RNA-dependiente de células infectadas con virus influenza es capaz de sintetizar "in vitro" una mezcla de ácidos ribonucleicos (RNAs) de simple y doble cadena (MAHY y BROMLEY, 1970). La ultracentrifugación de estos RNAs en gradientes de sacarosa, permite separar un RNA de simple cadena de 8S y otro de 18S; además, también se encontraron otro RNA de doble cadena que sedimentaba a 11 S, así como moléculas replicativas intermedias que lo hacían de 14 a 20 S, según se puede ver en el Cuadro IV.

CUADRO IV.- Idea del tamaño molecular de los distintos RNA diferenciados en el virus influenza.

Coeficiente de sedimentación	Peso molecular x 10 ⁶
21 S	0,98
20 S	0,93
17 S	0,65
16 S	0,61
14 S	0,39
13 S	0,34

b) Experimentos de hibridación cruzada, usando 3 clases de tamaño de RNAs monocatenarios de viriones frente a RNAs bicatenarios de células infectadas, indicaron que la frecuencia de bases -presente en la clase de tamaño mas pequeño- no existían en las moléculas de RNAs mas grandes. Así, HORST y cols. (1972) encontraron distintas secuencias de oligonucleótidos en varias clases de RNAs virales.

c) Después de un breve tratamiento a pH 3, o permanencias prolongadas de estos RNAs por encima de 4° C, tan sólo aparecen moléculas de RNA del tamaño mas pequeño (LI y SETO, 1970).

Al estudiar la fracción proteica, nos encontramos con que es la mas importante -cuantitativamente considerada- ya que supone aproximadamente un 60-70% de la masa total. Hace casi diez años que DIMMOCK (1969); DIMMOCK y WATSON, (1969), con métodos serológicos y electroforéticos, alcanzó a separar 7 componentes serológicos, mientras que CONTENT y DUESBERG (1970) no lograron separar mas que 5 componentes por electroforesis en gel de poliacrilamida, aunque sospecharon que podría existir alguno mas. Después de los últimos trabajos (COMPANS y cols, 1970; KLENK y cols, 1972; LAVER, 1971; LAZAROWITZ y cols, 1973 a; LAZAROWITZ, 1973b; SCHULZE, 1970; SCHULZE, 1972 y WRIGLEY y cols, 1973) quedan definitivamente admitidos los 7 componentes cuyas características se indican en el Cuadro V.

La función y localización exacta del polipéptido (P) no ha sido establecida, pero es un componente interno del virión (COMPANS y cols, 1970; KLENK y cols, 1972). En algunos sistemas se han encontrado 2 polipéptidos de este tipo (P_1 , P_2)

(SKEHEL y SCHILD, 1971; BISHOP y cols, 1972). El polipéptido (NP) es la subunidad de la ribonucleoproteína (RNP) (PONS y cols, 1969 y JOSS y cols, 1969).

En cuanto al polipeptido (NA) -al igual que el (HA)- contiene moléculas glucídicas y es la subunidad de la neuraminidasa viral (WEBSTER, 1970; GREGORIADES, 1972). La glicoproteína mas grande (HA) posee actividad hemaglutinante; se sintetiza como un producto primario del gen pero puede ser escindida proteolíticamente en dos polipéptidos: (HA₁) y (HA₂) (LAZAROWITZ y cols, 1973a; RIFKIN y cols, 1972; KLENK y cols, 1972; STANLEY y cols, 1973). El que la glicoproteína se escinda en mayor o menor proporción depende de la célula huésped, de la estirpe viral y de la presencia o ausencia de plasminógeno en el suero que entra a formar parte componente del medio.

Por otra parte, WEBSTER (1970) también ha purificado y estudiado comparativamente preparaciones de neuraminidasa y hemaglutinina; de esta forma, utilizando criterios electroforéticos, inmunológicos y de microscopía electrónica, se pudo establecer que ambas espículas estaban compuestas de subunidades cuyo peso molecular era de 58.000 y 47.000 d., respectivamente.

El polipéptido (M) resultó ser el más abundante del virión, aunque su tamaño molecular sea el mas pequeño; estas características, junto con la propiedad de no estar glicosilado, sugirió que es el constituyente de la membrana proteica que se situa por debajo de la bicapa lipídica.

CUADRO V.- Resumen de datos que caracterizan a las proteínas estructurales del virus influenza.

Localización de la proteína en el virión	Designación de la proteína	Peso molecular x 10 ³	Cantidad relativa en % de la proteína total	Nº aproximado de moléculas/virión	Designación funcional	Función
Proteínas dentro de la envoltura lipídica, asociada con el ácido nucleico	VPI	81-94	1,5-2,7	30-60	P(P ₁ ,P ₂)	Proteína que queda en la nucleocápsida pero no está necesariamente asociada al RNA.
Proteína dentro de la envoltura lipídica no asociada con ácido nucleico: capsida o membrana proteica	VPII	60-65	17-26	500-940	NP	Proteína nucleocápsida.
Glicoproteínas que están en parte o completamente fuera de la envoltura lipídica	VPIII	25-27	33-46	2500-3120	M	Es el constituyente principal, si no el único, de la membrana proteica
	VGP1	75-80	0-24	640-930	HA	Consta de HA ₁ + HA ₂ . Las 2HA forman una espícula hemaglutinante
	VGP2	55-58	3,1-69	110-240	NA	Actividad neuraminidasa, 4 forman una espícula NA
	VGP3	49-58	0-23		HA ₁	Subunidades HA;
	VGP4	25-30	0-12		HA ₂	2HA ₁ + 2HA ₂ forman una espícula de HA

Finalmente, la molécula conocida como (NS) resulta ser un polipéptido no estructural que aparece en grandes cantidades en las células infectadas con virus (LAZAROWITZ y cols, 1971); mientras que los polipéptidos (HA₁) y (HA₂), distinguidos en el cuadro anterior, no se consideran por separado ya que ambos son constituyentes primarios que se derivan del polipéptido (HA) por escisión.

Aunque no está muy claro, estudios con marcadores radioactivos, en tiempos inmediatos a la infección viral o mediante marcados prolongados, parecen indicar que las proteínas del virus influenza se escinden en uno o mas precursores polipeptídicos; y también, mediante análisis de estos péptidos, se ha confirmado que las tres principales proteínas comparten péptidos comunes (ETCHISON y cols, 1971).

Asimismo, se han podido establecer relaciones de proporcionalidad directa entre los tamaños moleculares de los diferentes RNA virales y los polipéptidos por ellos codificados, lo cual parece lógico según se puede ver en los datos citados en el Cuadro VI.

Al considerar los datos del Cuadro V habremos de admitir, de acuerdo con COMPANS y CHOPPIN (1975), que éstos no son totalmente rigurosos y han de estar condicionados por el método de análisis y las posibles variaciones dentro de una misma cepa viral. Así habremos de tener en cuenta que:

a) Los pesos moleculares de las glicoproteínas no pueden ser totalmente ciertos porque no se tiene en cuenta como influye la presencia de carbohidratos en las movilidades

CUADRO VI.- Relación entre los tamaños del RNA viral y las moléculas polipeptídicas

Polipéptido	Peso molecular	Tamaño estimado de los RNA virales
P ₁	94.000	9,8 x 10 ⁵
P ₂	81.000	9,3 x 10 ⁵
HA	75.000	8,2 x 10 ⁵
NP	60.000	7,0 x 10 ⁵
NA	55.000	5,8 x 10 ⁵
M	26.000	3,9 x 10 ⁵
NS	25.000	3,4 x 10 ⁵

electroforéticas y esta es normalmente la técnica que se ha seguido para calcular los pesos moleculares. Como consecuencia, el número de moléculas por virión no parece ser el correcto ya que tampoco se conocen con exactitud el peso molecular de las proteínas.

b) Los polipéptidos virales no glicosilados son de peso molecular constante en los distintos individuos de un mismo tipo, aunque crezcan en diferentes células; sin embargo, las glicoproteínas sí varían según las cepas, y por tanto esta es otra fuente de variabilidad no tenida en cuenta.

Los lípidos, según ya hemos dicho, constituyen aproximadamente el 20% de la masa total del virión influenza o FPV y no son específicos del propio virus sino que los adquiere durante el proceso de exocitosis o gemación ("budding" en la terminología anglosajona) a través de la membrana de la célula huésped; de aquí, que dentro de un mismo virus, la composición -tanto cuantitativa como cualitativa- de lípidos pueda variar según las características de la célula huésped (CHOPPIN y cols, 1971; KLENK y CHOPPIN, 1970 a, b; LAINE *et al*, 1972).

Finalmente, los glúcidos que entran en la composición total de estos virus en una proporción del 5 al 8%, pueden aparecer unidos en forma covalente a otras moléculas de proteína o lípidos dando origen a glicoproteínas o glicolípidos de una cierta significación biológica en las interacciones huésped-parásito. FROMMHAGEN y cols. (1959) han demostrado que la galactosa, manosa, fucosa y glucosamina son constituyentes de los polisacáridos del virus influenza. La secuencia y tamaño

del carbohidrato viral está determinado por la célula huésped, ya que se necesitan al menos 4 transferasas específicas para la biosíntesis de estas cadenas glucídicas; cabe suponer que el virus no posee suficiente información genética para codificar todas estas transferasas. Mas tarde, KLENK y CHOPPIN (1970 b), encontraron que los viriones que poseen neuraminidasa no tienen ácido neuramínico en sus carbohidratos; y SCHULZE (1974) ha demostrado que la falta de ácido neuramínico no es esencial para la infectividad viral.

1.2. Ciclo vital o replicación del virus influenza

Aunque en el capítulo anterior, hemos hablado del proceso de replicación viral, parece necesario revisar en profundidad los distintos datos que particularmente se refieren al ciclo vital del virus influenza y a los mecanismos y ordenación de las distintas síntesis de macromoléculas, hasta llegar al proceso de liberación de una nueva partícula viral al cabo de las distintas fases -ya conocidas- de adsorción, penetración, eclipse, ensamblado, maduración y liberación.

1.2.1. En cuanto a la adsorción, ésta se produce a través de la glicoproteína hemaglutinante por medio de un fenómeno físico de atracción electrostática. KILBOURNE y cols. (1968) demostraron que el antisuero X-7F1 obtenido frente a una estirpe híbrida de A₀ y A₂ (que posee la hemaglutinina de A₀ y la neuraminidasa de A₂) no inhibía la neuraminidasa de los virus A₀ pero sí inhibía la hemaglutinación y la infectividad de los virus A₀. En cambio, el mismo antisuero, era capaz de inhibir la actividad neuraminidásica pero no la hemaglutinante e infectiva de la A₂. Estos resultados sugieren la

importancia de la hemaglutinina en el proceso de adsorción.

También, por otra parte, se ha estudiado la naturaleza química de los receptores celulares de membrana, partiendo de investigaciones sobre un sistema biológico como el de interacción eritrocito-virus. Así, después de que HIRST (1941), por una parte, y McCLELLAND y HARE (1941) por otra, descubrieran que el virus influenza causaba la aglutinación de eritrocitos, se pudo comprobar que la neuraminidasa viral destruía los receptores de la superficie del eritrocito; de esta manera queda supuesto que el receptor del virus influenza es una glicoproteína que contiene ácido neuramínico.

MARCHESI y cols. (1972) observaron que al tratar con tripsina la superficie de células eritrocíticas humanas se producía una agregación de los receptores glicoproteínicos en placas. Si en ese momento producían una infección con virus y luego observaban al microscopio electrónico, veían que estos virus quedaban fijados a dichas placas. Asimismo se ha comprobado que numerosas sialoproteínas solubles, son receptores de los viriones influenza y pueden actuar como inhibidores de hemaglutinación (KRIZANOVA y RATHOVA, 1969).

1.2.2. *Durante la fase de Penetración*, el virus debe entrar dentro de la célula y a la vez (o después) ha de liberar la nucleoproteína o nucleocápsida. Existen dos tendencias para explicar este fenómeno: para un grupo de investigadores el fenómeno de "eclipse", que tiene lugar después de la infección, ocurre en la superficie celular de forma que queda la envoltura viral en la superficie celular y

penetra en la célula únicamente, la nucleoproteína. Sin embargo, para otro grupo de investigadores, el descapsulamiento durante el periodo de "eclipse" tiene lugar dentro de una vacuola fagocitaria. Tanto en un caso como en otro se necesita, primero, romper la envoltura con el fin de liberar la nucleocápsida y a continuación liberar, de esta última, el RNA. Como referencia a los autores que sustentan ambas teorías remitimos al estudio que sobre este punto hacen DURAND y cols. (1970).

Esto parece haber quedado claro mediante el empleo de la molécula 1-adamantanamina (amantadina), que es capaz de inhibir el crecimiento del FPV a este nivel: Para que esta molécula sea eficaz hay que administrarla antes de la infección viral ya que no tiene efecto alguno ni sobre la adsorción ni sobre la penetración.

Recientemente STEPHENSON y DIMMOCK (1975), ha observado que la penetración y descapsulación pueden ocurrir a 4° C; a esta temperatura no tiene lugar ni la fusión del virión a la membrana celular, ni viropexis. Esta observación contradice las dos teorías, antes mencionadas, de la penetración y descapsulación del virión; complicando, aún más, estos fenómenos iniciales de la multiplicación viral. Además, estos mismos investigadores encontraron que a 4° C el 50% de los viriones, llegan a estar asociados con el núcleo a los 15 minutos de la inyección y esta proporción aumentaba hasta el 85% a las 3 horas; este proceso a 37° C es mucho más rápido. Después los viriones salen del núcleo, quedando únicamente 20-30% a 37° C, y se incorporan al citoplasma.

1.2.3. *En relación con la biosíntesis de los componentes virales*, se sabe que una vez que el nucleoide viral atraviesa la membrana de la célula huésped, tiene lugar un periodo llamado de "eclipse" en el que se produce la biosíntesis de todos los componentes virales. Este periodo es quizá el mas estudiado pero a la vez el mas incierto y difícil de conocer, puesto que pueden existir particularidades condicionadas por la naturaleza del virus y que todavía no son conocidas. Como visión general del problema, referente a la biosíntesis de los distintos componentes de los orthomixovirus, iremos resumiendo los antecedentes que existen en cuanto a síntesis del RNA, proteínas, lípidos, y glúcidos.

En cuanto a la síntesis del RNA viral, todavía quedan algunas etapas inciertas en relación con el exacto papel del nucleo celular en la replicación de estos virus o sobre la posibilidad de inhibición por actinomicina D ó por α -amanitina. CHOW y SIMPSON (1971) al estudiar la transcripción del virión, previa disrupción de la envoltura viral con un detergente no aniónico, descubrieron una RNA polimerasa RNA-dependiente que interviene en el proceso biosintético de los viriones influenza. Esta enzima parece no ser inhibida por una exonucleasa (DNasa), ni por α -amanitina, ni por antibioticos tales como actinomicina D o rifampicina, pero es sensible a una RNA nucleasa (RNasa). Esta actividad enzimática requiere, además de los 4 trifosfatos de ribonucleosido, iones Mg^{2+} , Mn^{2+} y cationes monovalentes (BISHOP y cols, 1971). La actividad biosintética está localizada en las ribonucleoproteínas que contienen el RNA viral, nucleoproteína (NP) y proteína (P). Esta enzima, que se la denominó RNA-transcriptasa, es capaz

de producir "in vitro" por lo menos el 95% de las especies RNA virales complementarios y puede funcionar durante la transcripción sin un requerimiento en la síntesis de nuevas proteínas. Ha sido descubierta por HO y WALTERS (1966) en la fracción microsomal de células de membrana corioalantoidea infectadas con virus influenza (A₀/PR8). Esta actividad de la RNA-polimerasa RNA-dependiente alcanza un máximo de actividad a las tres horas después de la infección viral y requiere, según dijimos antes, los 4 trifosfatos de ribonucleósido y cationes divalentes y monovalentes. Su actividad enzimática resulta inhibida por actinomicina D tan sólo cuando el antibiótico se añade 1 hora después de la infección, pero si se añade 2 horas después o mas tarde aún, el antibiótico carece de efecto.

Experimentos de ZIMMERMANN y SCHAFER (1960), demostraron que si la p-fluorofenilalamina (FPA) se daba dentro de los primeros 60 minutos subsiguientes a la infección de las células de embrión de pollo con Fowl plague virus (FPV), se podía inhibir la formación de todo el material vírico, mientras que si se administraba 2 horas después de dicha infección, se formaba una cantidad normal de RNA viral; cabe deducir, de esto, que se necesita la formación de alguna proteína o proteínas imprescindibles para iniciar la síntesis de ácido nucleico (SCHÖLTISSEK y cols. 1962).

Se ha demostrado que las diversas estructuras moleculares aisladas presentando esta actividad enzimática, son complejos de ribonucleoproteína (RNP) similares en morfología a las ribonucleoproteínas (RNPs) presentes en los viriones influenza y contienen los polipéptidos (P) y nucleoproteína (NP) pero no el polipéptido (NS) (COMPANS, 1973). Asimismo,

se ha comprobado, además, en el caso de FPV, que la ribonucleoproteína funciona como un ribosoma activo (SCHOLTISSEK y cols. 1962) y que el producto de la RNA polimerasa citoplásmica es un RNA complementario para el RNA del virión (CALIGURI y COMPANS, 1974). Por medio de técnicas de hibridación con RNA del virión, se han identificado en el citoplasma celular de las células infectadas distintas especies de ribonucleoproteínas (RNP) y RNAs específicos del virus. Estas moléculas de RNA virales, mono y bicatenarias (resistentes a RNasa), son complementarios al RNA del virión; asimismo, se han aislado por este procedimiento, RNP virales y se ha comprobado que eran semejantes a las encontradas en el virión. También SCHOLTISSEK y ROTT (1970), mediante experimentos de hibridación, y KRUG (1972), por aislamiento de RNPs virales de nucleos y citoplasmas, vieron que las distintas especies de RNA específicas del virus aparecían en una fase temprana subsiguiente a la infección. En un sistema de Fibroblastos-FPV, la máxima proporción de síntesis de RNA complementario se produce a las 2 horas, mientras que para la síntesis de RNA del virión se llegan a alcanzar las 3 horas.

Por su parte, el último autor citado encontró que en el sistema celular MDCK-cepa WSN influenza era posible detectar cadenas de RNA complementario tanto en el núcleo como en el citoplasma. A partir de las 2 horas de la infección, la cantidad de RNA complementario en el núcleo permanecía constante, mientras que la concentración molecular del mismo en el citoplasma, seguía aumentando hasta las 4 horas, para después quedar ya sin variación. Se ha comprobado que a partir de las 4 horas post-infección, únicamente se sintetiza RNA del virión y este se va incorporando dentro de las RNPs citoplásmicas. Sin embargo, las moléculas de RNP que contiene RNA

complementario no son incorporadas dentro de los viriones y su función es todavía desconocida. Las RNPs nucleoplásmicas que contienen RNA viral, son ensambladas en una proporción mas baja que las RNPs citoplásmicas.

Según parece la RNA polimerasa del virión y la RNA polimerasa aislada a partir de células huésped son capaces, ambas, de sintetizar RNA complementario "in vitro" y no son inhibidas por la actinomicina D. Sin embargo, la actinomicina D sí es capaz de inhibir la replicación viral cuando se añade tempranamente en el ciclo de crecimiento, lo que sugiere que una función celular -que es sensible a actinomicina D- resulta especialmente imprescindible para la replicación viral. La mayoría de los RNA virus, incluyendo paramixovirus, son insensibles a este inhibidor; y lo mismo puede decirse con respecto a la mitomicina y α -amanitina.

Si las células que luego han de ser infectadas con virus influenza, se irradian con rayos ultravioleta (UV), también puede resultar después inhibida la replicación viral. Ello puede ser debido a un posible deterioro de las cadenas que han de actuar como moldeadoras.

Aunque la síntesis de RNA del virión resulta inhibida por la cicloheximida, ésta no tiene efecto sobre la transcripción primaria (BEAN y SIMPSON, 1973) ni es capaz de bloquear la síntesis de RNA complementario cuando esta molécula se añade tardiamente en el ciclo de crecimiento. Todo ello parece sugerir que es necesaria la síntesis de una o mas proteínas capaces de intervenir en la formación de enzimas comprometidas en la síntesis del RNA del virión (PONS, 1973; SCHOLTISSEK y ROTT, 1970).

En relación con la síntesis de proteínas durante la replicación viral, diferentes investigadores, analizando las distintas moléculas de RNA asociadas por la región polisoma de células infectadas (después de marcar radiativamente el RNA en presencia de actinomicina D), encontraron que el RNA extraído de esta región (y marcado en el periodo comprendido entre los 210 y 390 minutos después de la infección), tenía una sedimentación igual a la del RNA del virión (NAYAK y BALUDA, 1968). Asimismo ha podido ser también comprobado, que los RNAs viral y complementario se encuentran localizados en la región del polisoma. Según PONS (1972) (1973), el RNA complementario funciona como un RNA mensajero. Sin embargo, otros investigadores (KINGSBURY y WEBSTER, 1973), en sistemas acelulares de reticulocito de conejo, encontraron que, el RNA total extraído de células infectadas es capaz de dirigir la síntesis de polipéptidos específicos de virus y también, que el RNA extraído de viriones, era inactivo; ello se opone a la teoría anterior de que esta molécula tenga capacidad como mensajero.

Por otra parte, en las células infectadas, se han encontrado todos los polipéptidos del virión, más uno o dos polipéptidos no estructurales específicos del virus (KLENK y cols, 1972; LAZAROWITZ y cols, 1971; SKEHEL, 1972). La subunidad (NP) de la nucleocápsida resulta ser el polipéptido más abundante que existe en las células infectadas; en tanto que la proteína (M), pese a ser la más abundante en el virión, se encuentra en relativamente poca cantidad en la célula huésped, lo que sugiere que la síntesis de esta proteína está controlada y debe constituir una etapa limitante en la producción viral (LAZAROWITZ y cols. 1971). También en las células infecta-

das, se encuentra en grandes cantidades el polipéptido hema-
glutinina (HA), que no está escindido, y el polipéptido no
estructural (NS); sin embargo los polipéptidos (P) y (NA) se
encuentran en cantidades menores. Debido a que, en el sistema
célula-FPV los polipéptidos (P₂) (NP) y (NS) son los primeros
en detectarse, SKEHEL (1973) sugirió que estas moléculas pue-
den ser los productos directos de la transcripción selectiva
de 3 segmentos del genoma viral producidos por la polimerasa
del virión.

Al estudiar la localización intracelular de estos
polipéptidos virales, mediante técnicas de inmunofluorescen-
cia, se han encontrado antígenos nucleocápsulares tanto en
el núcleo como en el citoplasma y también se ha visto cómo
en el transcurso del tiempo llegan a desaparecer del núcleo,
lo que hace pensar que exista un transporte de nucleocápsidas
desde el núcleo al citoplasma. Mas recientemente se ha compro-
bado que todos los polipéptidos virales parecen ser sintetiza-
dos en el citoplasma (TAYLOR y cols, 1970).

Finalmente, hemos de señalar que se han hecho estu-
dios de coelectroforesis (LAZAROWITZ y cols, 1971) en las dis-
tintas fracciones celulares y se han llegado a conclusiones
de este tipo:

i) En el núcleo celular se ha encontrado que la
nucleoproteína (NP) es el polipéptido mas abundante en el nu-
cleoplasma y que este, está también presente en las RNPs vira-
les. Además se encontraron los polipéptidos no estructurales
(NS), (P) y un polipéptido no estructural (NS₂) cuyo peso mo-
lecular es de aproximadamente 11.000 d. No hay duda de que
existen emigraciones de los polipéptidos (NS) y (NP) y es, el

primero de ellos, el más rápido en dicho proceso; también se ha comprobado que la emigración no es afectada por la cicloheximida ni por actinomicina D. La función de los polipéptidos virales en el núcleo no está clara aunque es probable que los procesos nucleares resulten esenciales en la replicación viral, ya que ésta no puede producirse en fragmentos del citoplasma del que se haya eliminado el núcleo; en estas circunstancias los paramixovirus son capaces de replicarse (CHEYNE y WHITE, 1969).

ii) En la fracción soluble (que es el sobrenadante que queda después de centrifugar los restos celulares a 100.000 x g durante 60 minutos ó 200.000 x g durante 30 minutos), se encontraron los polipéptidos (NP) y (P). Es lógico que esto sea así, ya que estos últimos polipéptidos son los integrantes externos de las RNPs y éstas son conocidas desde el principio como "antígenos solubles" (S) (COMPANS, 1973 a; KLENK y cols, 1974).

iii) En la fracción de gránulos citoplásmicos, se pueden separar, por velocidad de sedimentación, 3 subfracciones distintas: a) Membranas lisas, en cuya subfracción el polipéptido más abundante es la hemaglutinina (HA), y se puede encontrar escindido en los polipéptidos (HA₁) y (HA₂) como sucede en el caso de células infectadas con FPV; también se pueden encontrar en pequeñas cantidades los polipéptidos (NA) y (M). b) Subfracción intermedia que sedimenta entre la fracción membranas lisas y membranas rugosas; en ésta, el polipéptido más abundante es el polipéptido (NP) y además contiene la mayoría de la actividad RNA polimerasa. c) Microsomal rugosa, que contiene los polipéptidos (HA), (NP) y (NS); paralelamente,

y por medio de técnicas en las que se dan pulsos con moléculas marcadas, se comprobó que el polipéptido (HA) emigra de las membranas citoplásmicas rugosas a las lisas; de aquí se dedujo que la glicoproteína viral se sintetiza en los ribosomas asociados con el retículo endoplásmico (RE) rugoso y que las cadenas completas emigran después a las membranas lisas.

iv) En la fracción polisoma, se encontraron grandes cantidades de los polipéptidos (NP) y (NS) (PONS, 1972); lo que sugiere que dichos polipéptidos permanecen asociados a los ribosomas y polisomas.

v) En la fracción membranas plasmáticas se pueden encontrar, a excepción de los polipéptidos no estructurales, la mayoría de los polipéptidos encontrados en el virión salvo la (HA) no escindida, que se encuentra en mayor proporción; en cualquier caso, siempre guardan la misma proporción cuantitativa que existe en el virión (LAZAROWITZ y cols. 1971; STANLEY y cols. 1973); de ello se deduce que los componentes virales de la envoltura, son los primeros en llegar a la membrana plasmática, y a continuación se van asociando a esas zonas los otros componentes internos.

KLENK y ROTT (1973), al investigar sobre las posibilidades de inhibir esta síntesis de proteínas, encontraron que la fluorofenilalanina y los inhibidores de proteasas inhiben la escisión de (HA) en (HA₁) y (HA₂). Asimismo se observó, que la temperatura podía causar un efecto inhibitor específico, ya que células infectadas e incubadas a 25° C no producían virus infectivos (ROTT y SCHOLTISSEK, 1968). Por otra parte, también se ha observado que la síntesis de glicoproteínas resulta inhibida por altas concentraciones de glucosamina y de 2-desoxiglucosa (KILBOURNE, 1959).

Referente a la síntesis de lípidos, el hecho de que la composición lipídica del virus influenza sea prácticamente análoga a la de la célula huésped, indica que los lípidos virales derivan de los de la célula parasitada; de aquí, que la síntesis de los lípidos virales sea un proceso normal de la célula y siga sus mismos patrones metabólicos (ARMBRUSTER y BEISS, 1958; FROMMHAGEN y cols. 1959; KATES y cols. 1962).

Finalmente, la síntesis de glúcidos durante la formación de nuevos viriones, se ha seguido a través de marcadores radioactivos con moléculas precursoras tales como fucosa y glucosamina marcadas con ^3H y ^{14}C . Así se ha comprobado que las cadenas de carbohidratos pertenecientes a las glicoproteínas, son sintetizadas durante la infección. También se ha visto que la glucosamina está asociada al polipéptido (HA) en las fracciones de membranas citoplásmicas lisas y rugosas, mientras que la fucosa aparece asociada con la (HA) en las membranas lisas, pero no en las rugosas (COMPANS, 1973 b).

1.2.4. *Durante el Ensamblado*, se lleva a cabo la disposición ordenada de los distintos elementos estructurales y, en dicho proceso, cabe distinguir varias fases según que se refieran al empaquetamiento del genoma segmentado, a la reorganización de las distintas moléculas que forman la nucleocápsida o al momento de gemación o exocitosis ("budding").

En cuanto a la fase de empaquetamiento del genoma segmentado, puede plantearse la cuestión de por qué siendo el genoma de naturaleza segmentada y necesitando todas las piezas para que un virión sea infectivo, ¿cómo pueden repartirse uniformemente todas las piezas en los viriones, de tal forma que a cada virión le corresponda una especie de cada RNPs ("pieza")?. Para explicarlo se han emitido las dos teo-

rias siguientes: a) los segmentos de ribonucleoproteínas (RNPs) quedan asociados por medio de un esqueleto continuo de proteína, lo que implica que los distintos segmentos de ribonucleoproteínas no se separan (PONS, 1970, KRUG, 1972); y b) las ribonucleoproteínas, según HIRST (1973), se incorporan al azar dentro de los viriones.

Para la formación de la nucleocápsida se ha demostrado, según varios experimentos, que las ribonucleoproteínas pueden existir tanto en el núcleo como en el citoplasma, y que las ribonucleoproteínas citoplásmicas no parecen estar asociadas con membranas intracelulares (COMPANS y CALIGUIRI, 1973). La proteína nucleocápsida se incorpora rápidamente en las ribonucleoproteínas (RNPs) virales; por otro lado, el RNA se incorpora dentro de las ribonucleoproteínas a partir de un conglomerado ("pool") de ácidos nucleicos previamente sintetizados.

En relación con el proceso de gemación y exocitosis ("budding"), hace bastante tiempo que MURPHY y BANG (1952) observaron mediante microscopía electrónica que en células de membrana corioalantoidea de embrión de pollo (infectadas con virus influenza) los virus liberados no producían lisis. Posteriormente, MORGAN y cols. (1961), usando anticuerpos marcados con ferritina, y observando también al microscopio electrónico, vieron que la ferritina quedaba fijada en zonas donde se formaban virus; es decir, en zonas de la superficie celular donde había antígenos virales específicos de los anticuerpos virales empleados. Mas recientemente se ha demostrado que los virus liberados poseen una envoltura, donde se aprecia

la unidad de membrana y externamente a esta, una capa de espículas (BACHI y cols. 1969). Parece completamente demostrado, en este proceso de exocitosis, que lo primero que se incorpora a la membrana de la célula huésped son las glicoproteínas virales de la envoltura viral; a continuación se incorpora, por la parte interior, la proteína de membrana (M) y después la ribonucleoproteína (RNP), que se une a la membrana (M), dando lugar al proceso de exocitosis. Varios hechos demuestran lo anteriormente expresado:

i - Células infectadas, cuya morfología al microscopio electrónico es absolutamente normal, pueden adsorber eritrocitos en determinadas regiones de la membrana celular. De lo que se deduce, que aún no viéndose la liberación de virus, aparecen zonas donde existen hemaglutininas virales que adsorben a estos eritrocitos.

ii - Las glicoproteínas de la envoltura viral, se asocian antes con la membrana que con la ribonucleoproteína (RNP) (LAZAROWITZ y cols. 1971).

iii - Todos los polipéptidos celulares se excluyen de aquellas zonas de la membrana celular en las que va a tener lugar el proceso de exocitosis. Esto explica el que no se encuentre ninguna proteína celular en la envoltura viral (HOLLAND y KIEHN, 1970).

iv - En la parte de membrana celular donde se produce el proceso de exocitosis no se han encontrado residuos de ácido neuramínico, lo que demuestra que en esa zona existe una

actividad enzimática de neuraminidasa (KLENK y CHOPPIN, 1970).

1.2.5. Finalmente, en el proceso de liberación de las nuevas partículas virales formadas, se ha comprobado la gran significación de las moléculas de neuraminidasa previamente sintetizadas; ya que anticuerpos específicos anti-neuraminidasa son capaces de inhibir esta liberación del virus (SETO y ROTT, 1966; WEBSTER y cols. 1968); y también, por otra parte, en células infectadas con mutantes que no poseen neuraminidasa se forman grandes agregados de virus que no pueden salir al exterior. Asimismo y como complemento de esta afirmación se ha comprobado, que estos virus tienen ácido neuramínico en su envoltura.

2. Paramixovirus

Este grupo de virus, que a partir de recientes clasificaciones, cuenta con mas componentes que el de Orthomixovirus y entre ellos, existen algunos, como los parainfluenza 1 al 5, NDV y el de la parotiditis que tienen propiedades muy afines a las del grupo Orthomixovirus. Otros virus del grupo, sin embargo, no poseen las actividades hemaglutinantes y neuraminidásicas, aunque todos ellos poseen características morfológicas semejantes que permiten diferenciarlos facilmente de los Orthomixovirus. Las diferencias mas importantes entre Orthomixovirus y Paramixovirus ya se vieron en otro apartado precedente. (Cuadro II)

Atendiendo a lo anteriormente dicho y al tipo de organismos que parasitan, se clasifican en distintas entidades, tal como se indica en el Cuadro VII (DINTER y cols. 1964; WALDER 1971; WATERSON, 1962).

CUADRO VII.- Algunas características diferenciales del grupo de los Paramixovirus

Tipo de virus	Otros nombres o subtipos	Algunos hospedadores naturales
NDV	Pneumoencefalitis aviaria	Pollos y otras aves
Parotiditis	Parotiditis epidémica	Hombre
Parainfluenza 1	Sendai, virus hemaglutinante del Japon	Ratón, episódicamente hombre
Parainfluenza 2	Tipo hemadsorción 2	Hombre
Parainfluenza 3	Grupo asociado (CA)	Hombre
Parainfluenza 4	Tipo hemadsorción 1	Hombre
Parainfluenza 5	Fiebre del embarque	Bovinos, ovinos
Sarapión	SV 5, DA	Hombre
Moquillo	Moquillo	Mono y Perro
Rinderpest	Peste Bovina	Hombre y Mono
Yucaipa		Perro
Nariva		Bovinos
		Pollos
		Roedores

Del cuadro anterior se deduce que todos ellos causan un amplio espectro de enfermedades, en los sistemas respiratorio y nervioso, siendo alguno de ellos capaces de atacar a casi todos los tejidos del organismo.

2.1. Morfología y estructura.

Como característica general, podemos señalar que los Paramixovirus son mas grandes y pleomórficos que los Orthomixovirus, son isodiamétricos y con un diámetro medio de 1.500 a 2.000 Å . Poseen envoltura lipídica y en su superficie mas externa se aprecia una capa de espículas. Las nucleocápsidas tienen una disposición en simetría helicoidal (HORNE y WILDY, 1961).

En cuanto a la ultraestructura de las distintas partes que componen el virión, habremos de considerar por separado la nucleocápsida y la envoltura.

Según es sabido, la nucleocápsida es la parte más interna del virión y consta de una molécula de RNA asociada a proteína, lo que constituye la ribonucleoproteína. Al microscopio electrónico, acudiendo a la técnica de tinción negativa, se ha demostrado que la nucleocápsida posee una estructura flexible de hélice sencilla, monocatenaria, con un diámetro entre 170 a 180 Å y con un espacio circular central de aproximadamente 50 Å (HORNE y cols. 1960).

El RNA de la nucleocápsida, tan sólo supone del 4 al 5% del peso total de la misma, siendo el resto proteína (HALL y MARTIN, 1973). La proteína se puede descomponer en

subunidades que tienen un peso molecular de unos 60.000 d según MOUNCASTLE y cols, 1971 de 56.000 a 61.000 d.

Además de la subunidad proteínica de la nucleocápsida -que es la mas abundante-, se han encontrado otras proteínas asociadas también a la nucleocápsida; la función de estas últimas no es muy conocida, aunque se cree que tienen actividad transcriptasa (MARX y cols. 1974).

La envoltura es la parte mas externa del virión y al tratar de ella habremos de tener en cuenta que en dicha estructura existen, por un lado, las espículas (que estan formadas por glicoproteinas) y, por otro, la bicapa lipídica con la capa de proteina asociada por su cara interna.

Las espículas forman una capa externa alrededor de la bicapa lipídica y poseen una longitud entre 80 y 120 Å. Por medio de enzimas proteolíticos tales como la pronasa, CHEN y cols. (1971) comprobaron -en viriones SV5-: a) que las espículas están formadas por moléculas de glicoproteinas; b) que estas espículas no llegan a atravesar la capa lipídica; c) que las espículas no intervienen en el soporte físico de las estructuras membranosas; y d) que, al eliminar las espículas, desaparecian las actividades hemaglutinante y neuraminidásica.

A diferencia de los Orthomixovirus, que poseen las actividades hemaglutinante y neuraminidásica separadas morfológicamente y que estas son realizadas por dos glicoproteinas distintas, en los Paramixovirus, ambas actividades van juntas y son realizadas por la glicoproteina mas grande de las dos que

componen la espícula. La glicoproteína grande, denominada (HN) o (HA/NA), posee un peso molecular de aproximadamente 67.000 d y la pequeña (F) tiene un peso molecular de aproximadamente 56.000 d (SCHEID y cols, 1972). Asimismo se encontró, que la glicoproteína pequeña era la responsable de la hemólisis y la fusión de las células infectadas (SCHEID y CHOPPIN, 1973).

La bicapa lipídica es de naturaleza semejante a la de la célula parasitada y, al microscopio electrónico, se pudo comprobar que estaba dispuesta en una forma muy similar al modelo unitario de membrana (McCONNELL y McFARLAND, 1972).

Al igual que los Orthomixovirus, los Paramixovirus (al menos los SV5, NDV y algún otro) tienen una membrana de proteínas asociadas con la superficie interna de la bicapa lipídica (SCHEID y CHOPPIN, 1973). La existencia de esta membrana proteica ha sido localizada por varios hechos: a) mediante estudios de difracción con rayos X; b) porque la proteína o proteínas componentes de la capa proteica no eran accesibles al marcado con reactivos específicos de superficie; c) porque resultaba resistente a enzimas proteolíticos; y d) porque previa disrupción de la bicapa, se aisló el componente proteico de esta membrana, y se comprobó que era una proteína no glicosilada, proteína (M), que tenía un peso molecular de aproximadamente 38.000 d.

Según CHOPPIN y cols (1972) la proteína (M) tiene dos funciones fundamentales: a) mantener la estructura e integridad de la envoltura viral, lo que consigue mediante las

interacciones que mantiene con los lípidos de la bicapa lipídica; y b) producir la exclusión de las proteínas celulares en aquellas áreas de la membrana celular que van a constituir la envoltura viral. Por otra parte, la nucleocápsida reconoce a esta proteína (M) y ello constituye la señal para que las nucleocápsidas se incorporen a las regiones de la membrana celular donde existen únicamente componentes virales (CHOPPIN y COMPANS, 1970).

2.2. Composición química

En términos generales, KLENK y CHOPPIN (1969), haciendo análisis químicos de viriones SV5 muy purificados, encontraron una composición global de 0,91% de RNA, 73% de proteínas, 20% de lípidos y 6,1% de carbohidratos, mientras que otros autores encontraron valores similares, aunque no totalmente idénticos, para otros paramixovirus (NDV, etc...) (NAKAJIMA y OBARA, 1967).

En cuanto a las particularidades de los distintos componentes, cabe establecer algunas precisiones:

i - El genoma de este grupo de virus está constituido por un RNA monocatenario de gran peso molecular, cuyo coeficiente de sedimentación, en gradientes de sacarosa, oscila entre 50 y 70 S (ADAMS, 1965; BLAIR y ROBINSON, 1968; COMPANS y CHOPPIN, 1968; KINGSBURY, 1973; NAKAJIMA y OBARA, 1967). Su peso molecular medio está alrededor de $5,5$ y $7,5 \times 10^6$ d. (COMPANS y CHOPPIN, 1968).

Analizando los coeficientes de sedimentación de distintos RNA específicos del virus, que han sido aislados a partir de células infectadas, se ha encontrado que estos RNA sedimentan a 18, 22 y 35 S, y que únicamente una pequeña parte de ellos lo hacían como los RNAs de los viriones (50-57 S); lo que demuestra que la mayoría de este RNA analizado es RNA-mensajero (RNAm) para codificar proteínas específicas del virus (BRATT, 1969).

ii - Las proteínas, estudiadas en principio, en NDV mediante electroforesis sobre gel de poliacrilamida estaban formando un conjunto de 3 proteínas mayoritarias y un número variable de otras proteínas que aparecen en menor proporción (EVANS, 1969). Posteriormente se han hecho estudios similares con los viriones de SV5, Sendai y NDV (CALIGUIRI y cols, 1969; KLENK y CHOPPIN, 1970) y se ha encontrado que el virión está compuesto por 5 a 7 proteínas distintas, y que posiblemente existan una o dos proteínas más, aunque en menor proporción.

Como característica común, todos los viriones de este grupo poseen los siguientes polipéptidos: a) una proteína-unidad de la nucleocápsida que tiene un peso molecular de aproximadamente 60.000 d (MOUNTCASTLE y cols. 1971); b) dos glicoproteínas, por lo menos, de las que la más grande y abundante tiene un peso molecular comprendido entre 65.000 y 74.000 d y la más pequeña de 53.000 a 56.000 d. Dichas glicoproteínas están situadas en la zona más externa, puesto que forman las espículas que, en este grupo, son uniformes y cada una posee las dos actividades hemaglutinante y neuraminidásica; c) otra proteína no glicosilada, con un peso molecular entre 38.000 y 41.000 d. Estas moléculas constituyen la membrana proteica que

está pegada a la parte interna de la envoltura. Es la equivalente a la proteína (M) de los Orthomixovirus; y d) otras 2 a 4 proteínas no glicosiladas, que están en proporción minoritaria y pueden variar en número, tamaño y proporción relativa, puesto que ellas sirven para establecer las diferencias entre los diversos individuos de este grupo.

Una propiedad importante de las glicoproteínas, es que tienen que estar siempre en la superficie mas externa del virión, mientras que las proteínas no glicosiladas están en la cara interna de la envoltura viral. El hecho de que el peso molecular del RNA que constituye el genoma, sea de aproximadamente 6×10^6 d., hace pensar que existe información potencial para codificar una o más proteínas no estructurales, que no son fácilmente reconocidas por estar en muy pequeña proporción (KINGSBURY y GRANOFF, 1970).

NEURATH y SOKOL (1963), por una parte, y ROUX y KALAKOFFSKY (1974) por otra, encontraron enzimas del tipo de ATPasa y algunas quinasas asociadas a los paramixovirus; lo que no está claro aún, es si estas enzimas son adsorbidas por los viriones al liberarse de las células huésped o son enzimas codificadas por el genoma del virión.

En el Cuadro VIII que sigue, se indican las distintas proteínas estructurales del virión SV5, según datos tomados de distintos autores (MOUNTCASTLE y cols, 1971; SCHEID y cols., 1972; SCHEID y CHOPPIN, 1973).

iii - Los lípidos, estudiados en primer lugar por KLENK y CHOPPIN (1970 b) y CHOPPIN y cols. (1972) en viriones SV5, parecen pertenecer a 4 tipos diferentes según la proce-

dencia de las células del cultivo. Así se ha encontrado que los viriones tienen una composición lipídica muy parecida a la de la membrana de la célula huésped parasitada. Por otra parte, QUIGLEY y cols. (1971), estudiando la composición lipídica de viriones Sendai y NDV que crecían en fibroblastos de pollo, encontraron que la composición lipídica de ambos tipos de viriones se parecía a la de la membrana celular eucarionte. Sin embargo, los viriones que contienen la neuraminidasa no contienen glicolípidos con ácido neuramínico. Esto es lógico ya que también se encuentra allí la enzima neuraminidasa.

En resumen se puede decir, que la composición lipídica de la envoltura viral está determinada principalmente por la célula huésped.

iv- Finalmente, los glúcidos existentes en los paramixovirus se encuentran formando distintas moléculas glicoproteicas; KLENK y CHOPPIN (1970 a) encontraron así, carbohidratos tales como galactosa, manosa, fucosa y glucosamina. Estos mismos investigadores encontraron grandes diferencias en la composición glucídica de un mismo tipo de virión cuando crecía en diferentes células.

Se sabe poco de la estructura exacta de las cadenas hidrocarbonadas existentes en las glicoproteínas y glicolípidos de los paramixovirus, sin embargo se admite que dicha estructura está determinada por la célula parasitada.

CUADRO VIII.- Algunos datos sobre las proteínas estructurales del virion SV5

Localización de la proteína	Designación de la proteína	Designación funcional	Peso molecular x 10 ⁻³	Cantidad relativa en % de la proteína total	Significación
Proteína asociada con el ácido nucleico	VP3	NP	61	Abundante	Proteína de la nucleocápsida
Proteína que está dentro de la envoltura lipídica pero que no está asociada con el ácido nucleico	VP6	MP	41	Abundante	Proteína de la membrana proteica
Glicoproteínas que están en parte o totalmente fuera de la envoltura lipídica	VP1	HA/NA	75		Glicoproteína que se encuentra en NDV pero no en SV5. Tiene actividades HA/NA.
	VP2	HA/NA	67		Glicoproteína que está en el SV5 pero no en el NDV. Tiene actividades HA/NA
Proteína que está en parte o totalmente por fuera de la envoltura lipídica	VP4	F	56	No es abundante	Glicoproteína responsable de fusión celular y hemolisis. Se encuentra tanto en SV5 como en NDV
Proteína no localizada	VP5		50	No es abundante	

2.3. Ciclo vital o replicación de los paramixovirus

Aunque el ciclo biológico de este grupo de virus es semejante al de los orthomixovirus, parece apropiado resumir los distintos estadios o fases, con el fin de poder indicar las particularidades que puedan existir durante la adsorción, penetración, biosíntesis de macromoléculas, ensamblado y liberación.

i- adsorción:

Este proceso biológico se lleva a cabo mediante uniones, por diferencia de carga eléctrica, entre la glicoproteína HN y los receptores celulares de membrana, localizados en la célula huésped.

Al igual que en orthomixovirus, el proceso de adsorción en este grupo, es independiente de la temperatura y dentro de amplio margen de pH con requerimiento de determinados cationes; a diferencia de los orthomixovirus, muchos paramixovirus se eluyen de los eritrocitos a 37° C y a temperatura ambiente, sin embargo, el NDV, presenta una unión irreversible (BURNET y ANDERSON, 1946).

Se ha comprobado que el proceso de adsorción es rápido y únicamente desciende el ritmo de fijación cuando ya se ha adsorbido el 70 - 80% del virus (LEVINE y SAGIK, 1956).

Aunque el proceso de adsorción se ha establecido con la máxima seguridad en el sistema eritrocito-paramixovirus, es igualmente válido para todos los sistemas célula-paramixovirus, y que en todos los casos, los receptores celulares se-

rian mucoproteínas que contienen ácido neuramínico (WATERSON, 1964). Una excepción importante es la del virus del sarampión, que únicamente es capaz de aglutinar eritrocitos de mono, y nunca se adsorben a receptores que contienen ácido neuramínico, quizás porque no poseen neuraminidasa (ROSEN, 1961).

ii - Penetración y pérdida de la capsula ("uncoating")

El proceso es común para todos, o casi todos, los virus provistos de envoltura y -aunque no se conoce el mecanismo íntimo del fenómeno- se han propuesto dos modalidades de penetración: a) mediante un proceso de viropexis o fagocitosis, en el que el virión se desprivaría de la envuelta, dentro de una vacuola digestiva, por medio de lisosomas (COMPANS y cols, 1966); b) mediante una fusión de la envoltura viral con la membrana celular penetrando únicamente la nucleocápsida en el citoplasma (HOWE y MORGAN, 1969).

Actualmente se cree que, una vez libre la nucleocápsida en el interior de la célula, el genoma viral puede ser transcrito inmediatamente sin liberarse de esta nucleocápsida, ya que se ha descubierto un complejo transcriptor asociado a la nucleocápsida (LERNER y cols, 1969) y, por otra parte, también, porque con la puromicina (WHEELLOCK, 1962) y la cicloheximida (ROBINSON, 1971 a) no se inhiben los procesos biosintéticos más tempranos; ello parece implicar que no es necesaria la síntesis de proteínas en las etapas más tempranas, que son las de transcripción.

iii - Biosíntesis de los componentes virales:

Una vez que la nucleocápsida está dentro de la cé-

lula parasitada, se produce el fenómeno de "eclipse", durante el cual tiene lugar una gran actividad biosintética en la que se producen todos los componentes virales. Para su mejor estudio, iremos considerando por separado los distintos tipos de macromoléculas que se originan:

a) Para estudiar la síntesis del RNA viral hay que tener en cuenta la existencia de una transcriptasa asociada al virión, ya que el RNA de los paramixovirus (cuando se utiliza aislado) no presenta infectividad. BALTIMORE y cols (1970) y poco más tarde HUANG y cols. (1971), encontraron actividad RNA polimerasa en viriones ND; también, en esta década; ROBINSON (1971 b), encontró una actividad semejante en viriones Sendai; y MOUNCASTLE y cols. (1971) en el SV5. Esta actividad enzimática "in vitro", requiere los cuatro trifosfatos de ribonucleosido, cationes Mg^{2+} y un agente reductor. De esta forma, el producto de la reacción es un RNA complementario del RNA del virión que sedimenta a 16 S. Esta reacción es sensible a la ribonucleasa (RNasa) y a la tripsina, mientras que es completamente insensible a la desoxirribonucleasa (DNasa) y a la actinomicina D.

MARX y cols. (1974) aislaron el complejo transcriptasa del virión Sendai, y comprobaron que estaba formado por la subunidad nucleocápsida y por una proteína no glicosilada de un peso molecular de aproximadamente 69.000 a 75.000 d (proteína P), siendo necesarias las dos proteínas para la transcripción.

La transcriptasa también funciona "in vivo", debiendo ser una etapa anterior a la replicación y a la transcripción general de mRNA; ya que esta actividad no es inhibida por la cicloheximida. Esta actividad enzimática da lugar a los primeros mRNA específicos del virión.

En cuanto al lugar donde se lleva a cabo la síntesis de este RNA viral, WHEELLOCK (1963), mediante autoradiografía, trabajando con NDV comprobó que dicha síntesis se efectuaba en el citoplasma. BLAIR y ROBINSON (1968), analizaron las moléculas de RNA viral encontradas en células infectadas con NDV y Sendai y demostraron que la mayoría de estas moléculas de RNA eran complementarias al RNA del virión (genoma). Su coeficiente de sedimentación variaba entre 18 y 50 S, siendo los mas abundantes los 18 S y menos abundantes los 50 S (genoma del virión); además, también se encontraban RNAs intermedios que sedimentan a 22 y 35 S. Mas tarde BRATT y ROBINSON (1971), analizando diferentes moléculas de RNA viral procedentes de células infectadas, encontraron varias moléculas de RNA mono y bicatenarios que estaban localizadas en el citoplasma y parecían ser formas intermedias de la replicación y transcripción del RNA viral. Además de en el citoplasma, puede hallarse RNA viral por síntesis en el nucleolo (BUKRINSKAYA y cols, 1966) y también en el nucleo, procedentes del citoplasma (BUKRINSKAYA y cols. 1969).

Posteriormente, COLLINS y BRATT (1973), por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida, separaron los RNAs de las fracciones 18 y 22 S, procedentes de células infectadas con NDV, en seis ó siete especies distintas de RNA y cuyos pesos

moleculares oscilaban entre $5,5$ y 15×10^5 d. Estos datos, que concuerdan muy bien con los tamaños de las proteínas del virión ND; hacen sugerir que cada especie de RNA debe corresponder a un mRNA de una proteína distinta.

La replicación y transcripción viral -según ha sido observado por distintos autores (ROBINSON, 1971 b; EAST y KINGSBURY, 1971)- no se llevan a cabo mediante un mismo enzima o complejo enzimático, ya que como se ha visto "in vitro", no se produce replicación ni tampoco RNA viral o RNA de 50 S. Por transcripción "in vivo", en presencia de cicloheximida, tan sólo se producen RNA de 18 y 35 S, pero no el de 50 S (ROBINSON, 1971; EAST y KINGSBURY, 1971). Por otra parte, también se ha comprobado que la replicación del RNA viral requiere una síntesis continuada de proteínas.

b) La síntesis de proteínas virales, en las células infectadas por paramixovirus, tiene lugar en el citoplasma según se ha demostrado por métodos de inmunofluorescencia (COHEN y cols, 1961). En general, podemos afirmar que se detectan tres proteínas muy abundantes, como son la HN (glicoproteína formadora de las espículas), NP (nucleoproteína) y MP (proteína de la membrana proteica); también se encuentran una serie de proteínas mucho menos abundantes y mas variables en cuanto a sus posibilidades de existencia (LOMNICZI y cols. 1971).

Recientemente se ha comprobado que existe un precursor (HNo) de la glicoproteína HN del NDV. Este precursor que tiene un peso molecular de 82.000 daltons se convierte, por un proceso de proteólisis, en la glicoproteína HN de peso molecular 74.000. Parece comprobado que la virulencia de las cepas de NDV

dependen del grado de escisión de HNo durante la infección (NAGAI y cols. 1976).

c) En relación con la síntesis de lípidos, sabemos que no existen lípidos específicos de estos virus y por tanto su síntesis, necesaria para la formación de la envoltura viral, se realiza normalmente en la célula huésped y a sus expensas.

d) Por último, la síntesis de glúcidos virales, también se lleva a cabo por la célula parasitada, ya que no se ha demostrado que existan glicosiltransferasas inducidas por el genoma de paramixovirus. Por otra parte, y por medio de precursores radiactivos tales como fucosa, glucosamina y galactosa, se ha demostrado que los azúcares se incorporan en cadenas en la parte glucídica de glicoproteínas y glicolípidos que se sintetizan de "novo".

iv - Ensamblado

Para estudiar el proceso, habremos de distinguir tres fases según que se refiera a la formación de la nucleocápsida, de la envoltura y de la liberación mediante gemación (budding).

a) El autoensamblado de la nucleocápsida tiene lugar principalmente en el citoplasma aunque también pueda hacerse en el núcleo. La nucleoproteína se une fuertemente, por medio de enlaces no covalentes, al RNA viral y deja a éste protegido de la digestión por ribonucleasas. Una vez así formada la nucleocápsida, y sin rodearse de ninguna membrana interna, emigra hacia zonas específicas de la membrana plasmática que ya están predestinadas a ser envolturas virales (COMPANS y cols. 1966).

b) En la formación de la envoltura viral, lo único que se sabe es que hay una sustitución de proteínas celulares por las glicoproteínas virales en las zonas de membrana celular donde se va a dar el proceso de gemación o exocitosis ("budding"). Pese a todo, se cree que este proceso es similar al de orthomixovirus.

v - Liberación

En relación con el fenómeno de liberación, podemos decir que también es muy parecido o idéntico al que se realiza en los orthomixovirus.

3. Analogías y diferencias entre los Mixovirus

Dado que, según hemos visto precedentemente, existen algunas características comunes entre distintos virus de ambos grupos y también, por la circunstancia de que ocasionalmente se han citado algunas diferencias de comportamiento biológico ante una misma situación de infectividad, no hemos querido terminar este capítulo sin precisar de un modo más concreto cuales son las analogías y diferencias -perfectamente definidas- entre estos dos grupos de virus tan relacionados. Ello proporcionará nuevos datos que añadir a los distintos criterios de diferenciación biológica.

3.1. Propiedades comunes entre Orthomixovirus y Paramixovirus.

Siguiendo un criterio ordenado, esta comunidad de comportamiento la examinaremos desde cuatro puntos de vista relacionados con: a) diversas alteraciones durante las biosíntesis celulares; b) formación de virus defectivos; c) varia-

ciones en sus efectos citopáticos; y d) su aglutinabilidad por lectinas vegetales.-

3.1.1. En cuanto a las alteraciones o modificaciones producidas durante las biosíntesis celulares, se ha visto que la infección con virus influenza, no causa un paro rápido de la síntesis de RNA celular aunque si tiene varios efectos sobre el metabolismo de la proteína y del RNA celular. También en un sistema fibroblastos de pollo-FPV, se ha observado un aumento de la actividad de RNA polimerasa dependiente del DNA (MAHY 1970); incluso usando α -amanitina, que es capaz de inhibir la RNA polimerasa nucleoplásmica DNA-dependiente (forma II) pero sin afectar a la RNA polimerasa nucleolar (forma I) se observó una disminución de la actividad RNA polimerasa I hasta menos del 20% de la actividad control a las 3-4 horas después de la infección. Sin embargo, en idénticas condiciones, la actividad polimerásica II se estimulaba en un 70% mas que los controles a partir de 1,5 horas después de la infección (MAHY y cols, 1972). Estos estudios, así como el hallazgo de que la α -amanitina inhibe la multiplicación viral, sugiere que la actividad de la polimerasa II, pueda ser esencial en la replicación del virus. Asimismo, después de producir esta infección viral, se ha observado una disminución en el marcado de los diversos RNA citoplásmicos (STEPHENSON y DIMMOCK, 1974). Sin embargo un fenómeno que parece estar en desacuerdo con que la RNA polimerasa I DNA-dependiente se inhibe, es que se observa una perfecta transcripción del RNA ribosomal normal.

Se ha comprobado, que se requiere alguna función nuclear para que el virus influenza se multiplique, ya que las células sin núcleo o célula con núcleo expuesto a radiaciones

UV o tratadas con actinomicina D y mitomicina C, no permiten la multiplicación viral (NAYAK y RASMUSSEN, 1966); (ROTT y cols, 1965; KELLY y cols, 1974). Por otra parte, MAHY y cols. (1972) observaron que la RNA polimerasa nucleoplásmica dependiente del DNA (polimerasa II) se estimulaba en fases tempranas de la infección viral, mientras que la RNA polimerasa ribosomal dependiente del DNA (polimerasa I) se inhibía. Todo ello hace suponer que al menos la polimerasa II esta implicada en la replicación viral.

Por otra parte, tampoco está claro el fundamento de la inhibición de la síntesis proteica celular, aunque algunos investigadores (PONS, 1972; COMPANS, 1973) consideran que en tal inhibición interviene la asociación del polipéptido (NS) con los polisomas citoplásmicos.

En el caso de paramixovirus, la rapidez de inhibición de la biosíntesis celular varía considerablemente según los virus y estirpes. Ello no obstante, la inhibición de biosíntesis celular también ocurre con algunos paramixovirus, siendo el caso mas estudiado el NDV. Así, WHEELOCK y TAMM (1961), en un sistema celular HeLa-NDV, encontraron que la síntesis de proteina y DNA celulares llega a ser rápidamente inhibida; en este caso, sin embargo, la inhibición de la síntesis de RNA resultaba ser mas tardía.

En estos virus, el mecanismo de inhibición de la síntesis de DNA es el mas estudiado y se ha observado que el paso inhibido es el de iniciación de nuevas cadenas de DNA, ya que cuando las cadenas están empezadas ya se siguen formando a un ritmo normal, durante la infección (ENSMYNGER y TAMM, 1970; HAND y TAMM, 1972). Según parece, la inhibición de la

síntesis de DNA celular, es una consecuencia de la inhibición de la síntesis de proteínas celulares, necesarias para la iniciación de la síntesis de DNA, pero que no intervienen en la elongación de la cadena de DNA.

Según parece, no está totalmente claro el mecanismo por el cual, la síntesis de proteína y RNA celular se inhibe en estas infecciones virales. Se cree que después de la infección con NDV, se sintetiza alguna proteína específica del virus, capaz de producir una desviación de la síntesis de RNA y proteínas celulares (WILSON, 1968; LANCZ y JOHNSON, 1971). También se ha sugerido que la proteína inducida por el virus puede estar involucrada en la degradación del RNA celular (HUO y WILSON, 1969).

No se ha encontrado proporción directa entre inhibición de síntesis de RNA celular y lisis celular; se ha observado que la síntesis del RNA se reprime más lentamente en fibroblastos de pollo infectados con NDV, que en células L infectadas con el mismo tipo de virus, aunque el daño morfológico celular sea más grande en las células de fibroblastos de pollo (THACORE y YOUNGNER, 1970). Se conocen un cierto número de factores, además de la inhibición de la biosíntesis celular, que pueden jugar un papel en la citopatología de estos virus. Dichos factores pueden ser alteraciones de membrana ocasionadas por la actividad de fusión de los virus, la actividad neuraminidasa, y la liberación de enzimas lisosómicos (REEVE y cols, 1971; SATO y cols, 1971).

3.1.2. *Sobre la formación de virus incompletos o defectivos*, se ha observado que, en la mayoría de los sistemas células-virus influenza, que son infectados con inóculos de alta multiplicidad, se producen partículas hemaglutinantes no infecciosas que se llaman virus "incompletos" ("fenómeno Von Magnus") (VON MAGNUS, 1954). Estas partículas virales defectivas se ca-

racterizan por poseer todos los componentes antigénicos de los virus infecciosos aunque su poder infectivo es muy pequeño o nulo. En cualquier caso, la formación de estas partículas virales se presenta mejor en pases seriados no diluidos, de virus influenza, en huevos. Posteriormente se ha demostrado que estas partículas poseen menos cantidad de RNA que las partículas normalmente infectivas (DUESBERG, 1968; NAYAK y BALUDA, 1969). Paralelamente, PONS y HIRST (1969), demostraron que aunque existía una síntesis defectiva de RNA en estos viriones, los procesos de ensamblado y liberación seguían siendo normales.

Por otra parte, parece claro que depende de la célula huésped, la cantidad de virus infecciosos y no infecciosos que se producen en varios pases seriados y así, se ha comprobado que, en células MDBK, infectadas con alta multiplicidad de virus influenza, se produce en menor grado el "fenómeno Von Magnus" que en la mayoría de las células (CHOPPIN, 1969).

En cuanto a las propiedades morfológicas y bioquímicas se pueden establecer las siguientes diferencias entre los virus normales e "incompletos" o defectivos: a) los virus "incompletos" sedimentan a 500 S, mientras que los normales lo hacen a 700 S (VON MAGNUS, 1954); b) al microscopio electrónico, se observó que los virus "incompletos", eran claramente pleomórficos (MOORE y cols, 1962). Pese a todo, esta relación pleomorfismo-"fenómeno Von Magnus" no parece clara; y c) el contenido de RNA en viriones "incompletos" es siempre más bajo (ADA y PERRY, 1956) y también se ha comprobado por estudios de electroforesis en gel de poliacrilamida, que las "especies" más grandes de RNA son las que faltan en los virus

"incompletos", existiendo un aumento en la cantidad de las especies pequeñas de RNA, para una población de virus determinada (NAYAK y BALUDA, 1969; PONS y HIRST, 1969).

CHOPPIN y PONS (1970) han sugerido un mecanismo para explicar la formación de virus "incompletos", que en esencia es el siguiente: Dado que las "piezas" de RNA viral de virus influenza se replican independientemente usando la misma polimerasa, las "piezas" pequeñas se replicarán más rápidamente que las grandes. De esta manera, habrá una tendencia a producir más moléculas pequeñas de RNA en las células infectadas. Por otra parte, si el RNA se incorpora al azar dentro de la progenie de viriones, es lógico pensar que habrá un exceso de población de virus con un exceso de "piezas" más pequeñas; de esta manera es más fácil encontrar viriones que sólo contienen moléculas pequeñas de RNA.

Además de la formación de virus tipo "Von Magnus", se ha observado infección "abortiva" en sistemas HeLa-influenza (WHITE y cols, 1965) y en células L-FPV (ROTT y SCHOLTISSEK, 1963). Estas infecciones se caracterizan porque el antígeno nucleoproteína se sintetiza y acumula en el núcleo. Las partículas virales producidas son hemaglutinantes y no infectivas y contienen menos cantidad de nucleoproteína que los viriones normales. En resumen, también en estos casos, la infección "abortiva" es similar al fenómeno "Von Magnus". Además, se ha encontrado que las partículas no infectivas producidas por células HeLa, muestran el mismo defecto en su contenido de RNA que los virus "incompletos" (CHOPPIN y PONS, 1970); es decir, pérdida de las "piezas" grandes de RNA y consiguiente aumento, en cantidad, de las piezas pequeñas de RNA.

Asimismo, en sistemas infectados con paramixovirus, se encontraron partículas virales hemaglutinantes no infectivas (GRANOFF y cols, 1950) y más tarde se observó que la infección con alta multiplicidad de virus Sendai también producía virus no infectivos (SOKOL y cols, 1964), siendo este fenómeno muy parecido al fenómeno "Von Magnus" de los sistemas infectados con virus influenza. Hace unos años KINGSBURY y cols (1970) han encontrado que existen partículas virales que contienen especies de RNA mas pequeñas que la especie 50 S (el RNA 50 S representa al genoma viral completo). Estos viriones defectivos se dan con mayor proporción en infecciones de alta multiplicidad. Los RNAs aislados de estos viriones sedimentaban, en gradientes de sacarosa, a 19 y 24 S respectivamente, conteniendo secuencias similares a las encontradas en el RNA 50 S del genoma viral.

También se ha comprobado la existencia de partículas defectivas en células infectadas con otros paramixovirus, tales como parotidítico (EAST y KINGSBURY, 1971) y sarampión (PARFANOVICH y cols, 1971). Según HUANG (1973) parece ser que, bajo ciertas condiciones, la producción de este tipo de viriones es general para este grupo y para otros no considerados aquí.

Al igual que en orthomixovirus, la producción de virus infectivos depende del tipo de célula infectada no produciéndose número significativo de viriones defectivos en pases seriados a alta multiplicidad de NDV en embriones de pollo (GRANOFF, 1955) ni con SV5 en células primarias de riñón de mono Rhesus (CHOPPIN, 1964).

Recientemente, se ha encontrado que partículas defectivas de paramixovirus pueden interferir con la replicación de viriones normales (PORTNER y KINGSBURY, 1971). Esta interferencia aumenta si los viriones defectivos se añaden antes que los viriones normales, aunque desaparece dicho fenómeno por irradiación UV de los viriones defectivos. La interferencia es específica para virus homólogos y no requiere la producción de interferón. Este hecho fué el que puso sobre aviso a ISAAC y LINDENMAN para el descubrimiento del interferón.

En virus Sendai, mientras el interferón causa inhibición en la producción de todas las especies de RNA (RICHMAN y cols, 1970), la inhibición del virus normal por el virus defectivo se caracteriza por una inhibición mayor del RNA 50 S que del RNA 18 S (PORTNER y KINGSBURY, 1971). El mecanismo de interferencia de la replicación de paramixovirus por viriones defectivos no ha sido aún establecido definitivamente, pero existen evidencias de que la interferencia es probable que actúe a nivel de la replicación viral, implicando una competición del RNA defectivo y el RNA normal, frente a la replicasa viral (PORTNER, y KINGSBURY, 1971 ; KINGSBURY, 1973).

Se han observado, además de la interferencia anterior, otras interferencias homólogas entre cepas de NDV, tales como:

- a) Interferencia por irradiación UV en el tiempo de la adsorción, (BALUDA, 1959) y la penetración del virus (BRATT y RUBIN, 1968), no pareciendo aún claro este mecanismo de inhibición;
- b) Interferencia intrínseca (MARCUS y CARVER, 1967), según la cual el NDV se ha empleado como indicador para detectar la presencia de virus no citopatogénicos, tales como la rubeola.

Quizá, la explicación mas probable de este mecanismo, sea que la RNA replicasa del virus interferente interactua con el genoma de NDV, evitando la replicación del RNA de NDV por su propio enzima (MARCUS y ZUCKERBRAUN, 1970).

3.1.3. También por *electromicroscopía* se han observado cambios en los efectos morfológicos sobre las células parasitadas que son específicos con virus influenza. El efecto citopático del virus influenza sobre células en cultivo, consiste generalmente en un redondeamiento y desprendimiento de las células; además el nucleolo adquiere una apariencia indefinida, se agranda gradualmente y se dispersa en gran parte del area nuclear (COMPANS y DIMMOCK, 1969). En el citoplasma, aparecen inclusiones densas que muestran estriaciones periódicas de aproximadamente 50 Å, (CIAMPOR, 1972), pudiendose encontrar estas inclusiones también en el nucleo (ARCHETTI y cols, 1970).

En el caso de paramixovirus, existen una gran variedad de interacciones, abarcando desde una muerte rápida de la célula hasta una infección persistente que consiste en una infección moderada con poca evidencia del daño celular. Algunas cepas son mas virulentas que otras, tanto en animales como en células cultivadas; este es el caso de muchas cepas de NDV (KENDAL y ALLAN, 1970; REEVE y WATERSON, 1970). Por otra parte, también la célula tiene un papel condicionante, ya que tipos distintos de células, pueden mostrar diferencias marcadas en el grado de citopatología, aun infectando con la misma cepa de virus. Así, células MK (riñón de mono) infectadas por SV5 producen una gran cantidad de virus infectivos mostrando pocos o ningún cambio morfológico o bioquímico que ponga en eviden-

cia el daño celular. En contraste con ello, las células BHK 21-F (líneas de células de riñón de hamster recién nacido), se fusionan para formar un sincitio gigante (después de las 12-24 horas post-infección) produciéndose pocos virus y las nucleocápsidas se acumulan para formar grandes agregados en el citoplasma; esto último, es debido a un bloqueo en la maduración de la membrana celular (COMPANS y cols, 1966; HOLMES y CHOPPIN, 1966).

3.1.4. *En relación con el fenómeno de aglutinabilidad por lectinas de plantas*, se ha visto que células infectadas con distintos virus con envoltura, incluyendo virus influenza, eran capaces de aglutinarse con lectinas tales como aglutinina de semilla de trigo y Concanavalina A (BECHT y cols, 1972). Subsiguientemente, se ha demostrado que las lectinas se unen a las células transformadas formando racimos; mientras que se unen de una manera más dispersa, sin formar racimos, a las células normales.

Según se ha señalado, las proteínas de la envoltura viral se incorporan en placas sobre la superficie celular y la exocitosis de las partículas virales se corresponde también en localización con las placas de glicoproteínas (NICOLSON, 1972). Por otra parte, según KLENK y cols, (1972), las glicoproteínas de virus influenza actúan como receptores de la Concanavalina A; puesto que esta lectina aglutina a los viriones influenza intactos pero no a los viriones tratados con proteasa, cabe pensar que, estos últimos, contienen menos glicoproteínas. Es posible que los receptores glucídicos de lectinas sean más accesibles en la superficie de células infectadas que en las no infectadas.

Como ya se ha dicho anteriormente, se ha observado el fenómeno de la aglutinabilidad, por Concanavalina A, en células infectadas con virus que poseen envoltura y consecuentemente también se observó dicho fenómeno, en células infectadas con paramixovirus tales como NDV y SV5 (POSTE y REEVE, 1972; NICOLSON, 1974). Por otra parte, se ha comprobado que la fusión celular de las células BHK21-F infectadas con SV5 se suprime de una manera total con Concanavalina A (ROTT y cols, 1972). A diferencia de las células infectadas con virus influenza, que formaban grandes flóculos, casi inmediatamente después de añadir la lectina, las células infectadas con NDV se aglutinan más lentamente formando agregados de apariencia más granulosa que los flóculos que se forman por células infectadas con influenza (BECHT y cols, 1972). El mecanismo de unión de las lectinas a las células infectadas con paramixovirus es el mismo que el descrito para las células infectadas con orthomixovirus (KLENK y cols, 1972).

3.2. Características diferenciales entre Orthomixovirus y Paramixovirus.

En este apartado se resumen algunas particularidades que pueden resultar específicas para los grupos de virus que nos ocupan. Así veremos en primer lugar una capacidad de variación o "enmascaramiento" antigénico que se puede producir en el virus influenza (Orthomixovirus) y después revisaremos dos propiedades de los paramixovirus relacionadas con la patogenia de la enfermedad, como son sus posibilidades de producir fusión celular o de persistir en el organismo parasitado y llegar a producir enfermedades crónicas.

3.2.1. En cuanto a la variación antigénica del virus influenza habrá de considerarse, en primer lugar, su alta frecuencia de recombinación y quizá ello, haya llevado a estudiar con detalle su variación antigénica. Así se han encontrado, para el virus influenza A, dos clases de variaciones antigénicas:

i - Deriva antigénica (BURNET, 1955), que parece ser debido a cambios y mutaciones graduales en las proteínas virales y que están condicionados por la presión selectiva de anticuerpos en una población inmune, según se ha demostrado en el laboratorio (HAMRE y cols, 1958; LAVER y WEBSTER, 1968). Este fenómeno de deriva antigénica en la naturaleza, afecta tanto a la neuraminidasa como a la hemaglutinina; y se produce, además de en el grupo influenza A, también con el tipo B (SCHULMAN y KILBOURNE, 1969; MEIER-EWERT y cols, 1970).

ii - Desviación antigénica ("antigenic shift") tan sólo se observa en virus influenza del tipo A. Tales cambios ocurren con poca frecuencia, e implica la aparición de cepas virales con antígenos de superficie, que no tienen ninguna relación con los encontrados previamente en el hombre. Esta clase de mutación es importante, puesto que da lugar a nuevos subtipos de virus que son responsables de epidemias de virus influenza en el hombre.

Para explicar los cambios principales (major shifts) se han propuesto dos teorías: a) Mutación directa; y b) Recombinación entre una cepa humana y una animal. En este segundo caso se produce la adquisición, por la cepa humana, de nuevos antígenos de superficie (WEBSTER y LAVER, 1971). Esta última

alternativa es muy factible, puesto que el virus influenza tiene una gran frecuencia de recombinación debido, posiblemente, a su genoma segmentado. Por otra parte, también se han conseguido aislar en el laboratorio antígenos híbridos de cepas animal y humana (KILBOURNE, 1968).

3.2.2. *La fusión celular* que ocurre como resultado de una infección por paramixovirus, requiere la síntesis de nuevas proteínas virales y, aparentemente, es debida a la incorporación de proteínas específicas del virus a las membranas celulares del huésped. El mecanismo bioquímico de este fenómeno no está claro y en cuanto a su significación, esta fusión puede ser un factor importante en la aparición de efectos citopáticos en ciertos sistemas virus-células.

3.2.3. *Las infecciones persistentes*, causadas por paramixovirus constituyen una de las propiedades más importantes de este grupo. Se ha descubierto esta propiedad en todos los individuos del grupo: así ha sido citado en parotiditis (WALKER, 1968), sarampión (RUSTIGIAN, 1966), parainfluenza III (COLE y HETRICK, 1965), Sendai (MAENO y cols, 1966), NDV (PREBLE Y YOUNGNER, 1973) y SV5 (CHOPPIN, 1964).

Estas infecciones conocidas como "cultivo portador" ("carrier culture") se caracterizan porque únicamente se infectan y producen virus unas pocas células del cultivo. La presencia del virus, en el cultivo, se limita por resistencia genética de las células de la población, o por factores inhibidores, tales como: presencia de interferón en el medio, partículas defectivas interferentes o anticuerpos (THACORE y YOUNGNER, 1969).

Otro tipo de infección persistente, en células infectadas por paramixovirus, es la infección conocida como estado estacionario ("steady state"), en la que todas las células se infectan, pero superviven todas ellas. En algunos sistemas de este tipo, los virus continúan produciéndose, aunque en una proporción más baja que durante la infección inicial en otros, sin embargo se producen pocas o ninguna partícula viral. Una diferencia importante, en ambos tipos de infecciones persistentes, es que en el último no puede neutralizarse si se añaden en el medio anticuerpos antivirales homólogos.

No se sabe aún el mecanismo íntimo, pero implica un estrecho control de la biosíntesis viral, dado que la célula logra supervivir teniendo incorporado un genoma viral. Se cree que estos factores reguladores se deben tanto al virus como a la célula huésped (NORTHROP, 1969). Debido a que muchas infecciones persistentes se caracterizan por la falta de producción de virus infectivos, pese a que las células contienen gran cantidad de antígeno viral, cabe pensar que en estos casos queda bloqueada la maduración del virus. Por otra parte, también se han encontrado defectos en la actividad RNA polimerasa de viriones aislados de células persistentes infectadas con NDV (PREBLE y YOUNGNER, 1973).

Un descubrimiento notable, hallado en la infección persistente por paramixovirus, es que los virus resultantes son termo-sensibles en relación a la cepa original (HASPEL y cols, 1973).

Asimismo, se han encontrado infecciones persistentes en el hombre, que conducen a enfermedades crónicas; este es el caso, de diversas encefalitis esclerosantes subagudas o letales ("subacute sclerosing panencephalitis" (SZPE)) causadas por el sarampión (SEVER y ZEMAN, 1968).

III. RESPUESTA DEL HUESPED FRENTE A LA INFECCION VIRAL

Desde nuestro punto de vista no puede ser abordado un estudio sobre acción antivirales sin hacer mención de las interacciones virus-huesped, máxime cuando por la peculiar biología de estos agentes su posibilidad de supervivencia está ligada a un estado de estricto parasitismo intracelular. Esta interacción es un proceso dinámico, mas complejo que el de cualquier infección bacteriana puesto que en ella, además de una respuesta inmunitaria, existe la producción de interferón y todavía no se sabe bien el íntimo mecanismo de regulación que puede haber entre ambos tipos de respuesta.

Las reacciones inmunológicas en general, y en particular frente a agentes virales, son resultados complejos de efectos específicos y no específicos. Según es sabido los efectos no específicos pueden aparecer a tres niveles: a) por fracaso en unión del virus a los receptores de la membrana celular (McLAREN y cols, 1959); b) por insuficiente liberación del ácido nucleico viral a partir de las células infectadas (HOLLAND

y HOYER, 1962); y c) por deficiencias en el ensamblado de las proteínas estructurales del virus (TAYLOR y cols, 1969; WALL y TAYLOR, 1970). Por otra parte, la multiplicación viral puede ser reprimida también por la inducción de interferón (GRESSER y OULL, 1964; GLASGOW, 1970), y por una acción de fagocitosis producida por macrófagos (ZISMAN y cols, 1971). Otras reacciones muy poco específicas, pudieran ser tenidas también en cuenta como son los procesos de inflamación y de coagulación de la sangre.

Si a todo esto se une que en esta Memoria se utilizan sustancias antivirales, capaces de modificar las relaciones entre huésped y agente patógeno, parece lógico la necesidad de revisar algunos datos sobre la respuesta inmunitaria y de interferón, frente a una infección viral, para disponer de datos que pudieran ser necesarios a la hora de considerar nuestros propios resultados experimentales.

1. Los virus como antígeno

Puede considerarse que todos los virus tienen, al menos, una proteína que difiere de las del huésped y esto les confiere individualidad, pero además debe tenerse en cuenta que las proteínas virales pueden actuar como antígenos, unas veces sin ser modificadas y otras después de ser alteradas por enzimas de la célula huésped o de combinarse con lípidos de la membrana. El hecho de que una proteína viral tenga una potencialidad biológicamente importante como antígeno, depende de: a) su localización en la célula parasitada; b) si es o no una proteína estructural del virión; c) su situación en relación con las super-

ficies del virión o de las membranas celulares; d) su proximidad a componentes de la célula huésped o su posible combinación con ellas; y e) su poder inmunógeno propio.

El comportamiento de los virus como antígeno es muy importante por varias razones. La reacción inmune que se desarrolla como consecuencia de una infección viral es, normalmente, beneficiosa para el huésped puesto que ayuda a la curación y además aumenta la resistencia contra una reinfección por parte del mismo virus. Los anticuerpos responsables de la protección son, principalmente, los neutralizantes de la infectividad al combinarse con los antígenos del virión. Otros anticuerpos, no neutralizantes, si bien no toman parte en la inactivación del virus resultan de gran utilidad para el diagnóstico de las enfermedades de esta etiología.

Hay dos clases de antígenos virales: unos que llevan los componentes estructurales del virión y que se conocen como virion-antígenos y otros que sólo están representados por elementos separados y mas pequeños que el virión y que se conocen como no virión-antígenos o antígenos solubles; el término soluble no tiene en este caso una significación físico-química. El primer grupo está formado, por lo general, de viriones sintetizados en exceso mientras que el segundo incluiría enzimas requeridos para la multiplicación viral.

1.1. antígenos de neutralización

Estos antígenos, que en su mayor parte están en la superficie del virión, son glicoproteínas como es el caso de VSV

(rhabdovirus) (KELLEY y cols. 1972), virus Chikungunya (togavirus) (IGARISHI y cols. 1971), Semliki forest virus (SFV) (KENNEDY, 1974), influenza (WHITE, 1974), paramixovirus (NORRBY y HAMMARSKJOLD, 1972), y Herpes simplex (POWELL y cols, 1974); o bien, proteínas sin carbohidratos como en el caso de adenovirus (KJELLEN y PEREIRA, 1968), picornavirus (BURNES y cols. 1973) y reovirus (DROUHET, 1960).

Aún no está aclarado qué parte de la molécula de glicoproteína (proteína o carbohidrato) es el determinante antigénico, pero en el caso de SFV (KENNEDY, 1974) y virus Sindbis (DUDA y SCHLESINGER, 1975), se sabe que reside en la fracción proteína. Esto parece lógico si se tiene en cuenta que el componente glucídico es originario de la célula huésped y por tanto el sistema inmunitario sería tolerante con estas fracciones.

1.2. Alteraciones de la superficie celular inducidas por las infecciones virales.

La envoltura de los virus estudiados por nosotros deriva de las membranas celulares del huésped y los viriones están íntimamente relacionados con estas membranas durante su adsorción, penetración y replicación. Las infecciones virales pueden conllevar profundos cambios de la membrana celular, así como en la fisiología y comportamiento de las células. Por lo general, estas infecciones conducen a alteraciones de la membrana celular que pueden ser identificadas por la aparición de nuevos antígenos. Por medio de estudios de inmunofluorescencia, inmuno-radiomarcado, inmunomicroscopía electrónica y otros ensayos empleando anticuerpos citotóxicos o células linfoides, BURNS

y ALLISON (1975) han hecho un estudio de los virus que producen cambios antigénicos en las membranas de la célula huésped; entre ellos destacaremos especies de los dos grupos de virus que nos interesan:

<u>ORTHOMIXOVIRUS</u>	<u>PARAMIXOVIRUS</u>
Influenza, tipo A, humanos y animales (FPV)	NDV Parotiditis Sendai SV5 Sarampión, peste bovina, Moquillo

La mayoría de los antígenos de superficie aparecen en estadios tempranos de la infección; así, células infectadas con virus influenza producen proteína viral al cabo de 1 hora (NOLL, 1962), y 4 horas después de la infección se pueden detectar antígenos virales derivados de la pared celular (NAHON y ECKERT, 1972). En células infectadas con NDV, estos antígenos derivados aparecen a las 3 horas, mientras que en infecciones por virus del sarampión y moquillo lo hacen 20 ó 24 horas después de dicha infección.

1.3. Análisis antigénico de las proteínas estructurales del virus influenza

Este se presenta como un modelo completo de los distintos antígenos de un virus determinado. Así, considerado como ente antigénico, el virus influenza ha sido el más estudiado (LAVER, 1973 ; SCHULZE, 1973); en él se ha comprobado que cada proteína puede servir como antígeno, pero únicamente bajo el

Desde el punto de vista inmunológico las glicoproteínas son importantes. En contraste con las proteínas virales, que son codificadas por el virus (HOLLAND y KIEHN, 1970), existen lípidos (KATES y cols. 1961) y carbohidratos (HOWE y cols, 1967) que son específicos de la célula huésped y que pueden modificar la antigenicidad del virus.

En el modelo propuesto por SCHULZE (1973), y que está representado en la Fig. 8, se indican las distintas proteínas y su situación en el virión influenza.

Después del tratamiento de viriones influenza con solventes de lípidos, se pueden aislar las espículas y separarse en sus respectivas subunidades de hemaglutinina y de neuraminidasa. Los anticuerpos originados por la neuraminidasa inhiben la actividad enzimática, pero no producen neutralización viral. Los anticuerpos neutralizantes reaccionan con el extremo distal de la hemaglutinina, seguramente con determinantes situados en HA₁, ya que HA₁ puede servir como inmunógeno para preparar anticuerpo inhibidor de la hemaglutinación (IH) y también pueden adsorber completamente los anticuerpos IH de sueros inmunes (ECKERT, 1973); lo que aún no está demostrado es que existan los mismos determinantes en la subunidad HA₂.

Mientras que las proteínas internas del virión muestran una gran estabilidad genética, la hemaglutinina y neuraminidasa están expuestas a influencias inmunológicas selectivas y sufren grandes cambios antigénicos; sobre todo, alteraciones en las secuencias de aminoácidos en HA₁ y HA₂; ello da lugar a profundos cambios en la posibilidad infectiva de los virus, dejando inermes a grandes masas humanas ante la aparición de

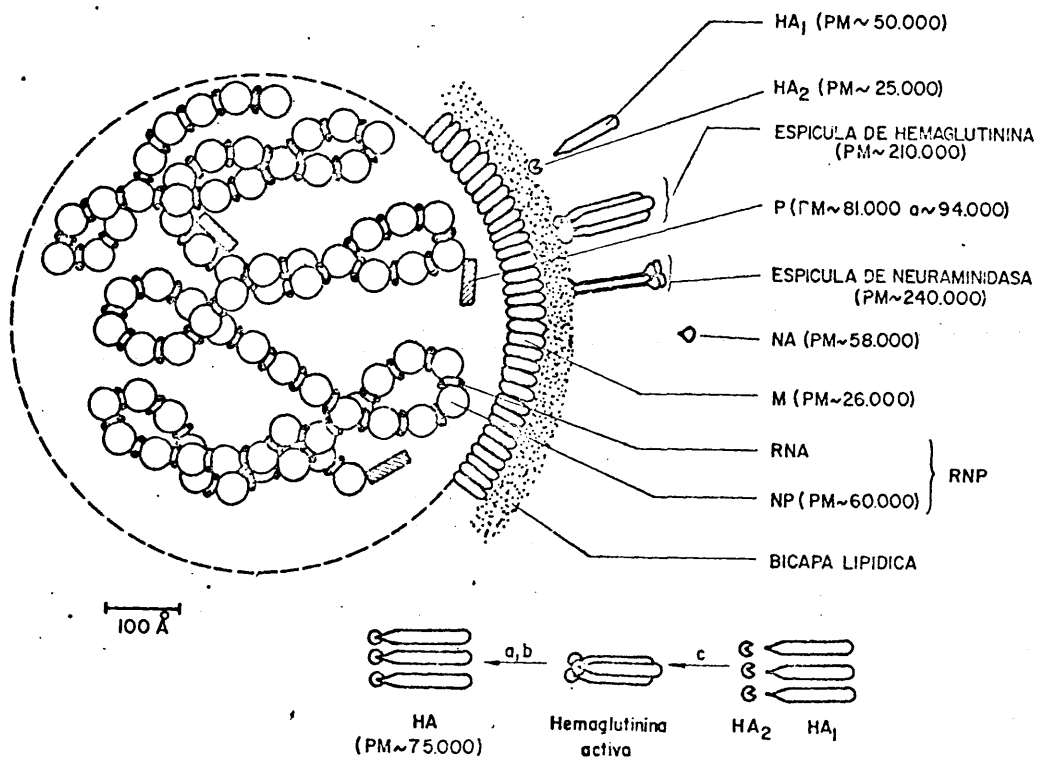


Fig. 8.- Modelo de la estructura antigénica del virus influenza

virus completamente diferentes en su composición antigénica, ante las cuales los anticuerpos preexistentes tienen poca actividad. Esto explica la aparición de pandemias cíclicas.

2.- Mecanismos de la neutralización viral

La neutralización puede definirse como la pérdida de la infectividad viral por medio de los anticuerpos. STENBERG en 1892 fue el primer investigador que demostró la neutralización de virus por suero de convaleciente (BOULTER, 1957). Lo que en origen parecía ser un proceso simple, se ha ido viendo que es una reacción compleja, no estando aún muy claro el mecanismo por medio del cual un anticuerpo produce la disminución de la infectividad viral.

En la reacción de neutralización intervienen tres componentes: el virus, el anticuerpo y las células huésped. En todos los estudios de neutralización hay que tener en cuenta: a) el tipo de virus infectante; b) las concentraciones relativas del virus y de anticuerpos que entran en juego; c) las características de las inmunoglobulinas antivirales usadas; d) presencia de complemento o cualquier otro factor neutralizante en el antisuero; y e) el tipo y carácter de las células huésped usadas en el proceso infectivo.

Como primer paso, se debe tener en cuenta el efecto del anticuerpo sobre la interacción virus-célula, habiéndose demostrado "in vitro", que cuando los anticuerpos se unen a los viriones se inhiben los procesos de adsorción, penetración y desvestimiento de las partículas virales en una gran variedad de sistemas virus-célula (JOKLIK, 1965; GRANOFF, 1965; MANDEL, 1967; DALES, 1965); en segundo lugar el efecto del anticuerpo

sobre la partícula viral, ya que cuando se enfrentan anticuerpo y virus, el primero se une a la superficie viral. Este proceso de adsorción puede producirse rápidamente incluso a 0° C, quedando detenido en esta fase si no se aumenta la temperatura; para que la reacción de neutralización tenga lugar de una manera perceptible, la temperatura debe ser superior a 5° C (LAFFERTY, 1963) y posteriormente se producen cambios conformacionales tanto en la inmunoglobulina como en la proteína viral a la que está unida (MANDEL, 1971). Estas dos etapas, tienen lugar tan rápidamente a 37° C que la neutralización se presenta como una reacción simple.

Los cambios conformacionales que aparecen sobre la envoltura viral, parecen ser un proceso importante en la neutralización, pero la unión de anticuerpo por si sólo, puede no producir alteraciones irreversibles en la superficie viral. A este respecto, hay que distinguir dos casos: a) que existen anticuerpos tempranos (presentes en las dos primeras semanas después de la inmunización) que tienen una baja afinidad por el virus y cuyas inmunoglobulinas se pueden disociar del virión restableciéndose la infectividad (HAJEK, 1970); y b) que más tarde aparecen los anticuerpos tardíos (detectables meses después de la inmunización), que tienen una gran afinidad ocurriendo rara vez, en condiciones fisiológicas, la disociación con la subsiguiente reactivación del virus (MANDEL, 1961). Sin embargo, cuando un virus neutralizado con anticuerpos tardíos es expuesto a pH bajo y a altas concentraciones de sales, se produce la reactivación (SVEHAG, 1965). Por otra parte, se ha comprobado que ciertos virus neutralizados por anticuerpos pueden ser reactivados por tratamiento con pepsina (KELLER, 1968), tripsina (RADWAN y BURGER, 1973) o papaina (MUSCHEL, 1962).

En cuanto a la *cinética en la interacción anticuerpo-virus*, se ha comprobado por ensayos de infectividad en distintos tiempos, que la neutralización tiene lugar en periodos cortos permaneciendo la constante de reacción invariable, para después disminuir y quedando, a veces, un "residuo" que resiste la neutralización.

En un principio se interpretó la neutralización como una reacción de primer orden (DULBECCO y cols, 1956; MANDEL, 1960), pero más tarde, por medio de experimentos de naturaleza cinética (PHILIPSON, 1966) y análisis cuantitativos de precipitinas (RAPPAPORT, 1970) se ha demostrado respectivamente, que existe un retraso inicial en la proporción de neutralización y que en la reacción de neutralización de un virión, interviene más de una molécula de anticuerpo. Actualmente se concibe el proceso como una unión del anticuerpo por el virus pero sin que se alcance la neutralización, cosa que sucede posteriormente por incorporación de nuevas moléculas de anticuerpo (HAHON, 1970; MAJER, 1972). Todo ello lleva a considerar que se necesita más de una moléculas de anticuerpo para neutralizar un virión, pudiéndose representar la neutralización por las dos reacciones secuenciales siguientes:

$$1^a \text{ -VIRUS + ANTICUERPO} \longrightarrow \text{COMPLEJO VIRUS INFECTIVO - ANTICUERPO}$$

$$2^a \text{ -COMPLEJO VIRUS INFECTIVO - ANTICUERPO + ANTICUERPO} \longrightarrow \text{VIRUS NEUTRALIZADO}$$

Un aspecto muy importante en la neutralización es el número de "sitios críticos" que posee el virión y entendiéndose por "sitios críticos" las proteínas virales de superficie que llevan aparejada la infectividad (DULBECCO y cols, 1956).

Con respecto al número de "sitios críticos", se pueden distinguir tres tipos de viriones: a) que tengan un único lugar crítico como es el caso de los bacteriófagos T pares; b) que tengan muchos lugares críticos sobre la superficie del virión, como sucede en los orthomixovirus que tienen muchas moléculas de glicoproteínas (HA y NA) sobre la superficie y que son básicas para su infectividad. Sin embargo únicamente realizan la neutralización los anticuerpos específicos de las hemaglutininas, en tanto que los anticuerpos específicos contra la neuraminidasa no contrarrestan la infectividad del virión (WEBSTER y LAVER, 1967) pero si dan lugar a un complejo inmuno-infectivo (MAJER y LINK, 1971). Además de los orthomixovirus se pueden incluir en este grupo, los NDV (SETO y cols. 1974), los adenovirus (NORRBY, 1969), RNA virus oncogénicos (IHLE y cols, 1975), el virus de la rabia (WIKTOR y cols, 1973) y el sarampión (SALMI y cols, 1972) y; c) que toda la superficie viral sea "sitio crítico" para la infectividad, como sucede con el bacteriófago f-2 (WEBER y cols, 1966) y virus del mosaico del tabaco (CASPAR, 1963).

En cuanto al mecanismo de neutralización, BRADISH y cols, en 1962, explicaron la neutralización como el resultado de una agregación de varias unidades individuales infecciosas por un anticuerpo multivalente, por tanto este mecanismo implicaría que la proporción de la pérdida de infectividad sería dependiente de la concentración viral. En contra de esta explicación existen los siguientes hechos: a) la neutralización es relativamente independiente de la cantidad de virus en la reacción (FAZEKAS DE ST. GROTH y cols, 1958); b) el anticuerpo puede neutralizar al virus que ya está adsorbido a la célula (KELLER, 1966) y; c) la neutralización aparece incluso con

fragmentos de anticuerpo, lo que puede equivaler a anticuerpo univalente (VOGT y cols, 1964 ; CREMER y cols. 1964).

Para comprender la aparición de una "fracción persistente" en las últimas etapas de la reacción de neutralización, aún cuando exista un exceso de anticuerpo, se han emitido las teorías siguientes: a) Antes de añadir el antisuero a la suspensión viral, pueden existir acumulos de partículas virales, en los que las partículas centrales no serán neutralizadas por el antisuero. De esta manera habrá infectividad residual, aún cuando exista un exceso de anticuerpo (WALLIS y MELNICK, 1967); b) También puede admitirse el que los anticuerpos tempranos se unan, aún en grandes cantidades al virus, pero de manera no muy efectiva, ya que el complejo virus-anticuerpo formado se disocia fácilmente por simple dilución apareciendo entonces una fracción persistente (FAZEKAS DE ST. GROTH y WEBSTER, 1963); c) En el proceso de neutralización, algunas partículas virales son poco eficazmente cubiertas con inmunoglobulinas, quedando lugares críticos al descubierto, que el virus puede utilizar para infectar a la célula huésped. Puede haber dos formas por las que este mecanismo tenga lugar: bien porque las inmunoglobulinas correspondientes a los lugares no críticos se unan de tal manera que bloqueen la unión de los anticuerpos neutralizantes a los lugares críticos vecinos, además los anticuerpos para los lugares críticos podrían inhibir la unión de los anticuerpos neutralizantes; bien porque el tamaño del lugar crítico sea suficientemente grande y puedan ser necesarias varias o muchas moléculas de anticuerpo para cubrir dicho lugar crítico. A este respecto, (LANNI y LANNI, 1953) se encontró, por estudios morfológicos de bacteriófagos T pares, que en el proceso de neutralización se unían mas de una inmunoglobulina al lugar crítico. Entonces, si el anticuerpo se une

poco eficazmente y deja zonas sin cubrir, estas podrían ser la causa de la infectividad. La explicación sería que una vez se ha unido la inmunoglobulina, esta podría inhibir estéricamente la unión de anticuerpos neutralizantes a los lugares críticos.

Por último y de una manera muy resumida diremos que los *factores accesorios en la neutralización viral*, son proteínas que ayudan al anticuerpo en la neutralización viral y que pueden ser: naturales, tales como factor reumatoide, complemento y proteína A estafilococal; o artificialmente inducidos en los animales inmunizados, tales como las anti-inmunoglobulinas y anticuerpos anti-complemento.

3. Inmunorrespuesta humoral frente a la infección viral

El mecanismo inmunológico específico, lo constituye, preferentemente, la síntesis de anticuerpos y las respuestas inmunitarias mediadas por células. Las características de la inmunorrespuesta específica mediante producción de anticuerpos, está muy condicionada tanto por el tipo de virus que produce la infección y la ruta de dicha infección, como por la naturaleza del tejido base de la respuesta inmune y algunos otros parámetros resultantes de las interacciones huesped-virus.

En cuanto al mecanismo invasor de los virus, en un organismo vivo, casi siempre se realiza a través de superficies de mucosas externas (OGRA, 1973), aunque en ocasiones pueden existir virus (hepatitis B, etc) con capacidad de invadir directamente a través de la corriente sanguínea. Una vez que los virus se han implantado en las mucosas, después de una proliferación inicial, se extienden a otros tejidos que resulten mas específicos para estos agentes causales

De los cinco grupos distintos de inmunoglobulinas (IgG; IgM; IgA; IgD e IgE) encontrados en el suero y secreciones externas humanas, tan sólo los anticuerpos específicos del virus corresponden a los grupos IgM e IgA (OGRA y KARZON, 1970) aunque también se encuentre IgG capaces de realizar una neutralización de virus.

Todas las inmunoglobulinas se encuentran en la sangre, donde existen en mayor cantidad las IgG e IgM. La IgM tiene un peso molecular de 900.000 d y su coeficiente de sedimentación es 19S, teniendo como características interesantes la de atravesar la placenta y poseer actividad frente a bacterias, virus y otras proteínas antigénicas. La IgG (7 S) es la inmunoglobulina sérica mas abundante (75%), también atraviesa la placenta y parece ser mas eficiente que la IgM en la neutralización viral, aunque sea mas eficiente, por el contrario, la IgM en las reacciones de fijación de complemento y aglutinación. La IgA tiene un peso molecular de 160.000 d (7 S) y constituye aproximadamente el 10% del total; aunque contribuye a la respuesta específica del virus, su función en el suero no es todavía comprendida. La IgD y la IgE se encuentran en el suero en pequeñísimas cantidades y no parecen poseer actividad antiviral.

Las inmunoglobulinas secretoras, que bañan las superficies de las mucosas externas, están constituidas por todas las inmunoglobulinas del suero, pero en este caso la inmunoglobulina predominante es la IgA (TOMASI y BIENENSTOCK, 1968; TOMASI y GREY, 1972). La IgA secretada por glándulas de mamíferos, tracto respiratorio, tracto gastrointestinal y tejido ocular es distinta a la encontrada en el suero; es ditérica (11 S), tiene un peso molecular de 380.000 d y consta de dos unidades monoméricas de IgA (7 S) (CEBRA y SMALL, 1967; TOMASI y GREY, 1972). Generalmente la IgA secretada, así como pequeñas cantidades de IgG e IgM, se sintetizan localmente en superficies de mucosas (TOMASI y BIENENSTOCK, 1968; BIENENSTOCK, 1970), aunque parte de la IgA (7 S) e IgG puedan proceder del suero.

Por tanto, en la respuesta humoral frente a los virus, hay que distinguir entre las respuestas de las inmunoglobulinas del suero y las que corresponden a las inmunoglobulinas secretadas.

3.1. Respuesta primaria en las inmunoglobulinas del suero.

La inmunorespuesta primaria frente a virus se caracteriza por el desarrollo de anticuerpos IgM, que subsiguientemente van siendo sustituidos por los IgG y por la IgA, esta última en menor proporción (OGRA y cols, 1968). Esta afirmación fué comprobada primero por BROWN y GRAVES (1959) y posteriormente por otros investigadores (SVEHAG y MANDEL, 1964 a, b; UHR, 1964).

SVEHAG y MANDEL (1964 a, b), comprobaron que esta respuesta bifásica primaria en el suero, era dependiente de la

dosis: El anticuerpo neutralizante IgM (19 S) aparece de 8 a 12 horas después de la administración de una dosis simple de antígeno (poliovirus) y el periodo de inducción es de 3 a 5 horas. Si la inmunización es de intensidad débil, se forman transitoriamente las IgM (19 S), para cesar bruscamente su síntesis 5 ó 6 días más tarde. Por otra parte, la inducción del anticuerpo IgG (7 S) requiere una cantidad 50 veces mayor que la que se precisa para la formación de IgM; apareciendo por lo menos 48 horas más tarde y en menor proporción. Cuando la inmunización se hace con dosis altas de antígeno, se forman IgM e IgG; precediendo siempre la formación de la primera a la segunda en 36 a 48 horas y alcanzando, la primera, un máximo dentro de los 7 días, aunque con una vida media corta. La respuesta en anticuerpos IgG, aumenta en una proporción lenta y decelerada durante 3 semanas o más, y su respuesta se prolonga durante más tiempo. La cinética de formación de anticuerpos anti-poliovirus del tipo 19 S y 7 S, es independiente de la naturaleza del antígeno viral -ya sea vivo o inactivo- de la ruta de administración, edad del animal inmunizado (recien nacido o adulto) y de las especies animales empleadas (conejo, cobaya u hombre).

Mas recientes estudios (OGRA, 1970; OGRA y cols, 1971) que emplean técnicas modernas y sensibles, han dado resultados similares a los obtenidos por SVEHAG y MANDEL (1964b). Dichos estudios han demostrado que tras la inmunización de pollos jóvenes con vacuna de poliovirus, los primeros anticuerpos en aparecer en el suero fueron IgM, los cuales se detectaban a las 12-24 horas y su título máximo se alcanzaba antes de los 12 días; a partir de dicho periodo de tiempo, la respuesta iba disminuyendo y dejaba de detectarse a partir de los dos meses de realizada la inmunización.

Las IgG aparecieron prontamente, en concentraciones muy bajas; sin embargo su nivel aumentó y constituyó la clase predominante en el suero, después de la desaparición de las IgM. Las IgA (7 S) aparecieron en un periodo comprendido entre unos pocos días y varias semanas después de la aparición de las IgM e IgG. Generalmente la respuesta en IgA es relativamente mas baja en magnitud que la correspondiente a IgG e IgM.

3.2. Respuesta secundaria en las inmunoglobulinas del suero.

Numerosos investigadores han observado una reanudación de la formación de anticuerpos IgG después de una nueva inmunización con antígeno activo, lo que prueba la existencia de una "Memoria inmunológica". En el caso de IgA e IgM, la respuesta inmunológica secundaria es mas pequeña; aunque en estudios mas particulares (SCHLUEDERBERG, 1965; LINNEMANN y cols, 1973) poco o nada se ha observado en cuanto a la respuesta secundaria de IgM.

En niños primovacunados contra la poliomelitis y reinmunizados un años después (OGRA y cols, 1968) apareció una respuesta inmunitaria de caracter secundario (IgM) después del "impulso" de inmunización. Esta respuesta fue similar a la observada por SVEHAG y MANDEL (1964 a, b) utilizando poliovirus inyectados en conejos. Pese a todo, la respuesta secundaria IgM parece depender del tiempo y del tipo y dosis del antígeno, así como de la sensibilidad y especificidad de las técnicas empleadas en su detección (OGRA y cols, 1968).

3.3. Significación de los anticuerpos en la resistencia antiviral.

Los anticuerpos circulantes anti-virus se adquieren como resultado de una infección natural, mediante inmunización con vacunas virales, o bien por administración pasiva de inmunoglobulinas específicas y tienen una intervención decisiva e importante en la limitación y recuperación de una enfermedad viral (MURPHY y GLASGOWS, 1968; NATHANSON y COLE, 1970).

En un principio (ZIMAN y cols, 1971), se creyó que los anticuerpos circulantes y la actividad macrofágica eran los únicos elementos capaces de intervenir en la eliminación de las infecciones primarias virales; pero, mas tarde, según hemos indicado en parrafos precedentes, también se ha comprobado la intervención de otros mecanismos, tales como interferón y otros factores no específicos (BARON, 1967; LWOFF, 1959) en la eliminación de la infección primaria por virus. Así se ha observado que el interferón se sintetiza antes que el anticuerpo y que después de una infección por influenza, herpes o virus vacunal, la desaparición del virus está más relacionada con la producción de interferón que con la aparición de anticuerpos específicos (ISAACS y HITCHCOCK, 1960; FRIEDMAN y cols, 1962), aunque los anticuerpos circulantes tengan también una gran importancia en la limitación de la viremia y eviten la propagación del virus a los órganos susceptibles (COWAN, 1973; GLASGOW 1970; MURPHY y GLASGOW, 1968; NATHANSON y COLE, 1970). Sin embargo, GLASGOW (1970) y MURPHY y GLASGOW (1968) han comprobado como caso particular que la resistencia frente al virus de la encefalomiocarditis del ratón y su eliminación de la corriente sanguínea coincide más con la aparición de anticuerpos circulantes, que con el desarrollo alcanzado por los niveles de in-

terferón. Por todo ello, los anticuerpos circulantes se consideran mas relacionados con la protección frente a una reinfección, ya que la presencia de anticuerpos preexistentes es uno de los conceptos más fundamentales de la inmunología viral.

Así, como resumen del comportamiento del huésped frente a una infección viral, habríamos de admitir que inmediatamente después de una infección viral o administración de vacunas de virus inactivados o vivos, se observa en el suero unas respuestas de anticuerpos, que según su orden de aparición son: IgM, IgG e IgA.

Las IgM son los anticuerpos iniciales, primeramente sintetizados, pero la respuesta en IgG es la principal fuente de anticuerpos específicos con vida mas larga y que permanecen aún después de la desaparición de la IgM.

Por otra parte, los anticuerpos de secreción pueden evitar la reinfección de las mucosas y por lo tanto, sirven para limitar la extensión viral a otros órganos.

De aquí que el sistema inmunitario, en una infección viral, reponda como una combinación de 4 efectos: a) factores genéticos de resistencia; b) actividad macrofágica; c) una inmunorespuesta mediada por células; y d) con presencia de anticuerpos circulantes y secretados.

4. Producción de interferón

El interferón es una glicoproteína antiviral (DORNER y cols, 1973), con una extraordinaria importancia por su papel en la defensa del organismo vivo y que se produce, tanto en cultivos celulares como en animales, aunque lo sea principalmente por una infección viral. El interferón también puede ser inducido por un gran número de agentes no virales, hasta el punto de que ultimamente se está dedicando mucho más esfuerzo investigador quizá por sus implicaciones terapéuticas a la inducción inespecífica de interferón que a la propia inducción por virus.

De una manera general, los inductores de interferón podrían clasificarse en los grupos que siguen: a) virus RNA (mono y bicatenarios); b) virus DNA (mono y bicatenarios); c) bacterias; d) protozoos; e) rickettsias; f) ácidos nucleicos, naturales y sintéticos, el más activo y por tanto más estudiado es el ácido poliriboinosínico unido al ácido poliribocitídico "poli I:C", sólo o conjugado con lisina; g) endotoxinas; h) polímeros sintéticos; i) fitohormonas; j) polisacáridos y k) mitógenos.

El mecanismo de inducción de esta substancia, descubierta hace más de veinte años por ISAACS y LINDENMANN (1957), con capacidad para hacer resistentes a las células frente a un ataque por virus es siempre el mismo e independiente del inductor. Se puede definir como una glicoproteína con efecto antiviral, el cual no se debe a toxicidad sobre las células; es activa frente a un amplio espectro de virus no relacionados entre sí e inhibe la multiplicación viral a través de un efecto

intracelular que lleva aparejado la síntesis de mRNA y proteínas. Se encuentra en el organismo o en cultivos celulares solamente cuando han sido tratados con inductores; su peso molecular puede variar entre 25.000 y 180.000 d dependiendo de las células o del inductor utilizado y es mucho mas activo en células de especies homólogas que en cualquier otras células. Es estable a pH 2.

Para la inducción del interferón por virus, se sabe que es imprescindible la duplicación de la cadena del ácido nucleico cuando se trata de un virus monocatenario, tanto si es RNA como DNA (FALCOFF y FALCOFF, 1970). A partir de este estado bicatenario del ácido nucleico inductor se llega a la inducción de la proteína interferón mediante un mecanismo análogo al admitido para la síntesis y represión de la β -galactosidasa.

En cuanto al mecanismo de síntesis de interferón, cabe resumirle como sigue:

a) El virus penetra en la célula y pierde su cubierta liberando su ácido nucleico mono o bicatenario.

b) El ácido nucleico viral se replica y una de sus cadenas se liga a los ribosomas de la célula. Este acontecimiento puede servir como señal de disparo para la derrepresión de un cistrón DNA de la célula huesped que condiciona la formación de mRNA del interferón.

c) Los polisomas que tienen así incorporado el mRNA del interferón producen y liberan el interferón, que pasa al torrente sanguíneo en el caso de seres vivos, o al medio de mantenimiento cuando se trate de cultivos celulares.

Una clara idea de este mecanismo a nivel celular y molecular puede obtenerse de las figuras 9 y 10 respectivamente (RONDA y ALONSO, 1977).

Existen dos teorías sobre el destino del interferón una vez liberado de las células productoras: según la primera, que fué mantenida hasta hace pocos años (BURKE e ISAACS, 1958 a y b; ANDREWS, 1961; ISAACS y cols, 1961) era imprescindible la entrada del interferón en otras células para desarrollar su actividad antiviral y ello implicaría un alto consumo de estas proteínas. Sin embargo, a partir de los trabajos de ANKEL y cols. (1973) y CHANY y cols. (1975) se tuvo una confirmación experimental -al menos por el comportamiento en cultivos celulares- de la teoría de que el interferón no tenía necesidad de atravesar la pared celular para desde allí, desencadenar el estado de resistencia antiviral.

CHANY y cols (1975) ligaron el interferón a partículas CNBr-Sepharosa y añadieron el resultante a cultivos celulares, manteniéndolo dentro de una bolsa de plástico que impedía el paso de aquellas partículas al resto del cultivo; pasadas 24 horas era retirado el soporte y el cultivo celular se infectaba con VSV. Después se llevó a cabo la observación de las marcas infectivas y se encontró que la porción del cultivo que estaba dentro del soporte limitado por las partículas de Sepharosa con el interferón no presentaban las placas infectivas que eran patentes en el resto del cultivo. También, estos mismos autores, demostraron que se podían hacer tratamientos sucesivos de cultivos celulares, por este sistema de partículas tratadas sin llegar a agotar el poder protector del interferón ligado, esto parece indicar claramente que tan sólo es necesari-

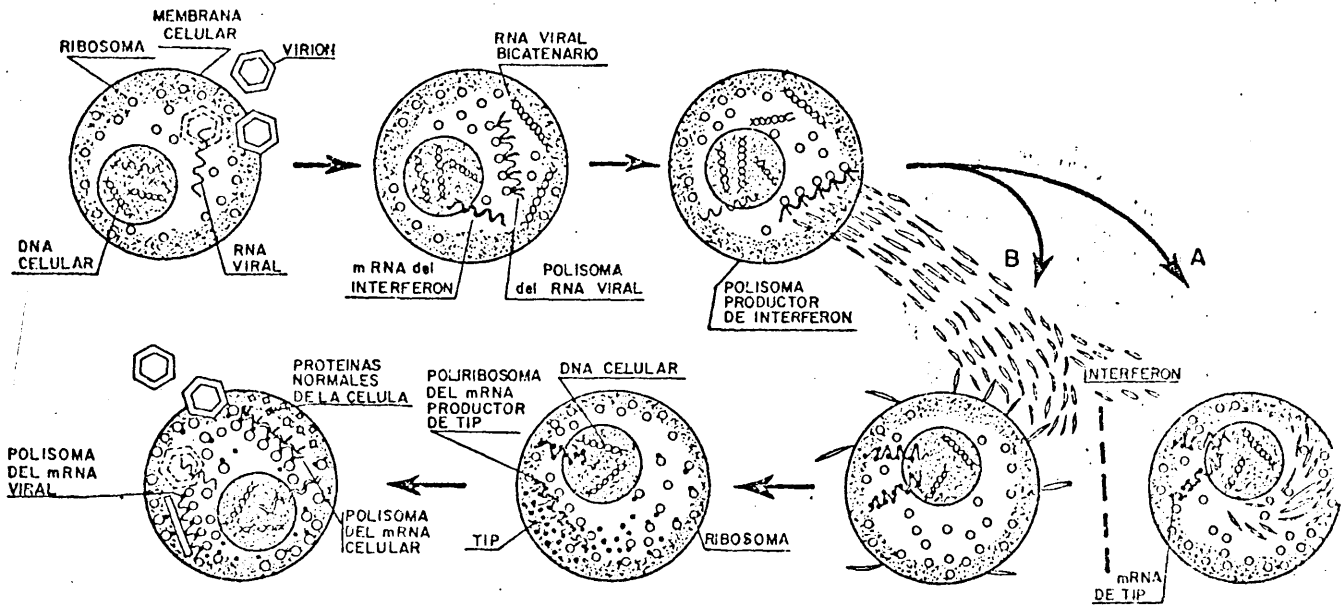


Fig. 9.- Representación esquemática de acontecimientos moleculares, a nivel celular, de la inducción y acción específica del interferón.

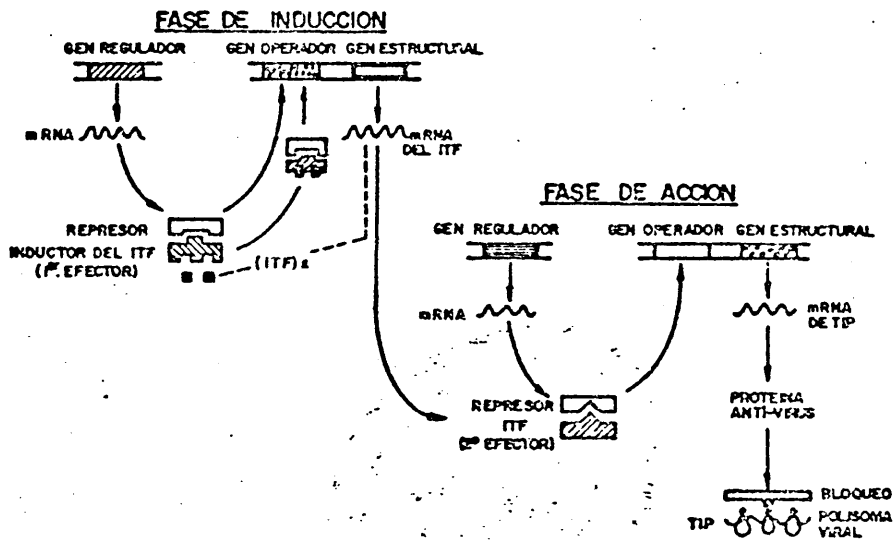


Fig. 10.- Mecanismos reguladores en la síntesis y actividad del interferón a nivel de las fases de inducción y de acción, respectivamente.

rió un contacto del interferón sobre receptores específicos situados en la pared celular para producir la respuesta (SHEAFF y STEWART, 1969). Estos receptores específicos soportan moléculas gangliosídicas con una gran afinidad para las glicoproteínas y a su vez disponen de un mecanismo de puesta en marcha de las subsiguientes reacciones. Muy recientemente, FILIPIC y cols, (1977) han demostrado la naturaleza sialoglicoproteica de estos receptores (p.m. 70.000 - 80.000 d) que presentan por analogía con los receptores para las fitohemaglutininas, la cinética de acoplamiento del cortisol y del IF es idéntica presentándose competencia entre ellos frente a los receptores que están situados en la pared celular; este acoplamiento está regido por una configuración alostérica de las moléculas receptoras.

Efectivamente el interferón, desde la pared celular, da lugar a una serie de acontecimientos que van a actuar sobre el genoma de la célula dando lugar a la aparición de un nuevo RNA, el mRNA de la proteína inhibidora de la traducción (TIP). Se ha comprobado que el mRNA del TIP está codificado, en células humanas, por los cromosomas 2 y 5 (CREAGAN y cols, 1975; TAN y cols, 1974). Este TIP ha sido aislado por SAMUEL y JOKLIK (1974) en células tratadas con interferón y ha quedado identificado con un polipéptido de p.m. de 48.000 daltons, el cual aparece siempre en las células tratadas, pero nunca en células no tratadas. Este polipéptido llega a inhibir la traducción del mRNA viral en un 90% (SAMUEL y SOKLIK, 1974) sin que tenga ningún efecto sobre la traducción del mRNA de la célula, ni inclusive de mRNA exógeno extraños o sintéticos (WIEBE y JOKLIK, 1975).

De los investigadores interesados en el modo de inducción del IF, unos se ocuparon de identificar los genes responsables de la formación del mRNA del TIP, mientras que otros se dedicaron a la búsqueda del gene o genes que darían la señal formadora del TIP en las células que recibieron sobre su membrana al IF ya formado (EPSTEIN, 1975; EPSTEIN y EPSTEIN, 1976).

En experimentos llevados a cabo sobre células humanas monosómicas, disómicas y con células trisómicas procedentes de personas con esta anomalía, se encontró que en las trisómicas del cromosoma 21 aparecía mayor resistencia a la infección viral después de ser tratadas con IF humano comparados con la resistencia conferida a células disómicas o monosómicas, para este cromosoma, y en estos estudios se ha identificado el gene antiviral (AVG en la literatura anglosajona) localizado en el extremo distal del brazo largo de dicho cromosoma. Es curioso señalar a este respecto que aún no exista en la bibliografía ningún dato sobre experiencias que determinen, en células animales, los genes responsables de la inducción del IF y de la formación del TIP que confiere la resistencia antiviral.

Por otro lado destacamos el hecho que frente al aislamiento e identificación del TIP, polipéptido de 48.000 d, no ha podido ser determinado el elemento que desencadena la producción de dicho polipéptido; hipotéticamente se ha señalado a alguna histona u oligopéptido como el intermediario entre el momento de la unión del IF a los receptores de la membrana celular y la puesta en marcha del sistema de producción del polipéptido regido por el gene antiviral.

4.1. Inducción de interferón en fibroblastos de pollo por mixovirus

En general los virus que componen el grupo Mixovirus, son excelentes inductores del IF, pero muy en particular el influenza, gracias al cual se descubrió la existencia de este factor antiviral; y también el NDV, por ser uno de los mas utilizados en todos los campos relacionados con la experimentación sobre actividad, modo de acción, estandarización, preparación de antisueros antiinterferón y en el estudio de los complejos mecanismos de interacción interferón-respuesta inmunológica, así como en la depresión y superinducción en presencia de quimioterápicos y antibióticos.

Los mixovirus dan lugar a altos títulos de IF en ratón, células murinas, conejo, embrión de pollo y mono, pero el título obtenido en fibroblastos de pollo es bastante más bajo, debido precisamente a su poder citopático rápido que impide la puesta en marcha del ciclo productor del IF. Este inconveniente se ha obviado inactivando los virus por irradiación ultravioleta (HO y BREINING, 1965), o aprovechando la termolabilidad de los virus, utilizando temperaturas de 35-37° C en tratamientos largos (GIFFORD y HELLER, 1963; LE CLERC y COGNIAUX - LE CLERC, 1965), y muy concretamente de NDV, a temperaturas más altas pero en tratamiento corto (RONDA y ALONSO, 1974). Según estos autores, tanto la irradiación como la inactivación a estas temperaturas, mantienen la capacidad inductora, permitiendo alcanzar más altos niveles que en el caso de virus con actividad citopática.

Intensos o largos tratamientos de irradiación o temperaturas superiores a 40° C dan lugar a la desaparición del

poder interferente de los virus así tratados, sugiriendo que el inductor puede residir bien en el ácido nucleico viral o bien en la proteína, pero a partir de los trabajos de BURKE e ISAACS en 1958 se tiene la seguridad de que es el ácido nucleico el responsable de la inducción, siempre que no hayan experimentado alteraciones profundas; por tanto el ácido nucleico es el protagonista de la iniciación de dos series de acontecimientos; una que induce a la multiplicación viral (abolida por el tratamiento) y otra que conduce a la formación del IF (favorecida por la integridad funcional de la célula); no obstante las proteínas virales juegan, también, un papel importante una vez dada la señal de formación de interferón.

Ha habido grandes controversias entre la afirmación del FALCOFF y FALCOFF en 1970 de que era imprescindible la duplicación en los ácido nucleicos para la aparición de IF, y el hecho innegable de que los virus inactivados por UV o temperatura eran capaces de inducir IF, pero en el mismo año 1970 LOMNICZI y BURKE, trabajando con cepas salvajes y mutantes de SFV encontraron que un mutante que no producía RNA viral en condiciones no permisivas de temperatura, era un mutante capaz de inducir el IF siempre y cuando se infectase el cultivo con cantidades superiores a 10 UFP/célula. Así demostraron que en el caso de algunos virus RNA, el IF puede ser inducido bien por el RNA viral sintetizado por las células o bien por el mismo RNA viral infectante en su forma monocatenaria; en el mismo año GANDHI y cols, (1970) hallaron que varios mixovirus inducían interferón sin que se produjese ninguna síntesis de RNA viral.

A este respecto HO (1964 a) puntualiza que el término "virulencia" se aplica normalmente a los aspectos clínicos en el enfermo, pero es muy difícil de definir su significación cuando las infecciones se producen en los cultivos celulares. Este autor sugiere que en el presente contexto, la "virulencia" o patogenicidad debiera ser definida en términos bioquímicos. Dado que la producción de IF requiere mecanismos sintetizadores propios de la célula, quedaría deprimida esta producción, cuando las células en cultivos han sido infectadas por virus "virulentos" puesto que aquellos mecanismos han sido inhibidos, apareciendo el interferón cuando el inductor es un virus "avirulento" en términos bioquímicos.

4.2. Inducción de interferón en pollos por mixovirus

Los individuos de este grupo son buenos inductores de IF en todo tipo de aves, sin que las gallináceas hagan excepción. Inmediatamente después del descubrimiento del interferón varios autores se ocuparon en la inducción de esta proteína en pollos y así tenemos ISAACS y LINDENMANN (1957) con influenza, BURKE e ISAACS (1958 a) con FPV, mientras que los primeros trabajos de inducción en animales vivos con NDV no aparecen hasta 1965 publicados por HO y BREINING.

En 1963, BARON y BUCKLER, trabajando con NDV, Sindbis y Sendai en ratón, demostraron que cuando una, relativamente, gran cantidad de material vírico era inoculado por vía endovenosa, se podía detectar el interferón en el suero sanguíneo una hora después de la inoculación, alcanzando los máximos niveles 4 a 7 horas más tarde; es decir, antes de que se haya logrado una significativa, clínicamente, multiplicación viral.

La inducción de IF en animales se encuentra favorecida por el poder patógeno del virus, al contrario de cuanto sucede en la inducción sobre cultivos celulares; siendo además la respuesta más temprana lo que permite hacer detecciones de IF mucho antes de que el animal presente signos de enfermedad o la muerte (fase que podría corresponder a la lisis celular, estableciendo un paralelo entre ambos sistemas de células huésped).

La introducción en el organismo vivo de un virus buen inductor va a dar como resultado la aparición de interferón no sólo en la sangre sino también en otros sistemas u órganos: riñón, cerebro y bazo (KONO y HO, 1965), si bien ello depende no sólo del virus utilizado como inductor sino también de la vía de inoculación elegida.

La mayor parte de las células del organismo son capaces de producir elevadas cantidades de IF al ser tratadas, con inductor adecuado, pero ha de tenerse en cuenta que los linfocitos se han revelado como las células mejores productoras de la proteína que nos ocupa; los linfocitos T dan lugar a una más prematura aparición en sangre que la debida a los linfocitos B, que sin embargo es más potente. En la actualidad se obtiene interferón en cultivos de esplenocitos inducidos por virus (interferón tipo I o clásico) o por mitógenos específicos (lipopolisacáridos, fitohemagglutininas), o bien por sensibilización con antígenos seguida de un tratamiento con el propio antígeno sensibilizante (interferón tipo II o antigénico). Mucho se podría decir sobre la interrelación entre interferón-linfocitos-sistema inmunitario, pero este tema queda fuera del presente trabajo.

4.3. Inducción de interferón en presencia de diversos inhibidores metabólicos y quimioterápicos

Actualmente se tiene la certeza de que la producción de interferón surge como una derepresión de genes seguida por una transcripción de mRNA de interferón y la consiguiente traducción posterior. Este esquema ha sido basado sobre resultados obtenidos con un limitado número de inhibidores metabólicos, principalmente actinomicina D (como inhibidor de la formación de RNA dependiente del DNA) y cicloheximida y puromicina (como inhibidores de proteínas).

La inducción de IF en cultivos celulares es inhibida por actinomicina D (HELLER, 1963; WAGNER, 1963) y lo mismo sucede en conejos tratados con actinomicina e infectados con virus Sindbis (HO y KONO, 1965); el mismo efecto depresor aparece en ratones tratados con cicloheximida e infectado con NDV (YOUNGNER y cols, 1965). Idéntico comportamiento presenta la puromicina tanto en cultivos celulares (WAGNER y HUANG, 1965; BUCHAN y BURKE, 1966) como "in vivo" en ratones inoculados con NDV ó en conejos infectados con Sindbis (YOUNGNER y cols, 1965; KE y cols, 1966).

Por tanto y a partir de estos conocimientos se pudo asegurar que la producción de IF inducido por virus involucra la síntesis de RNA dependiente de DNA y la síntesis de proteínas tanto en cultivos celulares "in vitro" como en tratamientos de animales "in vivo".

Los trabajos aquí citados fueron el origen de un acúmulo de investigaciones sobre la estrecha dependencia entre

inducción de IF e inhibidores metabólicos y todos ellos confirmaron lo antedicho.

Por este camino se ha llegado a conseguir una superinducción de IF prolongando el periodo de producción del mismo (TAN y cols, 1970; VILCEK y NG, 1971; HAVELL y VILCEK, 1972; VILCEK y HAVELL, 1973; SEHGAL y cols, 1975, 1976), muy probablemente por el fenómeno descrito por MCAUSLAN (1963) en la represión de la timidina quinasa en células HeLa infectadas con virus vacunal. Así se consigue por tratamiento de células con actinomicina D la inhibición de la producción de un mRNA para una proteína reguladora del IF, proteína que ejerce un control negativo a nivel transcripcional (SEHGAL y TAMM, 1976; CAVALIERI y COLS, 1977; RAJ y PITHA, 1977; SEHGAL y cols, 1977).

No cabe duda de la importancia que tiene cualquier investigación que relacione antimetabolitos e inducción de IF, lo que ha hecho que en nuestro Instituto RONDA y ALONSO (1974; 1976) hayan estudiado el efecto de rifamicina y derivados en la producción de la proteína interferente inducida por NDV en cultivos de fibroblastos o en pollo. Asimismo, RONDA y cols, (1977) presentaron una comunicación al V Congreso Nacional de Microbiología sobre inducción de interferón en presencia de sustancias antitumorales, donde se estudia las alteraciones en el título de interferón producido por NDV en pollos inoculados con mitomicina C, bleomicina y methotrexato, y los mismos autores presentaron otra comunicación haciendo un estudio comparativo sobre el efecto de la ciclofosfamida en la inducción del interferón - respuesta inmune de pollos infectados con NDV (RONDA y cols, 1978).

IV. ALGUNOS ASPECTOS DE LA QUIMIOTERAPIA ANTIVIRAL

Si se establece un paralelismo entre la Quimioterapia Antiviral y la Quimioterapia Antibacteriana, se observará que esta última está mucho mas desarrollada que la primera por las siguientes razones:

a) Los virus dependen obligatoriamente del metabolismo de la célula huésped al serle imprescindible la maquinaria metabólica de esta. Por tanto, la mayoría de los procesos metabólicos de los virus se confunden con los de la célula por el infectada. La eficacia del fármaco antiviral estará muy relacionada, por una parte, con la ausencia o baja toxicidad frente a la célula y por otra con su capacidad para incidir sobre aquellos pasos metabólicos que sean exclusivos del metabolismo viral.

b) El diagnóstico de una enfermedad se basa en sus síntomas y éstos, en las enfermedades virales, aparecen según dos patrones extremos que corresponden el periodo de incubación; si éste es corto, los síntomas aparecen muy pronto y cuando lo hacen la enfermedad está muy avanzada (gripe, fiebre amarilla, etc.); en otros casos, cuando el periodo de incubación es

largo, la enfermedad está completamente implantada cuando aparecen los primeros síntomas (enfermedades producidas por leucovirus, etc). En ambos casos la terapia resulta muy difícil.

Cronológicamente los primeros agentes antivirales específicos fueron las tiosemicarbazonas, cuya introducción en clínica medica se debe a DOMAGK y cols, (1946); mas tarde fueron los benzimidazoles (TAMM y cols,1952),el interferón (ISAACS y LINDEMANN, 1956) y distintos análogos de purinas y pirimidinas (idoxuridina) (PROSOFF, 1959; HERRMANN, 1961),los que se han ido utilizando sucesivamente. En la actualidad han tomado mucha importancia en la Quimioterapia Antiviral sustancias tales como la amantadina (GRUNERT y cols, 1966; WEINSTEIN y CHANG, 1973) y la citarabina (UNDERWOOD, 1962; JUEL-JENSEN, 1973).

Para su estudio recurriremos a examinar, en primer lugar, los distintos mecanismos de acción antiviral; ellos nos iran poniendo al corriente del desarrollo de las nuevas moléculas y de sus posibilidades de diseñar otras mas potentes. Por otra parte, veremos a continuación la metodica para controlar las actividades antivirales y la posibilidad de estudiar los mecanismos de acción de estos fármacos.

1. Posibilidades de interferir la multiplicación viral

Desde la década de los años cuarenta, en que se encontraron sustancias claramente antivirales,tales como el grupo de las tiosemicarbazonas, hasta la fecha, se conocen in-

finidad de productos químicos que de diferentes maneras y en sistemas biológicos variados son capaces de inhibir la multiplicación viral. Por tanto, cabe clasificarles para su estudio atendiendo al proceso metabólico viral que inhiben.

1.1. Substancias que interfieren con la adsorción del virus.

Los principales compuestos inhibidores de este proceso son los polisacáridos sulfatados (TAKEMOTO y LIEBHABER, 1961) y los mucopolisacáridos (MANDEL, 1957; PIZZA y cols, 1967; AGOL y CHUMAKOVA, 1963); ninguno de estos agentes son específicos y su acción se lleva a cabo al afectar tanto los sitios específicos de las células huésped como de los virus.

1.2. Substancias que interfieren con la penetración viral

En este grupo encontramos con el clorhidrato de amantadina (DAVIES y cols, 1964; WALLBANK y cols, 1966; GALBRAITH y cols, 1973) y la cloroquina (ALLISON y cols, 1965; DURAND y cols, 1970). Generalmente este tipo de compuestos actúa a nivel del desvestimiento del virión.

1.3. Substancias que interfieren con las enzimas asociadas al virión y a la transcripción del genoma parental.

Dentro de este grupo cabe distinguir tres tipos de substancias que pueden clasificarse:

i - Inhibidores de la RNA polimerasa RNA dependiente (reverso-transcriptasa), en este grupo se encuentran las rifamicinas (SENSI y cols, 1960; GURGO y cols, 1972) y las distamicinas (KOTLER, 1971; CHANDRA y cols, 1970).

ii - Inhibidores de RNA polimerasas RNA ó DNA dependientes asociadas al viri6n, entre los que se encuentran principalmente la streptovaricina, que actua sobre la RNA polimerasa DNA dependiente asociada al virus vacunal (QUINTRELL y McAUSLAND, 1970) y el dihidroclorhidrato de selenocistamina, que actua sobre la RNA polimerasa RNA dependiente de mixovirus (OXFORD, 1973)

iii - Inhibici6n de la transcripci6n del DNA parental; entre las principales sustancias que inhiben el ciclo multiplicativo a este nivel nos encontramos con la adenosina monofosfato c6clica (ZIMMERMAN y RASKA, 1972).

1.4. Substancias que interfieren con el proceso de traslaci6n del RNA mensajero.

Tambi6n dentro de este grupo se pueden considerar cuatro subgrupos en funci6n de su mecanismo particular.

i - Substancias que interfieren en la interacci6n de mRNA viral con los ribosomas celulares. Entre los diversos productos que intervienen a este nivel cabe destacar el interfer6n, que estudiaremos mas ampliamente y la isoprinasina (GORDON y BROWN, 1972; MULDOON y cols, 1972).

ii - Substancias antivirales que interfieren con la iniciaci6n de las cadenas polipept6dicas virales. En este grupo nos encontramos con dos compuestos muy conocidos: La p-fluorofenilalanina (FPA) (ACKERMAN y cols, 1954, WECKER y cols, 1962; JOKLIK, 1962; KIT y cols, 1963; FUJITA, 1973), y la cicloheximida (ENNIS y LUBIN, 1964; SCHOLTISSEK y ROTT, 1970; FLEXNER y cols, 1973).

iii - Compuestos que inhiben la síntesis de las proteínas virales. Como ejemplo podemos citar la rodamina (2-tio-4-oxotiazolidina) (EGGERS y cols, 1970).

iv - Inhibidores de las proteínas precursoras de los péptidos estructurales del virus. Entre los principales nos encontramos con el cloruro de zinc (KORANT y cols, 1974) y los inhibidores de proteasas (KORANT, 1973).

1.5. Substancias que interfieren con la síntesis del genoma de los virus con RNA

Dentro de este grupo hay que distinguir tres subgrupos:

i - Compuestos inhibidores que interfieren con la síntesis del genoma de los virus con DNA. Este es el caso de la guanidina, HBB (2-(α -hidroxibencil)-bencimidazol) y derivados (TAMM y EGGERS 1963; EGGERS y WAIDNER, 1970).

ii - Compuestos inhibidores de la RNA polimerasa viral. Como ejemplo citaremos la gliotoxina (RIGHTSEL y cols, 1964; LARIN y cols, 1965).

iii - Compuestos inhibidores de la polimerización de los ribonucleótidos por las RNA polimerasas virales. Los mas estudiados son: virazol (SIDWELL y cols, 1972; HUFFMAN y cols, 1973) y la cordicepina (3'-desoxiadenosina) (LOVINGER y cols, 1973).

1.6. Substancias que inhiben la replicación del DNA viral.

Dentro de este grupo se pueden distinguir los siguientes subgrupos:

i - Inhibidores que causan la degradación del DNA viral parental. Entre ellos encontramos la camptothecina (WALL, 1966; HORWITZ y HORWITZ, 1971) y el azul de toluidina (HIATT y cols, 1960).

ii - Inhibidores de procesos enzimáticos relacionados con la síntesis de DNA. Los representantes mas importantes de este grupo son los nucleosidos de purinas y pirimidinas, siendo los mas estudiados la citosin arabinósido (ara-C) (LEVITT y BECKER, 1967; EIDINOFF y cols, 1965; CAMPBELL y cols, 1968) y el adenosin arabinósido (ara-A) (MILNER y cols, 1968).

iii - Inhibidores de la síntesis de DNA viral por incorporación a las moléculas de DNA viral. Los principales representantes de este subgrupo son los halogenuros de desoxirribonucleósidos tales como: 5-iodo-2'-desoxiuridina (IUdR) (PRUSOFF, 1967; PRUSOFF y GOZ, 1973), 5'-etil-2'-desoxiuridina (GUARI, 1969) y el 5'-trifluometil-2'-desoxiuridina (F₃ TdR) (OKI y HEIDELBERGER, 1971). Actúan por sustitución de los desoxirribonucleósidos por análogos estructurales.

iv - Inhibidores de procesos enzimáticos en la biosíntesis de los nucleótidos. El principal representante es el 6-azauracil ribonucleósido (6-azauridina) (FALKE y RADA, 1970).

v - Inhibidores que interactúan con el DNA viral. En este subgrupo destacan las distamicinas (KOTLER y BECKER, 1971) y la actinomicina D (KIRK, 1960; SCHOLTISSEK y ROTT, 1970).

1.7. Substancias antivirales que afectan a los RNA mensajeros tardíos y proteínas virales tardías

Las más conocidas de entre este subgrupo son la isatin β -tiosemicarbazona (IBT) (HAMRE y cols, 1950, EASTERBROOK, 1962), el N-metil-isatin- β -tiosemicarbazona (metisazona) (LEVINSON y cols, 1971; LEVINSON y cols, 1973), y la rifampicina (SUBAK-SHARPE y cols, 1969; GRIMLY, PM y cols, 1970).

1.8 Substancias que inhiben la formación de membranas virales en células infectadas

Las más conocidas son la 2-desoxi-D-glucosa (KILBOURNE, 1959; COURTNEY y cols, 1973; STEINER y cols, 1973; KALUZA y cols, 1972; KLENK y cols, 1972) y la D-glucosamina (KLENK y cols, 1972; DUBIN y cols, 1974; KALUZA y cols, 1972; HUNTER y cols, 1974; SAMSON y FOX, 1974).

De las sustancias precedentemente citadas se pueden deducir varias consecuencias en primer lugar destaca la variedad de origen (natural, semisintético o sintético); en segundo lugar, la complejidad estructural de los compuestos es también muy variada, abarcando desde sustancias muy sencillas (guanidina, etc) hasta muy complicadas (rifampicina, etc.) y reuniendo entre ambos extremos todo tipo de compuestos incluyendo proteínas naturales (interferón); y por último, la multiplicidad de efectos que es posible conseguir.

La toxicidad o capacidad para producir lesiones o alteraciones metabólicas celulares, abarca un gran espectro de concentraciones, encontrándose sustancias que son muy tóxicas aún a concentraciones muy bajas (rifampicina, etc) y otras por el contrario no lo son o sólo cuando se administran en grandes concentraciones (interferón). Un caso especial lo constituye las purinas y pirimidinas halogenadas que, aparte de su riesgo de toxicidad, pueden alterar el aparato genético de las células humanas favoreciendo además la infección con oncornavirus y herpesvirus (TEMIN, 1971; KLEIN y DOMBOS, 1973; BECKER y cols, 1974).

Un análisis mas profundo de los compuestos capaces de producir actividad antiviral nos indica que el modo de acción varía mucho, encontrando inhibidores poco específicos que afectan casi por igual a la multiplicación viral y a los procesos celulares, pero que en condiciones determinadas y a concentraciones subtóxicas pueden resultar eficaces (análogos, tanto de aminoácidos, como de purinas y pirimidinas). Otros son específicos de la célula, pero que sin llegar a concentraciones tóxicas pueden afectar claramente al ciclo multiplicativo viral, así nos encontramos con que los polisacáridos sulfatados y mucopolisacáridos afectan a la adsorción viral porque se unen eléctricamente a los receptores celulares por los que el virus se une a la célula y los bloquean. Por otro lado, otro tipo de inhibidor celular lo representa la amantadina, la cual alterando la membrana celular o lisosomal impide el desvestimiento de ciertos virus (ortomixovirus y paramixovirus).

Por último, existe una serie de productos que inhiben etapas específicas del ciclo de la multiplicación viral, tal es el caso de la rifampicina, que inhibe la reversa-transcriptasa

en oncornavirus, el virazol y la HBB, que inhiben la síntesis de RNA viral, etc.

Un caso especial de inhibición lo constituye el interferón, que previamente hemos estudiado con mayor detalle y que presenta un amplio espectro antiviral.

Una gran limitación de las sustancias antivirales confirmadas, es que tienen un pequeño espectro antiviral, y así una sustancia determinada puede ser eficaz frente a un determinado virus en un determinado sistema, serlo menos frente a ese mismo virus en un sistema biológico distinto y no serlo nada con un virus distinto considerado en los mismos sistemas.

De los cientos de productos que tienen actividad antiviral "in vitro", en la práctica sólo hay unos pocos que son aplicables a la terapia o profilaxis humana, puesto que para considerarlos como tales tienen que cumplir una serie de condiciones: a) la molécula debe ser soluble en los fluidos corporales; b) tiene que tener posibilidad de una administración adecuada dentro del organismo; c) el fármaco, frente a procesos enzimáticos, debe quedar inalterado o activado y en cualquier caso sin perder efectividad; d) la molécula tiene que ser capaz de alcanzar los tejidos infectados; e) no debe ser afectada por mecanismos inmunes que puedan neutralizar su acción; f) no tiene que ser tóxica; y g) no dar lugar a la aparición de mutantes resistentes a ella.

Las únicas moléculas o fármacos que hasta hora han sido aplicadas al hombre son las que se indican a continuación:

METISAZONA.- (llamada comercialmente "Marborán")

Este producto es una droga profiláctica frente a la viruela y para el tratamiento de complicaciones después de la vacunación antivariolosa (BAWER y cols, 1969; RIVEIRO DO VALLE y cols, 1965).

CLORHIDRATO DE AMANTADINA.- (clorhidrato de amino-1-adamantano)

Por vía oral tiene cierta actividad profiláctica sobre la gripe. (GRUNERT y cols, 1965; JACKSON y cols, 1963; WEINSTEIN y CHANG, 1973).

IDOXURIDINA.- (iodo-5-desoxi-2'uridina, IUdR)

Es un análogo de la timidina, tiene efecto terapéutico frente a la multiplicación de DNA-virus (vacuna, herpes); empleado usualmente en la queratitis herpética. Entre la bibliografía referente al tema encontramos los trabajos de (PRUSOFF, 1959; HERRMAN, 1961, NOLAND y cols, 1970, GURWITH y cols, 1971; KAUFMAN y cols, 1962; JAWETZ, 1973)

CITARABINA.- (citosin arabinósido, ara-C)

Tiene un efecto profiláctico frente a herpes virus en infecciones experimentales en conejos (queratitis) (UNDERWOOD, 1962) y ratas (RENIS, 1973). En pacientes humanos también ha sido aplicada (CHOW, 1970; JAWETZ, 1973; JUEL JENSEN, 1973).

La adenosin arabinósido (ara-A) tiene unas características similares a la anterior, pero todavía está en periodo de estudio (SIDWELL, 1968).

En definitiva, aunque estos compuestos se pueden aplicar en clínica humana, a la hora de administrarlos hay que tener en cuenta que los resultados no están aún plenamente evaluados desde el punto de vista de una investigación clínica con gran número de casos y que un prolongado tratamiento con ellos puede llegar a producir efectos tóxicos por acumulación.

2. Metodología de las investigaciones en quimioterapia antiviral.

En la mayoría de los casos la selección que se aplica en el ensayo de sustancias antivirales es prácticamente empírica, ya que, salvo con algunas excepciones, la estructura de una hipotética sustancia antiviral generalmente no nos indica nada de su modo de acción ni de su posible espectro de inhibición dentro de la gran cantidad de distintos sistemas huesped-virus que existen. El que este procedimiento sea empírico, lleva como consecuencia la necesidad de ensayar una gran cantidad de posibles sustancias antivirales, en un sistema biológico adecuado. Como las interacciones células huesped-virus-sustancia antiviral son muy particulares y selectivas, no se puede establecer un modelo general de sistema de ensayo biológico que sirva para todos los casos.

El sistema de ensayo elegido debe ser de tal naturaleza que nos permita detectar y cuantificar la diferencia que

pueda aparecer entre el sistema tratado con la posible sustancia antiviral y el mismo sistema sin tratar, para ello se debe disponer de una técnica de cuantificación que sea lo mas sencilla, rápida y económica posible. De aquí que consideramos imprescindible exponer, de una manera panorámica, los distintos sistemas biológicos y técnicas de cuantificación que existen, para a continuación dar cuenta de las técnicas mas usadas en los ensayos de valoración y determinación de mecanismos de acción.

Así atendiendo al sistema biológico empleado, el ensayo puede realizarse sobre cultivos celulares, en huevos fértiles (ensayo "in ovo") o por medio de animales de laboratorio (ensayo "in vivo"). Normalmente la búsqueda de sustancias antivirales comienza con un ensayo sobre cultivos celulares porque reúnen una serie de ventajas tales como: a) es el más económico para un proceso de selección entre numerosas sustancias; b) es el más rápido, ya que la actividad antiviral se puede medir a las 48 horas, mientras que en ensayos "in vivo" pueden durar, en ciertos casos, dos semanas; e) los efectos son generalmente mas identificables y mensurables que en los restantes ensayos; y d) al ser un sistema biológico sencillo, hay menos variedad de respuestas debidas a individualidades, ya que se trata de un mismo origen común y por lo tanto la evaluación estadística de los resultados es mucho mas representativa que en el caso de un ensayo "in vivo".

Pese a que este sea el sistema biológico ideal para comenzar el ensayo de sustancias antivirales, posee ciertas limitaciones que obligarán a ensayar mas tarde, la sustancia

antiviral, que ha producido efectos inhibitorios, en sistemas "in ovo" e "in vivo". Como principales limitaciones podemos considerar que: a) son sistemas muy alejados de la realidad, puesto que los cultivos de tejidos tienen menos defensas y los virus no siguen las rutas naturales ni encontrarán las mismas barreras biológicas que si penetrasen en un organismo superior y b) no todos los compuestos que son efectivos en cultivos celulares presentarán la misma actividad "in vivo".

Siempre, antes de aplicar cualquier técnica o método de ensayo a un determinado sistema biológico célula-virus, es necesario realizar pruebas de toxicidad con las nuevas moléculas sobre las células huésped para evitar que si existen efectos tóxicos se puedan obtener erróneos resultados.

2.1. Ensayos de antivirales sobre cultivos celulares

Según se indicó anteriormente, estos métodos son los más usados, no solamente en la detección y ensayo de sustancias antivirales, sino también en estudios sobre relación estructura química-actividad biológica y para conocimiento de su modo de acción bioquímico.

En esencia se realizan en dos series paralelas de cultivos celulares infectados con el virus en cuestión; una de las series es tratada con la sustancia en ensayo y la otra serie permanece como testigo; por tanto, si existe una diferencia evaluable en los efectos producidos por el virus sobre las células, se considerara como sustancia antiviral.

El efecto a considerar en la determinación de una substancia antiviral, dependerá del sistema de cultivo de tejidos-virus empleado; así un virus puede producir lesiones visibles, citolisis completas, formación de placas o marcas infectivas, o puede causar la aparición de fenómenos específicos tales como la hemaglutinación, hemadsorción o actividad neuraminidásica. Aparte de estos efectos mas o menos directamente mensurables, existen otros que dan pie a la aplicación de técnicas de medición indirecta tales como: inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, inmunoferritina, fijación del complemento, neutralización, incorporación de material radioactivo, etc.

Logicamente nos encontraremos con sistemas de cultivo de tejidos-virus en los que se podrán cuantificar muchos efectos y en otros, por el contrario, se obtendrán pocos datos por falta de los efectos señalados.

Generalmente hablando, los dos tipos principales de cultivo de tejidos, usados en los ensayos de actividad antiviral, son fragmentos de membrana corioalantoidea y cultivos celulares en monocapa; entendiéndose por monocapa la disposición de las células unidas por contiguidad y no por aposición de unas sobre otras.

También se han usado, y aún se usan, los cultivos de fragmentos de membrana corioalantoidea de embriones en los ensayos de actividad antiviral con el virus influenza (orthomixovirus) y varios paramixovirus. Este sistema se basa en el cultivo de fragmentos de membrana corioalantoidea en medios adecuados que contengan o no a la substancia antiviral. A con-

tinuación se añade a cada uno de ellos un inóculo de virus constante y determinado. Los sistemas tejido-virus así mantenidos en tubos, se incuban durante 36 horas a 37° C en un rotor angular de tubos. Después de este periodo se miden las concentraciones virales por algunas de las técnicas apuntadas anteriormente.

Previamente a la realización del ensayo de la actividad antiviral de un compuesto se tiene que realizar el ensayo de toxicidad en las mismas condiciones técnicas y en donde se compara el aspecto y estado funcional de los fragmentos de membrana corialantoidea tratados con una substancia y los no tratados.

Con gran diferencia, las monocapas celulares son más empleadas en los ensayos de actividad antiviral y constituyen actualmente el sistema biológico mas idóneo para el ensayo de substancias antivirales. La mayor parte de las células susceptibles de ser cultivadas comparten la propiedad de formar, tras un periodo determinado de incubación estática, monocapas fijadas a la cara interna de la base del recipiente del cultivo. Se pueden distinguir tres grandes grupos de células cultivables:

i - Células en primocultivo.- Son células de origen primario; es decir, células procedentes de digestión trípica de organos vivos tanto de adultos como embriones. Una vez cultivadas mantienen todas las propiedades de las células normales del organismo vivo del que procede, conservando su cariograma inalterado. pero con el inconveniente de que son células que sólo pueden utilizarse durante tres generaciones como máximo.

Entre los principales tipos de células que corresponden a este grupo, encontramos: células renales de la mayoría de los mamíferos, células de tiroides, células amnióticas y fibroblastos; estas últimas, que son las más utilizadas proceden de embriones de pollo, ratón, hamster y humanos.

ii - Células de línea continua.- Este tipo de células se caracteriza por poseer una supervivencia indefinida al mantenerse durante sucesivos pases en medios de cultivo (como si se tratara de cultivos bacterianos). Estas células han sufrido modificaciones que las diferencian morfológica, fisiológica y funcionalmente de las células de los tejidos que les han dado origen, con el cariograma atípicamente alterado.

Las ventajas de los cultivos de estas células residen en su facilidad de obtención (no se necesita recurrir a un organismo vivo) y en su uniformidad dentro de un mismo laboratorio donde no cambian las condiciones del cultivo. Dentro de este grupo nos encontramos células de línea continua procedentes de células normales, o bien procedentes de tejidos tumorales tales como HeLa, KB, etc.

iii - Células diploides.- En cierto sentido poseen características intermedias a los dos grupos anteriores ya que son células diploides que mantienen un cariograma normal y que pueden ser mantenidas en cultivos durante unos 40 pases.

Debido a sus grandes ventajas de la poca modificación de sus células originales y a su uniformidad, estas células son cada vez más usadas. Sus principales limitaciones son su conservación y control, lo que implica comprobación periódica de

que la célula diploide no se diferencie en su cariograma de la célula origen.

Tanto las células diploides como las procedentes de primocultivo son utilizadas en la preparación de vacunas antivirales, mientras que las células de línea no pueden ser empleadas por vehicular en ellas ciertos principios que pueden dar lugar a la aparición de tumores.

2.1.1. *Los métodos basados en la titulación de infectividad viral*, se establecen en paralelo sobre dos series de cultivos celulares infectados con suspensión de virus diluidos decimalmente; una de ellas, se trata con el compuesto antiviral y la otra, permanece como testigo. Ambas se mantienen en condiciones óptimas y a intervalos de tiempo determinados se observan los efectos citopáticos y se calculan las dosis infectivas del 50% para el cultivo de tejidos (DICT 50) por medio del método de titulación de REED y MUENCH (1938). Si existe diferencia en la infectividad medida por la disminución en el título infectivo, del tratado al testigo, podremos considerar que el compuesto posee una determinada actividad antiviral.

Este mismo método de titulación de infectividad viral se puede aplicar a ensayos "in ovo" e "in vivo" como veremos más adelante y en estos casos se miden los aumentos de supervivencia o disminución en el número de muertes de los grupos tratados con sustancia antiviral frente a los testigos.

En todos los casos, los resultados se consideran estadísticamente con el fin de hallar valores representativos que nos permitirán medir y comparar diferencias entre grupos trata-

dos con distintas concentraciones de sustancias, por una parte, y entre los tratados y controles por otra.

El método estadístico mas usado en el cálculo de valores representativos es el, ya citado, de REED y MUENCH que introduce el concepto de dosis letal 50% (DL₅₀) para cada especie animal de laboratorio usada y por extensión a embriones (dosis letal embrión 50%, DLE₅₀) representando en ambos casos la dilución decimal de la suspensión viral que produce efectos, causados por el virus, en el 50% de los individuos infectados.

Dado que los intervalos entre las diluciones son grandes y difícilmente la DL₅₀ (DLE₅₀ ó DICT₅₀) se puede corresponder con ninguna dilución decimal del virus, sino que esta comprendida entre dos de ellas, para poder calcular exactamente la dilución REED y MUENCH establecieron: a) cada grupo considerado de animales, huevos o cultivos de tejidos (tubos, placas Petri, etc) deben tener por lo menos 5 individuos para que la representatividad de las evaluaciones estadísticas sea más correcta, puesto que depende directamente de la cantidad de resultados obtenidos; b) la dilución crítica buscada (DL₅₀, DLE₅₀ ó DICT) debe estar comprendida por lo menos entre dos diluciones superiores y dos diluciones inferiores; y c) la DL₅₀ se calcula, a partir de los resultados obtenidos, por el método de totales acumulativos, que suma para cada dilución todos los individuos que han muerto o presentado efecto causado por virus, a partir de las diluciones menos concentradas de las suspensiones virales y todos los individuos que han sobrevivido o no presentando efecto causado por virus, a partir de las diluciones más concentradas. Después, aplicando una formula general con los

datos obtenidos o bien utilizando una fórmula simplificada de cálculo, que es la que nosotros hemos utilizado en el presente trabajo, y que viene representada por:

$$DL_{50} = \frac{\text{mortalidad inmediatamente superior al 5\%} - 50}{(\text{mortalidad inmed. sup. al 5\%}) - (\text{mortalidad inmed. inf. al 5\%})}$$

los resultados obtenidos con esta fórmula simplificada no varían sustancialmente a los obtenidos con la fórmula que utiliza los totales acumulativos. del mismo modo se calcula la DICT considerando los tubos donde aparece citolisis como datos de mortalidad.

(El valor hallado en la fórmula se suma al exponente negativo de la dilución viral más concentrada de las dos que comprenden al 50% de las muertes, pudiéndose expresar en números racionales la dilución que representa la DL_{50} .

2.1.2. Los métodos de valoración basados en estudiar las curvas de viabilidad, consisten en el recuento de células por medio de un colorante vital, generalmente azul Tripano, que tiñe las células muertas y deja las vivas transparentes; así sucesivos recuentos de células vivas a determinados tiempos dan unas curvas características.

Si se encuentran diferencias significativas para las curvas de viabilidad entre ambos sistemas de cultivo de tejidos -virus, en los tratados y no tratados con la substancia antiviral, ello indicará que la substancia es efectiva como agente antiviral.

Este método es muy económico, reproducible y muy directo siendo su gran desventaja la de no poder aplicarse a virus que no produzcan efectos citopáticos.

2.1.3. *En relación con los métodos basados en la inhibición de placas o marcas infectivas*, HERRMANN y cols. (1960) y RADA y cols. (1960), independientemente, desarrollaron unos métodos de ensayo para sustancias antivirales que están basados en la propiedad que tienen ciertos virus para formar marcas infectivas en sistemas de células determinados (técnicas de Dulbecco). La inhibición de la formación de estas placas infectivas en células, en presencia de la sustancia antiviral, es un método efectivo para detectar su actividad, teniendo la ventaja de que se puede realizar a la vez el ensayo de toxicidad y el de la actividad antiviral de un determinado compuesto.

El método utilizado por ambos equipos investigadores consiste en la utilización de monocapas celulares sobre placas Petri, infectadas con cantidad suficiente de virus para producir un gran número de marcas infectivas. Después de un tiempo de adsorción del virus, se lava la monocapa y se cubre con una capa de agar que contenga sales y nutrientes apropiados para el sistema celular usado. A continuación y a tiempos determinados se coloca sobre el centro de la capa de agar un disco de papel de filtro impregnado con la sustancia a ensayar, análogamente a como se hace en la práctica de antibiogramas sobre medio sólido, incubando a continuación durante un tiempo suficiente para permitir el desarrollo de marcas infectivas. El compuesto ensayado difunde alrededor del disco y si posee actividad antiviral, disminuirá el número de marcas alrededor de él.

Las marcas se visualizan con una segunda capa que contiene rojo neutro. En caso de que la concentración del compuesto antiviral en el agar sea tóxica para la célula, se formará un halo claro debido a la lisis tóxica celular en esos puntos. Con este método se pueden hacer determinaciones cuantitativas si se utilizan varias concentraciones de la sustancia antiviral.

Fué DULBECCO (1952) quien introdujo esta técnica de producción de placas en el estudio de los virus animales. En la práctica una partícula viral infecta a una célula la cual libera virus que pasan a infectar las contiguas, siempre que esten mantenidas bajo un medio sólido que impida una diseminación viral a distancia. Las marcas infectivas producidas por la infección viral son de un tamaño característico para cada virus, aunque un virus pueda presentar marcas infectivas de dos o tres tamaños. DULBECCO y VOGT (1954 a, b) también observaron que la aparición de las marcas infectivas no tenía lugar cuando se añadía antisuero específico al medio sólido de recubrimiento. Mas tarde HSING y MELNICK (1955) simplificaron este método de trabajo haciendolo accesible a laboratorios poco dotados.

La técnica es absolutamente válida cuando cumpla los siguientes requisitos: a) no deben formarse placas en ausencia de virus; b) el número de marcas infectivas debe estar en una proporcionalidad lineal con respecto a la concentración viral ensayada; c) tiene que ser reproducible, es decir, distintos ensayos de una misma muestra de virus deben dar resultados superponibles.

La técnica, por otra parte, tiene dos variantes según que las células utilizadas estén en monocapa o en suspensión. La primera de ellas, es la original, (DULBECCO, 1952). En este caso las células, en medio de líquido de crecimiento y a concentraciones adecuadas son puestas en recipientes de plástico o vidrio neutro (placas Petri, frascos, etc) y se incuban a 37° C hasta la formación de la monocapa de células que se fijan en la curva interna inferior; en ese momento se elimina el medio sobrenadante y se añade, previo lavado con PBS ó Hank's un pequeño volumen de las suspensiones virales a ensayar. Después de un tiempo determinado de adsorción, (tiempo de contacto virus-célula) que varía según el tipo de virus ensayado se elimina el inóculo por absorción y se añade medio nutritivo con agar hasta formar una capa nutriente sólida. Los cultivos se incuban a la misma temperatura durante un tiempo determinado que depende del tipo de virus en estudio, generalmente de 2 a 4 días. Pasado este tiempo aparecen unas marcas incoloras causadas por la destrucción de las células en ese area; estas marcas se puede ver por medio de luz indirecta frente a un fondo oscuro, o mejor por adición de una segunda capa de agar mezclado con colorante, normalmente rojo neutro. De esta manera se resaltan las marcas, que apareciendo incoloras contrastan con el color rojo de las células vivas que han tomado el colorante.

La técnica de placas sobre suspensiones celulares en medios sólidos fué desarrollada y perfeccionada por COOPER (1955, 1961) y se efectua como sigue: Se añade agar nutritivo en el recipiente en el que se va a realizar el ensayo hasta formar una capa sólida, este sustrato se puede almacenar a 4° C durante 1 ó 2 semanas; en el momento de realizar la técnica, se añade a una suspensión celular determinada un pequeño volumen

del virus (inóculo) a ensayar para, a continuación y sin periodo de adsorción, añadir al sistema virus-células un volumen igual de medio líquido agarificado, agitando rápidamente la mezcla y vertiéndola sobre las capas de agar almacenadas a 4° C; el resto de la técnica es idéntica a la variante desarrollada por Dulbecco.

En cuanto a las ventajas y desventajas de ambas técnicas tenemos que, en la técnica de Dulbecco, las células se pueden observar microscópicamente y las marcas resultan muy nítidas, pudiéndose contar muy bien; pero tiene el inconveniente de existir muchos riesgos de contaminación y que sólo se puede aplicar a células que se puedan adherir al plástico o vidrio y por tanto puedan dar lugar a la aparición de monocapas celulares.

Si consideramos la técnica de Cooper veremos las ventajas de no necesitar que las células formen monocapas, que es menos sensible a la contaminación y que es más rápida por no requerir tiempo de adsorción. Entre las desventajas tenemos que no se puede utilizar con virus que posean un diámetro mayor de 150 milimicras, que las células no se pueden examinar microscópicamente, que requiere un mayor número de células y que las marcas son más grandes pero menos definidas que las obtenidas por la técnica de Dulbecco.

Finalmente cabe decir que, entre las muchas aplicaciones de estas técnicas de ensayo de placas se encuentra: a) poder realizar ensayos de ácidos nucleicos infecciosos (ALEXANDER y cols. 1958; FRANKLIN y cols, 1959); b) controlar células infectadas (TEMIN y RUBIN, 1958); c) comprobar la inhibición de

· marcas infecciosas por antisueros, substancias antivirales o interferon (BURT y COOPER, 1961; DE SOMER y PRINZIE, 1957; PORTERFIELD, 1959); d) posibilidad de aislar clones, aplicaci3n importantísima derivada del concepto de que cada una de las placas se origina de una simple partícula infectiva (DULBECCO y VOGT, 1954 a).

Pese a todo, quizá una de las mayores aplicaciones la constituya la titulaci3n de suspensiones virales, ya que los títulos así conseguidos vienen expresados en unidades formadoras de placas (p.f.u), que representa la máxima cantidad de placas o marcas infectivas/unidad de volumen del inóculo viral. Con ello podemos cuantificar bastante exactamente la actividad antiviral, por el número de lesiones o marcas infectivas sobre los cultivos celulares, de una forma económica y reproducible sin necesidad de acudir a sistemas "in ovo" e "in vivo".

En la práctica, estas técnicas se encuentran limitadas a ser aplicadas tan sólo con virus que formen marcas infectivas en monocapas celulares al crecer en medios sólidos.

2.1.4. *También existen métodos basados en la hemaglutinaci3n*, dicha técnica fue introducida por TAMM y cols, (1952) y mediante ella se valora la acci3n antiviral de derivados del benzimidazol en sistemas biológicos infectados con virus influenza y se compara el poder hemaglutinante del virus multiplicado en células tratadas y sin tratar. Este método sólo tiene aplicaci3n en el caso de virus con actividad hemaglutinante.

Como datos mas específicos de esta técnica de hemaglutinaci3n (HA) señalaremos que presenta una variante conocida como inhibici3n de la hemaglutinaci3n (HI).

Fueron HIRST (1941) y McCLELLAND y HARE (1941) los primeros en observar este fenómeno de hemaglutinación, que consiste en el distinto comportamiento de la sedimentación, entre los hematies, en presencia de ciertos virus. Los primeros forman un velo continuo de color rojo salmón sobre el fondo del recipiente, mientras que los hematies en ausencia de virus se sedimentan en un botón nítido de color rojo.

La hemaglutinación es debida a la propiedad que tienen muchos virus o antígenos virales de adsorberse, por medio de receptores específicos, a la superficie de los hematies haciendo que estos se aglutinen.

Ya HIRST (1948), por lo menos en el grupo Mixovirus, introdujo la idea de que la hemaglutinación era un fenómeno enzimático, aunque experimentos posteriores hacen dudar de esto. Lo que si está claro es que el fenómeno de HA, al menos en el periodo de adsorción sobre los hematies, es independiente de la temperatura, pudiéndose realizar a 4° C o a temperatura ambiente, según el tipo de virus. En cuanto a la verdadera causa de la aglutinación de hematies, primero se pensó que las partículas virales o hemaglutininas harían de puente entre los hematies; más tarde CHESBRO y HEDRICK (1958) han demostrado que la aglutinación de los hematies está causada por la modificación de la tensión superficial en ellos.

La hemaglutinación se puede bloquear por medio de anticuerpos específicos y esta propiedad dió lugar a la introducción de una nueva variante técnica, la inhibición de la hemaglutinación (HI).

Fue Salk, quien aprovechando la propiedad hemaglutinante de ciertos virus, el que introdujo y desarrolló la técnica HA (1944, 1948). Posteriormente se han introducido distintas variantes aprovechando y utilizando: a) la mayor velocidad de sedimentación de los hematies aglutinados (LEVINE y cols. 1953) y b) medidas fotométricas comparativas de la densidad óptica antes y después de la hemaglutinación (DRESCHER y cols, 1962). Aunque estas técnicas en un principio se introdujeron y fueron utilizadas con el grupo de Orthomixovirus, actualmente se aplica a otros muchos grupos de virus teniendo en cuenta determinadas condiciones.

La técnica de HA posee muchas ventajas en su aplicación entre las que destacan: a) es sencilla, rápida y económica y b) mide directamente el número de partículas o antígenos virales, ya que existe una proporcionalidad directa entre la cantidad de virus, o antígenos hemaglutinantes, existentes en una suspensión y su título hemaglutinante.

Como contrapartida posee una serie de desventajas tales como: a) muchos sistemas hematies-virus son muy inestables; b) existen inhibidores no específicos en el suero o en los fluidos patológicos que contienen el virus que pueden enmascarar los resultados, pero la importancia de la presencia de estos inhibidores puede disminuir desde el momento en que se trabaja con muestras de la misma procedencia como veremos en nuestro caso particular.

2.1.5. *Los métodos basados en la hemadsorción* fueron propuestos por primera vez por DRIESSEN y GREENHAM (1959). Se basa esta técnica en la propiedad que tienen algunos virus

(mixovirus en general, vacunal, etc) de modificar las células en las que se multiplican de tal manera que los hematies se adhieren a su superficie. El número de hematies adheridos al cultivo es proporcional al número de células infectadas que contiene. El efecto se puede medir lisando con agua los eritrocitos adheridos al cultivo y determinando la cantidad de hemoglobina en solución por espectrofotometría.

Una técnica cuantitativa de hemadsorción fue introducida por VOGEL y SHELOKOV (1957) trabajando con sistemas de células de riñón de mono infectadas con virus influenza; esta técnica resulta muy útil para el diagnóstico y cuantificación de ciertos virus que, sobre determinadas células, no pueden producir efectos citopáticos. Consiste en la inoculación de células en cultivo con el virus en estudio, lavando previamente con medio EAGLE sin suero, se mantienen los cultivos a 37° C y después de cierto tiempo se añade una pequeña cantidad de hematies en suspensión que se dejan en contacto de 3 a 5 minutos; después de agitación suave se observan las preparaciones al microscopio óptico con cien aumentos. Si la reacción es negativa, los hematies flotan en el medio ya que no se han fijado sobre las células; por el contrario la reacción es positiva cuando se observa la adsorción de hematies sobre las células y entre los espacios intercelulares lo que indica que existen hemaglutininas en las membranas de las células que fueron infectadas.

Los principios teóricos de esta técnica parecen ser análogos a los de la HA, y los hematies sólo se adsorberán sobre las células que posean en su superficie hemaglutininas virales. La hemadsorción constituye una técnica francamente útil

para la detección de los virus hemadsorbentes que no presentan efectos citopáticos visibles (CHANOCK y cols, 1959; PARROT y cols, 1959).

2.1.6. *Métodos basados en la actividad neuraminidásica* son utilizados por BRAMMER y cols (1968) aprovechando esta propiedad, presentada por los orthomixovirus y algunos paramixovirus, para la evaluación de la actividad antiviral de derivados de isoquinolina. Constituye un método directo, ya que la actividad de la neuraminidasa es directamente proporcional a la cantidad de virus presente. Se puede considerar un buen método, que KENDAL y MADELEY (1969) lo han aplicado sistemáticamente en la búsqueda de sustancias antivirales, estando limitada esta técnica a los virus que se han indicado anteriormente.

2.1.7. *Mediante técnicas inmunofluorescentes*, BOYD y SOMMERVILLE (1974) han diseñado un método general que se puede aplicar a muchos y muy diversos tipos de virus. Haciendo uso de la inmunofluorescencia para cuantificar la reducción del número de partículas o antígenos virales debida al efecto de una supuesta sustancia antiviral. Como consecuencia de la complejidad de obtención y conservación de los reactivos (antígeno, anticuerpo y sustancia fluorescente), esta técnica resulta muy laboriosa y en la práctica se emplea más en el estudio del modo de acción de un compuesto antiviral que en la cuantificación de su efecto.

Actualmente existen una serie de técnicas más modernas, que se sirven de la inmunoperoxidasa y la inmunoferritina, que pueden sustituir con ventaja a la inmunofluorescencia, pero que en la práctica no se emplean por ser más difíciles de manejo y por estar todavía en fase de perfeccionamiento.

En cuanto a la técnica de inmunofluorescencia, fue primeramente desarrollada y aplicada clínicamente por COONS y cols. (1942); a partir de entonces, ha sido muy utilizada con muchos tipos de virus animales, tanto RNA como DNA. Hace pocos años BOYD y SOMMERVILLE (1974) la aplicó como técnica indirecta en el ensayo de sistemas célula-virus muy diversos. Básicamente esta técnica consiste en visualizar a través de un microscopio con lámpara de mercurio la reacción antígeno-anticuerpo, marcando este último con una sustancia fluorescente que no interfiera con la reacción específica antígeno-anticuerpo; existen varios marcadores fluorescentes siendo el más usado al isotiocianato de fluoresceína (FITC).

En la ejecución de esta técnica tenemos que tener en cuenta los siguientes pasos:

i - Obtención y preparación del antisuero específico mediante inmunización de un animal con el antígeno viral del cual queremos obtener su anticuerpo específico. Para la preparación de antígenos debe tenerse en cuenta que el antígeno viral se tiene que purificar bien para eliminar los componentes antigénicos de las células huésped y del medio nutritivo en el caso de cultivos celulares y que se debe tener la seguridad de que el animal o células donadoras del antisuero no sean portadoras de virus latentes con el fin de evitar la introducción de antígenos virales indeseables.

ii - Fraccionamiento del suero, una vez obtenido, para conseguir separar las γ -globulinas. El método más usado es el del fraccionamiento con sulfato amónico a saturación y a media saturación, consiguiéndose al final un precipitado que contiene las γ -globulinas. Este precipitado se dializa frente

a PBS para eliminar el ión amonio y la fracción globulínica conseguida es la que se conjuga con el FITC para obtener el anticuerpo fluorescente después de determinar exactamente la cantidad de proteína que se tiene que conjugar, evitando así coloraciones inespecíficas por exceso de colorante.

iii - Una vez conseguidas las γ -globulinas conjugadas, se pueden emplear para identificar su antígeno correspondiente. Para ello, éste debe estar localizado bajo una de las formas siguientes: a) en cultivos celulares en monocapa, sobre portaobjetos o en tubos Leighton con lámina de vidrio incorporada; b) en frotis de tejidos infectados y c) en cortes de tejidos infectados.

iv - El material infectado (células, frotis o cortes) se fija con acetona a -20° C (existen otros fijadores de uso más específico tales como el benceno, cloroformo, eter, xilol, etc) y se procede a la coloración con el conjugado fluorescente que para reaccionar con el antígeno debe realizarse por contacto a 37° C y en atmósfera húmeda.

v - Una vez realizada la reacción antígeno-anticuerpo fluorescente, se lava la preparación para eliminar el conjugado (anticuerpo fluorescente) libre y se cubre con glicerol tamponado a pH 7, estando lista la preparación para observarse al microscopio de lámpara de mercurio. Los complejos antígeno-conjugado se ven de un color amarilloverdoso brillante.

Esta técnica tiene la ventaja de que se puede aplicar a muchos sistemas células-virus, siendo además muy rápida una vez obtenidos los anticuerpos fluorescentes. En el ensayo de compue

tos antivirales, resulta algo complicada y es de difícil interpretación para ensayos cuantitativos, sin embargo puede ser útil como rápido procedimiento de selección de moléculas muy activas capaces de inhibir la replicación viral. Haremos mención de la posibilidad de utilización técnica de los anticuerpos marcados con ferritina (ANDRES y cols, 1962, 1978; LEVINTHAL y cols, 1967; MORGAN y cols, 1961; 1962; SINGER, 1959; SMITH y cols, 1960; STICH y cols, 1967), pero haciendo las mismas consideraciones que hicimos para las técnicas de inmunofluorescencia, resultando aún mucho mas compleja y laboriosa que aquella.

2.1.8. *Los métodos basados en medir la incorporación de los ácidos nucleicos de precursores marcados radioactivamente fueron desarrollados por MILLER y cols, (1970) como un procedimiento mas fino para detectar y cuantificar la actividad antiviral de una substancia. Esencialmente consiste en medir directamente la cantidad de DNA o RNA viral sintetizado durante un ciclo biológico a partir de precursores (timidina o uridina) tritiados y por tanto, una reducción en la síntesis de ácido nucleico, nos indicará que la substancia ensayada tiene efecto antiviral.*

Este método, que además de poder ser aplicado a cualquier sistema célula-virus, por no depender de propiedades especiales del virus, posee también las ventajas de la rapidez, facilidad de manejo y posibilidad de utilización en un sistema automático.

2.2. Ensayo de antivirales sobre huevos fértiles

Este tipo de ensayo emplea como sistema biológico huevos fecundos de varios días de edad. Los huevos fértiles

constituyen un sistema biológico de primer orden ya que son utilizados en la multiplicación de muchos grupos de virus, entre ellos los orthomixovirus y los paramixovirus, además pueden ser fuente de fibroblastos, tan necesarios en cultivo de monocapas.

La utilización de huevos fértiles, tanto en los países y aislamiento de virus como en el ensayo "in ovo" de sustancias antivirales, ha sido anterior a la utilización de los cultivos de tejidos y aunque en algunas facetas ha perdido frecuencia de uso con respecto a estos últimos, aún constituyen un sistema imprescindible en las técnicas de Virología.

Como sistema de ensayo en la búsqueda de sustancias antivirales posee una serie de ventajas tales como : a) menor complejidad que un animal de laboratorio, aunque sin embargo, posean muchas de sus características y siendo por tanto un sistema biológico mas próximo a la realidad que el sistema célula-virus; y c) no tiene un sistema inmunitario desarrollado, lo que facilita la interpretación de los resultados.

Como principales desventajas se podrían citar: a) constituyen un material menos uniforme que los cultivos celulares (aunque lo sea mas que los animales de laboratorio); b). se les puede aplicar menos técnicas en el estudio y cuantificación de una posible sustancia antiviral; c) puede poseer virus latentes o anticuerpos heredados de la gallina o ave de donde proceden; y d) no se pueden observar efectos citopáticos, aunque si pueden estudiarse micro o macroreacciones en la membrana corioalantoidea.

En esencia, el ensayo, consiste en medir las posibles diferencias que puedan existir entre dos grupos inoculados de huevos fértiles, uno de ellos tratado con la molécula a estudiar y el otro sin ella, que actúa como testigo.

Normalmente los huevos embrionados que se emplean son de 9 a 11 días de edad, y esto es así por dos razones principales: a) esta edad no entra dentro de ninguno de los dos picos máximos de mortalidad natural (entre el 3° y 4° día de edad, con una mortalidad del 3 al 4% de los embriones y otro entre los días 19 y 20, con porcentajes de mortalidad igual o mayor al 15%) (BYERLY y cols, 1933; PAYNE, 1919); b) se puede obtener suficiente cantidad de líquido alantoideo de aspecto claro y aún con pocos uratos.

La inoculación de la sustancia antiviral suele hacerse en saco alantoideo y en el caso de que no sea soluble se inyecta en el saco vitelino (BAUER, 1972), mientras que la inoculación del virus depende del tipo utilizado; en el caso de orthomixovirus y paramixovirus la más utilizada es en la cavidad alantoidea.

La actividad antiviral de una sustancia se determina por alguno de los siguientes efectos: a) aumento del tiempo de supervivencia del embrión o disminución de la mortalidad del grupo tratado con respecto al testigo, calculado por el método ya citado de REED y MUENCH; y b) disminución del título hemaglutinante (HA) del líquido alantoideo.

Previamente al ensayo antiviral, se realiza un ensayo

de toxicidad, en el cual se miden las posibles diferencias entre dos grupos de huevos embrionados; uno de ellos tratado con la substancia antiviral. Normalmente los efectos medidos en esta prueba son el aumento de mortalidad o disminución del tiempo de supervivencia (usando el método de REED y MUENCH) y el aspecto macroscópico (hemorragias, retraso en el crecimiento u otras anomalías) en los individuos de los grupos tratados, con respecto a los grupos testigos.

El ensayo de antivirales en huevos embrionados ha sido aplicado por varios autores, entre los que se encuentran HANRE y cols (1950) y KUCERA y cols (1965). Una variante la constituye el uso de huevos desembrionados (BERNKOPF, 1949), con virus que se multiplican y producen lesiones en la membrana corioalantoidea (influenza y poxvirus). Para ello se desembrionan huevos fértiles, generalmente de 14-15 días de edad. Una vez efectuada esta operación, la membrana corioalantoidea es infectada por el virus y después de un tiempo de incubación se introduce en este sistema así obtenido la substancia que se va a ensayar en diluciones en PBS, Hank's o solución salina. De este modo se puede observar la actividad de la droga a diferentes concentraciones y tiempos por la reducción del título HA o del título infectivo presente en el tampón empleado como líquido de relleno y vehiculante de la droga.

Como desventajas de este método podemos destacar la dificultad de poder calibrar la toxicidad del compuesto antiviral y lo poco apropiado que resulta para substancias poco solubles en estos diluyentes.

2.3. Ensayo de compuestos antivirales sobre animales de laboratorio

Antes de la introducción en Virología de las técnicas de cultivos celulares, este fue el tipo de ensayo más usado. Actualmente es un paso intermedio entre la detección de la actividad antiviral en cultivos de tejidos y el ensayo previo a la utilización en seres humanos. Consiste en la inoculación de dos grupos de animales con dosis conocidas de virus, (la ruta de inoculación depende del tipo de virus); uno de los grupos se trata con la sustancia antiviral a ensayar y el otro queda como testigo. El efecto antiviral se cuantifica por los resultados obtenidos en mortalidad o por el aumento en la supervivencia de los animales. Lógicamente y debido a la complejidad de respuesta que puede dar un animal de laboratorio, los resultados obtenidos serán más oscuros que en el caso de ensayo "in ovo" o en monocapas, y se necesitará por tanto un tratamiento estadístico más complicado que el de los otros resultados.

Al igual que en ensayos "in ovo", también es necesario realizar un control previo de toxicidad, que técnicamente se realiza de la misma manera que el ensayo antiviral.

2.4. Ensayos para conocer el modo de acción de una sustancia antiviral.

Ya hemos advertido en repetidas ocasiones que, un paso previo a la realización de cualquier tipo de ensayos de la actividad antiviral, lo constituye el ensayo de toxicidad sobre cultivos celulares, sobre huevos embrionados o sobre animales de laboratorio, el cual determina la concentración máxima

de sustancia antiviral que puede ser administrada al sistema biológico elegido sin causarle una disminución de vitalidad, ya que una concentración tóxica enmascararía los resultados de la inhibición viral específica por hacer mas débil al sistema biológico sobre el que se ha de actuar.

En líneas generales, se puede considerar que el ensayo de toxicidad debe efectuarse administrando la sustancia antiviral, siguiendo las mismas técnicas que se han de llevar a cabo en el ensayo de actividad antiviral, comparando los efectos observables entre un grupo de sistemas biológicos tratados con la droga y otro grupo con las mismas características pero sin tratar. Lógicamente si la sustancia es tóxica habrá diferencia de resultados entre el grupo tratado y grupo testigo. En los ensayos "in vivo" e "in ovo" el efecto tóxico se mide normalmente por tiempos de supervivencia o aumentos de mortalidad así como aparición de lesiones. En los ensayos en monocapas por el aspecto observado al microscopio óptico, por curvas de viabilidad de la población celular o bien por modificaciones morfológicas o funcionales que puedan producirse en las células.

En el estudio de la actividad antiviral de una sustancia, se realizan una serie de determinaciones mas o menos complejas encaminadas a concretar en que estadio del ciclo multiplicativo del virus actúa específicamente la sustancia antiviral. Uno de los ensayos previos en estas determinaciones se lleva a cabo por contacto directo "in vitro", a diversas temperaturas y tiempos de la droga sobre el virus. Con este fin se hace actuar una determinada cantidad de la solución del com-

puesto antiviral sobre dosis infectivas o letales, fijadas de antemano e inoculando posteriormente esta mezcla a los sistemas biológicos de ensayo. Una reducción o inhibición de los efectos virales, característicos en cada caso y para los virus estudiados, sobre el huésped nos indicará la efectividad de la substancia. Un claro ejemplo de efecto antiviral a este nivel es el realizado con derivados de isoquinolinas sobre mixovirus (BRAMMER y cols, 1968) y de detergentes de amonio cuaternario sobre virus vacunal y encefalíticos equinos (RONDA, 1960).

Por otro lado, y a priori, una substancia antiviral añadida a un sistema célula-virus, puede actuar a tres niveles: antes de la entrada del virus en la célula, en el momento de la unión virus-célula o intracelularmente.

La comprobación de la actividad antiviral en el primer nivel se hace por medio de determinaciones en la infectividad de tomas realizadas durante cortos periodos, inmediatamente después de la inoculación del virus, y por tanto, teóricamente, antes de que el virus se fije a la célula. Si existe una reducción en el virus, comparado con el poder infectivo de este mismo virus incubado en un sistema biológico sin la droga, tendremos la indicación de que la substancia ha actuado antes de que el virus se fije en la célula.

La segunda posibilidad de actuación de la substancia se comprueba determinando la proporción de virus unido al sistema biológico, para ello se titulan muestras del sobrenadante en diferentes intervalos de tiempos. Esta posibilidad se realiza en el caso de que la primera sea negativa y el compuesto antiviral se administre antes que el virus.

En el caso de que el compuesto antiviral tenga poca o ninguna efectividad en los dos niveles anteriores, se realiza un ensayo para comprobar la tercera posibilidad. Para ello se añade medio con una concentración suficiente de sustancia antiviral en tiempos distintos pre y postinfección viral, determinándose después el efecto sobre la producción de virus. Si el compuesto es activo cuando se añade antes, o en periodos tempranos de la infección, indicará que la actividad se ejerce en la síntesis del RNA ó DNA viral o en la síntesis de las enzimas polimerasas del RNA ó DNA. Por el contrario, si el compuesto es activo cuando se añade en etapas tardías de la infección, indicará que el efecto es sobre la síntesis de proteínas específicas del virus, el ensamblado o maduración viral. La determinación exacta del modo de acción a este nivel requiere experimentos complejos y sofisticados de biología molecular. Así por ejemplo, la formación del RNA ó DNA viral se puede seguir añadiendo uridina o timidina marcada, según el caso, y determinando la radioactividad asociada al RNA ó DNA extraído en diferentes tiempos, o bloqueando la síntesis del RNA ó DNA celular por medio de actinomicina D ó DNA nucleasa que sólo afecta a los DNA celulares (MILLER y cols, 1970), o por ambos métodos.

Con propósitos de investigación de mecanismos bioquímicos de acción con los compuestos antivirales, se acude, además de a las distintas técnicas antes mencionadas, a otras con base inmunológica o mediante el empleo de isótopos radiactivos. Así tenemos los métodos de inmunodifusión y neutralización para estudios de interacciones huésped-parásito y las técnicas de marcado de virus con radioisótopos para mejor investigar en la Biología Molecular de las partículas virales.

i - La técnica de inmunodifusión, fué introducida por varios investigadores en diferentes laboratorios (ELEK, 1948; OUDIN, 1949; OUCHTERLONY, 1949) y su aplicación en el estudio de los virus animales fué inmediata. Se fundamenta en la visualización de la reacción de precipitación antígeno-anticuerpo en un medio semisólido. En el lugar de contacto del antígeno con su correspondiente anticuerpo habrá precipitación en línea recta o en curva (según el dispositivo empleado) que será más o menos visible dependiendo de la cantidad de los componentes enfrentados.

Existen diferentes tipos de inmunodifusión (CROWLE, 1961), siendo los mas utilizados los de doble difusión radial y bidimensional sobre placa. Una de las ventajas que ofrece esta técnica es la de poder combinarse con otras aumentando de esta manera su poder resolutivo. Así, combinado con la electroforesis, dá lugar a la inmunolectroforesis y con radioisótopos la radioinmunolectroforesis.

Las variantes de doble difusión se ha utilizado con representantes de todos los grupos de virus animales, sobre todo en el estudio de su variación antigénica utilizando el agar como medio semisólido y normalmente se realiza en ensayos cualitativos (CLARKE, 1964).

En el caso de acudir a inmunolectroforesis, se hace primero un fraccionamiento electroforético de uno de los componentes de la inmunodifusión (antígeno o anticuerpo) poniéndole, acto seguido, en contacto con el segundo componente (anticuerpo o antígeno). Su uso también se limita a ensayos cualitativos.

Tanto en las técnicas de doble difusión como en las de inmunolectroforesis, la reacción de precipitación, se visualiza con algún colorante de proteínas, generalmente negro-amido o azul.

La autoradiografía, es una variante perfeccionada de la inmunodifusión e inmuno electroforesis. Se combina el antígeno a una substancia radioactiva y se fracciona el antisuero electroforéticamente, las fracciones resultantes se hacen reaccionar con el antígeno marcado y el precipitado así obtenido, se detecta fácilmente mediante el marcado radioactivo específico (AIBENDER y cols, 1965; MILLER y OWEN, 1960).

Estas técnicas, en general, tienen como ventaja la sencillez, rapidez y generalidad de aplicación, pero son indirectas y poco exactas cuantitativamente.

ii - La técnica de neutralización, fué desarrollada por ANDREWS y ELFORD (1933) y mejorada por DULBECCO y cols. (1965). Teóricamente se basa en una reacción antígeno-anticuerpo de forma que el antígeno neutralizado "in vitro" sea incapaz de producir enfermedad o lesión en el huésped. Entonces, el "modus operandi" consistirá en poner en contacto, en condiciones específicas, al virus con su anticuerpo correspondiente para después inocularlo al huésped. Si no existe anticuerpo o si éste está en menor cantidad que el antígeno, se observarán lesiones, enfermedad o muerte del huésped. Por el contrario, si existe exceso de anticuerpo para neutralizar el antígeno, no se producirán los efectos anteriores.

DULBECCO y cols, en este trabajo y estudiando la cinética de reacciones de este tipo, demostraron la utilidad de

esta técnica en la cuantificación y observaron: a) que la proporción de virus inactivado es directamente proporcional a la concentración de anticuerpo existente en ese suero; y b) que el logaritmo del porcentaje de virus que permanece activo es inversamente proporcional al tiempo de incubación, siempre que exista anticuerpo libre.

La técnica consta de tres elementos bien determinados, como son: el virus, el anticuerpo y el sistema huésped. El virus se prepara y aísla con métodos bien establecidos. Con respecto al anticuerpo pueden ocurrir tres casos: a) el suero o reactivo inmune es desconocido (diagnóstico de enfermedades); b) el suero o reactivo inmune es conocido y contiene anticuerpos determinados con lo cual se pueden identificar los antígenos; y c) se conocen el suero y el virus, entonces se pueden establecer determinaciones cuantitativas en las que se pueden estudiar interacciones huésped-parasito-fármaco.

El sistema huésped empleado depende del tipo de virus, pudiendo ser: a) animales adecuados por su sensibilidad al virus en estudio y en los que habrá de tenerse en cuenta la ruta de inoculación para cuantificar los resultados por las lesiones, síntomas o muertes producidas; b) huevos embrionados, en los que también hay que tener en cuenta la ruta de inoculación, edad del embrión, etc, cuantificando los resultados por medio de las hemaglutininas presentes en el líquido alantoideo, lesiones en MCA ó muertes; c) cultivos de tejidos, como sistema más simple, seguro y económico. Dentro de este sistema existen dos variantes, según que se trate de cultivos en medio líquido o sobre medios sólidos.

En el primer caso los virus infectantes crecen inmersos en un medio líquido, y cuando los virus se liberan de las células se difunden libremente, cuantificando por efecto citopático (C.P.E), por hemadsorción, o por hemaglutinación, etc; mientras que la segunda variante está basada en la técnica de Dulbecco y en este caso las células y los virus infectantes están inmersos en un medio sólido, lo que evita la difusión libre del virus, produciéndose unas lesiones muy localizadas (placas o marcas infectivas). Cada marca infectiva tiene su origen en la multiplicación de una partícula viral o u.f.p.

Como la formación de marcas infectivas por virus puede ser inhibida por la neutralización, este es el método más sensible y usado en la cuantificación de la técnica de neutralización. Asimismo es uno de los métodos más utilizados para la titulación de virus capaces de producir estas placas o marcas infectivas y, consecuentemente, se puede aplicar a la valoración de acciones terapéuticas antivirales.

iii - Por último, el marcado de virus con isótopos lo utilizó en primer lugar COHEN (1948); de esta manera se pudo empezar a estudiar la composición, lugar de síntesis, replicación, recombinación y ensamblado.

Básicamente, estas técnicas radiactivas, consiste en detectar cuantitativamente o seguir la pista a isótopos que son introducidos en precursores necesarios para la multiplicación viral. Los isótopos elegidos deben cumplir una serie de requisitos tales como, una fácil incorporación a la molécula precursora, una actividad específica fácilmente medible y una energía de radiación que no dañe a las estructuras celulares. Los isótopos radiactivos más usados son los emisores β tales como: ^3H , ^{14}C , ^{32}P y ^{35}S .

La detección de isótopos radioactivos se puede realizar por medio de espectrómetros especiales mediante los cuales se cuantifica la incorporación del precursor marcado dentro de una molécula y de esta manera se sabe la proporción de síntesis de ella. Los más usados en la actualidad son los contadores de centelleo líquido, necesarios para contar las emisiones β de baja energía; tienen la ventaja de permitir el uso simultáneo de dos isótopos en la misma muestra.

Otros métodos recurren a la autorradiografía, técnica introducida por VAN TUBERGEN (1964) y que permite la visualización directa de la radiación emitida por el precursor marcado radioactivamente. Teóricamente se basa en producir imágenes por las radiaciones β sobre emulsiones de sales de plata, similares a las emulsiones fotográficas, haciendo que esta se reduzca a plata metálica y de esta manera se producen zonas oscuras fácilmente observables por el microscopio electrónico e incluso en el microscopio normal.

La autorradiografía puede ser aplicada en la localización de los procesos sintéticos durante la multiplicación viral en células infectadas, comparando de paso, la diferencia metabólica entre las células infectadas y no infectadas. Otra ventaja de esta técnica es que combina datos estructurales y funcionales.

Todas las técnicas radioactivas, en general, son muy útiles ya que permiten un estudio directo del ciclo de la síntesis viral; sin embargo son lentas y complicadas, en especial si se intenta aplicar en estudio de sustancias supuestamente viricidas.

V. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Pese a la opinión de algunos científicos de la imposibilidad de encontrar quimioterápicos antivirales idóneos que no afecten al huésped, consideramos que en el estado actual de los conocimientos sobre Biología Molecular de Virus debe profundizarse en estas investigaciones en la seguridad de que se encontrarán inhibidores específicos de la replicación viral. Al revisar los antecedentes bibliográficos claramente se aprecia la dificultad que entraña conseguir progresos en la Quimioterapia Antiviral por tratarse de un parasitismo intracelular con difícil accesibilidad para el fármaco y por la peculiar estructura del virus poco vulnerable desde el exterior sin alterar el propio mecanismo de pervivencia de la célula huésped. Por el momento, se aprecian con mayor frecuencia las dos vías de aproximación al problema que parecen las más efectivas: a través de la síntesis de proteínas y la de ácidos nucleicos. En cualquier caso empiezan a aparecer datos que nos llevan a pensar en la posibilidad de interferir la infección viral en los estadios tempranos, a nivel de fijación de la célula y sobre todo consideramos de gran interés poder potenciar los efectos de quimioterápicos con acciones inmunobiológicas más específicas.

Al revisar la bibliografía que precede se puede interpretar a los virus como formas abortivas de células degeneradas que perdieron sus facultades metabólicas y que están sujetas a evolución y variabilidad por alteraciones genéticas mutacionales o por recombinación aparte de otras modificaciones condicionadas por las defensas del huésped.

Se han estudiado las características físicas, composición química y las relaciones estructura-función que siempre parecen encaminadas a asegurar la automultiplicación. Los diversos estadios del ciclo vital (adsorción, penetración, desvestimiento o decapsulación, biosíntesis de los componentes virales, ensamblado y liberación) parecen estar suficientemente conocidos, aunque existe la duda de si el nucleóide lleva la información del ensamblado de las distintas piezas del virus, en un orden prefijado para condicionar la aparición de factores morfogenéticos que regulan este ensamblado correctamente o se sintetizan proteínas específicas cuya particular estructura pudiera modular específicamente este ensamblado; o bien tienen lugar los dos acontecimientos biológicos.

De lo hasta aquí recogido parece claro que los Mixovirus son un excelente modelo biológico para estudiar relaciones huésped-parásito en RNA-virus y con aplicación a virus tumorales y lentogénicos, y, en especial, para investigar sobre el comportamiento de la membrana durante el proceso infectivo y en su reacción frente al quimioterápico. Así el estudio bibliográfico lo hemos centrado particularmente en el virus influenza -Orthomixovirus de gran significación patógena y posibilidades de mutagénesis- y en el NDV -Paramixovirus con amplio espectro de virulencia y citopatología-; ambos

virus tienen además peculiaridades de comportamiento serológico que pueden entrañar dificultades en su control inmunológico por su variabilidad. Por otra parte hemos analizado las diferencias de inactivación que presentan ambos grupos de virus y la diversificación de las funciones biológicas desempeñadas por los distintos componentes virales.

En el ciclo biológico, la fase de "eclipse" subsiguiente a la penetración a través de la membrana permanece obscura como sucede en otros fenómenos de genética molecular (en transformación bacteriana, por ejemplo) durante el enfrentamiento del ácido nucleico exógeno y el genoma receptor del huésped.

Con el fin de tener datos que pudieran servirnos para interpretar posibles diferencias de comportamiento entre los distintos virus a estudiar en este trabajo, hemos recopilado bastantes datos en cuanto a características análogas y diferenciales de comportamiento entre Orthomixovirus y Paramixovirus. Los datos recogidos son de consideración difícil por tenerse que valorar a través de alteraciones biosintéticas, formación de virus defectivos y variabilidad de efectos citopáticos y respuesta a lectinas vegetales.

Tanto los Orthomixovirus como los Paramixovirus producen una paralización gradual, en mayor o menor grado, de la biosíntesis de DNA, RNA y proteínas celulares; la rapidez en dicha inhibición depende del virus y de la célula huésped empleada. En ambos grupos se producen, a altas multiplicidades, viriones defectivos. El efecto "Von Magnus" e infección abortiva de Orthomixovirus son casos concretos de la producción de

virus defectivos. El fenómeno de citopatocidad se observa en los diferentes individuos de estos dos grupos, pero esta citopatocidad abarca un gran espectro de gradación desde el clásico redondeamiento, muerte y lisis de las células (caso de FPV, influenza, NDV y Sendai) hasta un inapreciable cambio morfológico en la célula huésped, tal es el caso de células MK infectadas con SV5 que produce gran cantidad de virus infeccioso. Ambos grupos producen cambios en las membranas celulares de las células huésped de tal manera que estas son aglutinadas por lectinas vegetales, tales como Concanavalina A y aglutinina de semilla de trigo. La diferencia estriba en que las células infectadas por Orthomixovirus se aglutinan en grandes flóculos casi inmediatamente después de añadir las lectinas, mientras que con NDV (Paramixovirus), la aglutinación es menos rápida y su forma es de apariencia más granular.

Como diferencias más importantes entre ambos grupos se pueden enumerar los fenómenos de interferencia. Hasta ahora, sólo se ha descrito en Paramixovirus, se distinguen varios tipos de interferencia en los cuales no interviene el interferón. También pueden destacarse los fenómenos de infección persistente que sólo se presenta en Paramixovirus. En cultivos celulares se distinguen dos tipos de infecciones persistentes: a) "cultivo transportado", en el cual sólo se infectan unas pocas células, que producen virus y b) "estado estacionario", en el que todas las células del cultivo celular se infectan pero superviven; en este tipo la mayoría de los virus producidos son defectivos. También se han encontrado infecciones persistentes en sistemas "in vivo", las posibilidades de recombinación, una de las características que más distingue el grupo de Orthomixovirus, es su alta recombinación; característica que demuestra la naturaleza segmentada del genoma.

El fenómeno de variación antigénica sólo se ha demostrado, de manera clara en Orthomixovirus, y se distinguen dos tipos de variaciones: desviación antigénica y deriva antigénica. La fusión celular solamente aparece en células infectadas con Paramixovirus; la fusión que es un resultado de la infección, requiere síntesis de proteínas virales y aparentemente se debe a la incorporación de proteínas específicas en las membranas celulares.

En relación con el IF podemos resumir su mecanismo diciendo que aparece como consecuencia de la derrepresión de un gen o genes en la célula invadida por un virus con producción de esta glicoproteína que atravesando la membrana celular por el torrente sanguíneo para fijarse en receptores de otras células produciendo un estado de resistencia a la infección viral por la aparición de una proteína (TIP) que impide la traducción del mRNA viral.

En cuanto a la aplicación de la quimioterapia en infecciones por virus hemos recogido gran número de datos y de su consulta destaca la gran variedad de orígenes de los antivirales ensayados (natural, semisintético y sintético) su diversa complejidad estructural y la multiplicidad de efectos que es posible conseguir. De los cientos de productos con actividad "in vitro" pocos son los que se pueden aplicar a la terapia o profilaxis humana ya que estos quimioterápicos han de cumplir ciertas posibilidades de atoxicidad, solubilidad, adecuada administración, inalterabilidad frente a enzimas del organismo, accesibilidad al foco viral y no crear mutantes resistentes.

En cuanto a la respuesta del huésped frente a la infección, parece mejor estudiado el fenómeno de aparición del interferón que la propia respuesta inmunitaria, quizá ello sea debido a dificultades de valorar exactamente la cinética de neutralización biológica del virus en relación con la cinética de aparición de las distintas inmunoglobulinas. Así se conocen perfectamente los mecanismos moleculares de producción de interferones, aunque faltan datos para conocer exactamente su regulación y mucho más aún para desenmascarar el íntimo mecanismo de regulación e interrelación entre el interferón y la respuesta inmunitaria en una misma infección viral. El tema es por demás apasionante y a su mejor conocimiento se dedican algunos esfuerzos en nuestro laboratorio.

De los quimioterápicos por los que más nos sentimos interesados, como son algunas moléculas antitumorales, antivíricas y hexosaminas tenemos algunos antecedentes que serán comentados junto con nuestros resultados en el capítulo de DISCUSION; de momento tan sólo mencionaremos que la glucosamina entra en la composición glucídica del virus influenza e interviene en moléculas glicoproteicas de alta significación en las interacciones huésped-parásito. Este aminoazúcar -del que no hemos encontrado un estudio detallado de su posible acción tóxica sobre la célula huésped- parece manifestar únicamente su efecto inhibitor sobre virus provistos de envoltura. Su mecanismo de acción se basa, según los datos consultados, en interferencia a nivel de síntesis de glicoproteínas a través de desequilibrios en el metabolismo del uridin-trifosfato (UTP). Esta inhibición de glicosilación de las glicoproteínas, en algunos experimentos, parece evitar el proceso de evaginación o exocitosis, aunque los datos no nos parecen totalmente claros

y de hecho, también aparecen datos de otros autores, para los que el efecto inhibidor de la glucosamina afecta a los polipéptidos PE₁ y PE₂ precursores de las formas glicosiladas E₁ y E₂ que se relaciona con la formación de espículas en la envoltura viral. Son bastantes los investigadores que se han ocupado del efecto inhibidor de la glucosamina pero ninguno a utilizado sistemas "in ovo" y muy pocos hacen experiencias "in vivo" en general consideramos que el efecto del aminoazúcar es variable, dependiendo de las células huésped, tipo de virus y circunstancias experimentales por lo que deben aportarse nuevos datos en los que se controlen exactamente los distintos parámetros biológicos a considerar.

Precisando algo más en cuanto a los últimos resultados con empleo de D-glucosamina en experiencias "in vitro" sobre diversos sistemas virus-células hemos podido comprobar que la inhibición según los diversos autores, es de grado variable y depende de la dosis, de la fuente de carbono en el medio (según sea fructosa o glucosa), del sistema biológico empleado y del momento de la aplicación.

Se discute sobre si se producen reducciones en la síntesis del RNA, si se trata de una inhibición de determinadas glicoproteínas o de si aparece una nueva molécula de este tipo (proteína HA₀ de 64.000 d) y de si el efecto se produce o no a nivel post-trasduccional del precursor de una de las dos principales glicoproteínas del virión maduro; también parece estar en litigio si este efecto "in vitro" alcanza al complejo ("pool") funcional de uridin-trifosfatos (UTP), siendo dicho efecto mas patente en las células mas viejas y pudiendo ser contrarrestado por la presencia de uridina. Por supuesto

estos resultados vienen avalados por datos mas o menos contradictorios según el sistema biológico empleado de disminución en el grado de infectividad del virus o en su poder hemaglutinante. Ello hace que con esta Memoria se pretenda sacar conclusiones definitivas sobre la real actividad antivírica del aminoazucar D-glucosamina.

Los estudios con derivados del adamantano presentan la dificultad de su total insolubilidad en agua y disolventes polares por lo que al considerar la efectividad de los resultados habrá de tenerse muy en cuenta el sistema biológico y el "modus operandi". En resumen podemos decir que, según los datos consultados, estas moléculas son escasamente tóxicas y que concentraciones de $100\mu\text{g/ml}$ tan sólo producen un retraso en el crecimiento celular. Se sabe que la amantadina produce un efecto inhibitor sobre distintos virus cuando se añade al sistema una hora antes o en el momento de la infección, mientras que no se observa efecto algunos cuando el quimioterápico se administra una hora o más después de la inoculación viral.

En cuanto a estudios "in vitro" sobre cultivos celulares con adamantano y clorhidrato de amantadina podemos resumir que no existen antecedentes relativos al adamantano mientras que con la amantadina se ha encontrado recientemente que cuando esta molécula está presente en el momento de la infección viral no llega a producirse expresión del genoma viral inhibiéndose a nivel de la transcripción. Según parece, el efecto antiviral se produce en los estadios muy tempranos de la infección celular haciendo un bloqueo sobre una fase, aún no precisada, de la replicación viral.

De todas formas, creemos necesario hacer un estudio mas sistemático de la influencia del parámetro tiempo en relación con la dosis del quimioterápico y sistema biológico de ensayo. En cuanto al mecanismo de acción de la amantadina, se sabe que afecta a alguna etapa del proceso de desvestimiento o desnudación pero todavía no está bien conocido; por microscopía electrónica, se observa en células tratadas con el quimioterápico e infectadas por virus cómo se forman pequeños acúmulos de productos intermedios del desvestimiento viral. Este efecto puede ser reversible según las circunstancias experimentales.

Del resto de los quimioterápicos que utilizaremos en el presente trabajo está perfectamente conocido su mecanismo a nivel molecular por tratarse de antibióticos que actúan a nivel de síntesis de ácidos nucleicos, pero de todos los aquí empleados no existen datos en cuanto a su papel en la producción de interferón; de aquí nuestro interés por realizar el siguiente protocolo experimental.

Finalmente, para completar este estudio bibliográfico señalaremos que hemos realizado una revisión de las distintas técnicas empleadas en la investigación de nuevos quimioterápicos antivirales y que en todas ellas es preciso estudiar previamente el sistema biológico para utilizar el huésped adecuado (animales, huevos embrionados o cultivo de tejidos) controlando convenientemente los distintos parámetros experimentales; sobre todo dosis y tiempo de infección en relación con el momento de aplicación del quimioterápico. Este hecho nos ha obligado a cuestionar la posible comparación de distintos resultados maxime si existe una clara respuesta inmunitaria, y nos llevará a emplear en este trabajo distintos sistemas "in vivo" e "in vitro" según nuestros propósitos experimentales. Esto presentará además la ventaja de contribuir mejor a nuestra formación científica en esta especialidad.

PARTE EXPERIMENTAL

I. PROTOCOLO

A la vista de lo señalado en la actualización del tema y de acuerdo con nuestros propósitos de aportar datos al conocimiento de las interacciones virus-quimioterápico-huesped, hemos establecido el protocolo experimental cuyo esquema se indica a continuación, atendiendo a diferentes puntos de vista, como son: a) elegir virus de gran significación biológica por su gran variabilidad y que dieran lugar a cuadros latentes; b) poder establecer comparación entre dos grupos tan relacionados como los orthomixovirus y paramixovirus; c) estudiar acciones antivirales del quimioterápico y del huesped a distintos niveles como son la síntesis de ácidos nucleicos, la fase de decapsulación o de desrevestimiento y en el momento de recubrimiento con la cubierta proteica, dada la estructura molecular de los virus que se estudian, de comprobar la influencia de esta acción antiviral tanto en la patogénesis del virus como en la respuesta del huesped; y c) aportar experiencias que pudieran normalizar el "modus operandi" en este tipo de estudios.

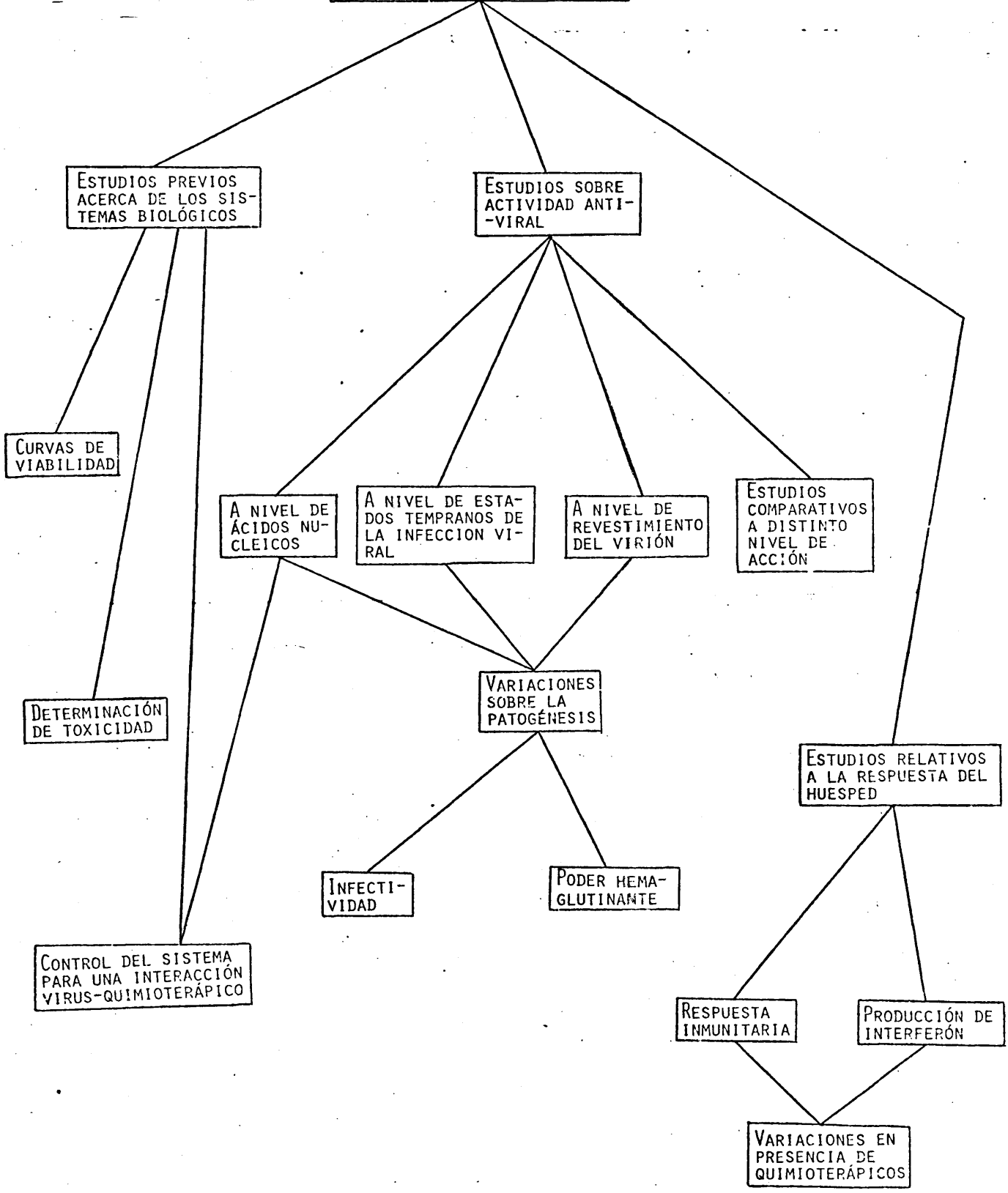
En cuanto a los estudios de producción de interferón a nivel de síntesis de ácidos nucleicos, ensayamos antibióticos tales como las rifamicinas -capaces de inhibir la RNA polime-

rasa- y también la bleomicina y cromomicina -inhibidores de la fase de replicación del material genético- por interactuar frente a la molécula de DNA mediante rotura de una de sus cadenas o por unión no covalente a la cadena moldeadora de DNA.

Para investigar sobre los efectos de los quimioterápicos a nivel de la decapsulación y capsulación del virus, así como la influencia que pueden ejercer estos quimioterápicos sobre la respuesta inmunitaria e interferente del huésped acudimos al empleo de amantadina, adamantano y D-glucosamina.

Así, de acuerdo con estos propósitos experimentales resumimos de un modo esquemático a continuación los distintos apartados en los que se agruparan los resultados de forma que pueda considerarse relacionados entre sí tanto las interacciones del quimioterápico con el virus como la respuesta del huésped en presencia del quimioterápico, esperando completar así datos que puedan ser útiles a la hora de valorar la quimioterapia antiviral.

INTERACCIONES
VIRUS-QUIMIOTERAPICO-HUESPED



II. MATERIAL Y MEDIOS

1. Virus

En el presente trabajo se han utilizado los siguientes virus:

a) Virus de la peste aviar clásica, Fowl plague virus (FPV), cepa *Rostock*, obtenido por pase en líquido alantoideo de huevos infectados;

b) Virus de la peste aviar atípica o de la enfermedad de Newcastle (NDV), cepa *Italia* y obtenido por pase en líquido alantoideo de huevos infectados;

c) Sendai, obtenido por pase en líquido alantoideo de huevos infectados;

d) Virus influenza, cepa *FM/1*, también obtenido por pase en líquido alantoideo de huevos infectados y

e) Virus de la estomatitis vesicular (VSV), cepa *Indiana C*, obtenido por pase sobre fibroblastos y que se empleo unicamente para las pruebas de titulación de interferón como virus interferido.

Los virus FP, ND y Sendai proceden del "Max Planck Institut fur Virusforschung" de Tubinga.

El virus influenza procede de la Colección del "Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología" del C.S.I.C. y el VSV procede de "The Animal Virus Research Institute" de Pirbright. Woking. Surrey. Gran Bretaña.

2. Células hésped

Se utilizaron cultivos celulares de fibroblastos de pollo obtenidos, en primocultivo, en nuestro laboratorio por tripsinización de embriones de 10 días.

3. Animales de experimentación

Empleamos pollos machos, raza Leghorn, nacidos y criados en nuestro laboratorio para tener seguridad de que no estaban vacunados y evitar así interacciones serológicas indeseables; así como para obviar una posible alimentación con antibióticos que pudieran falsear nuestros resultados.

4. Sueros

A lo largo del presente trabajo hemos obtenido en nuestro laboratorio distintos lotes de sueros antiviral y así hemos utilizado en esta ocasión sueros anti-NDV, anti-FPV, anti-influenza y anti-Sendai, después de la inmunización según métodos que reseñamos en el apartado 14 de técnicas. Nuestro método ha sido el siguiente:

Se hace sangría total por punción intracardiaca y la sangre recogida en tubos de vidrio de 100 ml de capacidad se lleva a estufa a 37° C durante una hora; pasado este tiempo se separa el coagulo de las paredes del tubo por medio de una pipeta

fina; se llevan los tubos a nevera (4° c) durante 24 horas. El suero se extrae por succión con pipeta esteril y se centrifuga durante 10 minutos a 1000 rpm^(*) recogiendo el sobrenadante que se mantiene en pequeños volúmenes a -20°C.

Es imprescindible efectuar el control de esterilidad bacteriana del suero, pero no obstante siempre hemos añadido mertiolato como conservador a una dilución final 1/100.000.

5. Medios nutritivos para cultivos celulares

Para las células de embrión de pollo se ha utilizado el medio de crecimiento (MFC) constituido por los siguientes compuestos:

Solución Hank's	94,7%
Hidrolizado de lactoalbúmina (Difco)	0,2%
Extracto de levadura (Yeastolate Difco)	0,1%
Suero fetal de ternera (Flow)	4%
Rojo fenol (0,2%)	1%
Penicilina	100 U.I./ml concen. final
Estreptomicina	100 μ gr/ml concen. final
Nistatina (Squibb)	20 U.I./ concen. final
Bicarbonato sódico 8,8% hasta ajustar el pH a 7,2	

También se ha utilizado para las células de embrión de pollo medio de mantenimiento (MFM) constituido por los siguientes compuestos:

(*) International portable refrigerator centrifuge; Model PR-2 International Equipment Company

Solución Hank's	96,7%
Hidrolizado de lactoalbúmina	0,2%
Extracto de levadura	0,1%
Suero fetal de ternera	2%
Rojo fenol (0,2%)	1%
Penicilina	100 U.I./ml. concentración final
Estreptomicina	100 μ gr/ml concentración final
Nistatina	20 U.I./ml concentración final
Bicarbonato sódico	8,8% hasta ajustar el pH a 7,2

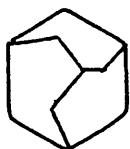
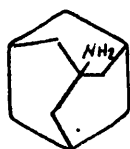
El medio de crecimiento es utilizado desde el momento de la obtención de las células hasta que estas se disponen en monocapa; a partir de este estado, apto para la infección viral, se utiliza el medio de mantenimiento con el fin de evitar la degeneración celular y consiguiente desprendimiento de los epitelios.

6. Quimioterápicos antivirales

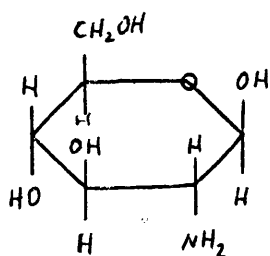
En primer lugar se utilizó chromomicina A₃ (TAKEDA Chemical Industries, Japon) y también bleomicina (Lab. Almirall, S.A.), rifamicina SV y rifampicina (Lab. Lepetit), substancias todas ellas de reconocida acción antibiótica, inmunosupresora y algunas con efecto antitumoral.

Además de estos se utilizaron los quimioterápicos: , adamantano (triciclododecano), clorhidrato de amantadina (clorhidrato de 1-adamantanamina); ambos en estado anhidro procedentes de Sigma Chemical Company, St. Louis USA y por último se ha utilizado clorhidrato de D-glucosamina de los Laboratorios Jorba, Madrid.

FORMULAS DE LOS QUIMIOTERÁPICOS UTILIZADOS

ADAMANTANO (TRICICLO (3,3,1^{3,7}) DECANO)

AMANTADINA (1-AMINO ADAMANTANO)



D-GLUCOSAMINA (2-AMINO-2-DESOXIGLUCOSA)

Para la preparación de las soluciones de trabajo con estos quimioterápicos se tuvo en cuenta que dos de ellos utilizados, clorhidrato de amantadina y clorhidrato de D-glucosamina se presentan originalmente en forma cristalina anhidra y son solubles en agua b.d. El pH del agua b.d. (5,5 - 6) no sufre apenas alteración con el clorhidrato de amantadina, mientras que con el clorhidrato de D-glucosamina disminuye ligeramente (5 - 5,5).

Las soluciones a la concentración deseada se ajustan a un pH entre 7 - 7,2 y se esteriliza mediante filtros Millipore de 0,22 μ . Realizada esta operación se hace un control de esterilidad bacteriana en agar y caldo común repartiendo el filtrado en volúmenes de 1 ml que se conserva a -20° C hasta posterior utilización.

El tercero, adamantano, también en forma cristalina anhidra, es insoluble en agua b.d. y en todos los disolventes polares, por lo cual fue necesario buscar un disolvente que, en pequeña cantidad, no fuera tóxico y pudiera disolver el adamantano en un volumen de agua b.d. necesario para obtener las concentraciones deseadas del quimioterápico. Para tal fin se realizaron los siguientes intentos:

a) Antes de hacer la dilución con agua b.d. se añadió al adamantano una o dos gotas de dimetil sulfóxido por ml, de disolución (aproximadamente 0,10 ml de dimetil sulfoxido/ml de disolución). Este proceder no dió resultado.

b) A una cantidad determinada de adamantano (100 mgr) se le añadió 1 ml de dimetil sulfóxido, \cong 0,30 ml de etanol y 24 ml de agua b.d. con lo cual se obtuvo una solución final con una concentración de adamantano de 4.000 γ /ml u 800 γ /0,2 ml. Después de colocar la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas, y 48 horas a 4° C, resultaba muy poco homogénea siendo el adamantano poco soluble en agua b.d.

c) Otro intento consistió en añadir a la mezcla anterior un volumen proporcional y no tóxico de acetona consiguiéndose mayor solubilidad de quimioterápico pero no absoluta.

d) Finalmente, el adamantano se disolvió en benceno, dimetil sulfóxido y agua b.d. en una proporción de 10%, 5% y 85% respectivamente, ajustándose el pH a 7 - 7,2. Con este proceder el adamantano resulta soluble, pero la solución ha de prepararse extemporáneamente dado que pasadas 48 horas se produce precipitación. Esta dilución así conseguida no ha sido filtrada por Millipore por contener disolventes orgánicos que podrían alterar los filtros, pero las pruebas de esterilidad bacteriana han resultado siempre negativas.

El resto de los quimioterápicos no presenta problemática alguna y se disolvieron a las concentraciones indicadas a partir de las formas terapéuticas inyectables proporcionadas por los laboratorios preparadores manejándose siempre en condiciones de esterilidad

7. Tampones y soluciones varias

Tampón fosfato salino (PBS).- Constituido por:

Cloruro sódico 8 gr
 Cloruro potásico 0,2 gr
 Fosfato disódico 1,15 gr
 Fosfato potásico 0,2 gr
 Agua desionizada 1.000 ml
 pH 7,3 final

Solución de tripsina al 1/250 DIFCO

Tripsina 2,5 gr
 Solución salina Hanks's 1 ml
 Penicilina 10.000 U.I. en 1 ml
 Estreptomicina 1 mgr en 1 ml
 Utilizada en solución 0,25%

Solución Alsever, constituida por:

Glucosa 20,5 gr
 Citrato sódico 8,0 gr
 Acido cítrico 0,55 gr
 Cloruro sódico 4,2 gr
 Agua desionizada 1.000 ml

Solución veronal

Cloruro sódico 85 gr
 Acido 5,5 dietil barbitúrico 5,75 gr
 5,5 dietil barbiturato sódico 3,75 gr

Cloruro cálcico 0,28 gr
Cloruro magnésico 6 H₂O1,68 gr
Agua desionizada 1000 ml

Para todo el trabajo se ha utilizado un agua desionizada y bidestilada obtenida en un sistema diseñado en el laboratorio

III. TECNICAS

1. Preparación de fibroblastos

Se han utilizado fibroblastos de embrión de pollo, obtenidos a partir de huevos embrionados de 10 días, procedentes de gallinas de raza Leghorn. Para su preparación se desinfecta con iodo el área de la cáscara del huevo que corresponde a la cámara del aire y se abre por esta zona para extraer el embrión.

Una vez extraídos todos los embriones, se eliminan las cabezas, vísceras y extremidades y los restos embrionarios se lavan con PBS frío y se trocean (siempre en condiciones estériles) hasta conseguir una masa homogénea de tejido muscular que se recoge con pipeta despuntada y se lleva a un matraz estéril con salientes en la base para romper la corriente de agitación. Posteriormente se añade al matraz una cantidad de tripsina, (Difco 1/250) al 0,25% en solución Hank's, suficiente para cubrir la masa muscular y se introduce, finalmente una pieza magnética estéril revestida de teflón. Se coloca el matraz sobre un agitador magnético (IKA - COMBIMAG - RCO de Janke y Kunkel K.G) durante 20 minutos a 37° C, obteniéndose al final de este periodo un sobrenadante con células en suspensión y un

sedimento formado por trozos de embrión aún no digeridos por la tripsina. El sobrenadante se pasa a otro matraz y se añade, en condiciones estériles, una cantidad abundante de PBS frío para evitar que la tripsina continúe actuando y se lleva a nevera a 4° C.

Por otra parte, al matraz de reacción, que aún contiene el sedimento formado por fragmentos de embrión, se le añade tripsina en un volumen análogo al que se sacó y se vuelve a colocar sobre el agitador magnético durante 15 minutos a 37° C. A continuación se hace una nueva toma de sobrenadante cargado de células y se pasa al matraz que tenemos a 4° C el cual lleva células en suspensión. Este proceso se repite mientras se vea la posibilidad de obtener células disgregadas a partir de los fragmentos de embrión que quedan en los sucesivos sedimentos.

La suspensión celular recogida a lo largo de la digestión se centrifuga a 1.000 rpm (800 g) durante 10 minutos^{*}. Al término de este periodo de tiempo se elimina el sobrenadante (PBS mas tripsina) y se añade una pequeña cantidad de PBS frío, que previo vigoroso pipeteo, resuspende al sedimento formado por el paquete de células. Se añade mas PBS hasta alcanzar un volumen aproximadamente igual al eliminado y se centrifuga a 1.000 rpm (800 g) durante 10 minutos, volviéndose a repetir el proceso anterior pero intercalando un doble filtrado a través de gasa esteril para eliminar los fragmentos gruesos. El filtrado se reparte en tubos y se centrifuga de 1000 a 1200 rpm (800

* International Portable Refrigerated Centrifuge, Model PR-2; International Equipment Company.

900 g) durante 10 minutos.

Se hace un recuento de la suspensión para poder determinar su concentración en células, y de esta manera, haciendo diluciones en medio de crecimiento (MFC), conseguir una concentración final de 1×10^5 ó 1×10^6 ml. El recuento se realiza en cámara Thomas y para ello se suspende 0,1 ml del sedimento, obtenido en la última centrifugación, en 10 ml de MFC y se observa en tinción vital con azul tripan por exclusión o con rojo neutro por coloración.

Una vez obtenida la concentración celular deseada, se reparte la suspensión a razón de 1 ml por cada tubo de cultivo o de 10 ml por cada frasco hexagonal. Tanto los tubos como los frascos deben ser de vidrio neutro para obviar las desviaciones del pH 7,2 con el consiguiente perjuicio para las células, en su momento mas sensible.

Los tubos y frascos hexagonales se cierran herméticamente con tapones de goma para evitar cambios en el pH del medio y se colocan en estufa a 37° C durante el tiempo necesario para que las células se adhieran a la pared y formen así un epitelio en forma de monocapa continua, que sucle estar en condiciones apropiadas para infectar pasadas 18 a 24 horas.

Para la obtención de monocapas estables y con un número óptimo de células, se efectuó un estudio de la influencia que ejerce la concentración, expresada en porcentaje del volumen total, de suero fetal de ternera, necesario para el crecimiento y mantenimiento de las células, presente en los medios de crecimiento (MFC) y mantenimiento (MFM).

En el estudio del efecto de la concentración del suero sobre el crecimiento celular, se depositaron en tubos Pyrex 10^6 células/ml de MFC con concentraciones variables (2, 4, 10 y 15%) de suero fetal. Después de 12, 24, 36 y 48 horas de incubación a 37°C , se realizaron tomas por tripsinización de los cultivos celulares, haciéndose el recuento celular por tinción por exclusión vital con azul tripiano.

En el mismo estudio llevado a cabo sobre el mantenimiento celular, se partieron de monocapas ya formadas con 10^6 células/ml. Se eliminó el MFC con la concentración óptima de suero fetal y se añadió, a los distintos grupos, 1 ml de MFM con concentraciones variables de suero fetal (1, 2, 5 y 10%). Las tomas de células y recuentos se llevaron a cabo del mismo modo que se hizo con MFC.

Los resultados se expresaron en sistemas de coordenadas, donde se representan el número de células vivas/ml de medio en ordenadas y el tiempo de incubación de los medios (MFC y MFM) con distintas concentraciones de suero en abscisas. El mismo estudio se ha llevado a cabo con hidrolizado de lactoalbúmina, en concentraciones finales en MFC y MFM de 0,4; 1; 2; 3 y 5 $\mu\text{g/ml}$, y con extracto de levadura para concentraciones finales de 0,1 ; 0,5; 1; 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$. Las curvas de viabilidad fueron halladas siguiendo la misma pauta que como se hizo con el suero fetal de ternera.

Los cultivos de fibroblastos fueron preparados y mantenidos con MFC y MFM respectivamente (ver fórmulas pag. 179-180) con arreglo a las especificaciones obtenidas en estos ensayos preliminares de los cuales se da cuenta en el capítulo de Resultados.

2. Obtención de hematies

Para las pruebas de hemaglutinación (HA) y de inhibición de la hemaglutinación (IHA) se hace necesario preparar suspensiones de eritrocitos, para ello se extrae sangre de pollos jóvenes, por punción intracardiaca, y se mezcla en un tubo de centrifuga con otro volumen igual de solución citratada de Alsever. Se agita la mezcla, a la que se añade un pequeño volumen de solución salina (3 ó 4 ml) y después de una centrifugación a 1000 rpm (800 xg) durante 10 minutos, se elimina el sobrenadante. El sedimento, formado por células sanguíneas, se resuspende en solución salina y se vuelve a centrifugar a 1000 rpm durante otros 10 minutos eliminando de nuevo el sobrenadante. Esta operación se repite hasta que se observa un sobrenadante limpio de plasma sanguíneo; en nuestra práctica nunca hemos necesitado mas de dos lavados.

El sedimento final puede mantenerse en nevera a 4° C hasta el momento de su utilización en las pruebas ya mencionadas, pero en un plazo no mayor de 3-4 días; pasado este tiempo empieza a producirse hemólisis espontánea.

3. Prueba de la hemaglutinación (HA)

Se utiliza el método de SALK (1944) mejorado por HIERHOLZER y SUGGS (1969), aunque aplicando la variante del micrométodo (TAKATSY, 1955; SEVER, 1962) con algunas variaciones en el "modus operandi".

En primer lugar se prepara una solución veronal 1/5 en agua destilada, y en caso necesario, se ajusta a pH de 7,2 con bicarbonato sódico. A continuación y a partir de un lote de hematies conseguido de la forma ya descrita, se hace una solución 0,5% en la solución veronal obtenida. Por medio de micropipetas (*) se añaden 0,05 ml de solución veronal 1/5 a todos y cada uno de los pocillos de la placa o placas de HA que se van a emplear (**).

El primer pocillo de cada fila recibe 0,05 ml del virus a titular, procedente de medios de cultivo o de líquidos alantoideos infectado (***) . Así en una sola operación pueden titularse 7 muestras de virus quedando la 8ª fila para el control de hematies. Con un conjunto de microdiluidores, con tantos diluidores como muestras de virus se quieran titular, se mezcla, agitando, el virus y el veronal del primer pocillo de cada fila, y con los mismos microdiluidores, se pasa 0,05 ml de la suspensión viral anterior al 2º pocillo de cada fila que contiene a su vez 0,05 ml de veronal 1/5. Esta operación se repite hasta llegar al 12º pocillo de cada fila. De esta manera y puesto que mezclamos igual volumen de la suspensión viral y de la solución veronal, se obtiene una serie creciente de diluciones al duplo a lo largo de cada fila. Se añaden a todos y a cada uno de los pocillos 0,05 ml de la solución de hematies preparada

(*) Pipette droppers 0,05 ml de Kooke Laboratory Products, Dynatech División, Alexandria, Virginia, EE.UU.

(**) Placas microtiter de estireno con 8 filas de 12 pocillos en forma de U; Cooke Engineering Co, Alexandria, Virginia EE.UU.

(***) micropipette 0,05 ml, de punta desechable; Socrex, Suiza.

anteriormente, Paralelamente se hace un control de hematies añadiendo la misma cantidad de estos a cada pocillo de la 8ª fila que contiene solamente veronal. Después de 1 hora a temperatura ambiente y en cámara húmeda, se leen los resultados considerando como resultados positivos, y por lo tanto que existe hemaglutinación, aquellos pocillos donde se observa un velo continuo color rosa salmón; por el contrario se consideran negativos los pocillos en donde se forma un botón rojo en el fondo. Los controles de hematies presentan el botón característico que nos indica la validez de la reacción.

El resultado de cada fila se expresa en su título hemaglutinante, que es el número inverso de la mayor dilución de virus que da una hemaglutinación completa.

4. Pruebas de inhibición de la hemaglutinación (IHA)

Estas pruebas se pueden hacer por dos métodos: en una de ellas -método α - las diluciones del virus aumentan al duplo mientras que el suero sigue una dilución constante (normalmente al 1/5); en el -método B- β se mantiene constante la dilución de virus y lo que varía es la dilución del suero inhibidor. En nuestro caso hemos utilizado siempre el método α .

La prueba de IHA, en cuanto a material y mecánica, se realiza de la misma manera que las pruebas de HA, pudiendose esquematizar de la siguiente manera: una vez que se han añadido 0,05 ml de solución veronal al 1/5 a todos los pocillos de la placa o placas de HA a utilizar, se asignan 2 filas de pocillos para cada muestra de virus a titular; la 1ª fila corresponde al control de título hemaglutinante del virus y servirá como

medida comparativa de la inhibición producida por el virus en presencia del suero específico (IHA) que se realiza en 2^a fila. Al primer pocillo de ambas filas se le añade 0,05 ml del virus en estudio y con los microdiluidores se hace una mezcla homogénea, pasando alicuotas de 0,05 ml desde aquí al 2° pocillo de ambas filas, y así sucesivamente hasta llegar al 12° pocillo. Una vez realizadas las diluciones crecientes al duplo en las filas que corresponden a la HA se añaden 0,05 ml de veronal al 1/5 por cada pocillo, mientras que en las filas que corresponden a la IHA, se añade 0,05 ml de suero inhibidor por pocillo; de esta manera, el virus en ambas filas queda a la misma dilución. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, tiempo necesario para la formación del complejo antígeno-anticuerpo, se añade a todos y a cada uno de los pocillos de ambas filas 0,05 ml de hematies al 0,8% en veronal 1/5. Se colocan en cámara húmeda y a temperatura ambiente durante 2 horas; al término de este periodo, se hace la lectura de la titulación comparando el título hemaglutinante obtenido en la fila sin suero con el título hemaglutinante de la fila donde se añadió el suero.

Cuando el suero se corresponde con el antígeno viral se produce una reducción del título hemaglutinante y esto se hace patente por el diferente título hemaglutinante que se obtiene en ambas filas. Con el fin de conseguir resultados representativos y comparativos, del título inhibidor de la hemaglutinación de cada suero problema, se usa la fórmula:

$$\text{Título inhibidor de la hemaglutinación} = \frac{\text{Título HA en el control del virus}}{\text{Título HA en la fila con suero}} \times \text{x dilución del suero}$$

5. Observación y recuento de las células huésped

Para realizar el recuento de células en un grupo determinado de cultivos en monocapas celulares, realizamos el siguiente protocolo: Una vez lavado cada tubo de cultivo con PBS, se añaden 0,2 ml de tripsina al 0,25% por tubo y se deja actuar durante un periodo comprendido entre 20 y 30 segundos. Sin eliminar la tripsina se añaden 0,3 ml de PBS por tubo con el fin de detener la acción enzimática. Desde el primer tubo del grupo considerado y previo desprendimiento total de las células, se pipetea esta suspensión al 2º tubo de cultivo que también es pipeteado vigorosamente con el mismo fin; así sucesivamente se va repitiendo la operación en todos los tubos hasta desprender las células de todas las monocapas de los cultivos considerados. La suspensión total se recoge en un tubo de centrifuga y se añaden 2 ml de PBS frío. Se centrifuga a 800 rpm (700 xg) durante 5 minutos y tras eliminar el sobrenadante (constituido por PBS y tripsina) se añade al sedimento 1 ml de PBS frío. Se pipetea con pipeta Pasteur hasta conseguir una resuspensión completa e inmediatamente después se añaden una o dos gotas de azul de tripan. De esta suspensión así teñida se recoge una gota que se deposita por capilaridad en una cámara de Thomas, contándose al microscopio óptico el número de células que aparecen transparentes, ya que las teñidas con azul tripano están muertas.

El número total de células contadas $\times 10^4$ representan las células/ml. Con el fin de conocer el número de células por tubo, se divide el resultado calculando según la fórmula por el número de tubos empleados en el recuento; de esta manera se obtiene el número de células por monocapa y por ml.

Esta misma técnica se ha utilizado en la determinación de la toxicidad de las drogas antivirales sobre los fibroblastos.

6. Determinaciones de toxicidad y curvas de viabilidad celular

Para conocer la toxicidad de las distintas sustancias sobre los fibroblastos, una vez conseguidos los cultivos en monocapa continua en tubos, se elimina el MFC y se lavan estos cultivos celulares con PBS a 20-25° C. Inmediatamente después, se hacen dos series de cultivos; una de ellas, que será tratada con la molécula a estudiar y otra que sirve de testigo.

Los cultivos de la serie tratada se dividen en tantos grupos como concentraciones de la sustancia (disuelta en MFM) se quieran ensayar debiendo estar constituidos los grupos por un número suficiente de unidades para permitir varias tomas; en nuestro caso hemos efectuado 3 tomas a distintos tiempos. La misma operación se realiza con la serie sin tratar.

En condiciones estériles, a cada unidad por grupo, se le añade 1 ml de MFM que contiene la sustancia. A las unidades del grupo testigo se les añade 1 ml de MFM sin droga. Se llevan todos los cultivos a estufa a 37° C y a las 18, 24 y 48 horas se observan al microscopio óptico invertido, haciéndose tomas de la tercera parte de cada grupo, tratado y sin tratar.

Normalmente cuando la concentración de la sustancia es claramente tóxica para la célula, se observan diferencias morfológicas con respecto a la serie testigo, consistiendo estas

diferencias en un redondeamiento de la célula (que pierde su aspecto acicular característico) y en un desprendimiento continuo de la monocapa.

Con cada toma de muestra se realiza un recuento celular con azul tripano y una vez hechos todos los recuentos, se representan graficamente los resultados, que nos darán las curvas de viabilidad de los grupos tratados y testigo.

En las gráficas se representan las tomas de muestra en abcisas y, en ordenadas, el número de células viables contadas. Cuando una gráfica representante de un grupo tratado es superponible con la gráfica del grupo testigo se considera que la molécula no es tóxica para dicha concentración.

7. Obtención de FPV, NDV, Sendai, e influenza en líquido alantoideo y de VSV en fibroblastos

Para la obtención de cantidad suficiente de FPV, NDV y virus Sendai e influenza, hemos utilizado huevos embrionados de pollo de 10 días de incubación. En condiciones estériles se hacen suspensiones, en solución salina, del líquido alantoideo infectado con el virus original, hasta obtener 1000 DLE₅₀/0,2 ml.^(*) Para evitar la inactivación térmica de los virus, se colocan los tubos con las suspensiones virales en baño de 2 a 4° C mientras dura la experiencia. Para la inoculación del virus hemos seguido la siguiente técnica:

Se practica un orificio mediante un trépano en una zona de la cáscara, previamente desinfectada, que corresponde a la cámara del aire y a través de este, se inoculan en el saco

(*) Calculado según el método de Reed y Muench

alantoideo 0,2 ml de la suspensión viral. Se cubre el orificio con parafina fundida y se llevan todos los huevos inoculados a estufa a 37° C. A partir de las 24 horas y hasta las 72 horas, se hace observación de los huevos infectados cada 12 horas, llevándose los embriones muertos a nevera a 4° C para clarificar el líquido alantoideo. Hemos desechado los embriones que mueren después de las 72 horas por no ser representativos. Este se extrae esterilmente y de cada huevo por separado, van haciéndose dos pruebas paralelas; una de HA que nos indicará si el embrión ha muerto por la infección viral o por traumatismo operatorio y otra, que es una prueba de esterilidad bacteriana en caldo común y agar común, y observando estos cultivos durante 5 días como mínimo. Durante estas pruebas los líquidos alantoideos extraídos se mantiene a -20° C. Después de desechar los líquidos alantoideos que no presentan o tienen bajo poder hemaglutinante y los que pudieran presentar contaminación bacteriana, se reúnen todas las muestras y el volumen total se centrifuga a 1.000 a 1.200 rpm (800-900 xg) durante 10 minutos para sedimentar los restos de células y tejidos. El sobrenadante resultante se recoge y tras otra prueba de esterilidad bacteriana, se reparten en viales en cantidades de 1 ml que se conservan a -60° C hasta posterior utilización.

Para la obtención de suficiente material infectivo de VSV se realizó la inyección de cultivos de fibroblastos con altas diluciones (10^{-6} a 10^{-8}) del virus original; se tomó esta precaución porque en bajas diluciones las partículas defectivas muy abundantes en este virus producen efectos auto interferentes lo que da lugar a títulos bajos de infectividad.

Los cultivos infectados fueron recogidos 24 horas después de la inyección, centrifugados y el sobrenadante fue conservado como queda explicado mas arriba. Nos interesa recordar aquí el hecho de que el VSV ha sido solamente utilizado como virus interferido en las pruebas de titulación de interferón y no ha sido nunca objeto de tratamiento por los quimioterápicos ensayados.

8. Titulación de virus por su efecto citopático sobre fibroblastos.

Se hace una observación de los cultivos celulares mediante microscopio de óptica invertida (Wild-Heerbrugg, Suiza) y cuando las monocapas de fibroblastos, adheridas al vidrio del tubo de cultivo o frasco hexagonal, son continuas, se elimina el MFC para después (en condiciones estériles también) lavar estas monocapas con PBS templado. Después de eliminar el PBS, los tubos o frascos se inoculan respectivamente con 0,1 ml. a 0,3 ml de la suspensión de virus que se quiere titular. Paralelamente, en los epitelios destinados a ser testigos, el volumen del inóculo es sustituido por un volumen igual de PBS. Durante la práctica de la inoculación la suspensión en PBS del virus se mantiene en baño a 2-4° C. Tras un periodo de contacto a 37° C entre células y virus, periodo de adsorción, que varía entre 1 y 3 horas según el tipo de virus, se añade 1 ml ó 10 ml de MFM a tubos o frascos hexagonales respectivamente y se llevan a estufa a 37° C.

Cada 12 horas se observan las monocapas al microscopio y se miden, por comparación entre las inoculadas y testigos, los efectos citopáticos causados por el virus hasta la total destrucción de la monocapa celular. Para que la prueba sea vá-

lida, es necesario que los cultivos testigos no presenten ningún efecto citopático inespecífico (por toxicidad del medio, por deficiente preparación del cultivo o por envejecimiento de las células). La titulación se expresa en TCID₅₀ calculadas por el método de Reed y Muench.

En el ámbito de este trabajo, esta técnica se ha usado sobre todo en el estudio de la reducción del título infectivo causado por una sustancia antiviral.

9. Determinaciones de toxicidad en embriones de pollo

Para estas determinaciones se utilizan huevos embrionados de 10 días, que se dividen en varios grupos; cada uno de ellos, excepto el grupo testigo, será tratado con una concentración distinta de la sustancia a ensayar. Es importante que cada grupo esté constituido por el mayor número posible de individuos, ya que en este caso la representatividad de los resultados resulta ser mayor.

El protocolo de esta técnica es similar al de obtención de pases de virus y se puede resumir así: A cada huevo embrionado, en condiciones estériles, se le inyecta en saco alantoideo 0,2 ml de la correspondiente concentración de la sustancia en solución salina ó PBS; al mismo tiempo, se le inyecta al grupo control 0,2 ml de diluyente empleado. Se llevan a estufa a 37° C y cada 12 horas, a partir de las 24 horas, se observan los embriones, contabilizándose las muertes y los tiempos en que ellas ocurren. Al término del periodo de observación, los resultados se expresan en gráficas de supervivencia o mortalidad. Es necesario extraer, en condiciones estériles, el líquido alantoideo de los huevos embrionados muertos,

para realizar un control de esterilidad bacteriana y así poder comprobar que los embriones no han muerto por contaminación con microorganismos del inóculo o en el curso de la operación.

Si al comparar las gráficas, una por una, de los grupos tratados con el grupo testigo, se encuentra reducción de supervivencia o aumento de mortalidad, se considera que la sustancia es tóxica a esa concentración considerada. Por otra parte, es interesante extraer los embriones tratados, que han muerto, y compararlos con los embriones no tratados, para poder deducir, si es posible, de qué manera actúa la molécula problema cuando alcanza concentraciones tóxicas.

10. Control del efecto "in vitro" de los diferentes quimioterápicos sobre los virus.

Para comprobar el posible efecto, por contacto, de las diferentes sustancias sobre los virus en estudio, se emplean huevos embrionados de 10 días o monocapas continuas de fibroblastos. Después de haber realizado la prueba de toxicidad de las sustancias disueltas en solución salina o PBS, y tras haber suspendido también el virus en los diluyentes anteriores, se realiza en un tubo de ensayo un contacto directo de las sustancias (a las máximas concentraciones no tóxicas) con los virus a distintas diluciones; esto se realiza durante distintos tiempos y temperaturas (4° C, temperatura ambiente y 37° C). Pasado el tiempo de contacto deseado, las mezclas "in vitro" así como los virus en las mismas condiciones pero sin tratar con las sustancias, se dializan frente a PBS en cámara -4° C (con el fin de no introducir droga en el sistema biológico) y se inoculan en idénticas circunstancias al grupo testigo.

La mecánica de inoculación, tanto en huevos embrionados como en monocapas de fibroblastos, es la misma que la empleada en la obtención de pases de virus y titulación por efectos citopáticos respectivamente: Así, en condiciones estériles, se inoculan en el saco alantoideo de cada embrión (o en tubo de cultivo o frasco hexagonal) 0,2 (0,1 y 0,3 ml respectivamente) de los virus tratados con la droga; se establece un grupo de embriones, de tubos o frascos hexagonales, por cada dilución distinta de virus y de sustancia en estudio. Paralelamente, a los grupos testigo de virus, se les administra el mismo volumen de inóculo de virus pero sin tratar con sustancia. Todos estos lotes de ensayo se llevan a estufa a 37° C y se observan a partir de las 24 horas, los huevos embrionados en el ovoscopio y las monocapas en microscopio de óptica invertida (cada 24 horas en el primer caso y a las 18, 24 ó 48 horas en el segundo). Se llevan a 4° C los embriones muertos o a -20° C cada toma de los cultivos consistentes en la tercera parte de cada grupo (tratados y control).

Después de 18 horas en nevera a 4° C, para conseguir la desaparición de la hemorragia en el líquido alantoideo se abre esterilmente el huevo y se extrae, individualmente de cada huevo, el líquido alantoideo. Se centrifuga de 1.000 a 1.200 rpm durante 10 minutos, y con el sobrenadante se hacen dos pruebas paralelas: una de hemaglutinación y la otra de control de esterilidad bacteriana, para asegurarnos que los embriones no han muerto por contaminación. Mientras duran las pruebas anteriores, los líquidos alantoideos infectados se mantienen a -20° C, y después de desechar los que pudieran estar contaminados, se descongela a temperatura ambiente y se hace una titulación, sobre embriones de pollo de 10 días, de

cada líquido alantoideo, expresando los resultados en DLE_{50} . Por otra parte, los resultados obtenidos en la prueba de hemaglutinación se procesan estadísticamente con el fin de conseguir un resultado único y representativo de cada grupo. Si existe una reducción de la DLE_{50} ó del título HA, frente al grupo control, se considera que la substancia es efectiva, a dicha concentración, como agente antiviral.

Las monocapas de fibroblastos, que se mantienen a $-20^{\circ} C$, se descongelan a $37^{\circ} C$ y se someten a tratamiento de congelación y descongelación dos veces mas con el fin de romper las células y liberar el virus que podría quedar en el citoplasma; después se mezclan por pipeteo vigoroso los tubos de cultivo o frascos hexagonales de cada grupo de todas las tomas. Se reúnen en tubos de centrifuga los distintos medios de cada grupo, y se centrifugan a 1.000 y 1.200 rpm durante 10 minutos. Con el sobrenadante se hacen 2 pruebas: una de HA y otra de control de esterilidad bacteriana y -después de desechar los medios infectados que pudieran estar contaminados- se procede a hacer una titulación infectiva, midiendo los efectos citopáticos causados por el virus sobre monocapas de fibroblastos de cada grupo tratado y testigo para expresar los resultados en $TCID_{50}$. Los resultados de HA también se procesan estadísticamente como en el caso de los huevos embrionados. Si existe reducción en $TCID_{50}$ ó en el título hemaglutinante de los grupos tratados con substancias frente a los testigos, se considera que la molécula es efectiva como agente antiviral a esa concentración considerada.

11. Titulación de virus por medida de la letalidad sobre huevos embrionados.

Se parte de un número determinado de huevos embrionados de 10 días, que se reparten en tantos grupos como diluciones de virus se vayan a emplear en la titulación más un grupo testigo que no será inoculado con virus.

El protocolo de esta técnica apenas difiere del de la obtención del virus por pases en líquido alantoideo, pudiéndose resumir de la siguiente manera: Se hacen diluciones decimales (en solución salina o PBS) de la suspensión del virus que se quiere titular y que puede proceder de líquidos alantoideos o de medios de cultivo infectados y tratados o no con drogas antivirales. Las diluciones de virus se mantienen en baño frío de 2 a 4° C, inoculándose 0,2 ml de las muestras en el saco alantoideo de cada huevo embrionado. Al mismo tiempo al grupo testigo se le inocula 0,2 ml de solución salina o PBS por la misma ruta. Se llevan todos los huevos embrionados a estufa a 37° C. A partir de las 24 horas y hasta las 72 horas, (las muertes ocurridas fuera de este periodo no son representativas), se observan cada 24 horas. Los que presentan muerte del embrión se llevan a nevera a 4° C durante 6 a 18 horas, y al término de este tiempo, se abren los huevos extrayéndose esterilmente los líquidos alantoideos. Se centrifuga, por separado, de 1.000 a 1.200 rpm durante 10 minutos, para eliminar restos de tejidos. De cada sobrenadante obtenido se hacen las pruebas paralelas de HA y de control de esterilidad.

Las muertes de los embriones se contabilizan a partir de estos datos por el método de Reed y Muench y se calcula la DLE_{50} , que nos dará el título infectivo del virus considerado sobre embriones de pollo.

12. Efecto protector de los quimioterapicos en huevos embri-
nados.

En este caso se trata de estudiar, en un sistema de ensayo "in ovo", los posibles efectos de las sustancias en las etapas tempranas de la multiplicación viral. El método seguido en este estudio, consta de tres partes: establecimiento de las distintas concentraciones de trabajo para cada sustancia, preparación de las distintas diluciones de los virus en estudio e inoculación del fármaco y el virus.

Las sustancias se disuelven en agua destilada estéril a las concentraciones previamente determinadas, se pasan a través de filtros Millipore de $0,22\mu$ y se controla a continuación la esterilidad bacteriana, sembrando en caldo y agar común todos los filtrados. Estas soluciones estériles se reparten en pequeños volúmenes y se guardan a -20° C hasta su utilización.

Inmediatamente antes de la inoculación y en condiciones estériles, se preparan distintas diluciones de virus en solución salina a pH 7; esto se hace a partir de líquido alantoideo, obtenido por pase sobre embriones de pollo, e infectado con el virus que se quiere estudiar. Mientras dura la inoculación, estas diluciones de virus se mantienen en baño frío de 2 a 4° C.

La tercera parte, que corresponde a la experiencia en sí, se puede resumir como sigue: con los huevos embrionados de 10 días, se establecen dos series de grupos de igual magnitud; una de ellas, previamente a la inoculación con virus, va

a ser tratada con la sustancia en estudio a concentraciones máximas no tóxicas y a distintos tiempos; a la otra serie, que va a actuar como testigo, se le administra la misma cantidad y a los mismo tiempos del diluyente sólo. En nuestras experiencias hemos seguido el siguiente protocolo: en condiciones estériles, se inyecta en saco alantoideo 0,2 ml del quimioterápico a distintas concentraciones previamente determinadas y después de un periodo de 1, 2, 3 ó 4 horas de incubación a 37° C, estos huevos embrionados así tratados, se inoculan en saco alantoideo con 0,2 ml de virus. Paralelamente, en otra serie testigo se hace la misma operación pero sustituyendo el fármaco por el diluyente sólo. Se llevan todos los embriones inoculados a estufa a 37° C, y cada 24 horas, a partir de la inoculación, se observan; los embriones muertos, se guardan en nevera a 4° C durante la noche para clarificar el líquido alantoideo. Al término de este tiempo, se extrae esterilmente el líquido alantoideo de cada huevo según técnica ya descrita.

El líquido alantoideo resultante de cada grupo, se titula en embriones de pollo de 10 días y los resultados obtenidos se expresan en DLE₅₀. Por otra parte los resultados obtenidos en la prueba de HA se tabulan de una manera similar a como lo hicimos en el estudio del efecto "in vitro" de la droga sobre los virus.

Si existe una reducción del título infectivo o hemaglutinante, o de ambos a la vez, en un determinado grupo de los tratados frente a su correspondiente lote testigo, se considera que el quimioterápico es efectivo a esa concentración como agente antiviral.

También resulta interesante, puesto que hemos anotado los tiempos en que ocurren las muertes de los embriones, comparar las gráficas de supervivencia o mortalidad de los grupos tratados frente a sus respectivos grupos testigos; así cabe considerar a la molécula como quimioterápico antiviral cuando exista un claro aumento de supervivencia o una disminución de la mortalidad.

13. Control del efecto antiviral sobre fibroblastos

El método de estudio aquí aplicado, es similar al descrito anteriormente "in ovo". Las sustancias a utilizar, ya filtradas a través de Millipore de $0,22\mu$ y mantenidas a -20° C, se llevan a las concentraciones deseadas para el ensayo; el mismo día de la experiencia, se hacen diluciones decimales (en PSB) de líquido alantoideo infectado por el virus a ensayar y para no alterar la proporción de composición del medio que baña las células en el momento de inocular el virus, se hace la última dilución decimal en MFM; con ésta se inocularán los tubos de cultivo o frascos hexagonales. Mientras dura la inoculación, las diluciones virales se mantienen en baño frío de 2 a 4° C.

La experiencia responde al protocolo siguiente: Una vez formadas las monocapas continuas de fibroblastos de embrión de pollo, sobre las paredes de tubos de cultivo o frascos hexagonales, se elimina el MFC en condiciones estériles, y se lavan las monocapas con PBS templado que se elimina. Con estos cultivos se hacen dos grandes series (A y B) más un grupo (Z) que actuará como testigo de las monocapas de fibroblastos. Una de las series (A), se dividirá en tantos lotes como concentraciones

de la substancia a estudiar queremos ensayar. Dentro de cada lote se haran tantos subgrupos como tiempos de incubación de las monocapas con la droga se quieran considerar (previos a la infección con virus). A su vez, estos subgrupos deben tener un número suficiente de cultivos como para permitir tres tomas sucesivas. En todos los casos, a las monocapas libres de MFC y lavadas con PBS, se añade MFM, con la concentración deseada del fármaco, a razón de 0,9 ml ó 9 ml por tubo o frasco respectivamente. Otro tanto se hará con la serie testigo (B) que no será tratada con el fármaco.

Paralelamente, a la serie testigo (B), se le añade 0,9 ó 9 ml de MFM sin quimioterápico. Al otro grupo testigo de células (Z), se le añade 1 ml ó 10 ml de MFM por tubo o frasco, respectivamente, sin la substancia; este grupo testigo tampoco recibe virus y sirve para conocer la multiplicidad celular normal.

Todos estos cultivos se llevan a estufa a 37° C y 1, 2, 3, ó 4 horas después (en A) según el subgrupo, se inoculan con 0,1 ó 0,9 ml de virus suspendido en MFM a las concentraciones determinadas, por tubo o frasco hexagonal respectivamente. Al mismo tiempo, y en las mismas condiciones, se inoculan los cultivos de la serie testigo con el mismo volumen de virus y a la misma dilución. Se vuelven a llevar a estufa a 37° C, y a las 18, 24 y 48 horas se observan los efectos citopáticos causados por el virus. También se examinan las monocapas correspondientes al grupo testigo de células (Z) para comprobar que estas se mantienen en estado normal. Inmediatamente después de realizada la observación microscopica, se realiza la correspondiente toma de cada subgrupo, tanto de tratados como

no tratados, y que corresponde a una tercera parte de todos los individuos de este subgrupo; estos cultivos se llevan a -20° C y tras un doble proceso de descongelación rápida a 37° C y congelación a -20° C de cada monocapa -para proceder a la rotura de las células- se pipetea fuertemente para conseguir un máximo de virus en el MFM que las baña. Se reúnen los MFM infectados de cada toma, y se centrifugan a 1.000 a 1.200 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes se recogen estérilmente y en una pequeña muestra de cada uno de ellos se realizan dos pruebas paralelas: una de HA y la otra de control de esterilidad bacteriana, manteniendo mientras tanto los sobrenadantes a -20° C. Una vez comprobada la esterilidad de cada toma, se descongelan a 37° C y se realiza individualmente una titulación a través de los efectos citopáticos producidos en los fibroblastos.

Las $DICT_{50}$ de cada toma, se comparan entre sí y con los testigos y los resultados de la prueba HA se tabulan como siempre.

Una reducción del título de infectividad o del título HA de cualquier toma tratada con el quimioterápico, en relación con su correspondiente toma testigo, nos indica que la sustancia es efectiva a una concentración y tiempo determinados.

14. Determinación de la tolerancia crónica de los pollos para los quimioterápicos.

Para determinar la tolerancia crónica en pollos para el adamantano, amantadina y D-glucosamina, se administraron estas sustancias por vía endovenosa (250 mg/Kg) durante 10 días.

sucesivos, a un lote de 10 animales. En este tiempo se llevó un control riguroso sobre el comportamiento de estos animales así como de su peso, comparandolo con animales no tratados. Se determinó asimismo, la tolerancia crónica en una pauta que difiere ligeramente con la anterior; se administraron a 10 pollos también por vía endovenosa y en la misma dosis estas sustancias durante 5 días seguidos dando un reposo de 3 días y se repite este proceder dos veces más. Todo ello hace un total de 15 inoculaciones durante 24 días. La observación de los animales tratados fue la misma que la llevada a cabo en la primera parte. Se realizó la autopsia de los 10 animales tratados 15 días después de la última inoculación con el quimioterápico correspondiente no encontrándose signo alguno de alteración o degeneración en bazo, hígado, riñones, corazón, pulmones e intestino.

15. Control de la inmuno-respuesta humoral anti-virus (NDV, FPV, influenza y Sendai).

Para la obtención de sueros hiperinmunes de pollo frente a los virus ND, FP, influenza y Sendai hemos seguido el protocolo siguiente.

a) Preparación de antígeno. Se hace una suspensión de líquido alantoideo que contiene el virus correspondiente en solución salina hasta alcanzar una actividad infectiva equivalente a 10^4 DICT. El virus es inactivado con B-propionolactona (B-hidróxi-propionona BPL; FLUKA. A.G. Suiza) añadida a la suspensión de virus hasta alcanzar una dilución final de 1/3.000. La suspensión se mantiene en agitación lenta durante 2 horas a 37° C. Se comprueba la inactivación por inoculación de esta suspensión así tratada, en pollos de 20 días

de edad, a dosis de 0,5 ml por vía intramuscular y en huevos embrionados de 10 días, a dosis de 0,2 ml en cámara alantoi-dea; la ausencia de muerte en animales y embriones indican la inactivación total del virus.

El antígeno así preparado es mezclado v/v con coad-yuvante oleoso (1 parte de Arlacel + 9 partes de Bayol, pro-cedentes ambos de Atlas Chemical Industries, Wilmington EE.UU).

Esta mezcla se homogeniza esterilmente en homogeni-zador M.S.E. refrigerado hasta conseguir una emulsión estable de aspecto lechoso.

b) Pauta de inmunización. Esta suspensión es inocu-lada en dosis de 1 ml por vía intramuscular a pollos de 1 Kg de peso. Esta inoculación se repite 2 veces más con intervalos de 8 días.

c) Obtención de suero hiperinmunes. Ocho días después de la última inoculación se hace sangría a muerte por punción intracardiaca recogiendo esterilmente los sueros según hemos reseñado anteriormente.

d) Control de anticuerpos. Siete días después de cada inoculación de la suspensión viral se hicieron sangrías de prueba para efectuar el control de actividad del suero por medio de las técnicas de IHA.

e) Obtención de sueros hiperinmunes en animales tratados con quimioterapicos. Se ha seguido la misma pauta de inmunización inoculando 250 mg de la droga/kg por vía

endovenosa diariamente durante 5 días en el periodo de los 8 días comprendidos entre cada inyección de antígeno mas los 5 días previos a la primera inyección. Para mas detalles puede consultarse el trabajo de RONDA y cols, (1966) de donde hemos tomado esta técnica.

16. Inducción y titulación de interferón sobre cultivos celulares tratados con los quimioterápicos y antibióticos.

Para la inducción de interferón sobre fibroblastos de pollo, hemos seguido la técnica descrita por RONDA y ALONSO (1974) que a grandes rasgos es como sigue:

Determinación de la toxicidad de los quimioterápicos para las células. Previamente fue fijada la toxicidad en las pruebas previas de actividad de los quimioterápicos frente a los virus habiendo determinado las curvas de viabilidad celular en tratamiento con amantadina, adamantano y D-glucosamina. En Resultados encontraremos que para amantadina y adamantano dosis de 100 μ son absolutamente atóxicas, siendo de 800 μ para la D-glucosamina.

En nuestros experimentos en inducción de IF, hemos utilizado dosis para la amantadina y adamantano de 100, 50 y 25 μ /ml de medio y para D-glucosamina, 800, 400 y 200 μ /ml de medio.

Inactivación de los virus a 37° C. Para obtener mas altos títulos de IF y para obviar el rápido efecto citopático de los virus empleados, se llevó a cabo inactivación manteniendolos

en estufa a 37° C. Con este fin se hicieron suspensiones de los virus ND, FP, influenza y Sendai en PBS hasta lograr un título de 10^5 DICT/ml; estas suspensiones, en cantidad suficiente para tener el material biológico necesario, fueron mantenidas a la temperatura de 37° C. Cada 12 horas fueron efectuadas tomas de muestra que inoculadas en cultivos celulares, sirvieron para fijar el momento en el cual se presenta la inactivación total del virus. En esta situación la inoculación del material infectivo no da lugar a efectos citopáticos en los cultivos ni a muerte en huevos embrionados.

En cada toma de muestras se ha determinado, además del poder infectivo, el título hemaglutinante.

Inducción del interferón en presencia de quimioterápicos. Los virus termoinactivados fueron inoculados sobre fibroblastos en frascos de cultivo pyrex hexagonales; después de un periodo de adsorción de 2 horas, se añadió MFM. Se recogieron muestras del medio 24 y 48 horas después de la inoculación del virus y fue determinado el título de interferón de estas muestras. Se siguió el mismo método de inducción de IF en presencia de los quimioterápicos, añadidos al medio 36, 24 y 12 horas antes o 2 horas después de la inoculación del virus. Los quimioterápicos se añadieron en dosis única en cada uno de los tiempos indicados.

Inducción de IF en presencia de antibióticos. Se ha seguido una técnica idéntica a la llevada a cabo con los quimioterápicos, pero en tratamientos de los cultivos celulares con antibióticos en tiempos de 4 y 2 horas antes de la infección, simultáneamente con el virus y 4 y 2 horas posteriormente.

La toxicidad de rifampicina y rifamicina para los fibroblastos ha sido determinada por RONDA y ALONSO (1974) y en nuestros ensayos se han utilizado concentraciones de 100, 50, 10 y 5 /ml de medio para la rifampicina y de 10 y 5 para la rifamicina; para la bleomicina se han utilizado concentraciones de 50, 10 y 5 ng dosis atóxicas fijadas por RONDA y ALONSO (1975), y para la cromomicina dosis de 1 y 0,5 ng fijadas igualmente por RONDA y cols (1967). Hemos utilizado, igualmente, el VSV para la titulación del IF.

Titulación del interferón. Todos los interferones inducidos en estas células, tanto tratadas como no tratadas con los quimioterápicos fueron titulados por método de DULBECCO (ver pag. 142). Para esta práctica se hicieron diluciones de los medios nutritivos que contendrán el interferón liberado de las células, tanto tratados como no tratados con los quimioterápicos. Estas diluciones de pretendido IF, efectuadas sobre medio de mantenimiento son añadidas a cultivos de fibroblastos en placas de Petri y mantenidas en estufa de CO₂ al 5%, después de 18-24 horas de incubación a 37° C, el interferón fue eliminado y los epitelios lavados dos veces con PBS. Las células fueron infectadas con VSV diluido hasta contener 100 unidades formadoras de placas infectivas, este virus es considerado como virus de ataque, y por tanto interferido. El recíproco de la dilución a la cual el número de placas o marcas infectivas es reducido en un 50% comparado con las que aparecen en controles no tratados con interferón se consideran como unidades interferón (UI).

17. Inducción y titulación de interferón en pollos tratados con quimioterápicos y antibióticos.

Para la inducción de IF se han utilizado los cuatro virus estudiados pero sin efectuar la termoinactivación, habiendo seguido la pauta y protocolo de RONDA y ALONSO (1976)

Inducción de interferón.- En grupos de 5 pollos Leghorn de 1 mes de edad con peso de 120 a 170 gr se hicieron inoculaciones por vía endovenosa de líquido alantoideo de huevos infectados con NDV, FPV, influenza o Sendai. La dosis inoculada fue de 0,3 ml de una suspensión de líquido alantoideo correspondiente a 10^5 DICT. Se hizo mezcla de los sueros y se determinó el título de interferón.

Inducción de interferón en presencia de quimioterápicos.- Se siguió el mismo proceder pero administrando las drogas en inoculación endovenosa única de 250 mg/Kg ó 100 mg/Kg, 36, 24 y 12 horas antes ó 2 horas después de la infección con el virus. Igualmente se llevó a cabo la mezcla de los sueros obtenidos dentro de cada grupo determinando el título IF.

Inducción de interferón en presencia de antibióticos.- La pauta difiere de la anterior en que se administran los antibióticos en dosis únicas de 250 ó 100 mg/Kg por vía intravenosa para la rifampicina y rifamicina y de 6 y 3 mg/Kg para la bleomicina y cromomicina, igualmente por vía intravenosa. La administración se llevó a cabo 4 y 2 horas previamente a la inyección con el virus, simultáneamente con el virus, y 4 ó 2 horas posteriormente. Se hicieron mezclas de los sueros de cada grupo y se determinó el poder interferón.

Cada determinación en horas y cantidades de drogas se ha llevado a cabo sobre grupos de 5 a 7 pollos de los característicos expuestos anteriormente.

Recogida de los sueros e inactivación de los mismos.- Teniendo en cuenta que el máximo título de IF en suero se obtiene entre 4 y 6 horas después de la inducción con el virus se hicieron esterilmente sangrias a muerte por punción intracardíaca. Los sueros fueron recogidos también esterilmente y mezclados. En estas determinaciones "in vivo" fue imprescindible hacer la inactivación de los virus presentes en el suero, dado que su presencia daría lugar a la destrucción de tejidos en las pruebas de titulación que impediría las lecturas de resultados. La inactivación se llevó a cabo por medio de diálisis de los sueros a pH 2,2 durante 24 horas a 4° C y posterior neutralización por 2 diálisis a pH 10 a 4° C (24 horas). En caso de no haber obtenido un pH 7 - 7,2 se alcalinizó con bicarbonato al 8%. El interferón presente en los sueros, resiste pH extremos entre 2 y 12; efectuadas pruebas de inactivación del virus y esterilidad bacteriana, pasamos a la titulación de interferón.

Titulación de interferón.- Los sueros fueron titulados sobre fibroblastos siguiendo la misma técnica que se detalló en el capítulo anterior utilizando el VSV como virus interferido.

IV. RESULTADOS

Parece lógico señalar al comienzo de este capítulo de Resultados la dificultad que supone resumir tanto cuanto sea posible el gran número de datos obtenidos en esta parte experimental teniendo en cuenta que hemos trabajado con cuatro virus distintos ensayándolos sobre cultivos celulares y también sobre huevos embrionados, todo ello frente a cuatro sustancias distintas en cuanto a sus efectos antivirales y otros tres además para conocer su influencia sobre la inducción de interferón.

De aquí que consideremos oportuno ir agrupando los diferentes resultados en los mismos apartados que se señalan en el protocolo experimental para después considerarlos en capítulos por separado.

1.- Estudios previos acerca de los sistemas biológicos

Antes de nada nos vimos precisados a controlar lo mas exactamente posible las condiciones de crecimiento de los fibroblastos de pollo que ibamos a utilizar en sus dos tipos de medio (crecimiento y mantenimiento) modificando aquellos nutrientes que según experiencias previas podrian afectar a la viabilidad celular, tales como suero fetal de ternera, hidrolí-

zado de lactoalbúmina y extracto de levadura.

Seguidamente sobre los sustratos de mantenimiento cuyas proporciones de nutrientes resultaron las idóneas para nuestros propósitos experimentales, determinamos las correspondientes curvas de toxicidad para las distintas sustancias, fijamos el grado de infectividad requerido y finalmente realizamos una experiencia control del sistema biológico para una interacción virus-quimioterápico.

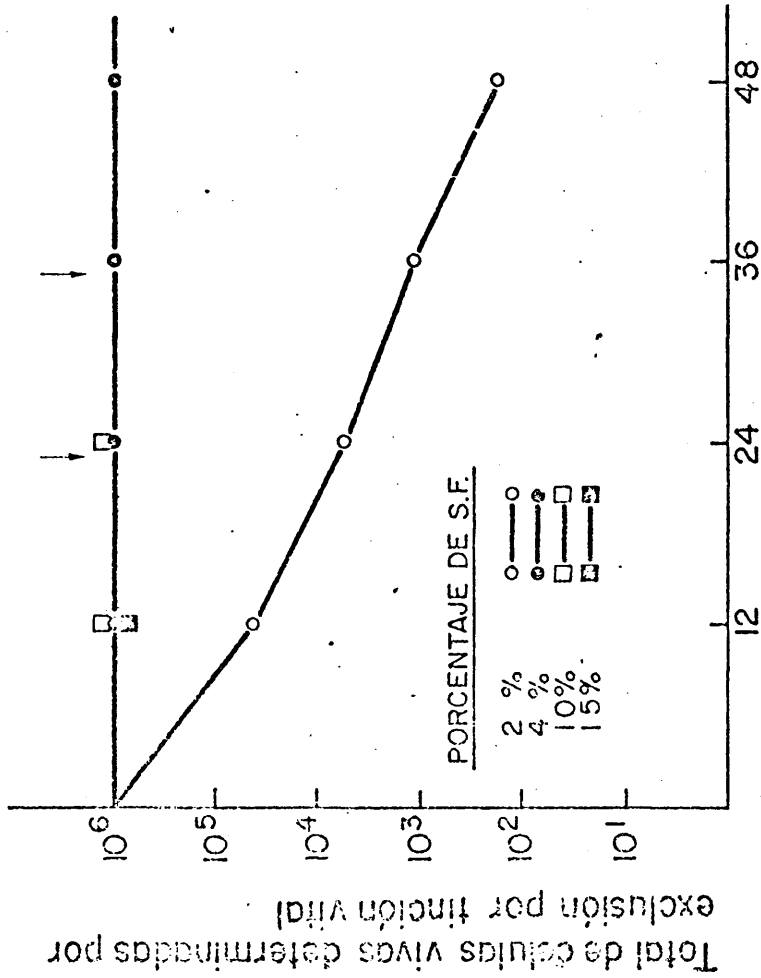
1.1. Curvas de viabilidad celular

De acuerdo con lo señalado en el capítulo de Técnicas, sobre el medio básico de Hank's estudiamos la influencia de distintas proporciones de suero fetal de ternera (Fig. 11), hidrolizado de lactoalbúmina (Fig. 12) y extracto de levaduras (Fig. 13). De las distintas concentraciones de nutrientes empleados así como de las variaciones en el crecimiento celular durante las primeras 48 horas dan idea las figuras anteriormente citadas.

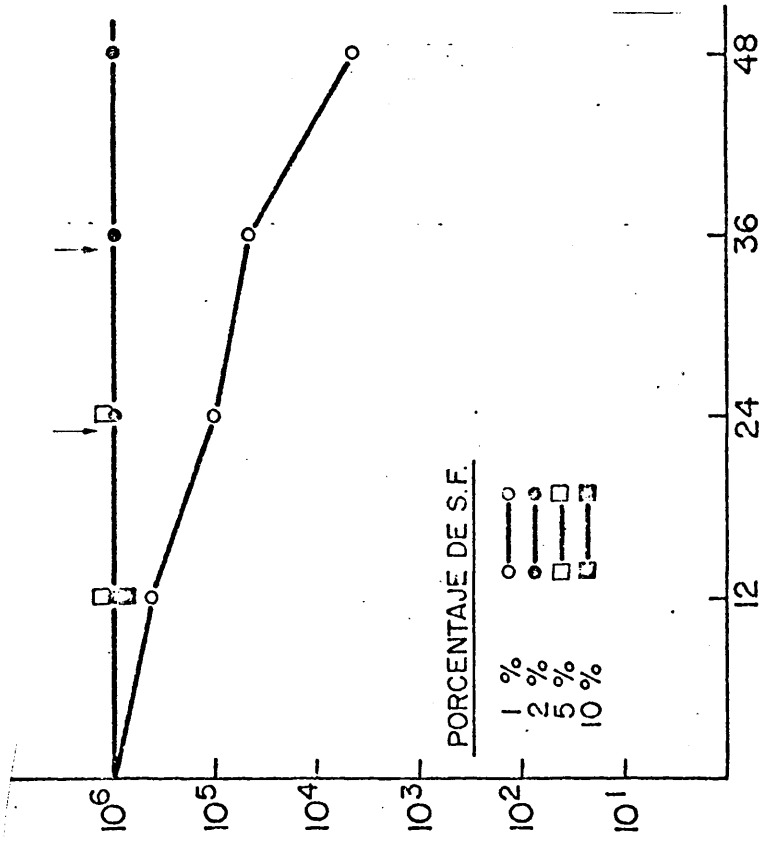
Como puede verse en la Fig. 11, la concentración de 2% en el medio de crecimiento y del 1% en el medio de mantenimiento producen una alteración en el normal crecimiento que conduce a una disminución en el número de células. Asimismo las concentraciones de 10 y 15% (crecimiento) y de 5 y 10% (mantenimiento) dan lugar a desprendimiento de la monocapa por exceso de acúmulos celulares.

Aplicando los mismos criterios de observación, en la Fig. 12 se comprueba que concentraciones de hidrolizado de lactoalbúmina de 0,5 y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en ambos medios, dan lugar a una

MEDIO DE CRECIMIENTO



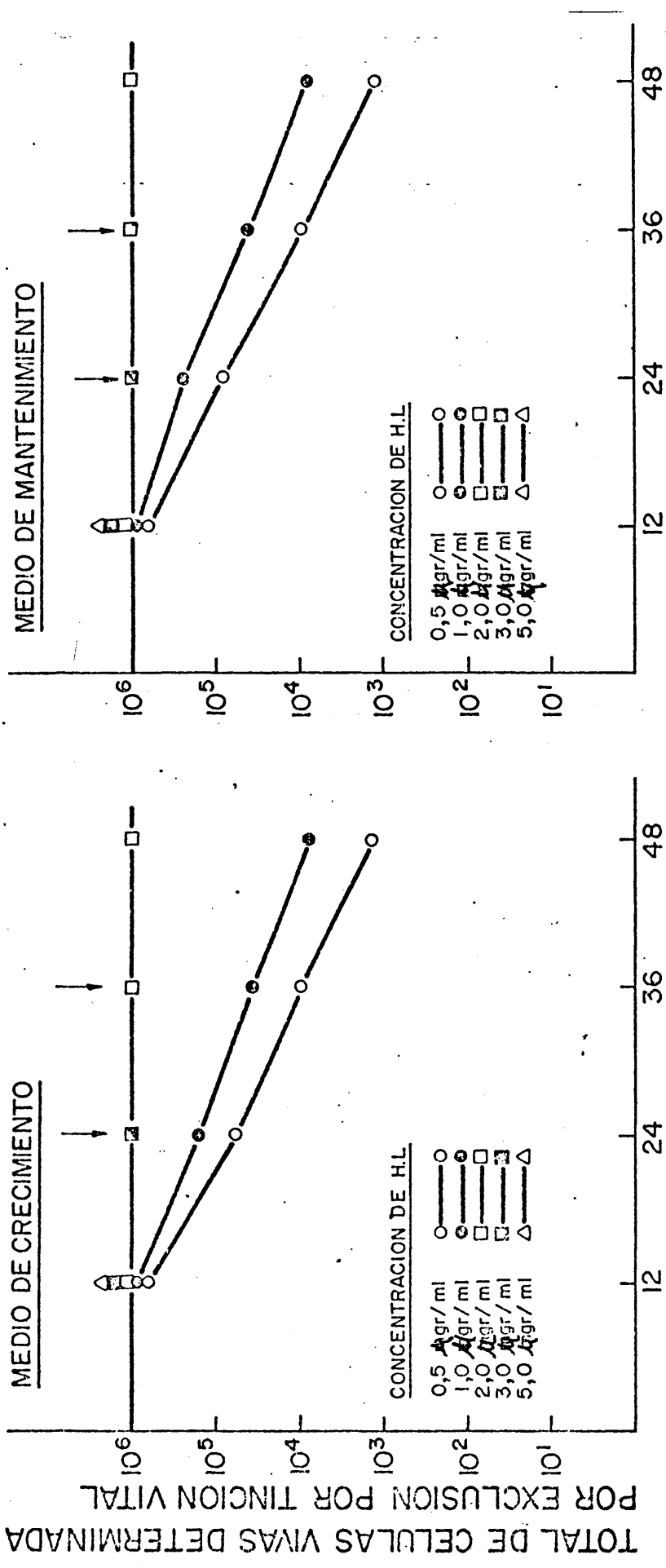
MEDIO DE MANTENIMIENTO



Tiempos de tomas en horas de las muestras de cultivos celulares

↓ Monocapa celular desprendida por exceso de S.F.

Fig. 11.- Variaciones en las curvas de crecimiento de fibroblastos durante 48 horas en cultivo sobre los medios de crecimiento y mantenimiento para distintos porcentajes de suero fetal bovino (S.F.)



TIEMPOS DE TOMAS EN HORAS DE LAS MUESTRAS DE CULTIVOS CELULARES

↓ MONOCAPA CELULAR DESPRENDIDA POR EXCESO DE H.I.

Fig. 12.- Variaciones en las curvas de crecimiento de fibroblastos durante 48 horas en cultivo sobre los medios de crecimiento y mantenimiento para distintas concentraciones de hidrolizado de lactoalbúmina (H.I.)

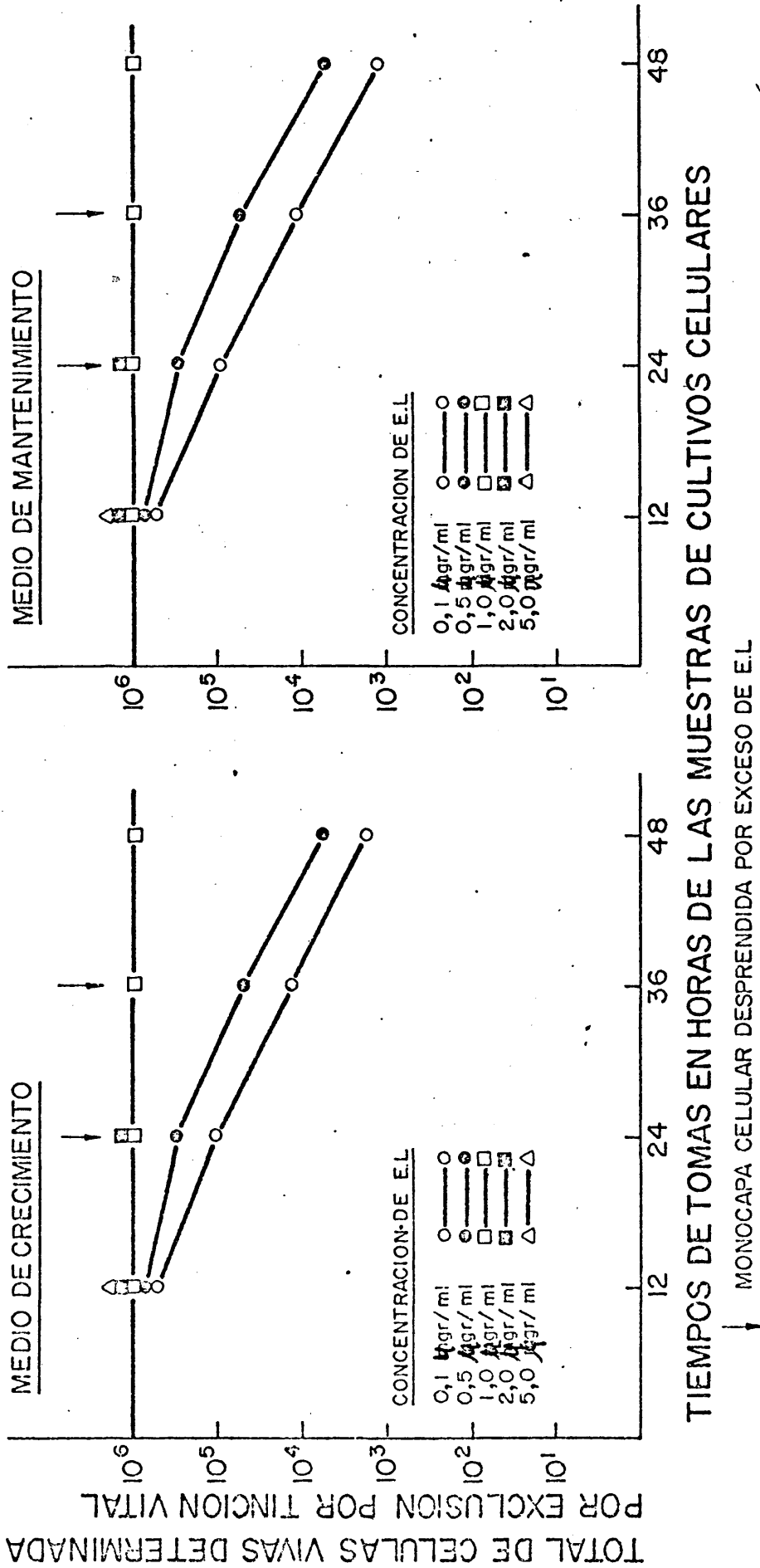


Fig. 13.- Variaciones en las curvas de crecimiento de fibroblastos durante 48 horas en cultivo sobre los medios de crecimiento y mantenimiento para distintas concentraciones de extracto de levaduras (E.L.)

reducción en el número de células vivas, mientras que concentraciones de $3 \mu\text{g}$ y mas altas producen el mismo fenómeno de desprendimiento de los cultivos en monocapa.

Finalmente la Fig. 13 nos señala que concentraciones de 0,1 y 0,5 μg de extracto de levadura/ml no son suficientes para una normal viabilidad celular en ambos medios, en tanto que concentraciones de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y mayores dan lugar a desprendimientos variables de la monocapa.

Así vistos los datos, el medio mas adecuado para nuestros propósitos experimentales habría de ser el de Hanks's con una concentración de 4% de suero fetal bovino (ó 2% para mantenimiento) mas 2 μg de hidrolizado de lactoalbúmina/ml y 1 μg de extracto de levaduras/ml.

En efecto, sobre este medio se han efectuado todas las experiencias llevadas a cabo con cultivos de fibroblastos de pollo.

1.2. Determinaciones de toxicidad

Subsiguiente a la determinación de la idoneidad de los medios de crecimiento y mantenimiento pasamos a estudiar las concentraciones de quimioterápico que era posible utilizar para cada substancia sin que se produjeran alteraciones en las células.

Esto se realizó según se indica en el apartado de Técnicas, determinando las curvas de viabilidad celular para contactos de 48 horas de duración, que es el tiempo de trata-

miento que se ha juzgado como oportuno en nuestro protocolo experimental. Las determinaciones se han efectuado en presencia de adamantano (Fig. 14), amantadina (Fig. 15) y D-glucosamina (Fig. 16) a las concentraciones que se indican en los gráficos.

En cuanto a las otras sustancias utilizadas tales como cromomicina, bleomicina, rifampicina y rifamicina existían en nuestro laboratorio datos previos sobre sus efectos tóxicos para fibroblastos y por tanto no tuvimos necesidad de realizar este tipo de experiencias.

En los resultados que siguen se puede ver que las moléculas de adamantano y amantadina en cuanto a su efecto tóxico son coincidentes ya que concentraciones superiores a las 100 γ /ml empiezan a disminuir la viabilidad celular y el efecto es proporcional a la concentración.

Para la D-glucosamina concentraciones de 800 γ /ml empiezan a producir ligeras alteraciones en la viabilidad celular a partir de las 36 horas en tanto que para concentraciones superiores la supervivencia celular empieza a ser afectada antes de las 12 horas y su efecto es claramente proporcional a la concentración.

En cuanto al efecto tóxico de estos quimioterápicos sobre huevos embrionados de 10 días se estudiaron las curvas de supervivencia en función del tiempo y para unas concentraciones comprendidas entre 0 y 3000 γ /0,2 ml (Fig. 17).

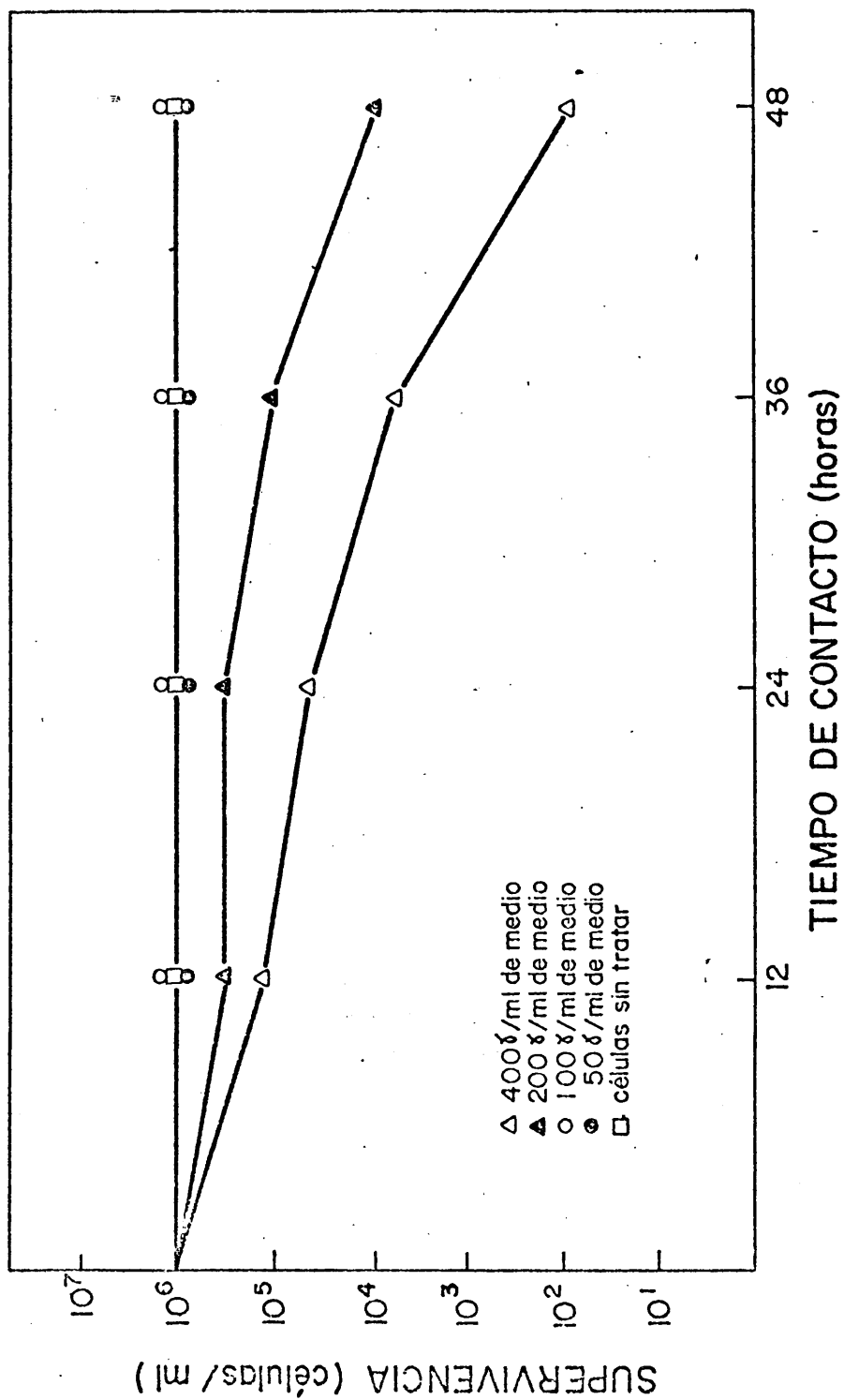


Fig. 14.- Curvas de supervivencia de fibroblastos de pollo en presencia de distintas concentraciones de adamantano en función del tiempo de contacto.

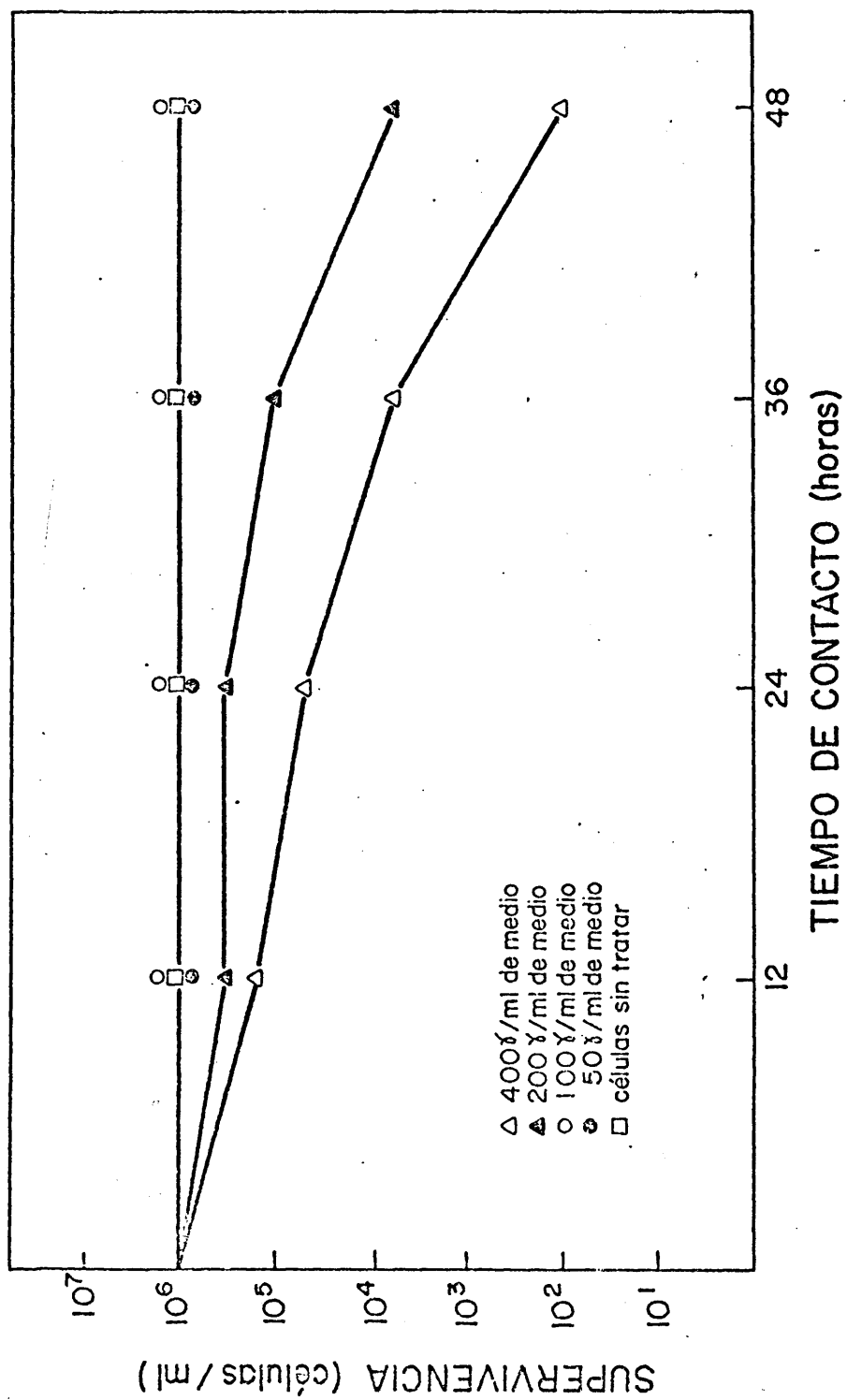


Fig. 15.- Curvas de supervivencia de fibroblastos de pollo en presencia de distintas concentraciones de amantadina en función del tiempo de contacto.

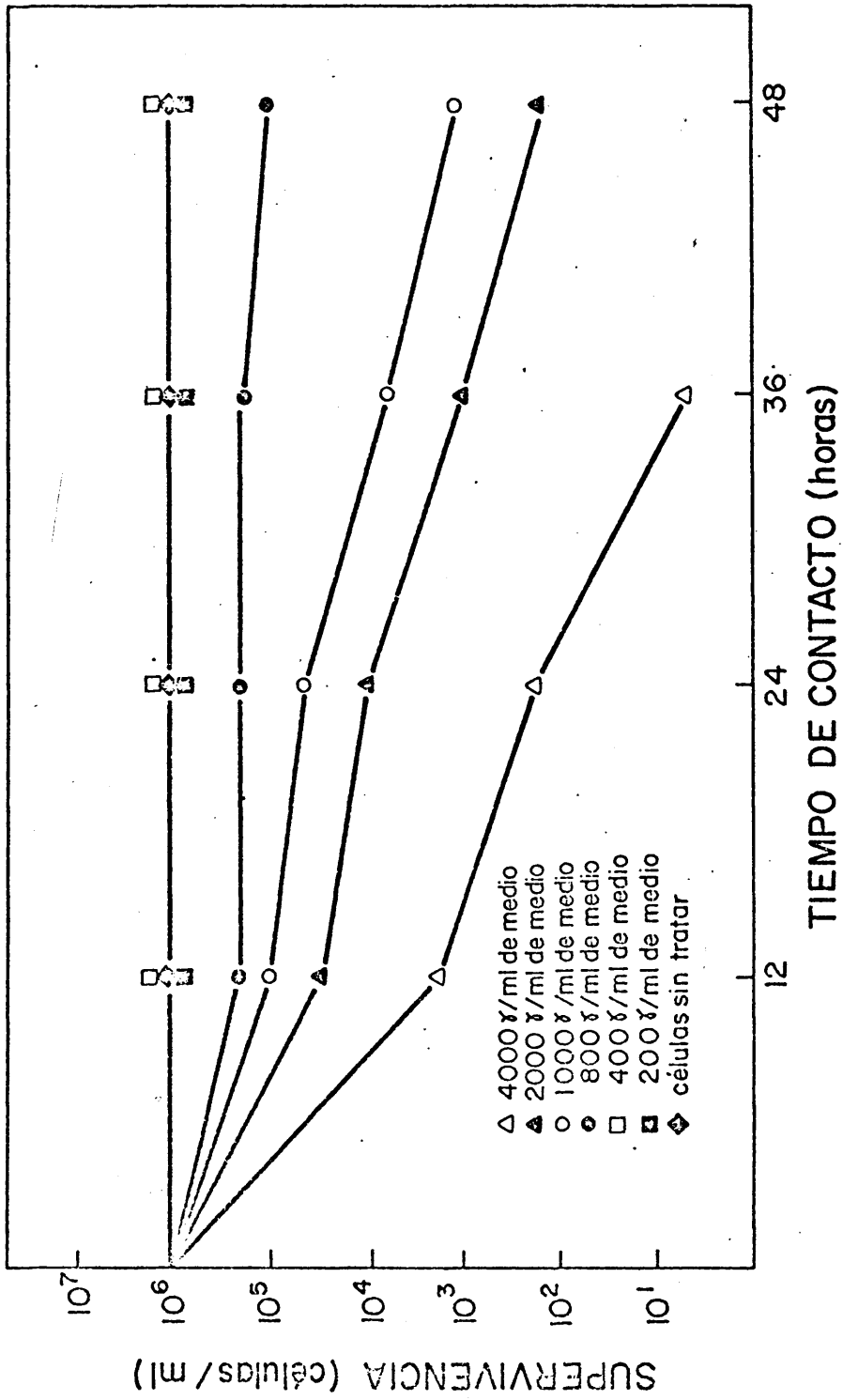


Fig. 16.- Curvas de supervivencia de fibroblastos de pollo en presencia de distintas concentraciones de D-glucosamina en función del tiempo de contacto.

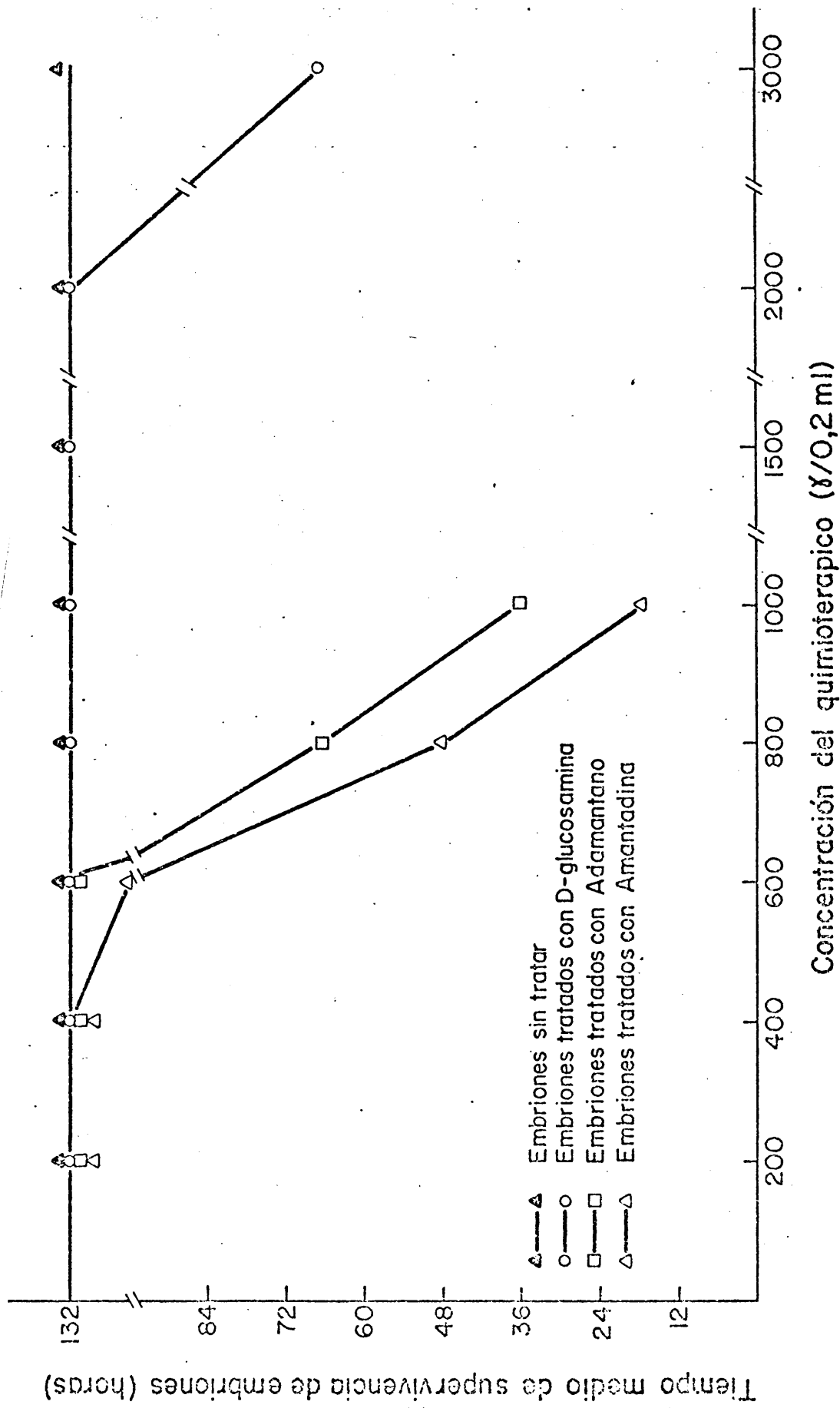


Fig. 17.- Curvas de supervivencia, en función del tiempo, de huevos embrionados sometidos a la acción de distintas concentraciones de adamantano, amantadina y D-glucosamina comparadas con un lote análogo de huevos embrionados testigos.

Como puede verse una vez más las moléculas de adamantano y amantadina exhiben una mayor toxicidad no debiendo emplearse para este tipo de ensayos a concentraciones superiores a 400 μ g /0,2 ml para la amantadina y 600 μ g /0,2 ml para el adamantano, mientras que la D-glucosamina puede ser utilizada en concentraciones casi 5 veces más elevadas.

A la vista de estos resultados y con los antecedentes que teníamos correspondientes a las otras sustancias a ensayar se han utilizado en este Memoria las concentraciones que a continuación se indican.

<u>Substancias</u>	<u>Dosis y sistema biológico empleado</u>
Cromomicina	1-0,5 ng/ml fibroblastos y 6-3 mg/Kg para pollos
Adamantano	100 y 50 μ g/ml para fibroblastos; 600 y 400 μ g /huevo embrionado; 250 y 100 mg/Kg pollo
Amantadina	100 y 50 μ g/ml para fibroblastos; 400 y 200 μ g/huevo embrionado; 250 y 100 mg/Kg pollo
D-glucosamina	800 y 400 μ g/ml para fibroblastos; 2000 y 1000 μ g/huevo embrionado; 250 y 100 mg/Kg pollo
Rifampicina	100, 50 y 10 μ g/ml para fibroblastos; 250 y 100 mg/Kg pollo
Rifamicina	10 y 5 μ g/ml para fibroblastos; 250 y 100 mg/Kg pollo
Bleomicina	50, 10 y 5 ng/ml para fibroblastos; 6 y 3 mg/Kg pollo

1.3. Ensayos de infectividad viral

Dado que los virus utilizados en este trabajo son habitualmente empleados en nuestro laboratorio, tenemos un perfecto conocimiento de los datos de infectividad, titulación

y preparación de las dosis infectivas para cultivos celulares y letales para huevos embrionados o pollos. Así, en cada caso, al exponer los resultados iremos indicando las dosis infectivas o letales utilizadas.

1.4. Control del sistema para una interacción virus-quimioterápico.

Antes de iniciar el estudio del efecto antiviral de los distintos quimioterápicos hemos querido ensayar para dos virus representantes de cada clase de mixovirus, FPV como "ortho" y NDV como "para", frente a una de las sustancias (cromomicina) y empleando los dos sistemas biológicos que habríamos de ensayar.

El hecho de que tuvieramos ciertos antecedentes sobre la acción de la cromomicina, según se cita en la bibliografía, nos habría de permitir un mejor control de los distintos parámetros experimentales en los sistemas de ensayo.

En primer lugar estudiamos las variaciones de título hemaglutinante y capacidad infectiva de estos virus cuando se mantienen en contacto previo con la sustancia antes de producir la infección en el cultivo de fibroblastos. En resumen, el sistema de ensayo consistió en establecer diluciones volumen a volumen de la cromomicina en líquido alantoideo virus-infectado, cuyos títulos hemaglutinante e infectivo han sido previamente determinados, y después de los contactos variables a 37° C que se indican en los resultados de las figuras 18 y 19 se inocula

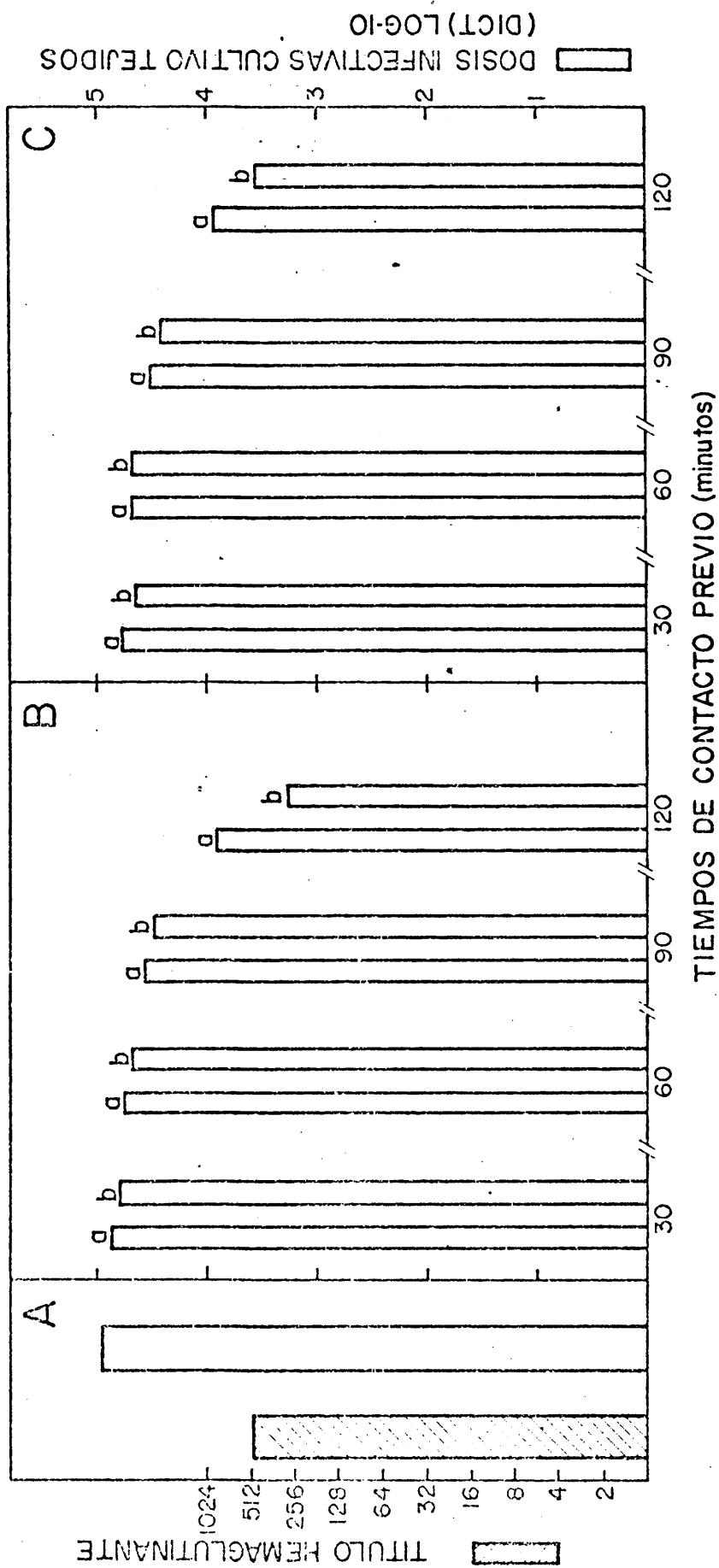


Fig. 18.- Variaciones del poder infeccioso de NDV sometido a tratamiento "in vitro" con 0,5 y 1 ng/ml (a, b respectivamente) de cromomicina durante tiempos de contacto variables. Están representados los valores testigos sin tratamiento (A), y las variaciones al cabo de 24 y 48 horas (B y C respectivamente).

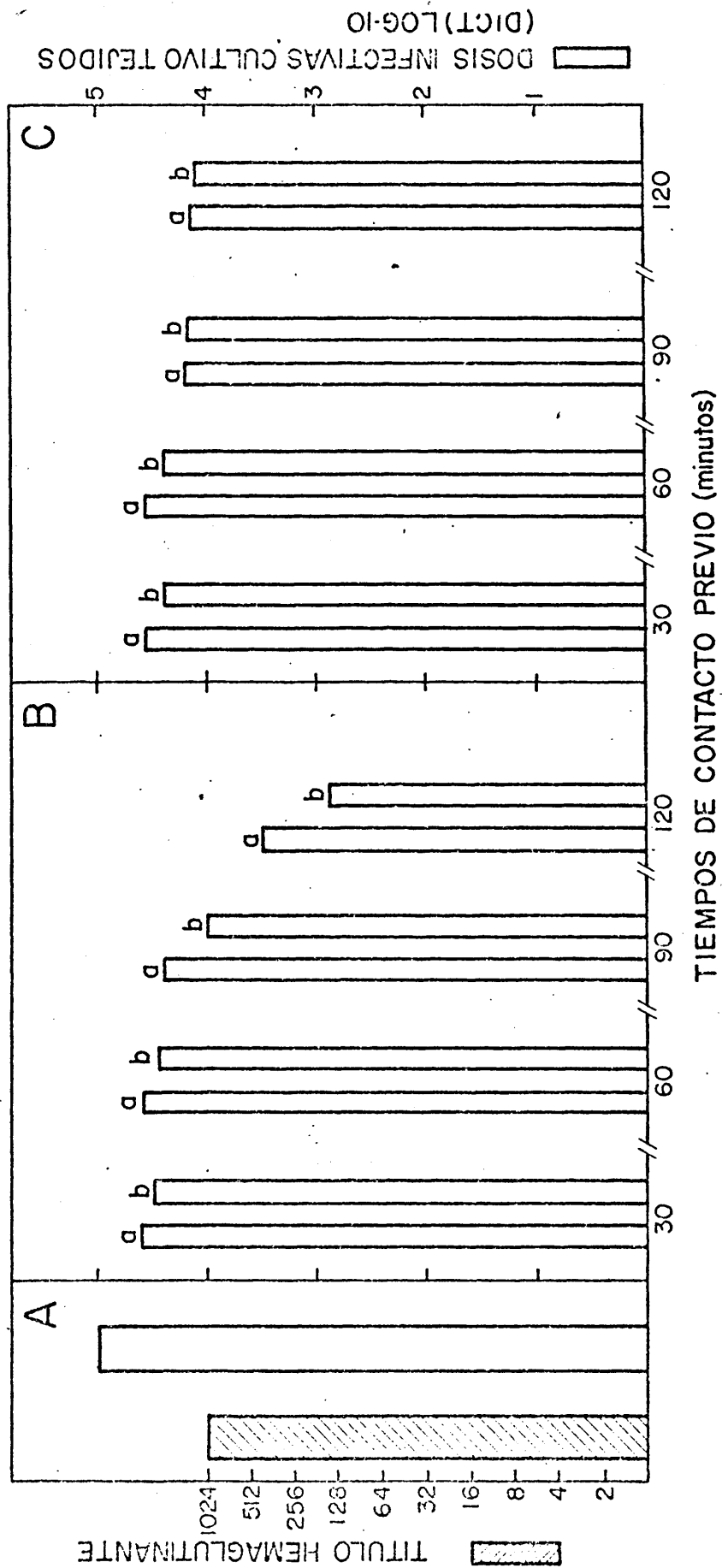


Fig. 19.- Variaciones del poder infectivo de FPV sometido a tratamiento "in vitro" con 0,5 y 1 ng/ml (a, b respectivamente) de cromomicina durante tiempos de contacto variables. Están representados los valores testigos sin tratamiento (A) y las variaciones al cabo de 24 y 48 horas (B y C respectivamente).

a los cultivos de fibroblastos para determinar al cabo de 24 y 48 horas las variaciones en el poder infectivo. En series aparte se determinan las posibles modificaciones que se hayan podido producir en el título hemaglutinante del virus contenido en el líquido alantoideo durante estos contactos previos con cromomicina. Dichos resultados no aparecen reflejados en las figuras puesto que no obtuvimos apenas variación en el nivel de títulos hemaglutinantes.

Como puede verse en las figuras anteriores aparece una cierta actividad antiviral frente a ambos virus ND (Fig. 18) y FP (Fig. 19) que es mas patente al cabo de 24 horas y para contactos de 90 y 120 minutos, observándose asimismo discretas diferencias proporcionales a la dosis de antibiótico utilizado.

Cabría pensar, dado los resultados obtenidos para los títulos hemaglutinantes -para los que no se apreció variación- que esta actividad está condicionada a una acción "in vivo" por mínimas concentraciones de substancia asociada al virus y que son inoculados junto con él a los fibroblastos en la segunda fase del ensayo.

Cuando este tipo de experiencias se realiza sobre series de huevos embrionados se obtuvieron los resultados que se indican en el cuadro IX. Las condiciones experimentales son idénticas a las señaladas para fibroblastos aunque utilizando tan sólo una dosis de cromomicina para la fase de contacto previo en líquido alantoideo (1 ng) y la infección se realizó con 0,2 ml del material infectante así tratado; las inoculaciones fueron efectuadas en saco alantoideo y los resultados se anota-

CUADRO IX.- Variaciones en el título hemaglutinante y poder infectivo de NDV y FPV, ensayados en huevos embrionados, en presencia de 1 ng de cromomicina.

Virus	Tipo de ensayo	Testigo sin tratamiento	Tiempos de contacto previo con la cromomicina (en minutos)			
			30	60	90	120
ND	HA	1024	1024	1024	1024	1024
	DLE*	5	4,8	5,1	3,6	3,5
FP	HA	512	512	512	256	256
	DLE*	5	5	4,8	4,5	3,2

* Las DLE₅₀ están expresadas en exponente de base 10.

ron a las 24 y 48 horas pero los datos del cuadro están referidos a totales acumulativos de las 48 horas.

Según estos resultados la acción, una vez mas parece producirse "in vivo" puesto que apenas hay variaciones significativas en el título hemaglutinante y la disminución de infectividad tampoco guarda una estrecha relación con el tiempo de contacto sobre todo para el NDV. De este modo pusimos a punto ambos tipos de ensayos biológicos sobre cultivos celulares y huevos embrionados, al mismo tiempo que comprobamos la acción de un antibiótico inhibidor de la síntesis de ácidos nucleicos.

2. Estudios sobre actividad antiviral

A la vista de los resultados obtenidos en las pruebas que preceden hemos considerado oportuno ensayar los quimioterápicos adamantano, amantadina y D-glucosamina en sistemas de huevos embrionados, puesto que la lectura de resultados parecía mas demostrativa y una vez encontradas condiciones mas facilmente determinables de actividad biológica antiviral acudiamos al ensayo sobre cultivos celulares.

2.1. Ensayo de quimioterápicos actuando en estados tempranos de la infección viral.

Para este propósito acudimos al ensayo de moléculas del tipo adamantano y amantadina. En los histogramas representados en la Fig. 20 se recogen todos los datos del efecto de tratamiento, sobre FPV, con adamantano durante 1 hora (A), 2 horas (B) y 4 horas (C) a distintas temperaturas de contacto "in vitro" para las cuatro concentraciones del quimioterápico que se indican en la figura.

De la misma manera se realizaron experiencias sobre NDV (Fig. 21), Sendai (Fig. 22) e influenza (Fig. 23) con vistas a determinar si aparecían variaciones de comportamiento que estuvieran condicionadas por diferencias en la naturaleza del virus.

Pese al gran número de ensayos efectuados y al extremo cuidado mantenido en la determinación de los datos, los resultados obtenidos carecen de significación y no fueron en absoluto alentadores. Como puede verse, las escasas diferencias de aumento de tiempo en supervivencia que aparecen en algunas experiencias (sobre todo en la dosis de 1000 γ /0,2 ml) no resultan confirmadas por el resto en que, en ocasiones, no existen diferencias y otras veces es ligeramente mayor la supervivencia en embriones no tratados que en los tratados.

En cualquier caso si nos parece observar que los incrementos en el tiempo de 2 a 4 horas carece de significación y que los virus FP y ND (Figs. 20 y 21 respectivamente) son algo más resistentes a la acción del adamantano -sobre todo el FPV- que los Sendai e influenza (Figs. 22 y 23 respectivamente).

En cuanto a la influencia de la temperatura mantenida durante el contacto virus-quimioterápico parece observarse -como tendencia- que la de 37° C es la que resulta algo más efectiva.

Por último, en relación con las dosis de quimioterápico empleado, la mayor frecuencia de resultados indicativos de una ligera actividad apareció siempre para la concentración de 1000 γ /0,2 ml para los cuatro virus ensayados.

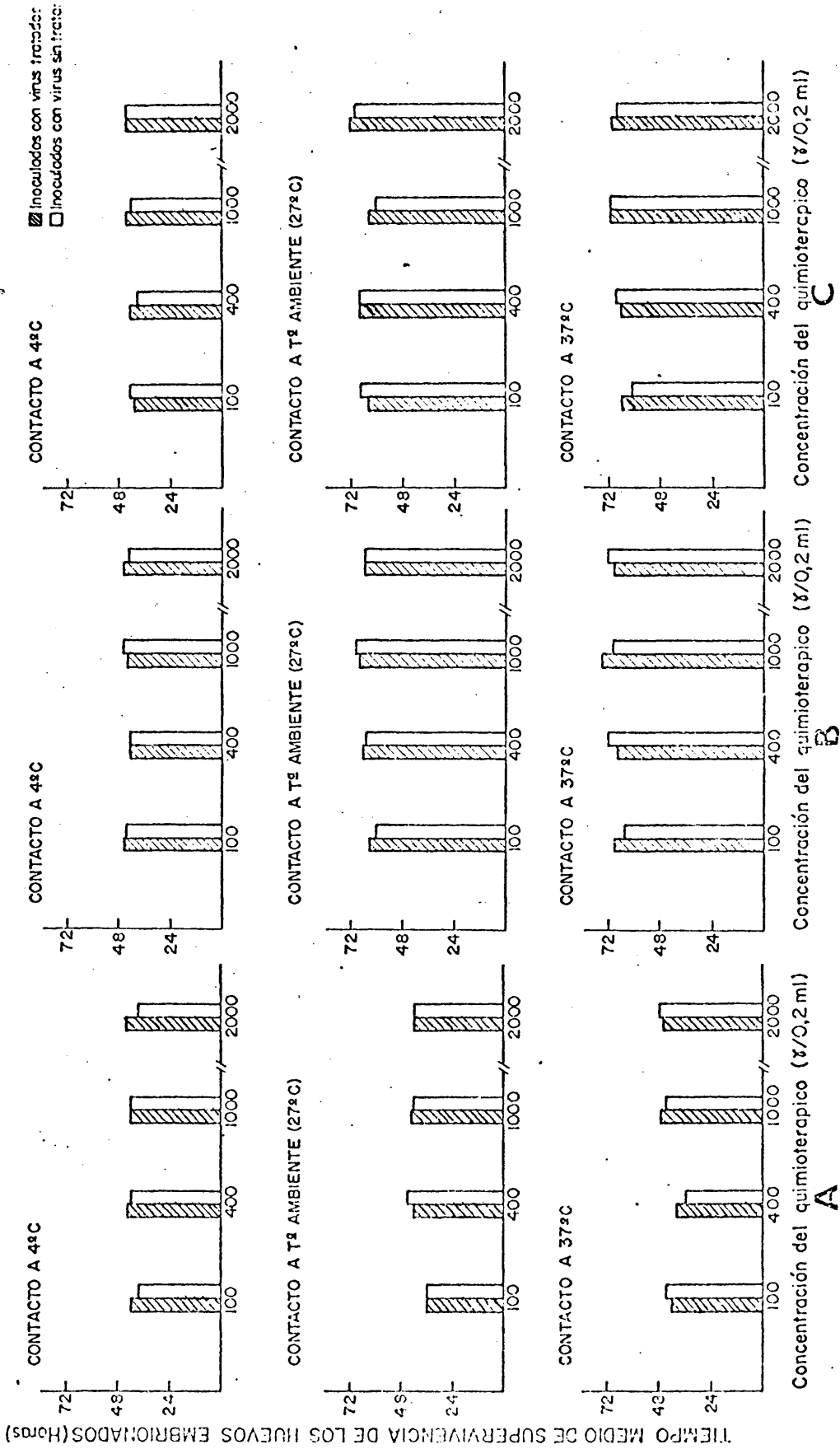


Fig. 21.- Efectos por contacto "in vitro", a varias temperaturas, de distintas concentraciones de adamantano sobre NDV (10³ DLE₅₀) inoculado en huevos embrionados a dosis de 0,2 ml.

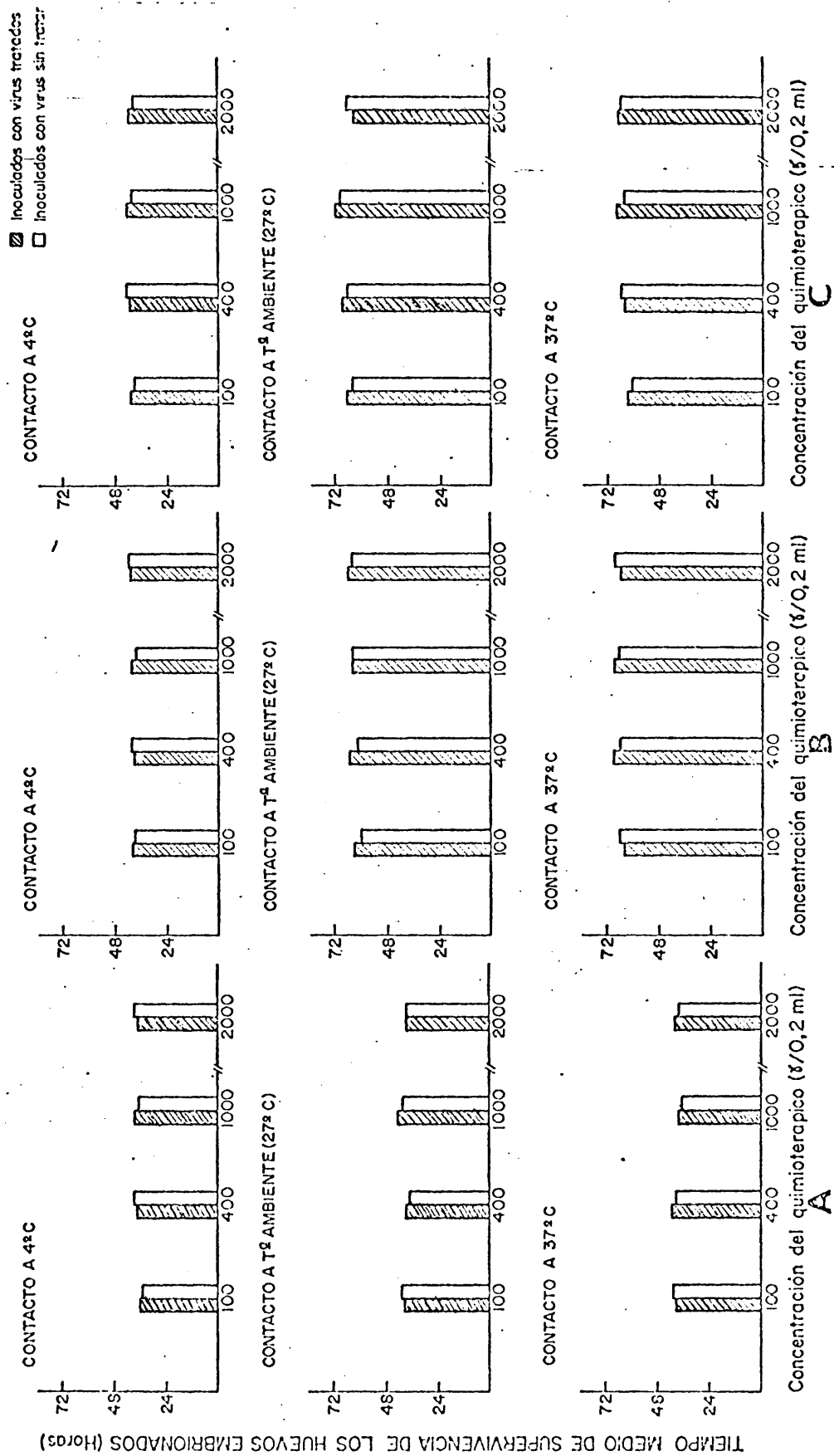


Fig. 22.- Efectos por contacto "in vitro", a varias temperaturas, de distintas concentraciones de adamantano sobre virus Sendai (10^3 DLE₅₀) inoculado en huevos embrionados a dosis de 0,2 ml

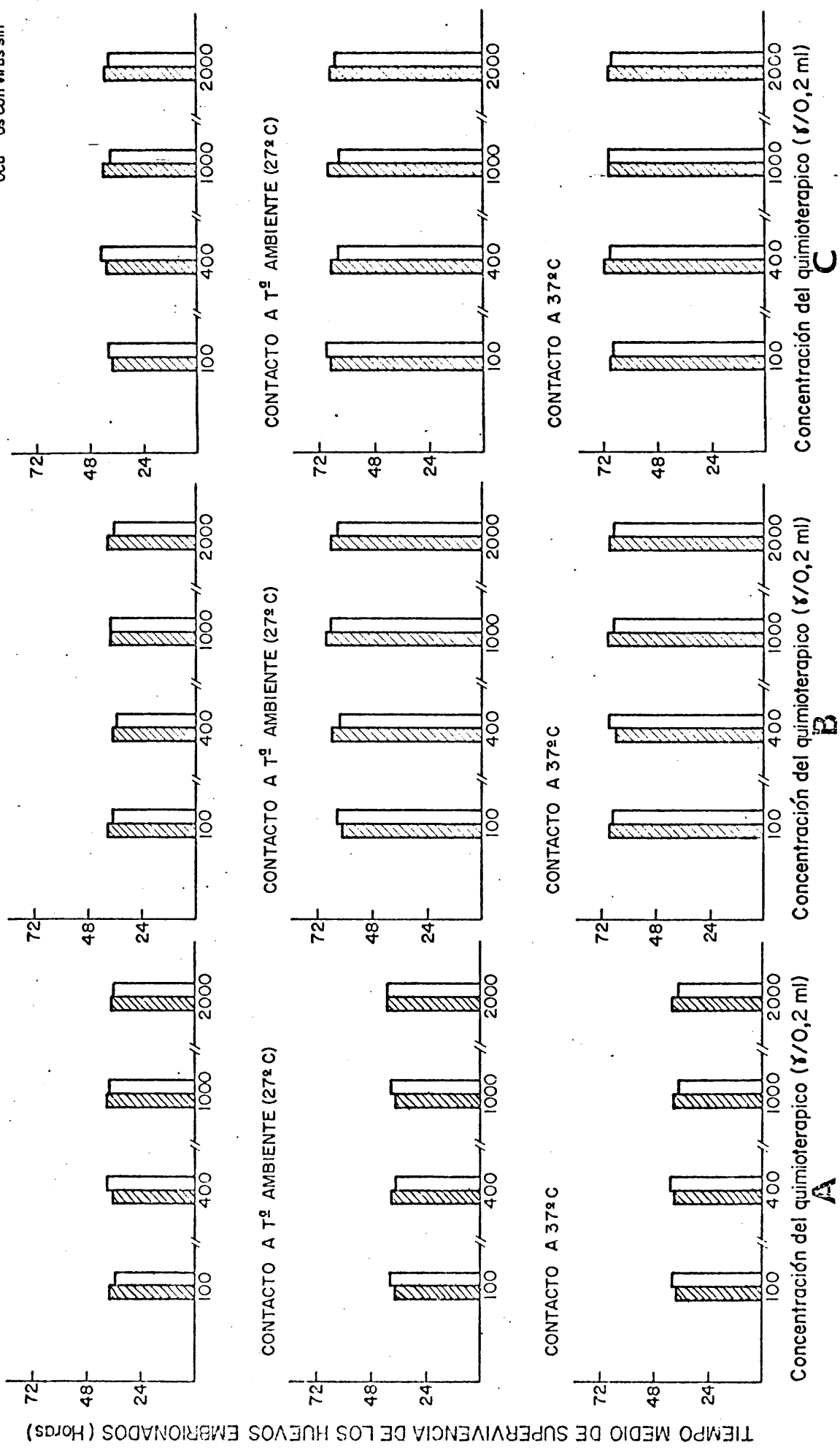


Fig. 23.- Efectos por contacto "in vitro", a varias temperaturas, de distintas concentraciones de adamanano sobre virus influenza (10³ DLE50) inoculado en huevos embrionados a dosis de 0,2 ml

Procedimiento similar de estudio fue el que seguimos con amantadina en experiencias de contacto con FPV (Fig. 24), NDV (Fig. 25), Sendai (Fig. 26) e influenza (Fig. 27) y consideraciones análogas las que se obtuvieron comparadas con el adamantano. Nos parece observar una cierta tendencia hacia la amantadin-sensibilidad en los virus influenza y Sendai sobre todo en los tratamientos correspondientes a 4 horas y a 37° C de temperatura.

A la vista de los resultados para experiencias de contacto directo "in vitro" entre virus y quimioterápico iniciamos otro tipo de pruebas en las que se ensayaron estas mismas sustancias (adamantano y amantadina) sobre FPV y NDV como representantes de ortho y paramixovirus respectivamente.

El tipo de ensayo que consideramos idóneo para poder dilucidar de una manera definitiva si existe actividad de estas sustancias frente a los virus indicados consistió en una modalidad de pruebas "in vivo" sobre huevos embrionados de 10 días.

Estos embriones fueron sometidos a un tratamiento preventivo con adamantano (600 μ /0,2 ml) y amantadina (400 μ /0,2 ml) a 37° C y tiempos variables (1, 2, 3 y 4 horas respectivamente). En estas condiciones los huevos embrionados se incubaron con las dos dosis infectivas que se señalan en los resultados y se volvieron a incubar a 37° C controlando los resultados cada 12 horas en función de la mortalidad de los embriones anotándolos como índices acumulativos según se indica en las figuras 28 y 29 que corresponden a adamantano y amantadina respectivamente.

■ Inoculados con virus tratados
□ Inoculados con virus sin tratar

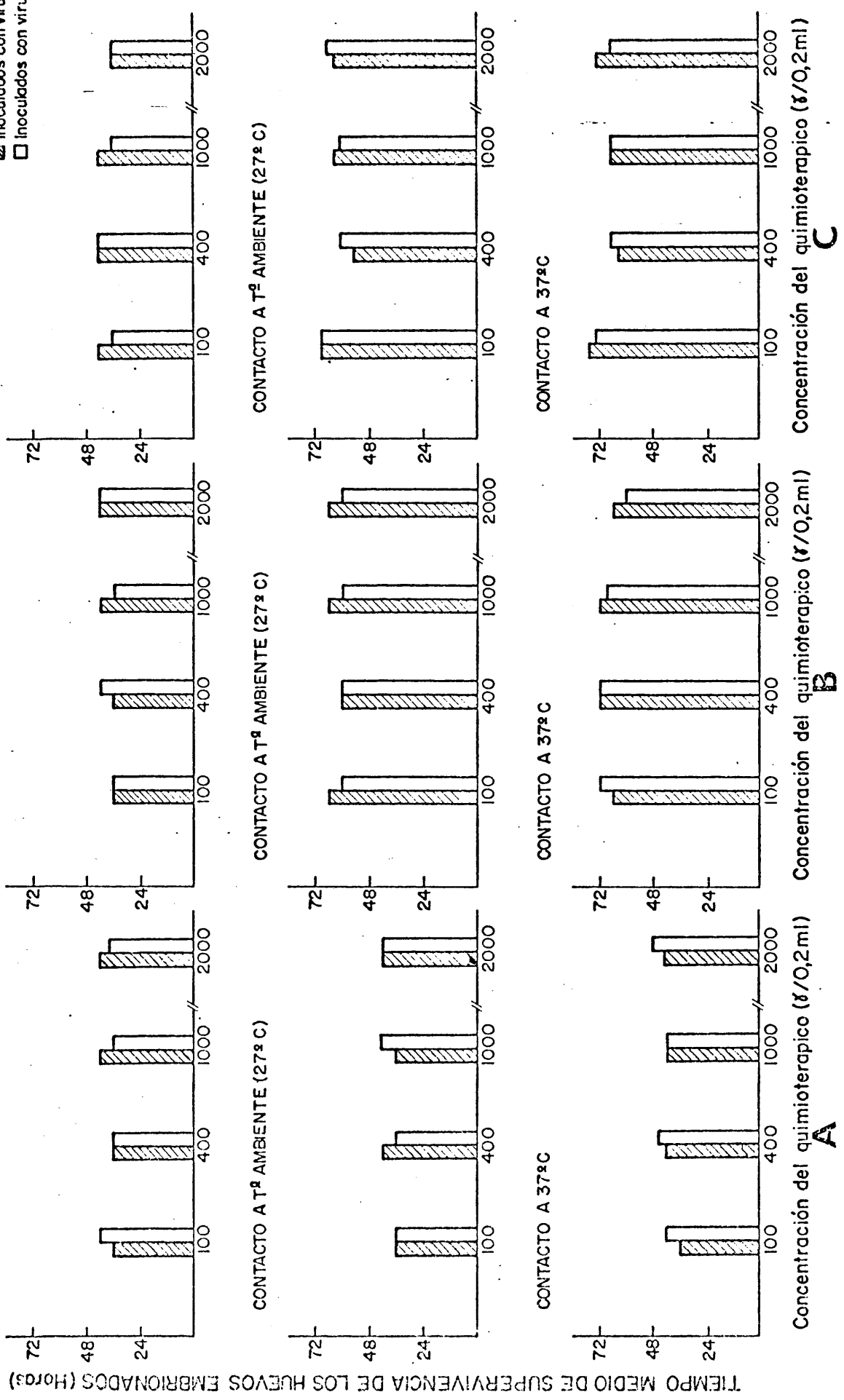


Fig. 24.- Efectos por contacto "in vitro", a varias temperaturas, de distintas concentraciones de adamantadina sobre FPV (10³ DLE50) inoculado en huevos embrionados a dosis de 0,2 ml.

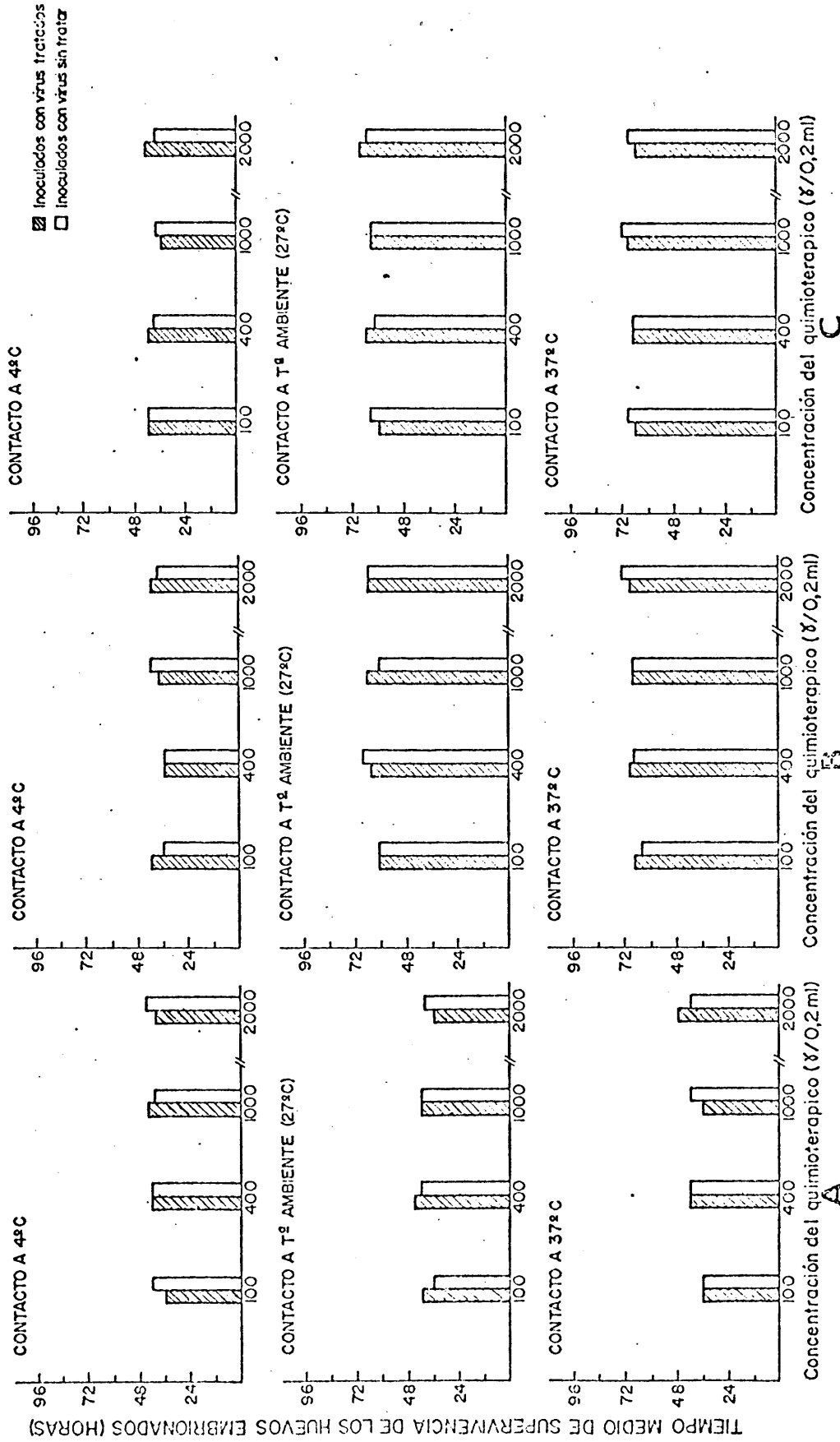


Fig. 25.- Efectos por contacto "in vitro", a varias temperaturas, de distintas concentraciones de amantadina sobre NDV (10^3 DLE₅₀) inoculado en huevos embrionados a dosis de 0,2 ml

■ Inoculados con virus tratados
 □ Inoculados con virus sin tratar

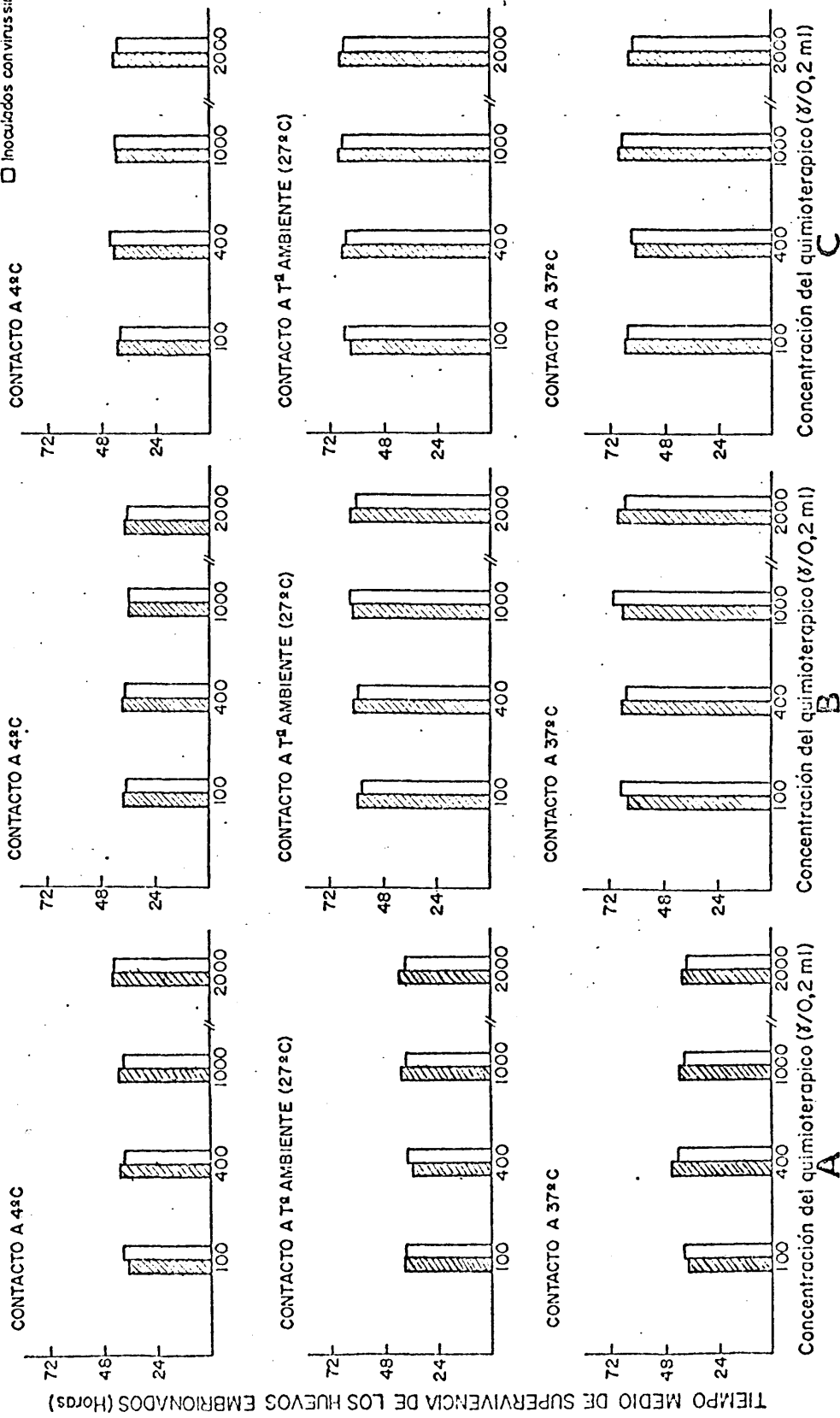


Fig. 26.- Efectos por contacto "in vitro", a varias temperaturas, de distintas concentraciones de amantadina sobre Sendai (10^3 D₅₀) inoculado en huevos embrionados a dosis de 0,2 ml.

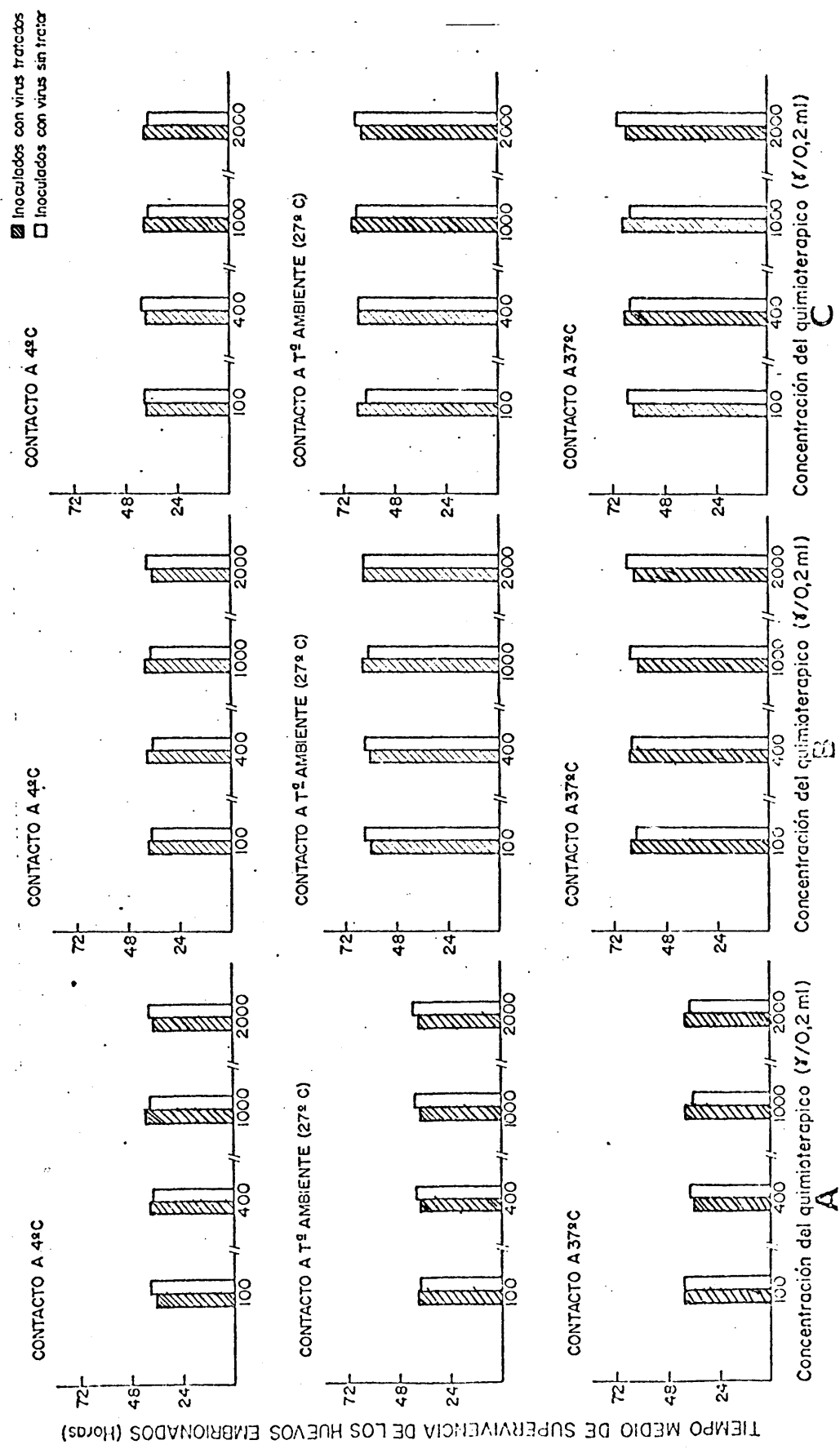


Fig. 27.- Efectos por contacto "in vitro", a varias temperaturas, de distintas concentraciones de amantadina sobre virus influenza (10³ DLE₅₀) inoculado en huevos embrionados a dosis de 0,2 ml.

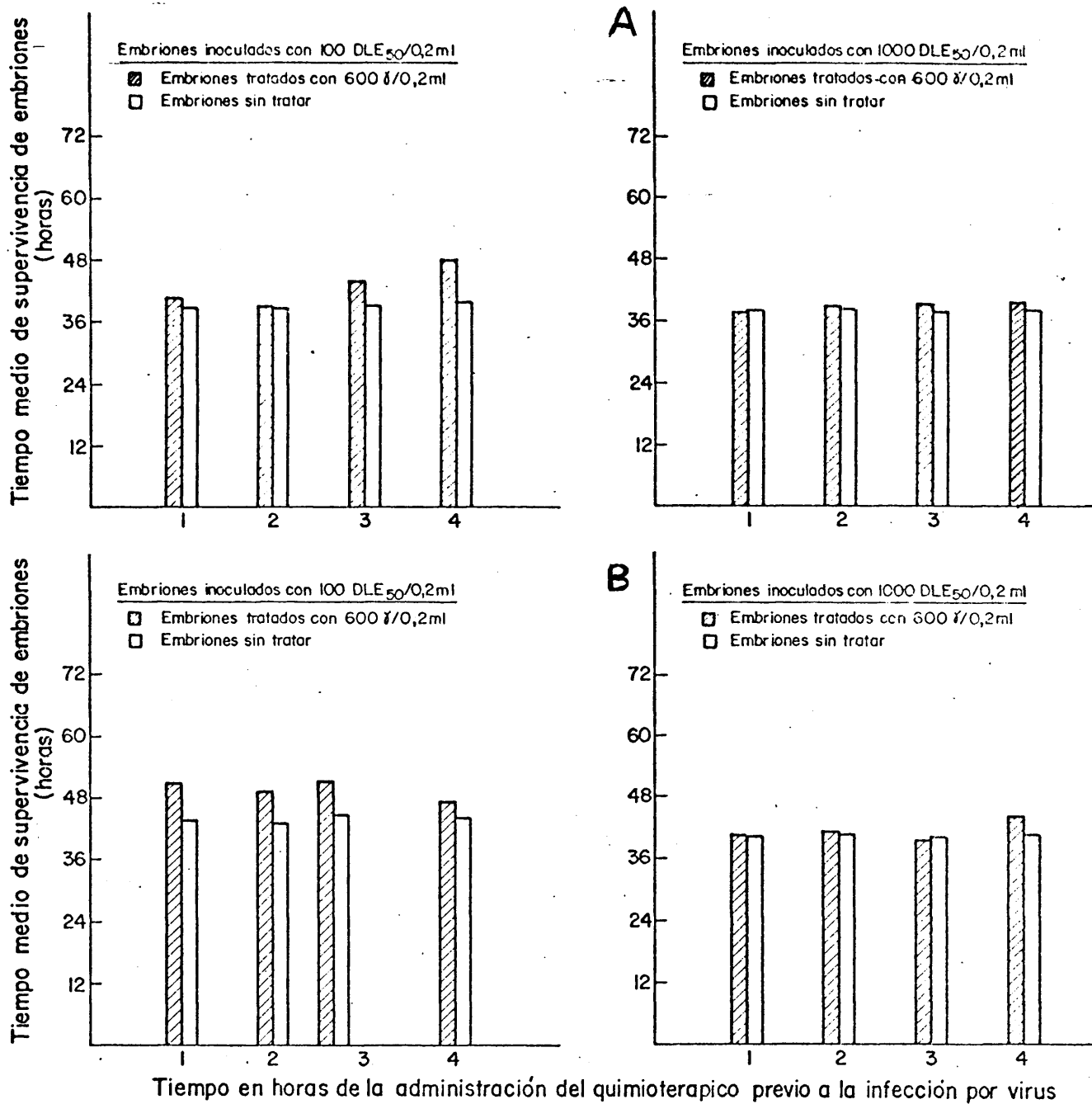


Fig. 28.- Efectos de distintos tratamientos previos con adamantano (600 μ /0,2 ml) sobre 10^2 y 10^3 DLE₅₀ de FPV (A) y NDV (B) contenidos en 0,2 ml e inoculados en huevos embrionados de 10 días.

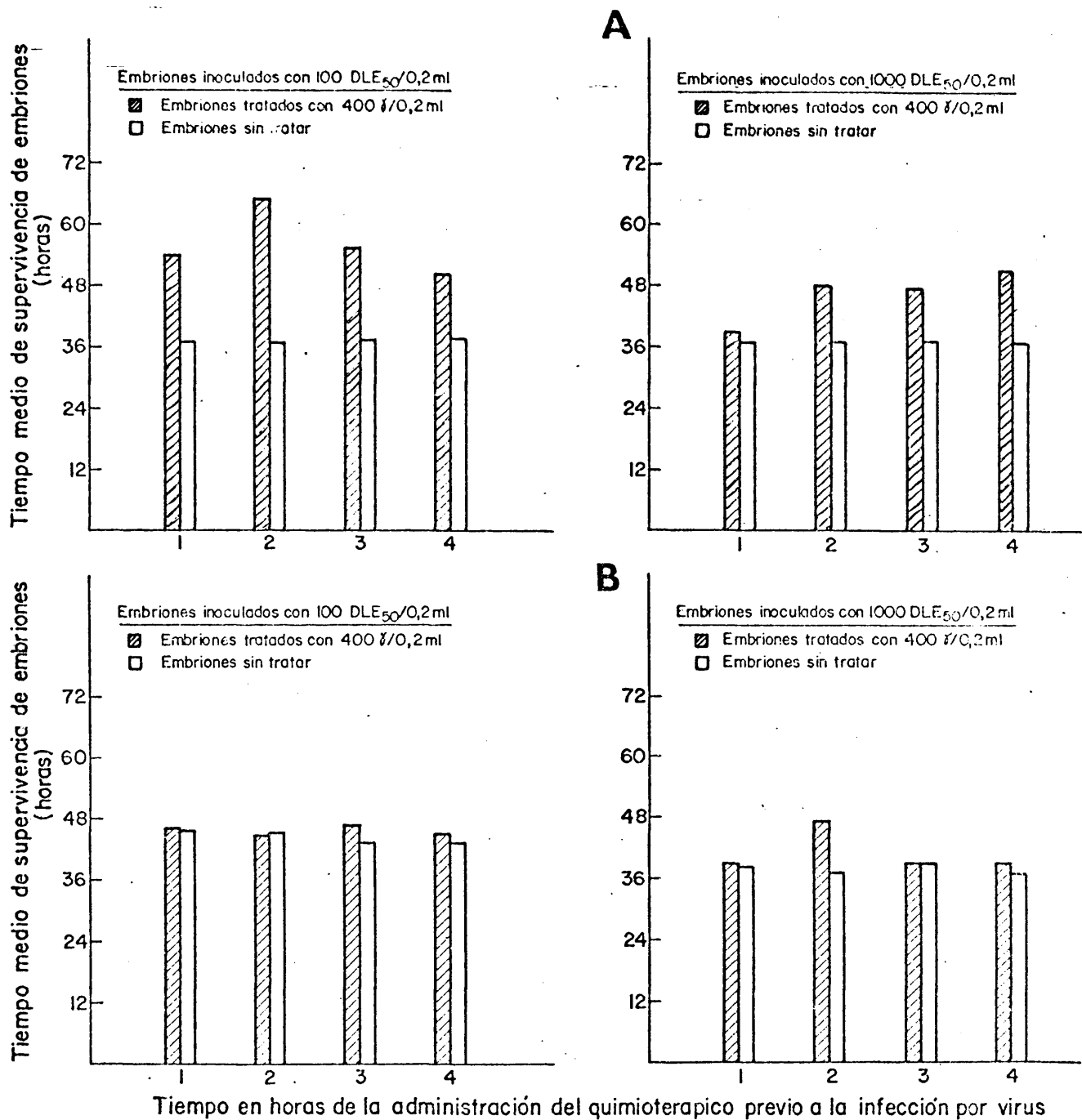


Fig. 29.- Efectos de distintos tratamientos previos con amantadina (400 µ/0,2 ml) sobre 10^2 y 10^3 DLE₅₀ de FPV (A) y NDV (B) contenidos en 0,2 ml e inoculados en huevos embrionados de 10 días.

Al considerar los resultados comparativamente entre ambas sustancias y virus parece claro que la amantadina es mas activa que el adamantano sobre todo en FPV; máxime teniendo en cuenta que de esta última se utilizaron concentraciones mas altas.

Asimismo se aprecia diferencias de actividad en función de la dosis infectiva utilizada ya que los resultados de protección antiviral son mucho más patentes cuando se utilizan 100 DLE.

Para las experiencias de amantadina y FPV parece observarse una ligera ventaja en las protecciones previas de dos horas de intervalo.

2.2 Ensayo de quimioterápicos que actúan a nivel de revestimiento del virión

Para este propósito realizamos experimentos con aminoazúcares tales como la D-glucosamina y la D-galactosamina, pero dándose la circunstancia de que esta última presentaba una acusada toxicidad, los ensayos definitivos fueron realizados tan sólo con D-glucosamina.

En primer lugar se realizaron experimentos de contacto "in vitro", según es habitual en nuestro laboratorio, de acuerdo con un protocolo experimental análogo al realizado con adamantano y amantadina.

Los datos obtenidos quedan representados para los distintos virus utilizados en la Fig. 30 (FPV), Fig. 31 (NDV), Fig. 32 (Sendai) y Fig. 33 (influenza).

Al considerar los datos obtenidos vemos que también a este nivel de acción antiviral los experimentos "in vitro" son poco demostrativos ya que aunque se aprecian algunas tendencias de protección en ciertos lotes de los ensayados estos resultados son de una positividad escasa y se producen aleatoriamente con independencia de la temperatura de contacto y la dosis. Ello hizo que acudieramos a otros tipo de experimentos en los que el tratamiento con D-glucosamina se hacía "in vivo" por inoculación previa de la substancia en huevos embrionados a intervalos diferentes de 1, 2, 3 y 4 horas antes de la infección con el virus correspondiente.

En serie de experimentos de protección "in vivo" se introdujo como otro parámetro variable la potencia infectante del virus modificando su dosificación expresada en DLE_{50} ; así se utilizaron según se puede ver en los resultados 10^2 y 10^3 DLE_{50} de virus FP y ND como representantes de ortho y paramixovirus.

En la figura 34 se pueden observar los primeros resultados de estos experimentos de protección "in vivo" sobre huevos embrionados.

De los datos obtenidos que anteceden se puede observar una cierta capacidad protectora antiviral de la D-glucosamina. Esta acción es algo mas patente para el FPV y desde luego con ambos virus se aprecia claramente la influencia de la dosis

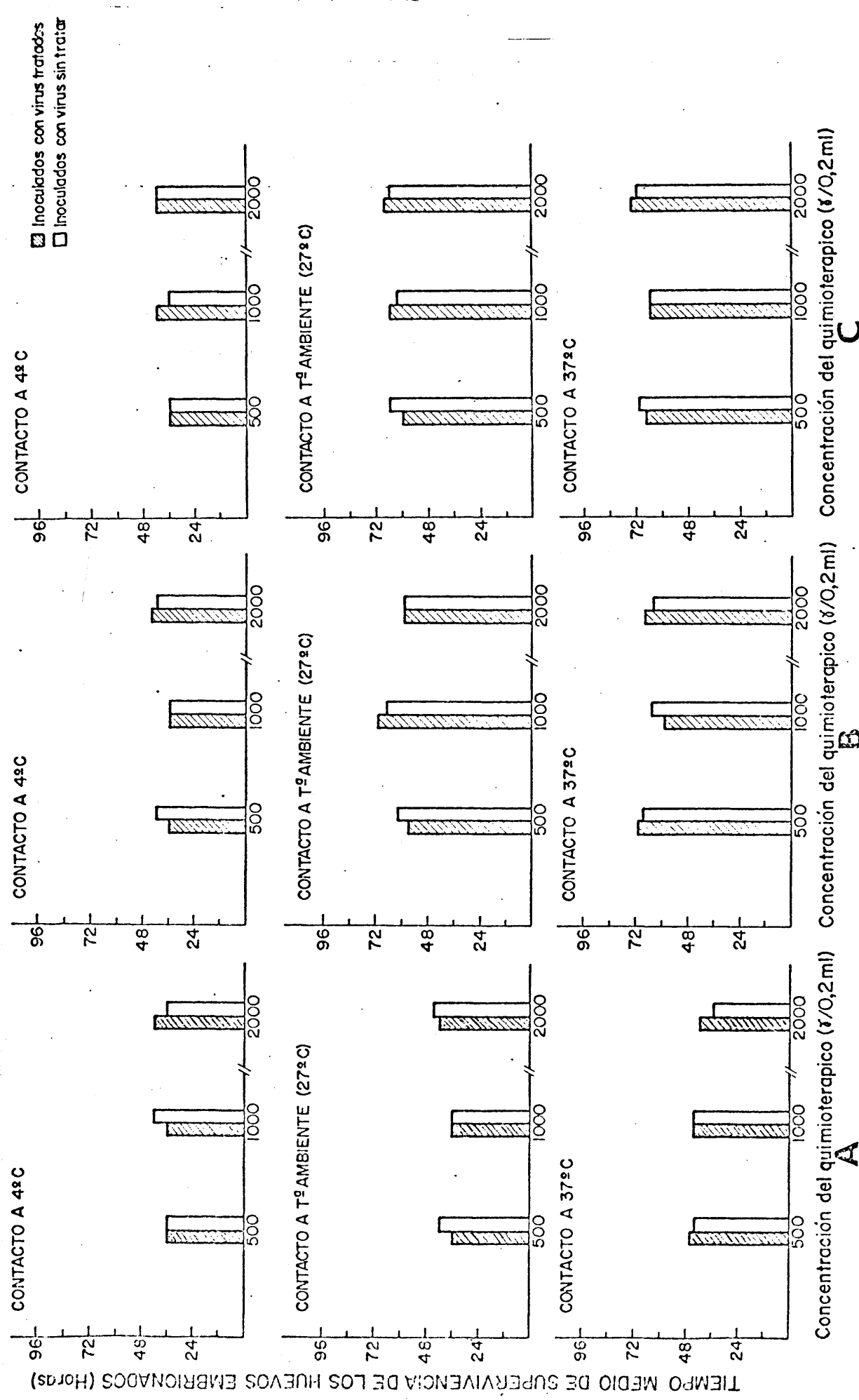


Fig. 30.- Efectos por contacto "in vitro", a varias temperaturas, de distintas concentraciones de D-glucosamina sobre FPV (10³ DLE₅₀) inoculado en huevos embrionados a dosis de 0,2 ml

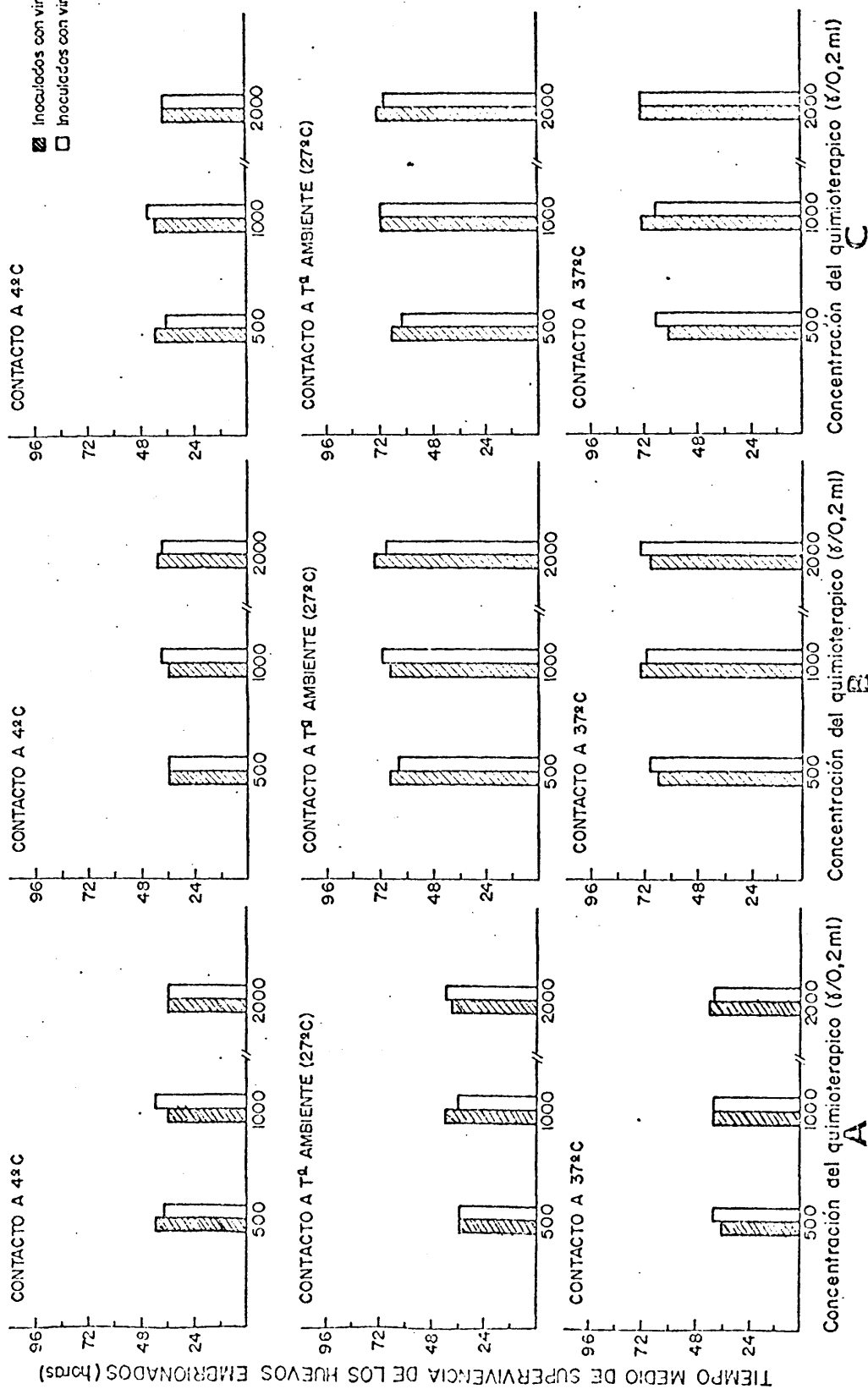


Fig. 31.- Efectos por contacto "in vitro", a varias temperaturas, de distintas concentraciones de D-glucosamina sobre NDV (10³ DLE₅₀) inoculado en huevos embrionados a dosis de 0,2 ml.

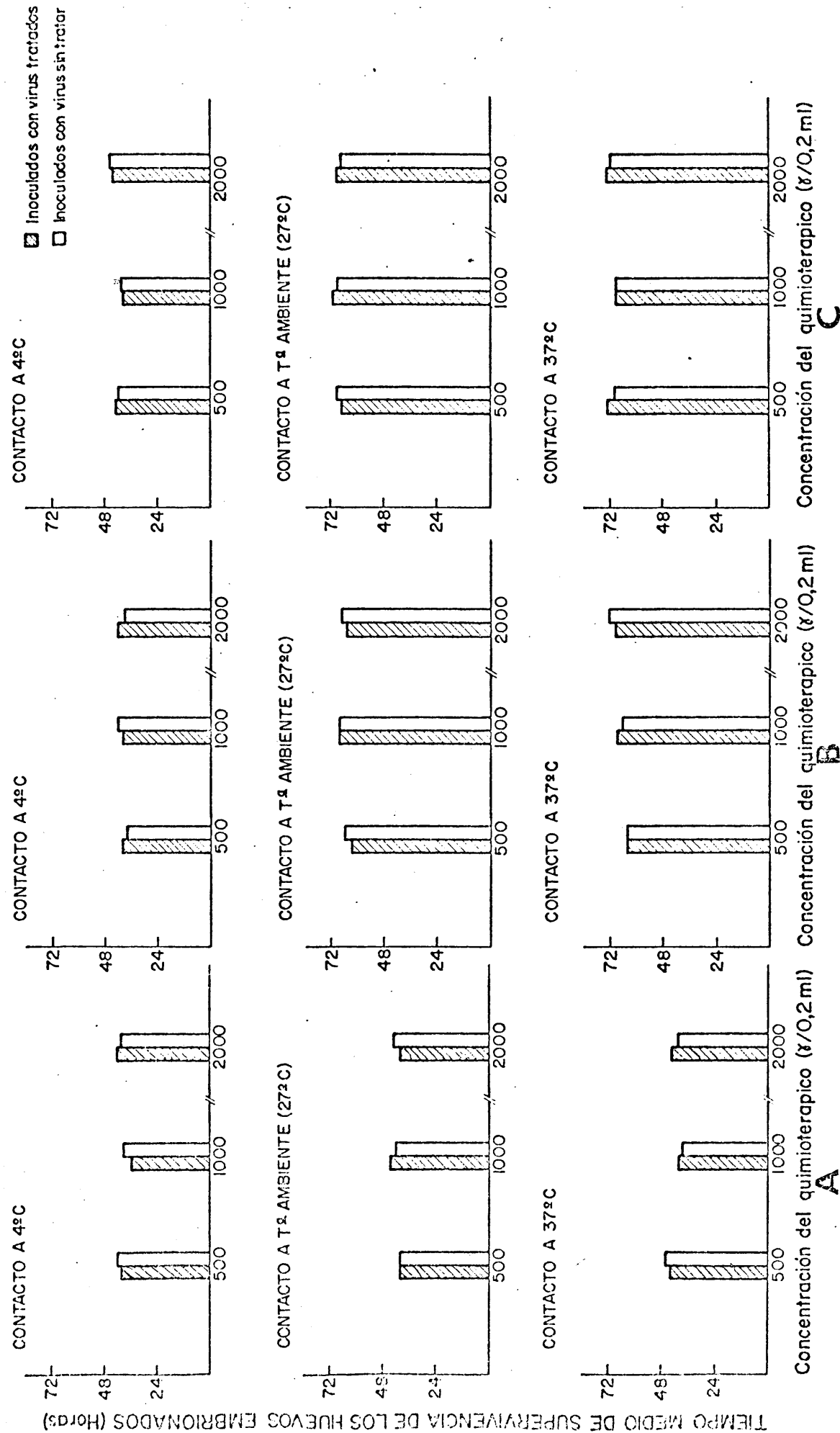


Fig. 32.- Efectos por contacto "in vitro", a varias temperaturas, de distintas concentraciones de D-glucosamina sobre virus Sendai (10^3 DLE₅₀) inoculado en huevos embrionados a dosis de 0,2 ml.

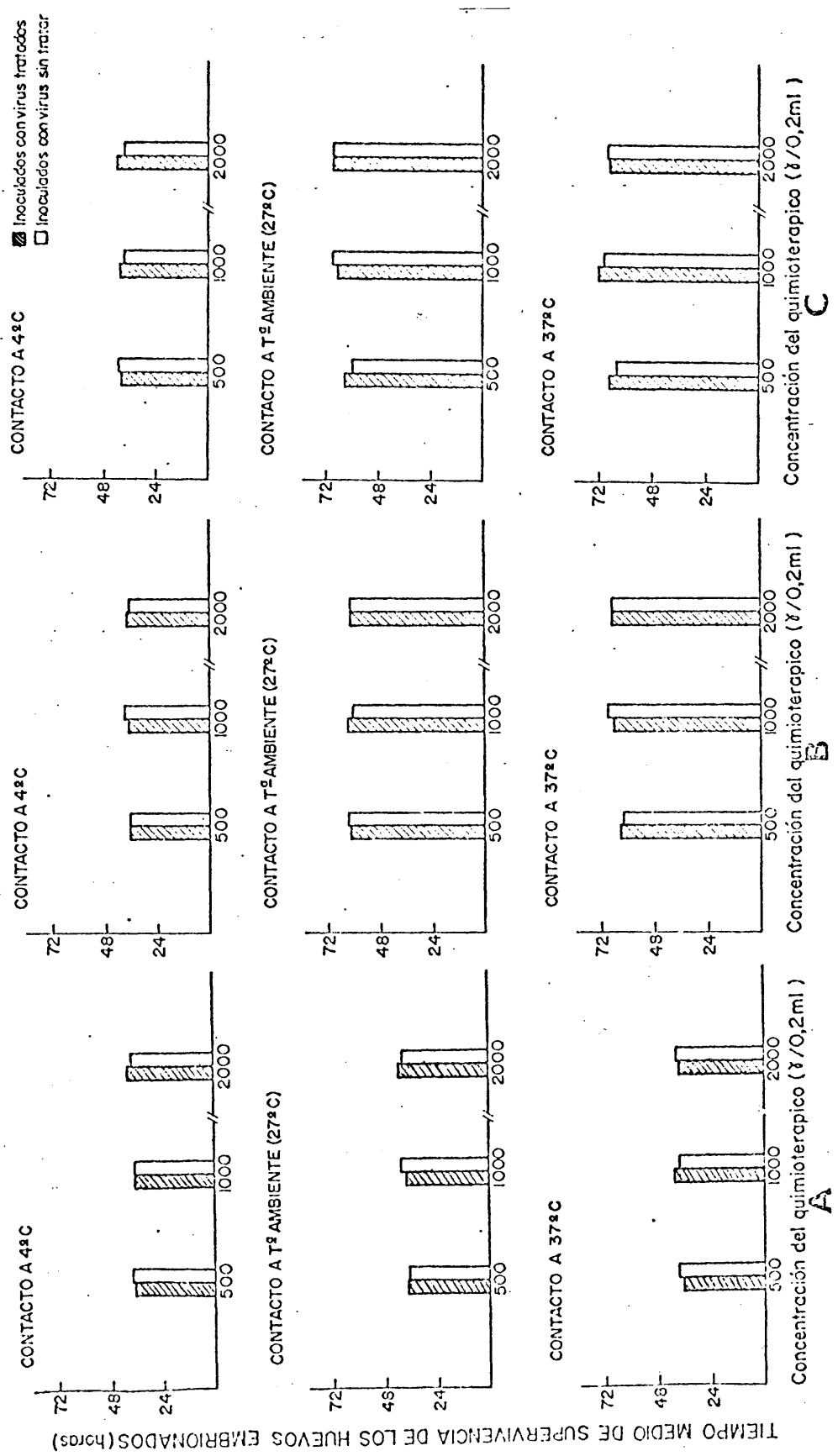


Fig. 33.- Efectos por contacto "in vitro", a varias temperaturas, de distintas concentraciones de D-glucosamina sobre virus influenza (10³ DLE₅₀) inoculado en huevos embrionados a dosis de 0,2 ml.

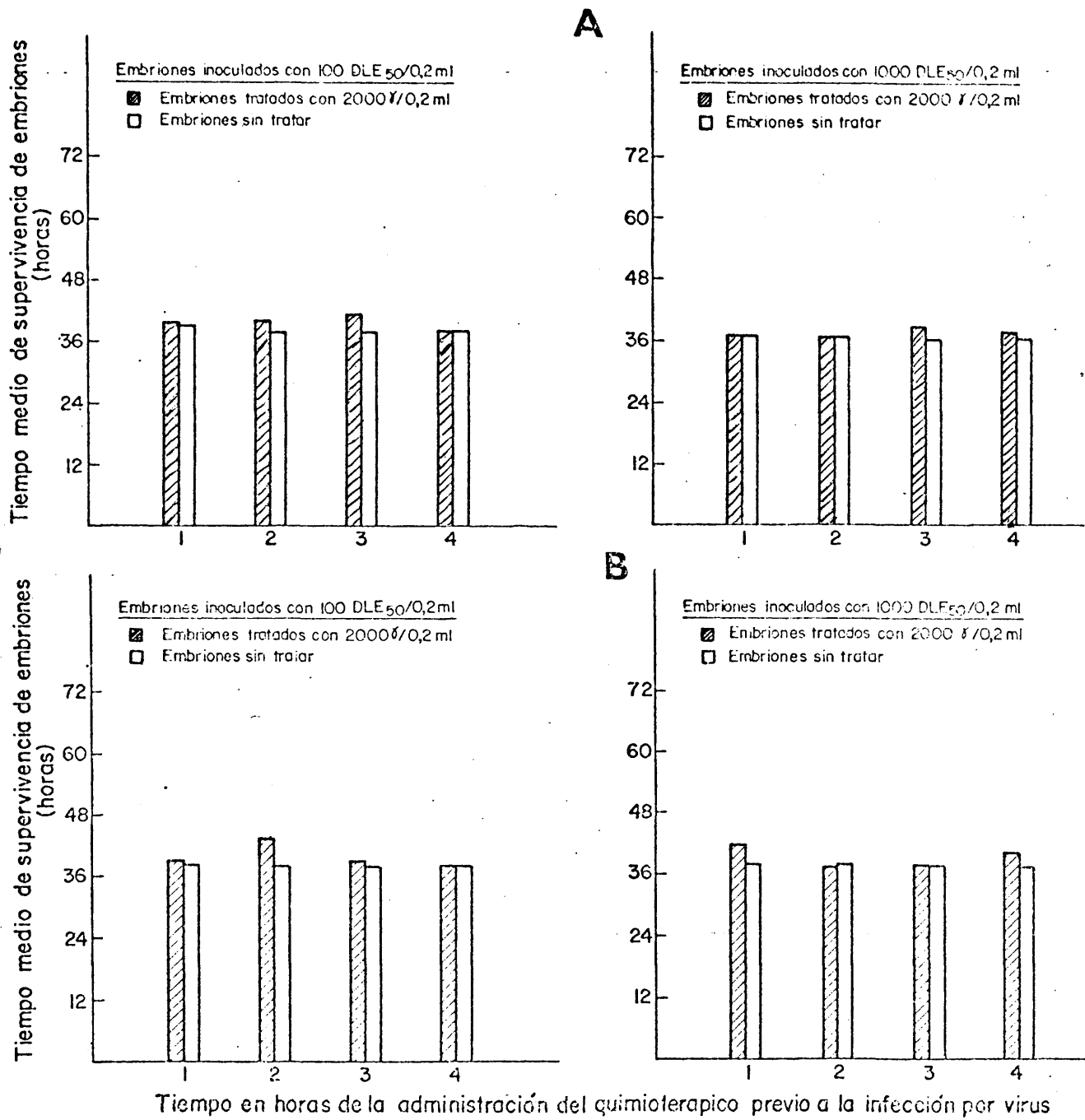


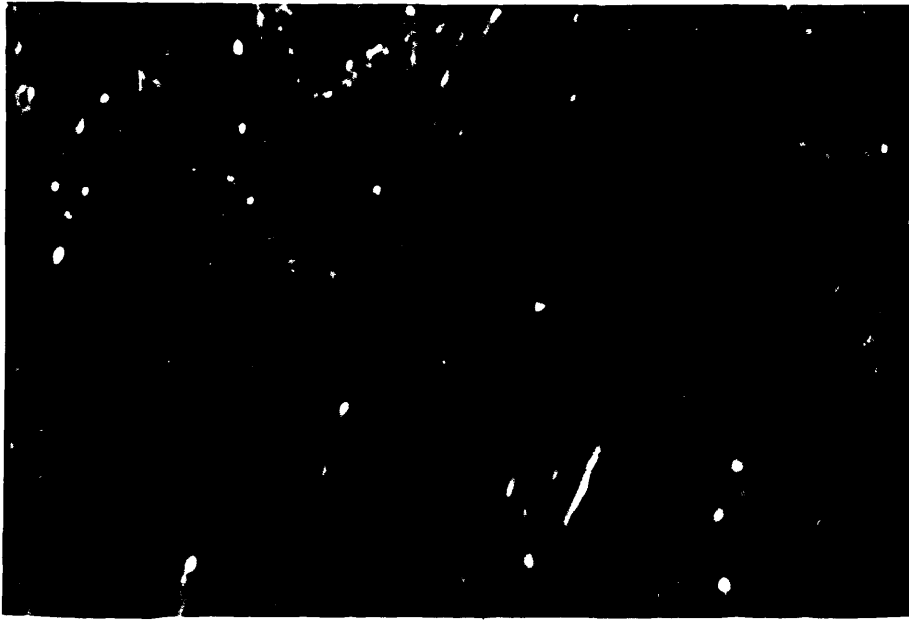
Fig. 34.- Efectos de distintos tratamientos previos de D-glucosamina (2000 μ /0,2 ml) sobre 10^2 y 10^3 DLE₅₀ de FPV (A) y NDV (B) inoculado en huevos embrionados de 10 días

infectante ya que en las series inoculadas con 10^3 DLE₅₀, la protección era prácticamente nula. De aquí que en las experiencias sucesivas utilizemos siempre la dosis infectiva de 10^2 DLE₅₀ en el caso del empleo de huevos embrionados.

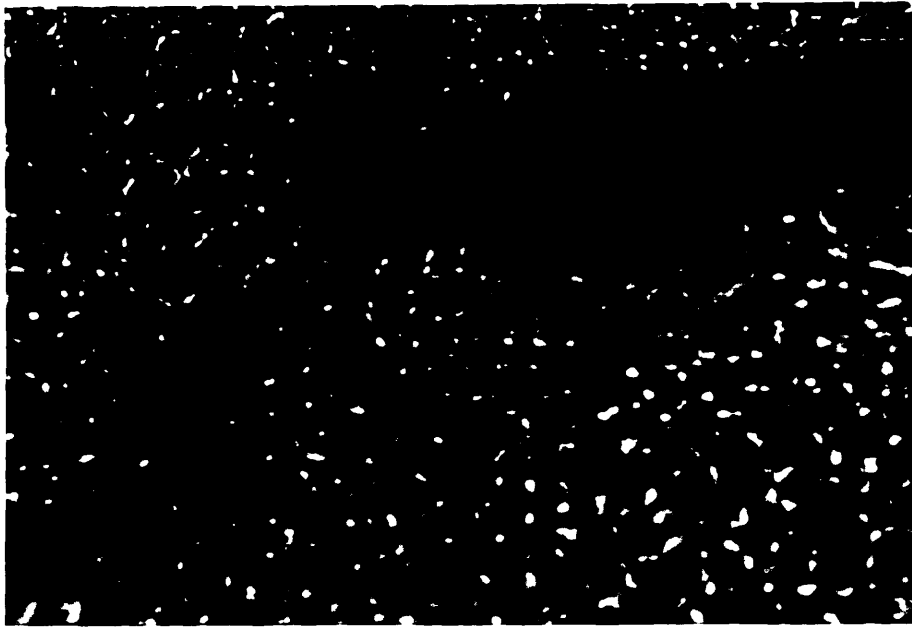
2.3. Ensayos comparativos de acción quimioterápica antiviral a distinto nivel bioquímico.

Una vez conocidos los datos que preceden se ha pretendido hacer estudios simultáneos en los tres quimioterápicos para poder establecer un examen comparativo entre los dos mecanismos de acción antiviral, a nivel de los estados tempranos de infección y la fase de recubrimiento viral. Estos ensayos se realizaron mediante diferentes pruebas de protección sobre fibroblastos y sobre embriones valorando los resultados en función de variaciones en el título hemaglutinante, disminución del poder infectivo para fibroblastos o letal para embriones y en función del tiempo de supervivencia de estos últimos.

Previo a todos estos estudios tuvimos que realizar unas experiencias para la determinación del poder citopático de los distintos virus con vistas a su titulación. Estas experiencias que se llevaron a cabo de acuerdo con lo indicado en Material y Métodos dieron resultados de los que pueden servir de ejemplo la Fig. 35 en cuyas fotografías se pueden ver las variaciones que se producen en la apariencia normal de fibroblastos hasta llegar a una imagen citolítica al cabo de las 48 horas. Dichas imágenes corresponden a una infección por FPV, pero son semejantes a los que obtuvimos con cualquiera de los otros tres virus.

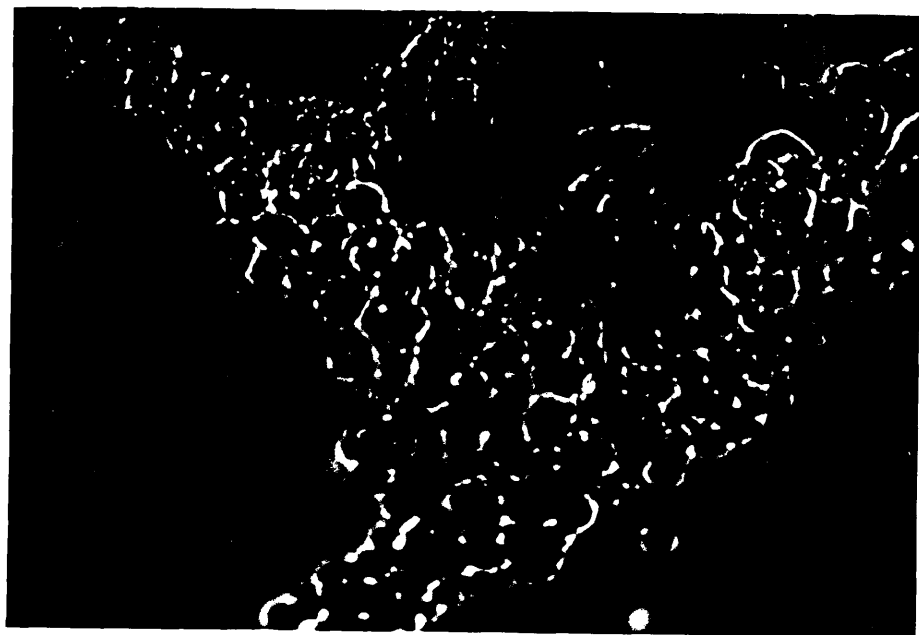


A

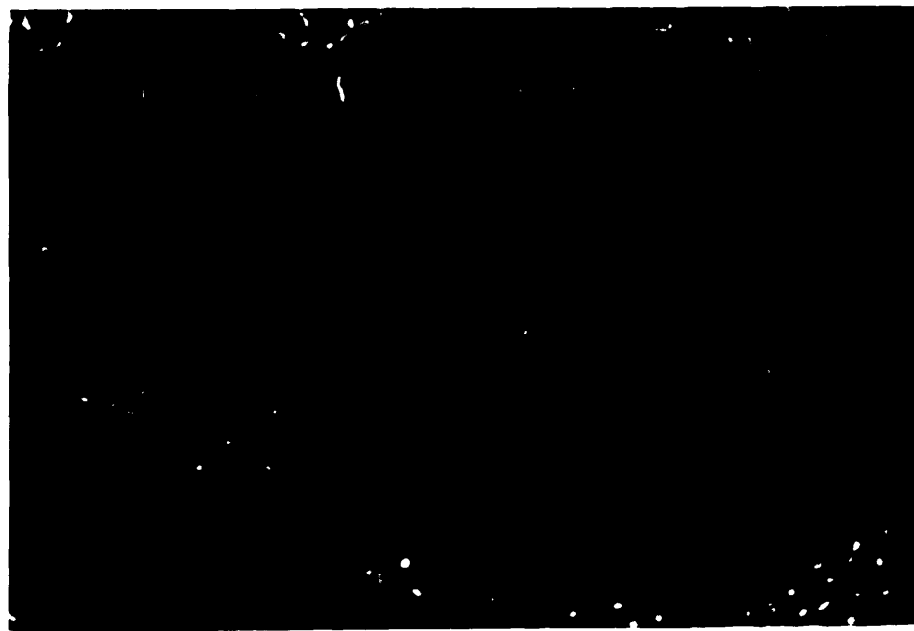


B

Fig. 35.- Variaciones en el aspecto normal (A) de fibroblastos de pollo. Infectados con FPV (10^3 DICT) al cabo de 24, 36 y 48 horas después de la infección (B, C y D respectivamente) (150 x) ver página siguiente.



C



D

Como puede verse a las 24 horas de la infección empiezan a apreciarse microzonas de lisis con alteraciones en la morfología celular; estas zonas de lisis van confluyendo hasta producir islotes de células cada vez mas degeneradas hasta quedar reducidas a istmos celulares de aspecto característico y precursores de la completa lisis celular.

En cuanto a las pruebas de protección sobre fibroblastos se utilizó un protocolo experimental consistente en establecer series de contactos de cada quimioterápico durante tiempos variables de 1 a 4 horas con el fin de conseguir que el quimioterápico llegara a la intimidad de las estructuras celulares antes de que estas hubieran de soportar la infección viral.

Los cuadros X, XI, XII y XIII recogen los resultados sobre variaciones en el título hemaglutinante de cultivos de fibroblastos infectados con FPV, influenza, NDV y Sendai respectivamente en presencia de distintas dosis de adamantano, amantadina y D-glucosamina.

Como puede verse, en términos generales resultaron mas sensibles los orthomixovirus que los paramixovirus y la acción sobre la capacidad hemaglutinante es mas intensa en el orden de D-glucosamina, amantadina y adamantano, asimismo se observa que contactos de 4 horas son los mas efectivos y tambien se aprecia en casi todos los casos un efecto proporcional a la concentración del quimioterápico.

CUADRO X.- Efectos del adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre el poder hemaglutinante del PPV (1) multiplicado en cultivos de fibroblastos de pollo en distintas condiciones experimentales.

Tiempos de incubación del sistema virus infectado mas el quimioterapico a distintas dosis (4)	Títulos hemaglutinantes (2) a distintos tiempos de contacto del quimioterapico (3) con los fibroblastos antes de la infección viral				Valores en testigos sin tratamiento	Quimioterapico empleado	
	4	3	2	1			
18 h.	50	8	16	16	16	ADAMANTANO	
	100	8	16	16			
24 h.	50	64	128	128	128		
	100	32	64	128			
48 h.	50	256	256	256	256		
	100	128	256	256			
18 h.	50	2	2	2	16		AMANTADINA
	100	2	2	2			
24 h.	50	16	16	16	64		
	100	8	8	8			
48 h.	50	128	64	128	256		
	100	64	32	32			
18 h.	400	2	2	4	8	D-GLUCOSAMINA	
	800	2	2	2			
24 h.	400	4	8	8	64		
	800	4	4	4			
48 h.	400	64	64	128	256		
	800	4	8	4			

(1) Dosis infectiva inoculada 10^2 DICT₅₀

(2) Los valores representá el título hemaglutinante de la mezcla de 5 tubos por determinación

(3) Medido en horas

(4) Las dosis se representan en χ /ml de medio de mantenimiento

CUADRO XI.- Efectos del adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre el poder hemaglutinante del influenza (1) multiplicado en cultivos de fibroblastos de pollo en distintas condiciones experimentales.

Tiempo de incubación del sistema virus infectado mas el quimioterápico a distintas dosis (4)	Títulos hemaglutinantes (2) a distintos tiempos de contacto del quimioterápico (3) con los fibroblastos antes de la infección viral				Valores en testigos sin tratamiento	Quimioterápico empleado	
	4	3	2	1			
18 h.	50	8	16	16	16	ADAMANTANO	
	100	4	8	16			
24 h.	50	16	16	32	32		
	100	16	16	32			
48 h.	50	64	64	128	128		
	100	32	64	128			
18 h.	50	0	0	2	16		AMANTADINA
	100	0	0	2			
24 h.	50	4	4	16	128		
	100	2	2	8			
48 h.	50	8	8	16	256		
	100	4	8	8			
18 h.	400	2	2	4	8	D-GLUCOSAMINA	
	800	0	0	4			
24 h.	400	4	8	16	32		
	800	4	4	4			
48 h.	400	8	16	64	128		
	800	4	8	32			

(1) Dosis infectiva inoculada 1×10^2 DICT₅₀

(2) Los valores representan el título hemaglutinante de la mezcla de 5 tubos por determinación

(3) Medido en horas

(4) Las dosis se representan en χ /ml de medio de mantenimiento.

CUADRO XII.- Efectos del adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre el poder hemaglutinante del NDV (1) multiplicado en cultivos de fibroblastos de polio en distintas condiciones experimentales.

Tiempo de incubación del sistema virus infectado mas el quimioterápico a distintas dosis (4)	Títulos hemaglutinantes (2) a distintos tiempos de contacto del quimioterápico (3) con los fibroblastos antes de la infección viral				Valores en testigos sin tratamiento	Quimioterápico empleado	
	4	3	2	1			
18 h.	50	8	8	16	8	ADAMANTANO	
	100	4	8	8			
24 h.	50	16	8	32	32		
	100	4	8	16			
48 h.	50	16	16	64	64		
	100	8	16	64			
18 h.	50	8	4	8	8		AMANTADINA
	100	4	4	4			
24 h.	50	16	16	16	16		
	100	8	8	16			
48 h.	50	32	32	32	32		
	100	16	16	32			
18 h.	400	2	2	2	4	D-GLUCOSAMINA	
	800	2	2	2			
24 h.	400	16	4	16	16		
	800	8	8	4			
48 h.	400	32	16	32	32		
	800	16	16	32			

(1) Dosis infectiva inoculada 100 DICT50
 (2) Los valores representan el título hemaglutinante de la mezcla de 5 tubos por determinación
 (3) Medido en horas
 (4) La dosis se representan en χ /ml de medio de mantenimiento

CUADRO XIII.- Efectos del adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre el poder hemaglutinante del virus Sendai (1) multiplicado en cultivos de fibroblastos de pollo en distintas condiciones experimentales.

Tiempos de incubación del sistema virus infectado mas el quimioterápico a distintas dosis (4)	Títulos hemaglutinantes (2) a distintos tiempos de contacto del quimioterápico (3) con los fibroblastos antes de la infección viral				Valores en testigos sin tratamiento	Quimioterápico empleado	
	4	3	2	1			
18 h.	50	8	8	16	16	ADAMANTANO	
	100	8	8	16			
24 h.	50	16	16	32	32		
	100	16	16	32			
48 h.	50	64	64	128	128		
	100	32	32	128			
18 h.	50	8	16	16	16		AMANTADINA
	100	4	4	8			
24 h.	50	16	32	32	32		
	100	8	8	32			
48 h.	50	32	32	64	64		
	100	16	32	64			
18 h.	400	4	4	8	8	D-GLUCOSAMINA	
	800	2	2	4			
24 h.	400	16	16	32	32		
	800	8	8	32			
48 h.	400	32	64	128	128		
	800	16	32	128			

(1) Dosis infectiva inoculada 10^2 DICT₅₀

(2) Los valores representan el título hemaglutinante de la mezcla de 5 tubos por determinación

(3) Medido en horas

(4) Las dosis se representan en γ /ml de medio de mantenimiento

En una segunda fase, paralelamente establecida con la anterior, se determinaban las variaciones del poder infeccioso de los cuatro virus sobre las distintas series de fibroblastos en presencia de adamantano, amantadina y D-glucosamina.

En los cuadros XIV, XV, XVI y XVII se recogen todos los datos obtenidos en estos experimentos, en los que como puede verse siguen siendo los orthomixovirus mas sensibles aunque en este tipo de ensayos aparece la amantadina como el quimioterápico mas efectivo.

Por otra parte y utilizando el mismo proceso mental pero sobre embriones, se estudió la acción de los tres quimioterápicos a distintas dosis y tiempos de contacto frente a los cuatro virus que aquí se estudian. Los cuadros XVIII al XXI ambos inclusive indican los resultados obtenidos en cuanto a variaciones en el poder hemaglutinante. Puede verse que la amantadina es el quimioterápico mas activo y precisamente sobre las infecciones embrionarias producidas por orthomixovirus considerándolo en función de las variaciones obtenidas en este tipo de determinación del comportamiento biológico del virus; pudiendo destacar que el aporte del quimioterápico resulta mas efectivo en tratamientos de 1 y 2 horas antes que la infección viral.

Seguidamente en los cuadros XXII al XXV, ambos inclusive se estudia la acción de adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre embriones infectados por virus, midiendo este efecto a través de las variaciones originadas en el poder infeccioso del virus medido en DICT por su actividad posterior residual.

CUADRO XIV.- Efectos del adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre el poder infectivo del FPV (1) multiplicado en cultivos de fibroblastos de pollo en distintas condiciones experimentales.

Tiempos de incubación del sistema virus infectado mas el quimioterápico a distintas dosis (4)	Poder infectivo en DICT ₅₀ (2) a distintos tiempos de contacto del quimioterápico (3) con los fibroblastos antes de la infección viral				Valores en testigos sin tratamiento	Quimioterápico empleado	
	4	3	2	1			
18 h.	50	6,1	6,7	7	7	ADAMANTANO	
	100	5,7	6,2	6,8			
24 h.	50	6,7	7,5	8	8,7		
	100	6,5	6,8	8			
48 h.	50	8,2	8	9	9		
	100	7,8	7,8	9			
18 h.	50	2,7	2,7	3,7	6,5		AMANTADINA
	100	2,5	2,1	3,1			
24 h.	50	6,1	6,3	6,5	9		
	100	4,2	4,2	4,8			
48 h.	50	8,5	8,8	9	9,5		
	100	6,5	6,5	7,5			
18 h.	400	4,8	5	5,2	6	D-GLUCOSAMINA	
	800	3,5	4	4,3			
24 h.	400	6	6,5	6,2	8,2		
	800	5,8	6,2	6,5			
48 h.	400	8,7	8,3	8,5	9,5		
	800	8,3	8,3	8,3			

(1) Dosis infectiva inoculada 10^2 DICT₅₀

(2) Los valores representan el título de la mezcla del medio de cinco tubos por determinación expresados como exponentes de base 10

(3) Medido en horas

(4) Las dosis se representan en γ /ml de medio de mantenimiento

CUADRO XV.- Efectos del adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre el poder infectivo del virus influenza (1) multiplicado en cultivos de fibroblastos de pollo en distintas condiciones experimentales.

Tiempos de incubación del sistema virus infectado mas el quimioterápico a distintas dosis (4)	Poder infectivo en DICT ₅₀ (2) a distintos tiempos de contacto del quimioterápico (3) con los fibroblastos antes de la infección viral				Valores en testigos sin tratamiento	Quimioterápico empleado
	4	3	2	1		
18 h.	50	5,9	6,1	6,5	6,5	ADAMANTANO
	100	5,5	6	6,3	6,6	
24 h.	50	6,7	7	7,5	7,7	
	100	6,5	6,8	7,2	7,5	
48 h.	50	7,9	8	8	8,2	
	100	7,5	8	7,8	8	
18 h.	50	2,2	2,5	3,5	4	AMANTADINA
	100	2	2	3,5	3,5	
24 h.	50	6	6	6,3	6,5	
	100	5,8	5,8	6	6	
48 h.	50	7	7	7,2	7,5	
	100	6,2	6,3	7	7,2	
18 h.	400	4,3	4,8	5	5,7	D-GLUCOSAMINA
	800	3,3	4,2	4,2	4,8	
24 h.	400	5,4	6	6,2	6,5	
	800	5,7	6	6	6,3	
48 h.	400	7,7	8	8,7	9,5	
	800	7,5	7,8	8,5	9,5	

(1) Dosis infectiva inoculada 1×10^2 DICT₅₀

(2) Los valores representa el título infectivo de la mezcla del medio de 5 tubos por determinación

(3) Medidos en horas

(4) Las dosis se representan en γ /ml de medio de mantenimiento

CUADRO XVI.- Efectos del adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre el poder infectivo del NDV (1) multiplicado en cultivos de fibroblastos de pollo en distintas condiciones experimentales.

Tiempos de incubación del sistema virus infectado mas el quimioterápico a distintas dosis (4)	Poder infectivo en DICT ₅₀ (2) a distintos tiempos de contacto del quimioterápico (3) con los fibroblastos antes de la infección viral				Valores en testigos sin tratamiento	Quimioterápico empleado	
	4	3	2	1			
18 h.	50	4,2	4	4,8	5,2	ADAMANTANO	
	100	4	4	4,5			
24 h.	50	5	5	6	6,8		
	100	4,8	4,5	5,8			
48 h.	50	5,8	6,2	6,5	7		
	100	5,8	6	6,8			
18 h.	50	3,5	4,3	5,5	5,5		AMANTADINA
	100	3,5	4	4,3			
24 h.	50	6,1	6,3	5,7	7		
	100	4,6	4,6	4,6			
48 h.	50	6,3	5,8	5,5	7		
	100	5	5,3	5,3			
18 h.	400	4,5	4,8	4,8	5,5	D-GLUCOSAMINA	
	800	4	4,3	5			
24 h.	400	6	6	6,3	7		
	800	5,6	5,8	6,3			
48 h.	400	6,3	6	6,3	7		
	800	5,6	5,6	6			

(1) Dosis infectiva inculada 10² DICT₅₀
 (2) Los títulos representarel título infectivo de la mezcla del medio de 5 tubos por determinación
 (3) Medido en horas
 (4) Las dosis se representan en μ /ml de medio de mantenimiento.

CUADRO XVII.- Efectos del adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre el poder infectivo del virus Sendai (1) multiplicado en cultivos de fibroblastos de pollo en distintas condiciones experimentales.

Tiempos de incubación del sistema virus infectado mas el quimioterápico a distintas dosis (4)	Poder infectivo en DICT ₅₀ (2) a distintos tiempos de contacto del quimioterápico (3) con los fibroblastos antes de la infección viral				Valores en testigos sin tratamiento	Quimioterápico empleado	
	4	3	2	1			
18 h.	50	5,3	5,5	6	6	ADAMANTANO	
	100	4,8	5	6			
24 h.	50	6,2	6,5	6,8	7		
	100	6	6,2	7			
48 h.	50	7	7,2	7,5	7,5		
	100	6,8	7	7,5			
18 h.	50	3,5	4,5	5,8	6		AMANTADINA
	100	3	4,5	5,5			
24 h.	50	4	5,8	7	7,2		
	100	3,8	4,2	7			
48 h.	50	7	7,8	8	8		
	100	6,5	7,5	8			
18 h.	400	5,3	5,8	6,3	6,3	D-GLUCOSAMINA	
	800	5	5,5	6,1			
24 h.	400	6,2	7	7,5	7,5		
	800	6	7	7,3			
48 h.	400	7	8	8,5	8,5		
	800	6,5	7,8	8,5			

(1) Dosis infectiva inocularada 10^2 DICT₅₀

(2) Los valores representan el título de la mezcla del medio de cinco tubos por determinación expresados como exponentes de base 10

(3) Medido en horas

(4) Las dosis se representan en γ /ml de medio de mantenimiento

CUADRO XVIII.- Efecto del adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre el poder hemaglutinante del FPV (1) multiplicado en huevos embrionados de pollo de 10 días

Tiempos de incubación (3) del sistema virus infectado mas el quimioterápico a distintas dosis (5)	Títulos hemaglutinantes (2) a distintos tiempos de contacto del quimioterápico (4) con los embriones antes de la infección viral				Valores en testigos sin tratamiento	Quimioterápico empleado
	4	3	2	1		
24 h.	400	128	512	256	512	ADAMANTANO
	600	128	256	128		
48 h.	400	256	512	256	1024	
	600	128	512	256		
72 h.	400	256	512	256	1024	
	600	256	512	256		
24 h.	200	4	8	2	512	AMANTADINA
	400	4	4	2		
48 h.	200	4	16	4	1024	
	400	4	16	4		
72 h.	200	4	32	4	1024	
	400	4	32	4		
24 h.	1000	512	512	512	512	D-GLUCOSAMINA
	2000	512	128	256		
48 h.	1000	1024	512	512	1024	
	2000	1024	256	512		
72 h.	1000	512	512	512	1024	
	2000	512	512	512		

- (1) Dosis infectiva por huevo embrionado: 10^2 DLE₅₀
- (2) Títulos hemaglutinantes obtenidos en la mezcla del líquido alantoideo de 10 huevos por determinación
- (3) Determinación del título hemaglutinante 24, 48 y 72 horas después de la infección.
- (4) Tiempos previos en horas de administración del quimioterápico.
- (5) Las dosis se representan en Y/huevo embrionado

CUADRO XIX.- Efectos del adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre el poder hemaglutinante del virus influenza (1) multiplicado en huevos embrionados de pollo de 10 días.

Tiempo de incubación (3) del sistema virus infectado mas el qui- mioterápico a distin- tas dosis (5)	Títulos hemaglutinantes (2) a distintos tiempos de contacto del quimioterápico (4) con los embriones antes de la infección viral				Valores en testigos sin tratamiento	Quimioterápico empleado
	4	3	2	1		
24 h.	400	512	512	256	1024	ADAMANTANO
	600	512	256	256		
48 h.	400	1024	512	1024	1024	
	600	1024	512	512		
72 h.	400	1024	1024	1024	1024	
	600	1024	1024	1024		
24 h.	200	8	16	4	1024	AMANTADINA
	400	8	8	4		
48 h.	200	16	32	4	1024	
	400	16	32	4		
72 h.	200	32	32	4	1024	
	400	32	32	4		
24 h.	1000	1024	1024	512	1024	D-GLUCOSAMINA
	2000	1024	512	512		
48 h.	1000	1024	1024	1024	1024	
	2000	1024	1024	1024		
72 h.	1000	1024	1024	1024	1024	
	2000	1024	1024	1024		

- (1) Dosis infectiva por huevo embrionado: 10^2 DLE₅₀
- (2) Títulos hemaglutinantes obtenidos en la mezcla del líquido alantoideo de 10 huevos por determinación
- (3) Determinación del título hemaglutinante 24, 48 y 72 horas después de la infección
- (4) Tiempos previos en horas de administración de quimioterápico
- (5) Las dosis se representan en χ /huevo embrionado

CUADRO XX.- Efectos del adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre el poder hemaglutinante del NDV (1) multiplicado en huevos embrionados de pollo de 10 días.

Tiempos de incubación (3) del sistema virus infectado mas el quimioterápico a distintas dosis (5)	Títulos hemaglutinantes (2) a distintos tiempos de contacto del quimioterápico (4) con los embriones antes de la infección viral				Valores en testigos sin tratamiento	Quimioterápico empleado
	4	3	2	1		
24 h.	400	32	32	32	64	ADAMANTANO
	600	32	16	32		
48 h.	400	128	32	64	128	
	600	128	32	64		
72 h.	400	256	128	128	256	
	600	256	128	128		
24 h.	200	64	32	16	64	AMANTADINA
	400	64	16	16		
48 h.	200	128	64	64	128	
	400	128	64	64		
72 h.	200	256	128	128	256	
	400	256	128	128		
24 h.	1000	64	64	32	64	D-GLUCOSAMINA
	2000	64	32	32		
48 h.	1000	128	128	64	128	
	2000	128	128	64		
72 h.	1000	256	256	256	256	
	2000	256	256	128		

(1) Dosis infectiva por huevo embrionado: 10^7 DLE₅₀

(2) Títulos hemaglutinantes obtenidos en la mezcla del líquido alantoideo de 10 huevos por determinación.

(3) Determinación del título hemaglutinante 24, 48 y 72 horas después de la infección

(4) Tiempos previos en horas de administración del quimioterápico

(5) Las dosis se representan en γ /huevo embrionado.

CUADRO XXI.- Efectos del adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre el poder hemaglutinante del virus Sendai (1) multiplicado en huevos embrionados de pollo de 10 días

Tiempo de incubación (3) del sistema virus infectado mas el quimioterápico a distintas dosis (5)	Títulos hemaglutinantes (2) a distintos tiempos de contacto del quimioterápico (4) con los embriones antes de la infección viral				Valores en testigos sin tratamiento	Quimioterápico empleado	
	4	3	2	1			
24 h.	400	128	128	64	128	ADAMANTANO	
	600	128	128	64			
48 h.	400	128	128	64	256		
	600	128	128	64			
72 h.	400	128	128	128	256		
	600	128	128	128			
24 h.	200	128	128	64	128		AMANTADINA
	400	128	128	32			
48 h.	200	256	256	128	256		
	400	256	256	64			
72 h.	200	256	256	256	256		
	400	256	256	256			
24 h.	1000	128	128	128	128	D-GLUCOSAMINA	
	2000	128	128	64			
48 h.	1000	256	256	256	256		
	2000	256	256	256			
72 h.	1000	256	256	256	256		
	2000	256	256	256			

- (1) Dosis infectiva por huevo embrionado: 10^2 DLF₅₀
- (2) Títulos hemaglutinantes obtenidos en la mezcla del líquido alantoideo de 10 huevos por determinación
- (3) Determinación del título hemaglutinante 24, 48, y 72 horas después de la infección
- (4) Tiempos previos en horas de administración del quimioterápico
- (5) Las dosis se representan en Y/nuevo embrionado

en cultivos de fibroblastos. Los resultados en este caso no fueron tan demostrativos como en la experiencia anterior medida en función del título hemaglutinante; quizá ello sea debido a que la actividad residual, por pequeña que esta sea pueda dar origen a progenies virales activas en cuanto a su poder infeccioso pero defectivos en cuando se refiere al poder hemaglutinante.

Finalmente en este estudio comparativo de los tres quimioterápicos y a la vista del diferente comportamiento según que se trate de valorar el efecto antiviral a través de la medida del título hemaglutinante o del poder infeccioso para ambos tipos de virus (ortho y paramixovirus) se acudió a determinar la acción del adamantano, amantadina y D-glucosamina en función de la supervivencia de embriones infectados con FPV y NDV representantes de ortho y paramixovirus respectivamente.

En las figuras que siguen se recogen los efectos comparativos de los 3 quimioterápicos sobre huevos embrionados infectados por distintas dosis de FPV (Fig. 36) y NDV (Fig. 37).

Una vez mas se muestran como mas sensibles a la acción de estos quimioterápicos el orthomixovirus frente a amantadina

3.- Estudios relativos a la respuesta del huesped

Hasta aquí hemos realizado experimentos que nos dan idea de la interacción virus-quimioterápico, pero teniendo en cuenta que estas substancias han de actuar "in vivo" sobre un

CUADRO XXII.-Efectos del adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre el poder infectivo del FpV (1) multiplicado en huevos embrionados de pollo de 10 días

Tiempo de incubación (3) del sistema virus infectado más el quimioterápico a distintas dosis (5)	Títulos infectivos (2) a distintos tiempos de contacto del quimioterápico (4) con los embriones antes de la infección viral				Valores en testigos sin tratamiento	Quimioterápico empleado	
	4	3	2	1			
24 h.	400	5,5	5,5	5	5,5	ADAMANTANO	
	600	5,5	4,5	4,3			
48 h.	400	7	7	7	7		
	600	7	7	7			
72 h.	400	8	8	8	8		
	600	8	8	8			
24 h.	200	5,5	5	4,8	5,5		AMANTADINA
	400	5,5	3,5	4,3			
48 h.	200	7	6,8	6,3	7		
	400	7	6,3	6			
72 h.	200	8	7,5	8	8		
	400	8	7,8	8			
24 h.	1000	5,5	5,2	5	5,5	D-GLUCOSAMINA	
	2000	5,5	5	5			
48 h.	1000	7	6,6	6,3	7		
	2000	7	6,4	6			
72 h.	1000	8	7,8	7,6	8		
	2000	8	8	7,2			

(1) Dosis infectiva por huevo embrionado: 10^2 DLE₅₀
 (2) Títulos infectivos expresados como exponentes de base 10, obtenidos en la mezcla del líquido alantoideo de 10 huevos por determinación.
 (3) Determinación del título infectivo 24, 48 y 72 horas después de la infección
 (4) Tiempos previos en horas y administración del quimioterápico
 (5) Las dosis se representan en χ /huevo embrionado

CUADRO XXIII.- Efectos del adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre el poder infectivo del virus influenza (1) multiplicado en huevos embrionados de pollo de 10 días

Tiempo de incubación (3) del sistema virus infectado más el quimioterápico a distintas dosis (5)	Títulos infectivos (2) a distintos tiempos de contacto del quimioterápico (4) con los embriones antes de la infección viral					Valores en testigos sin tratamiento	Quimioterápico empleado
	4	3	2	1			
24 h.	400	5	5	5	4,7	5	ADAMANTANO
	600	5	5	4,7	4,5		
48 h.	400	6,5	6,3	6,5	6	6,5	
	600	6	6	6,5	6		
72 h.	400	7,9	8	8	7,8	8	
	600	7,7	8	7,9	7,3		
24 h.	200	5	5	3,4	3,5	5	AMANTADINA
	400	5	4,8	3	3		
48 h.	200	6,5	6,5	5,7	5,8	6,5	
	400	6,5	6,3	5,7	5,6		
72 h.	200	8	7,7	7,5	7,7	8	
	400	8	8	7,3	7,7		
24 h.	1000	5	5	4,9	4,7	5	D-GLUCOSAMINA
	2000	5	5	4,5	4,3		
48 h.	1000	6,5	6,3	6,2	6,2	6,5	
	2000	6,5	6,7	6	6		
72 h.	1000	8	8	7,2	7,5	8	
	2000	8	8	7	7,2		

(1) Dosis infectiva por huevo embrionado: 10^2 DLE₅₀

(2) Títulos infectivos, expresados como exponentes de base 10, obtenidos en la mezcla del líquido alantoideo de 10 huevos por determinación.

(3) Determinación del título infectivo 24, 48 y 72 horas después de la infección

(4) Tiempos previos en horas de administración del quimioterápico

(5) Las dosis se representan en γ /huevo embrionado

CUADRO XXIV.- Efectos del adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre el poder infectivo del NDV (1) multiplicado en huevos embrionados de pollo de 10 días

Tiempo de incubación (3) del sistema virus infectado mas el quimioterápico a distintas dosis (5)	Títulos infectivos (2) a distintos tiempos de contacto del quimioterápico (4) con los embriones antes de la infección viral				Valores en testigos sin tratamiento	Quimioterápico empleado
	4	3	2	1		
24 h.	400	4,3	4,3	4	4,5	ADAMANTANO
	600	4	4	4		
48 h.	400	5,9	5,7	5,8	6	
	600	5,7	5,7	5,7		
72 h.	400	6,5	6,5	6,5	6,5	
	600	6,5	6,5	6,5		
24 h.	200	4,5	4	3,9	4,5	AMANTADINA
	400	4,5	3,9	3,7		
48 h.	200	5,9	5,7	5,5	6	
	400	6	5,7	5,5		
72 h.	200	6,5	6,3	6,5	6,5	
	400	6,5	6,3	6		
24 h.	1000	4,5	4,3	4,1	4,5	D-GLUCOSAMINA
	2000	4,5	4	3,8		
48 h.	1000	6	6	5,7	6	
	2000	6	6	5,7		
72 h.	1000	6	6,5	6,2	6,5	
	2000	6,5	6,5	6,2		

- (1) Dosis infectiva por huevo embrionado: 10^2 DLE₅₀
- (2) Títulos infectivos expresados como exponentes de base 10, obtenidos en la mezcla del líquido alantoideo de 10 huevos por determinación.
- (3) Determinación del título infectivo 24, 48 y 72 horas después de la infección.
- (4) Tiempos previos en horas de administración de quimioterápico
- (5) Las dosis se representan en χ /huevo embrionado

CUADRO XXV.- Efectos del adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre el poder infectivo del virus Sendai (1) multiplicado en huevos embrionados en pollo de 10 días

Tiempo de incubación (3) del sistema virus infectado mas el quimioterápico a distintas dosis (5)	Títulos infectivos (2) a distintos tiempos de contacto del quimioterápico (4) con los embriones antes de la infección viral				Valores en testigos sin tratamiento	Quimioterápico empleado	
	4	3	2	1			
24 h.	400	3,5	3,5	3	3,5	ADAMANTANO	
	600	3,3	3,3	3			
48 h.	400	5	4,8	4,7	5		
	600	5	4,7	4,5			
72 h.	400	6	6	6	6		
	600	6	6	6			
24 h.	200	3,5	3	2,8	3		AMANTADINA
	400	3,3	3	2,5			
48 h.	200	5	4,8	3,6	4,2		
	400	5	4,7	3,3			
72 h.	200	6	5,2	5	5,8		
	400	6	5	5			
24 h.	1000	3,5	3,5	3,2	3,3	D-GLUCOSAMINA	
	2000	3,5	3,5	3			
48 h.	1000	5	5	4,8	5		
	2000	5	5	4,7			
72 h.	1000	6	6	6	6		
	2000	6	6	6			

(1) Dosis infectada por huevo embrionado: 10^2 DLE₅₀

(2) Títulos infectivos expresados como exponentes de base 10, obtenidos en la mezcla del líquido alantoideo de 10 huevos por determinación

(3) Determinación del título infectivo 24, 48 y 72 horas después de la infección.

(4) Tiempos previos en horas de administración del quimioterápico

(5) Las dosis se representan en γ /huevo embrionado.

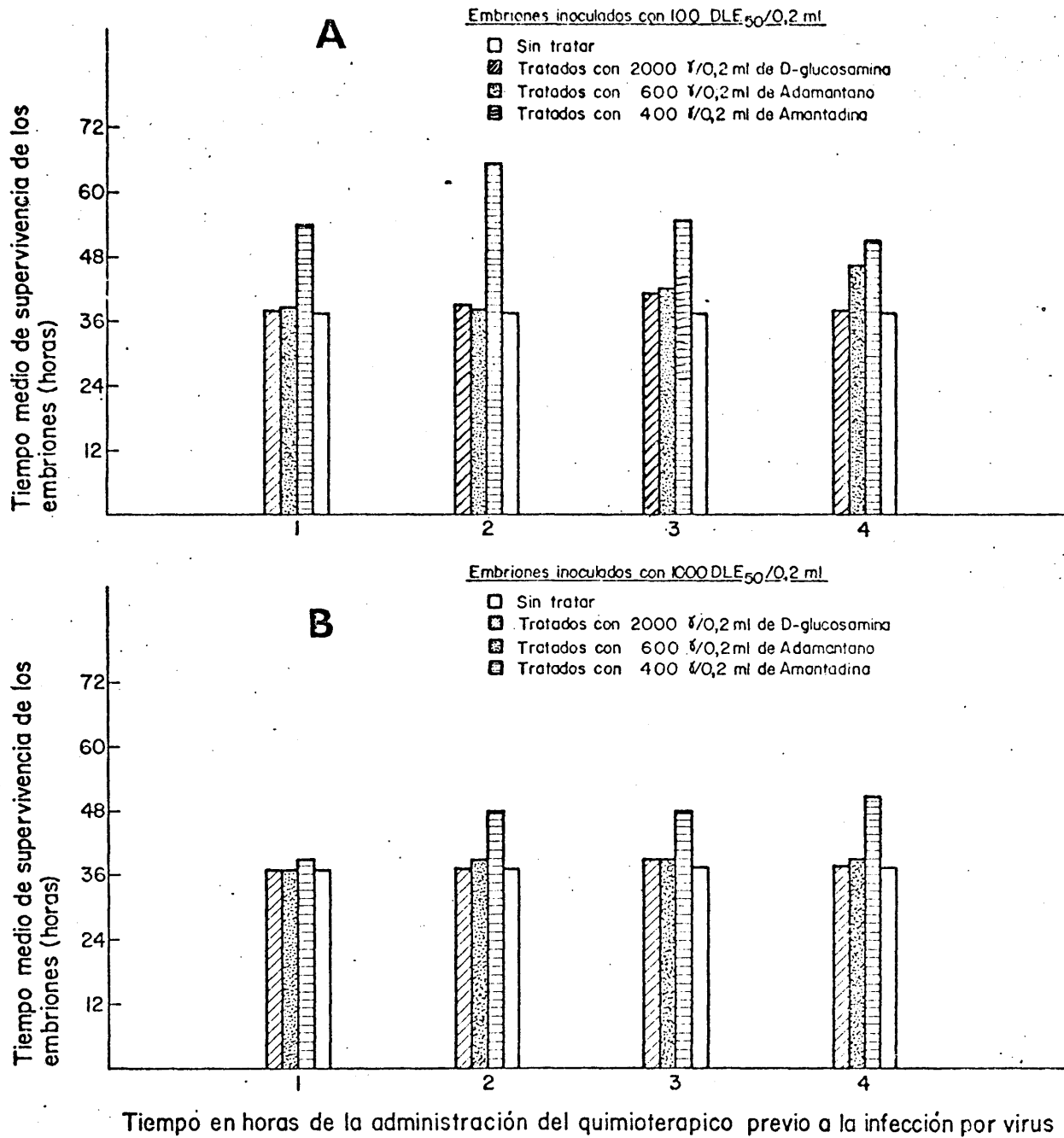


Fig. 36.- Estudio comparativo del efecto de adamantano, amantadina y D-glucosamina sobre la supervivencia de embriones infectados con FPV a dosis de 10^2 DLE₅₀ (A) y 10^3 DLE₅₀ (B)

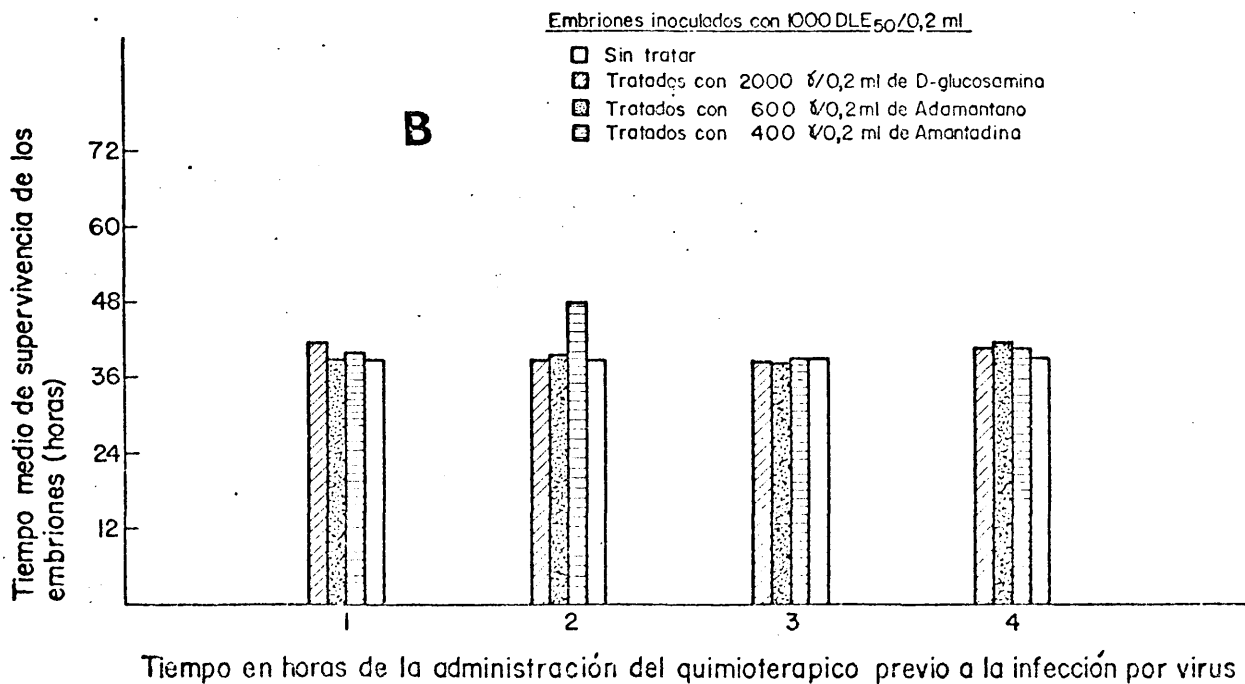
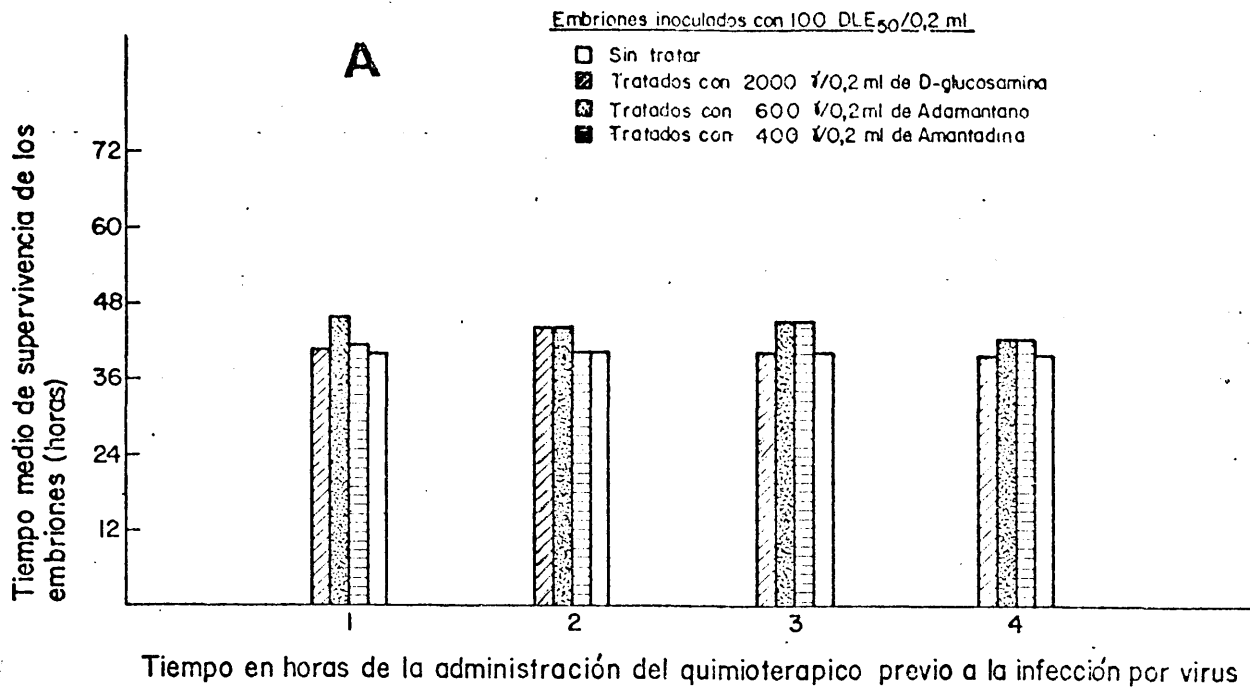


Fig. 37.- Estudio comparativo del efecto de adamantano amantadina y D-glucosamina sobre la supervivencia de embriones infectados con NDV a dosis de 10^2 DLE_{50} (A) y 10^3 DLE_{50} (B)

sistema con capacidad de respuesta biológica y que esta respuesta puede potenciar el efecto del quimioterápico o, por el contrario, puede condicionar la implantación de un estado variable de depresión inmunitaria, por ello parece lógico estudiar las variaciones que se pueden producir en la interacción virus-huesped en presencia de distintos quimioterápicos y antibióticos capaces de actuar a distintos niveles bioquímicos.

El estudio, en este caso, se ha realizado teniendo en cuenta las dos vertientes de respuesta mas significativas ante una infección viral: la producción de interferón y la aparición de anticuerpos circulantes, según se indica en los apartados que siguen.

3.1. Acción de los quimioterápicos antivirales sobre la respuesta inmune.

Para este estudio se procedió a valorar los niveles de anticuerpos circulantes en pollos valorandolos en función del poder inhibidor de la hemaglutinación, práctica muy frecuente en nuestro laboratorio y que a su relativa facilidad une una mayor precisión y rapidez de resultados que cuando se utilizan las pruebas de fijación de complemento.

El protocolo experimental consistió en la inmunización de pollos jóvenes con tres dosis sucesivas del antígeno viral correspondiente y dejando 8 días de intervalo entre cada dosis antigénica

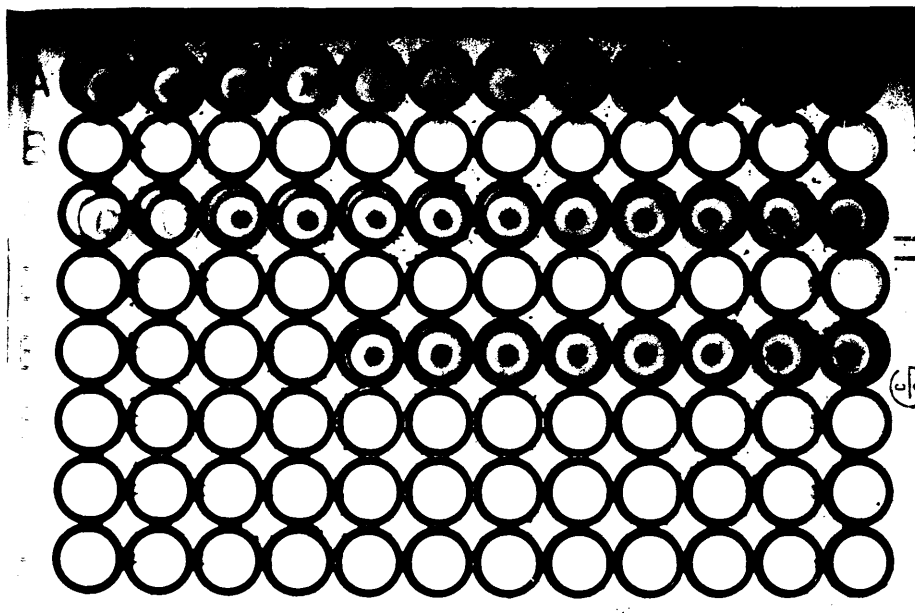
Previamente a cada inmunización se administró durante 5 días seguidos el quimioterápico a ensayar sobre su efecto en

el sistema inmune. Experimentos previos con determinaciones durante los días en que no se administraba la substancia antiviral demostraron no tener significación en cuanto a los resultados que se obtienen si las determinaciones de anticuerpos se efectúan los días 0, 8, 16 y 24 según se indica en los resultados correspondientes.

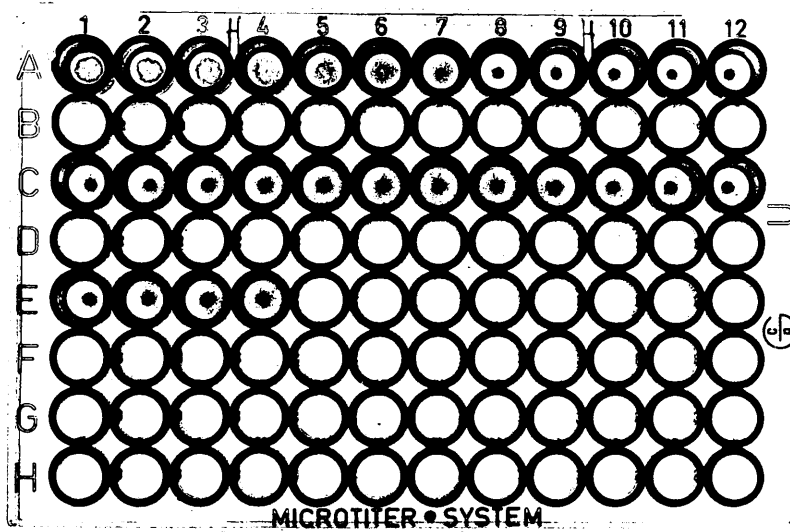
Como regla general hemos utilizado los sueros después de efectuar la inactivación del complemento a 56° C durante 30 minutos y en dilución 1/5 en tampón veronal. Como antígenos se usaron los virus influenza, FP, ND y Sendai inactivados y con coadyuvante según se indicó en el apartado de Técnicas y una idea de cómo se ha efectuado la interpretación de resultados se puede ver en la Fig. 38 en la que se presentan dos ejemplos de evaluación del título expresado en unidades inhibidoras de la hemaglutinación.

En cuanto al protocolo experimental seguido las Figs. 39 y 40 son claramente demostrativas al indicar en la parte A los valores obtenidos en los controles frente a los virus influenza y FP (Fig. 39) sin tratr con los quimioterápicos, mientras que en la parte B se señalan mediante barras horizontales (TQ) los intervalos cubiertos por el tratamiento quimioterápico antes de cada inmunización (a_1 , a_2 , a_3). De la misma manera la Fig. 40 respresenta los resultados obtenidos frente a los virus ND y Sendai.

También el el Cuadro XXVI se resumen para mayor claridad y de una forma comparativa los resultados finales que se obtienen al cabo de los 24 días que dura cada experimento con y sin quimioterápico.



NDV .- Título HA = 512; Título IHA = 320



Influenza.- Título HA = 64; Título IHA = 160

Fig. 38.- Aspectos de los resultados obtenidos sobre microplacas en pruebas de IHA en las que se puede distinguir en la fila A, el título hemaglutinante; en la fila C, el efecto inhibitor del suero inmune representado por la disminución del título hemaglutinante y en la fila E aparecen los controles de hematies. Para la interpretación de resultados consultese el texto.

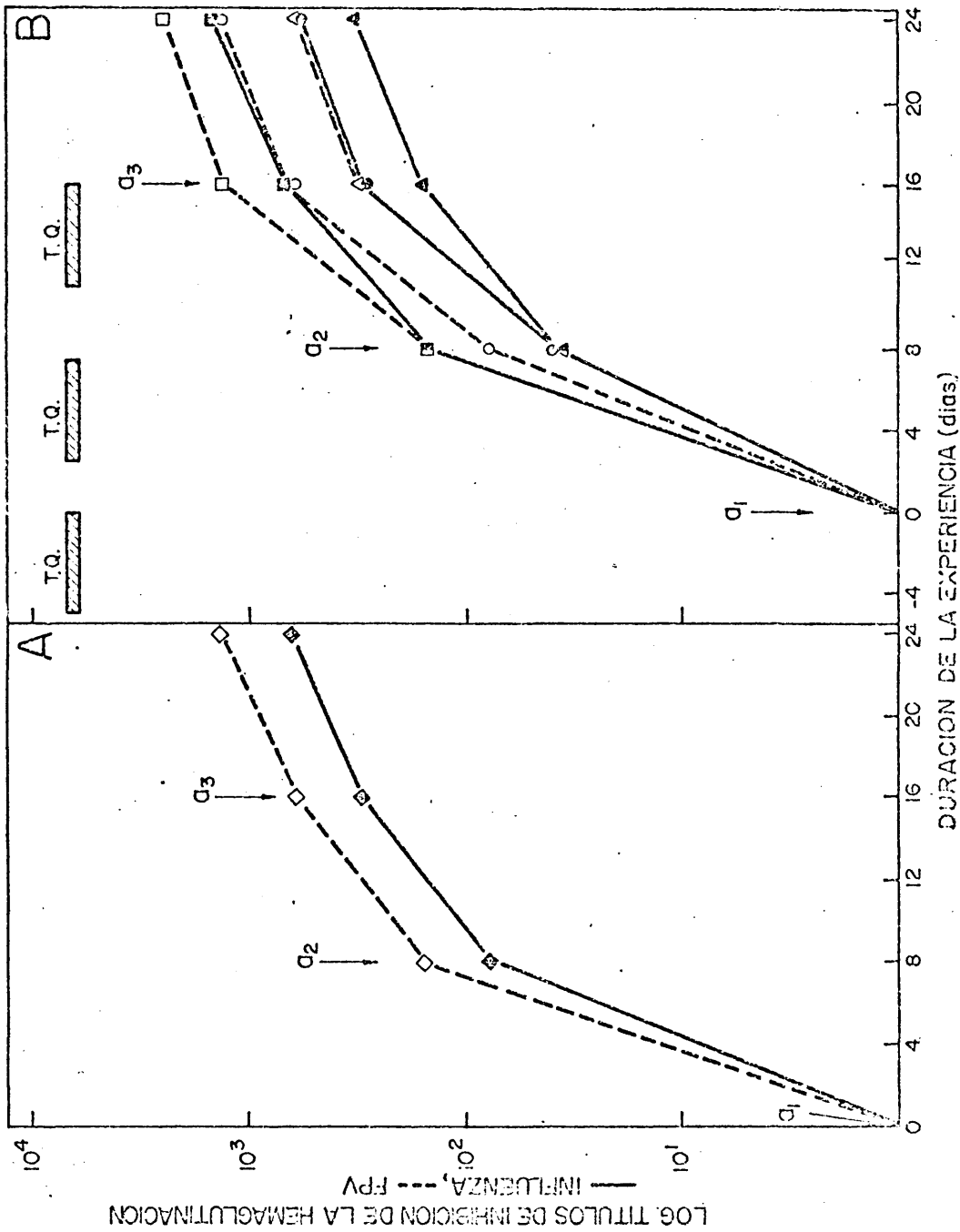


Fig. 39.- Cinética de la inmuno-respuesta humoral en las series testigo (A) y en las tratadas (B) con adamantano (●, O), amantadina (▲, △) y D-glucosamina (■, □) frente a los virus influenza (○, △, ▲, △) y FP (○, △, □, △, □, △).

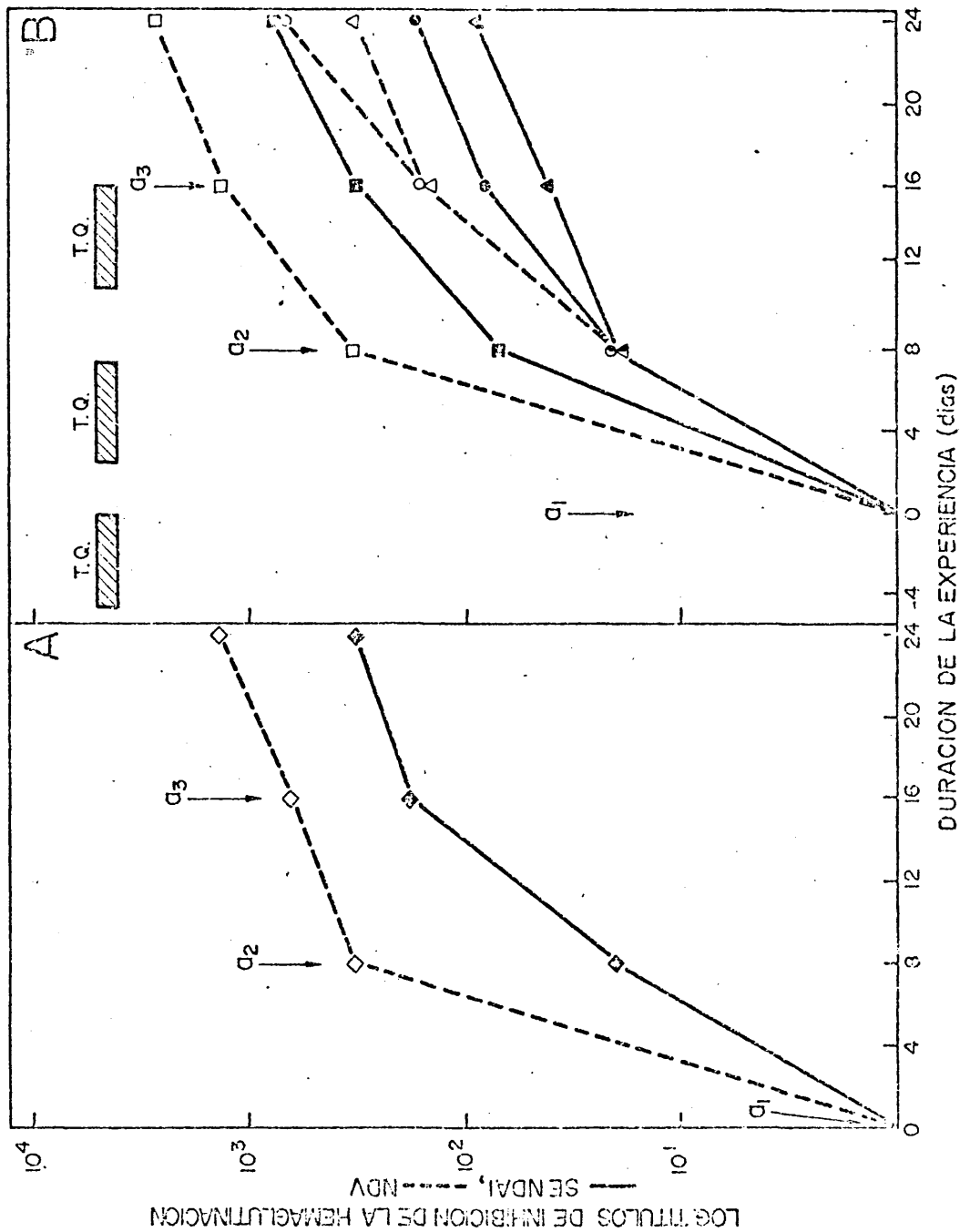


Fig. 40.- Cinética de la inmuno-respuesta humoral en las series testigo (A) y en las tratadas (B) con adamantano (●, ○), amantadina (▲, △) y D- glucosamina (■, □) frente a los virus ND (○---○, △---△, □---□) y Sendai (●---●, ▲---▲, ■---■).

CUADRO XXVI.- Variaciones en la respuesta inmunitaria frente a distintos Mixovirus en presencia de adamantano, amantadina y D-glucosamina al cabo de 24 días, expresadas en U.I. HA.

Tratamientos y controles	Virus utilizados en la inmunización			
	FPV	ORTHOMIXOVIRUS Influenza	NDV	PARAMIXOVIRUS Sendai
Sin adamantano	1280	640	1280	320
Con adamantano	1280	640	640	160
Sin amantadina	1280	640	1280	320
Con amantadina	640	320	320	80
Sin D-glucosamina	1280	640	1280	320
Con D-glucosamina	2560	1280	2560	640

Como se puede ver en la cinética de la respuesta inmuno-humoral y mas claramente en los datos finales correspondientes a 24 dias los virus FP e influenza, el primero ha presentado títulos mas altos inhibitorios, lo que se puede comprender por tratarse de un virus aviar y lo mismo podemos decir con respecto al NDV comparándolo con el virus Sendai.

En cuanto al comportamiento de los quimioterápicos parece claro que el adamantano no ejerce ninguna acción sobre la inmunización con orthomixovirus y un efecto ligeramente inmunodepresor aparece en las series con paramixovirus. Sin embargo, la amantadina en todos los casos manifestó este efecto inmunodepresor que también fue mas patente en los paramixovirus.

En relación con los tratamientos a base de D-glucosamina se observó un curioso fenómeno de inmunoestimulación que se hace patente en la misma proporción con los cuatro virus.

No se han ensayado antibióticos por tener suficiente evidencia, en nuestro Instituto, de la acción inhibidora de estas sustancias sobre el sistema inmune (BARASOAIN, 1976).

3.2. Acción de los quimioterápicos sobre la producción de interferón.

Por último en esta exposición de resultados nos ocuparemos de una respuesta del huésped que es totalmente específica frente a los virus, esto es la aparición de interferón.

Los estudios se efectuaron "in vitro" sobre cultivos celulares e "in vivo" sobre pollos de las características anteriormente indicadas.

El protocolo experimental, en esencia, consistió en establecer unos tratamientos previos del huésped con el quimioterápico o el antibiótico seguidos de una inoculación del virus para finalmente determinar los niveles de interferón producido. Existen algunas diferencias de matiz en el protocolo experimental que se explicaran al interpretar los resultados.

Previo a este estudio de producción de interferón se hizo necesario conocer la termoresistencia de los virus infectantes o la influencia de este tratamiento térmico sobre el poder citopático y el hemaglutinante de estos agentes. Así en la Fig. 41 se pueden ver las variaciones producidas sobre el poder citopático y hemaglutinante durante 72 horas de tratamiento a 37° C.

Como puede verse en las primeras 12 horas, los cuatro virus presentan un descenso en su poder infectivo y hemaglutinante. Doce horas más tarde el título hemaglutinante permanece inalterado como sucede a lo largo de todo el experimento mientras que el poder infectivo ha disminuido en valor equivalente, al menos, en 3 unidades logarítmicas. A las 36 horas el virus Sendai no produce efectos citopáticos al ser inoculados en cultivos celulares ni muerte en huevos embrionados. La misma observación se puede hacer para los virus influenza, FP y ND después de 48 horas de tratamiento térmico.

Consecuentemente utilizamos una termoinactivación (37° C) de 36 h para el virus Sendai y de 48 horas para los tres restantes antes de emplear estos virus como inductores de interferón en los ensayos "in vitro" que siguieron.

Acción de la temperatura (37°C) sobre el poder citopático y hemaglutinante del virus (líquido alantoideo- 10^5 DICT)

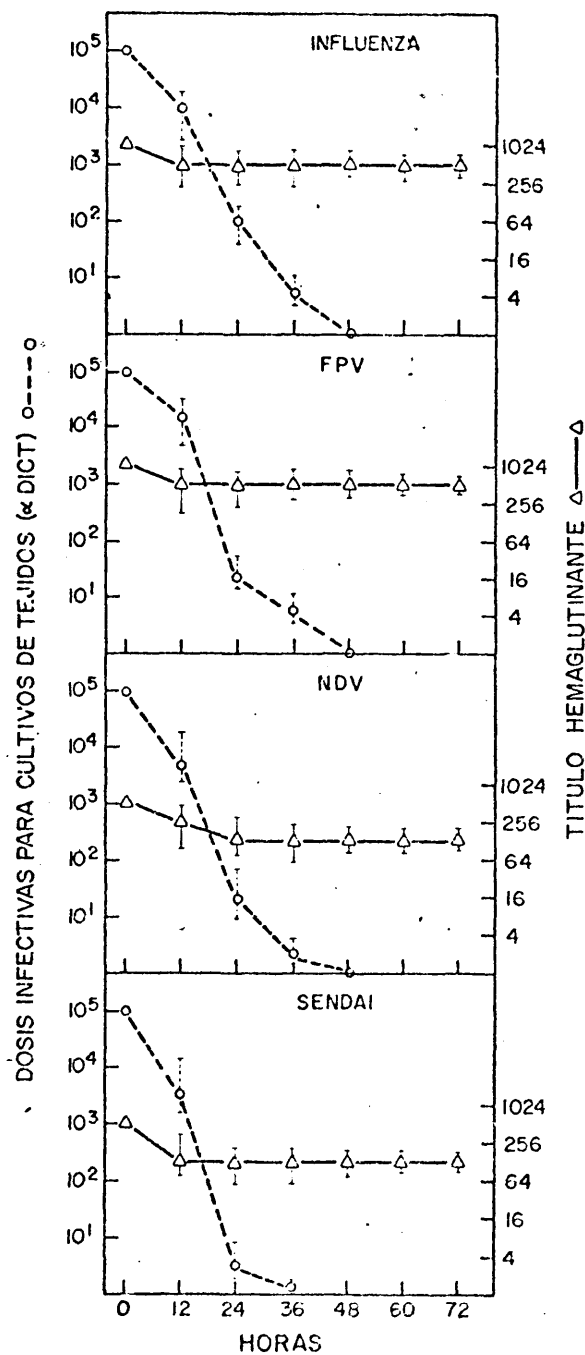


Fig. 41.- Influencia de la inactivación térmica a 37° C sobre el poder citopático y hemaglutinante del líquido alantoideo infectado con 10^5 DICT de los mixovirus estudiados.

Antes de entrar en la presentación de los resultados de la actividad de los quimioterápicos y antibióticos sobre la inducción de interferón consideramos necesario presentar unas fotografías demostrativas de la actividad del interferón medido por el método de Dulbecco en fibroblastos tratados con diferentes dosis de dicha proteína y enfrentados con VSV como virus de ataque (Fig. 41 bis).

En cuanto al experimento "in vitro" sobre cultivos de fibroblastos, se pueden ver en las figuras que siguen las variaciones en la producción de interferón en presencia de adamantano frente a FPV e influenza (Fig. 42) y NDV y Sendai (Fig. 43).

Igualmente se recogen los resultados de los tratamientos con amantadina frente a los orthomixovirus (Fig. 44) y paramixovirus (Fig. 45 y lo mismo con D-glucosamina en las Figs. 46 y 47, correspondientes respectivamente a FPV e influenza por una parte (Fig. 46) y NDV-Sendai (Fig. 47) por otra.

Como puede verse en los tratamientos hay que distinguir entre una variante de contactos previos de 12 a 36 horas en los que se eliminaba el quimioterápico, mediante lavado, antes de inocular el virus sobre las células y una experiencia en la que coexisten el virus y el quimioterápico que se administran 2 horas después que el virus.

En cuanto al adamantano y amantadina las dosis de 25 γ /ml no produjeron ningún efecto sobre los títulos de interferón en comparación con cultivos celulares que han recibido el virus pero no el tratamiento quimioterápico. Sin embargo con las dosis de 50 y 100 γ se observaron acciones depresivas en los niveles de producción de interferón que eran proporcionales a la concentración del quimioterápico utilizado, esta de-

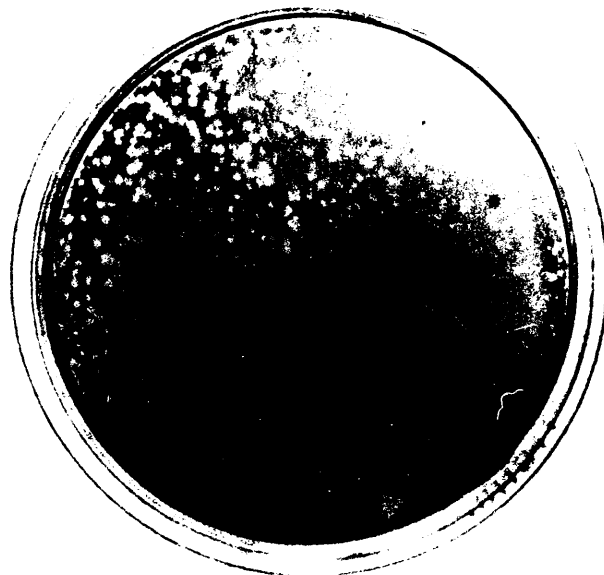
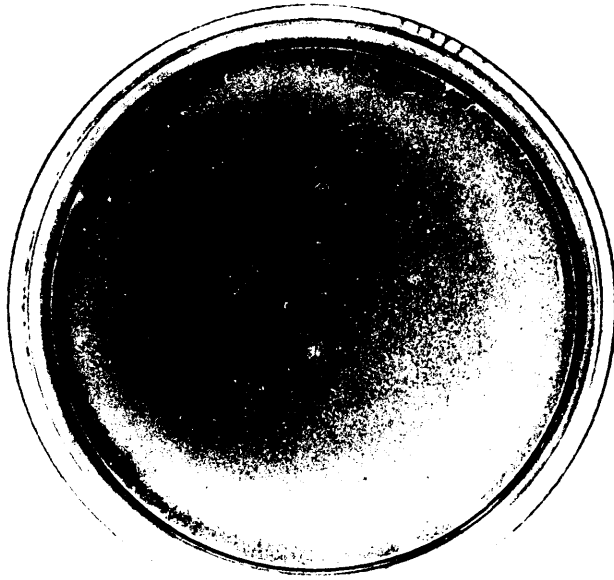
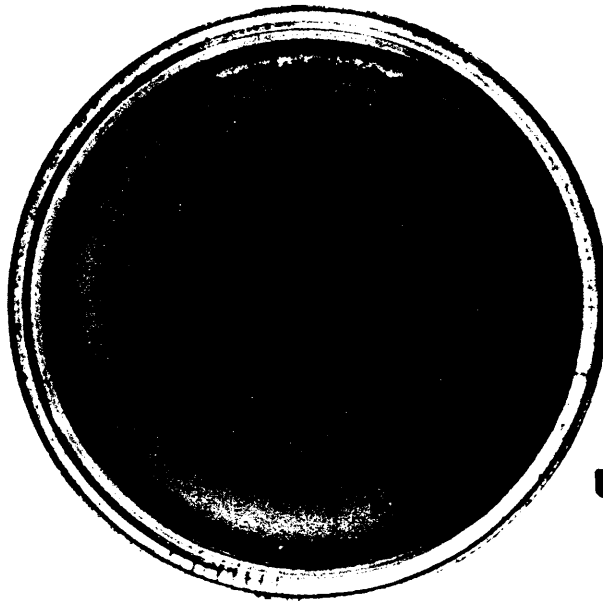
**A****B**

Fig. 41 bis.- Aspectos de marcas infectivas en cápsulas de Petri utilizadas en la técnica de DULBECCO para la titulación de interferón inducido, en este caso, por NDV; se utilizó el VS como virus interferido. La fotografía A representa testigo de fibroblastos infectados con VSV pero sin tratar con interferón, las fotografías B y C representan la reducción en el número de placas o marcas infectivas por la acción de diferentes diluciones de interferón y la D muestra el testigo de células no infectadas (ver página siguiente)



C



D

T

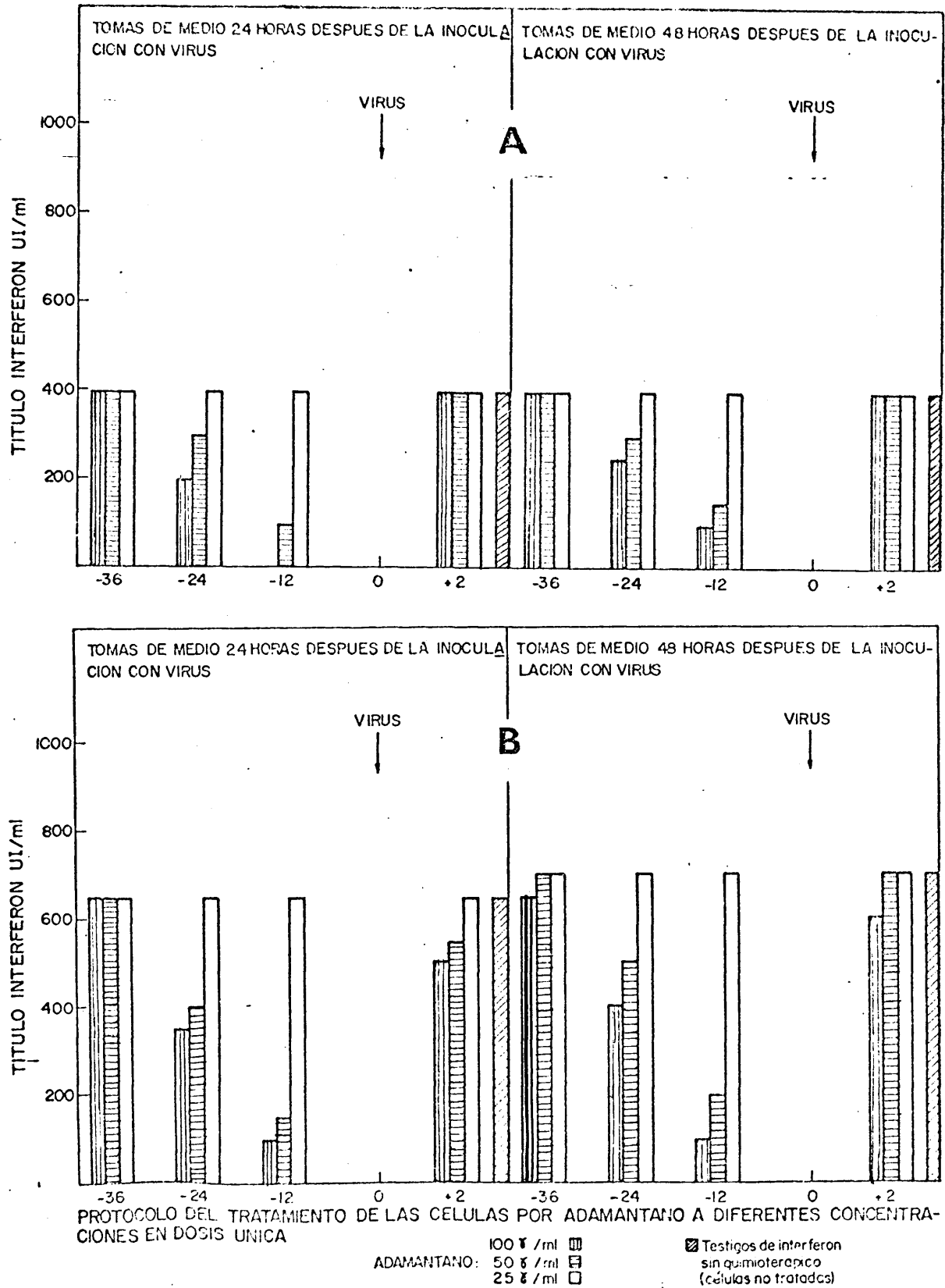


Fig. 42.- Variaciones en los títulos del interferón producido "in vitro" sobre fibroblastos inoculados con FPV (A) e influenza (B) en presencia de distintas dosis de adamantano

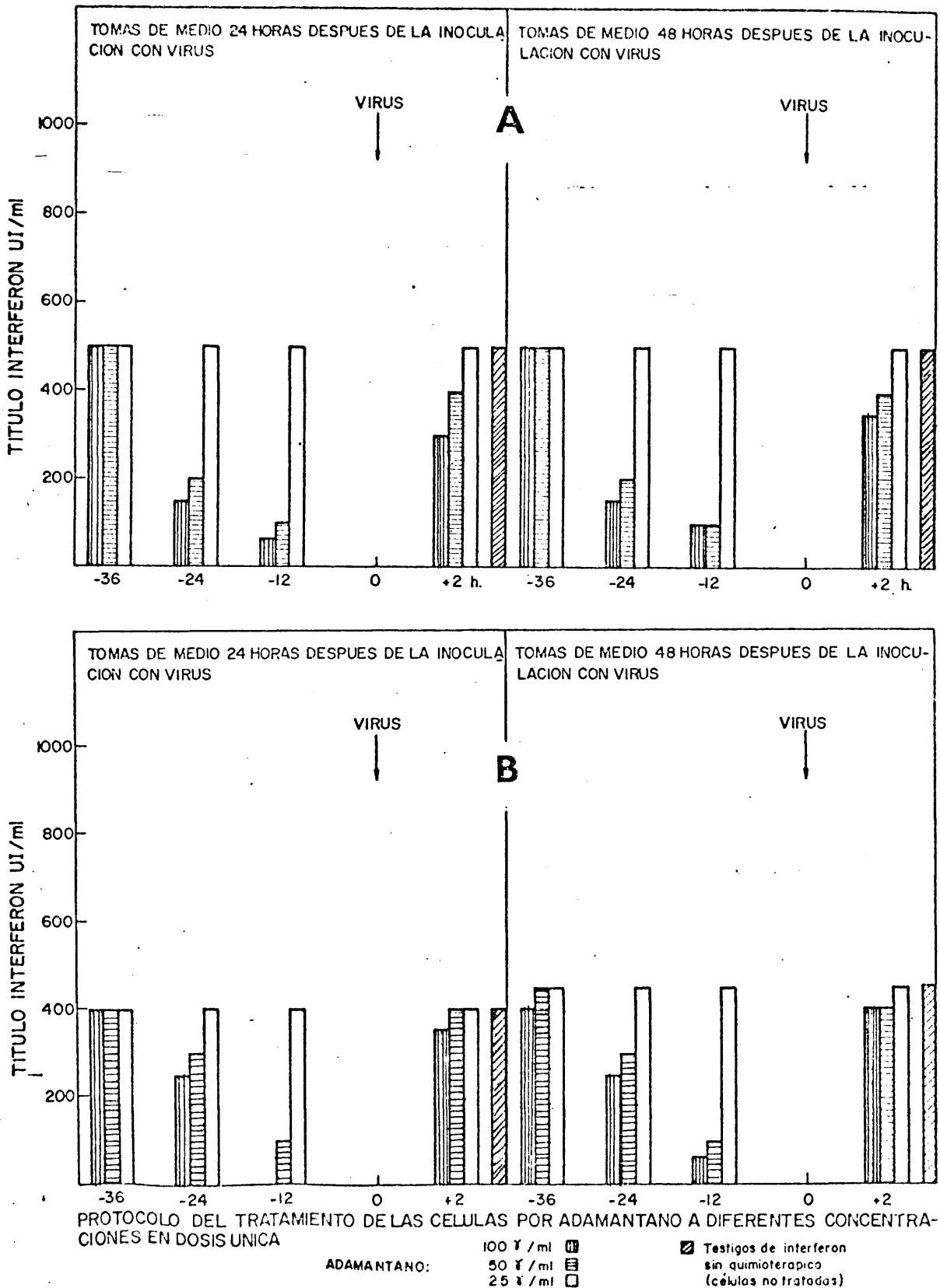


Fig. 43.- Variaciones en los títulos del interferón producido "in vitro" sobre fibroblastos inoculados con NDV (A) y virus Sendai (B) en presencia de distintas dosis de adamantano.

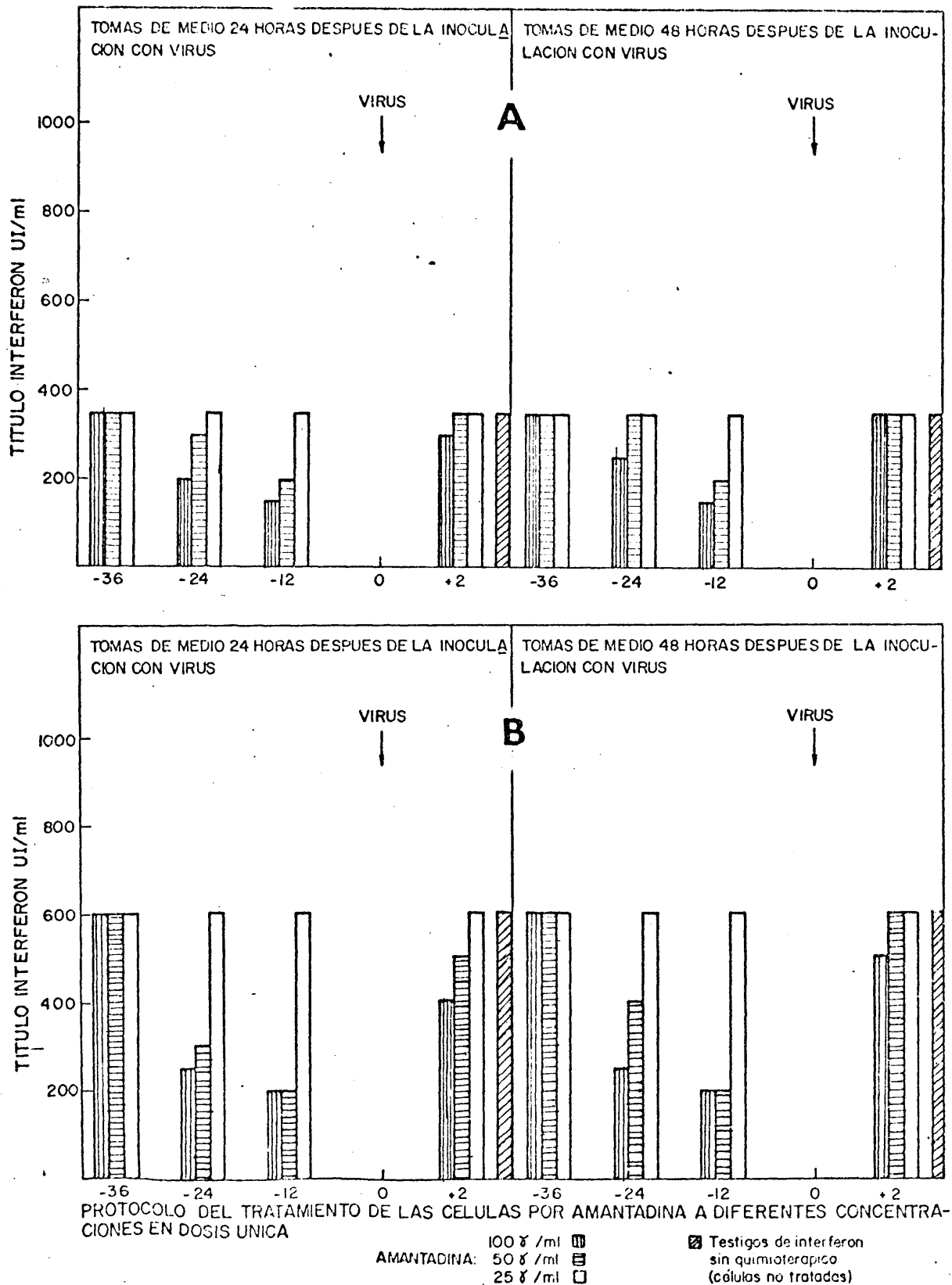


Fig. 44.- Variaciones en los títulos del interferón producido "in vitro" sobre fibroblastos inoculados con FPV (A) e influenza (B) en presencia de distintas dosis de amantadina.

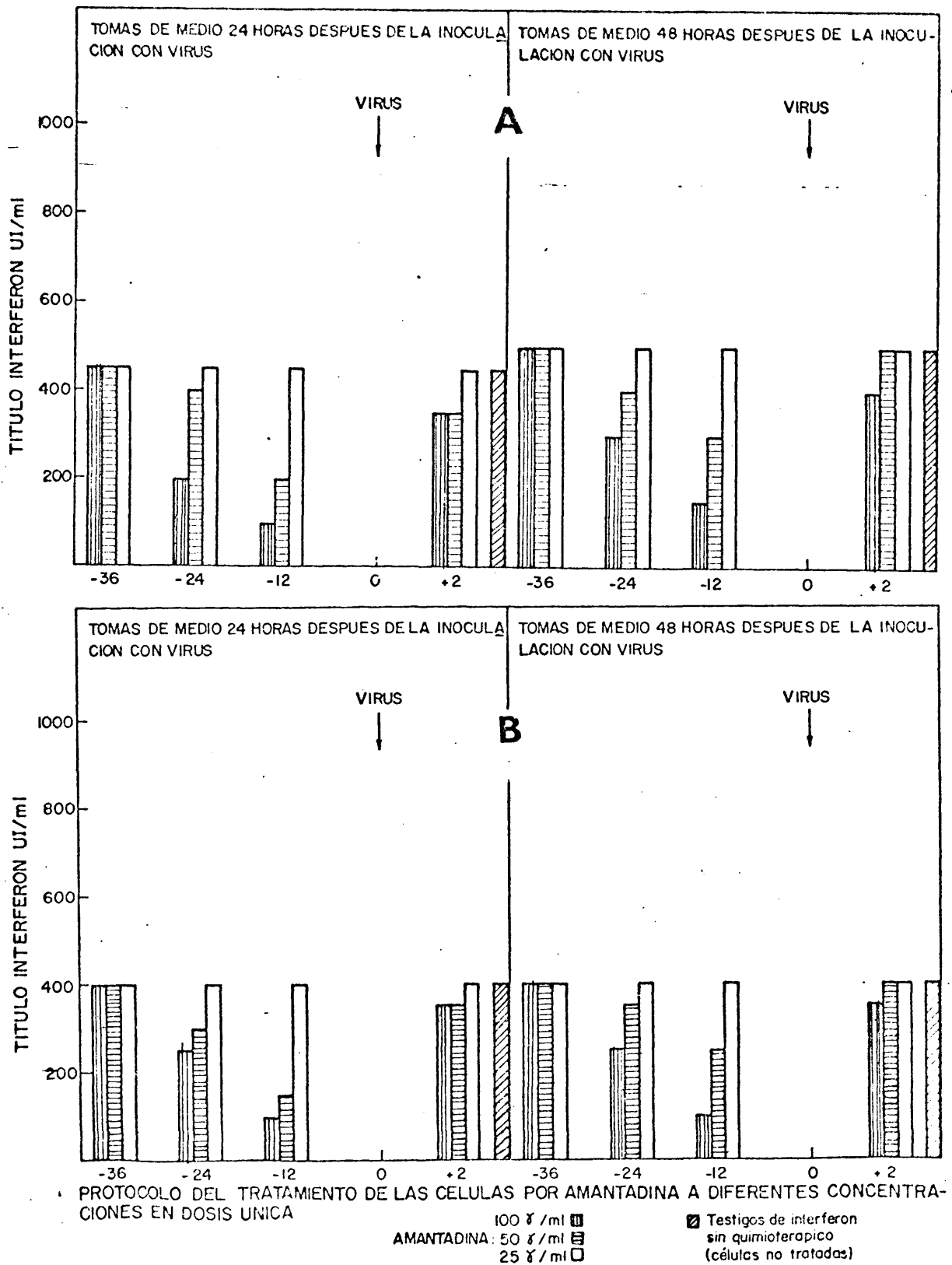


Fig. 45.- Variaciones en los títulos del interferón producido "in vitro" sobre fibroblastos inoculados con NDV (A) y virus Sendai (B) en presencia de distintas dosis de amantadina.

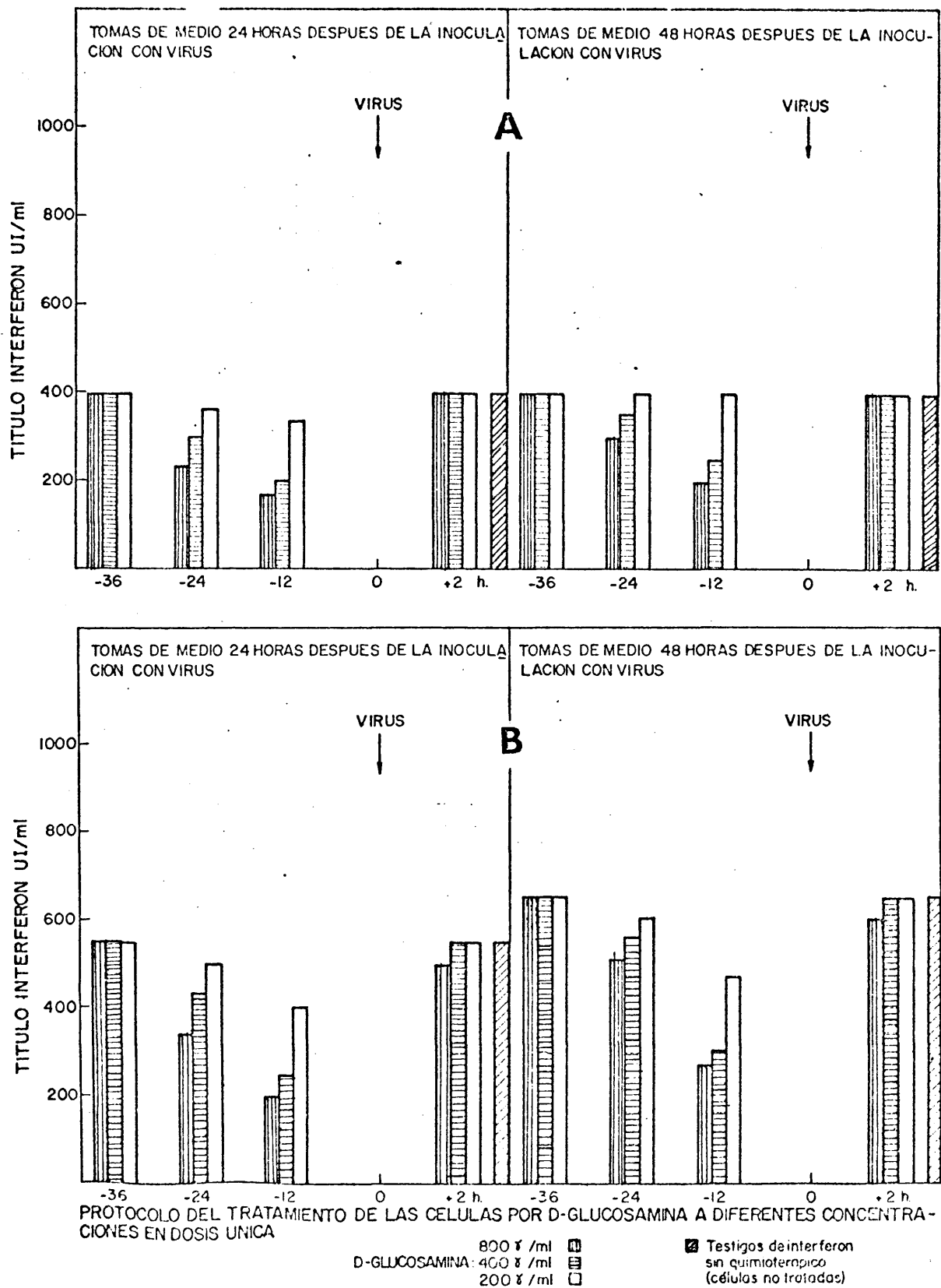


Fig. 46.- Variaciones en los títulos del interferón producido "in vitro" sobre fibroblastos inoculados con FPV (A) e influenza (B) en presencia de distintas dosis de D-glucosamina.

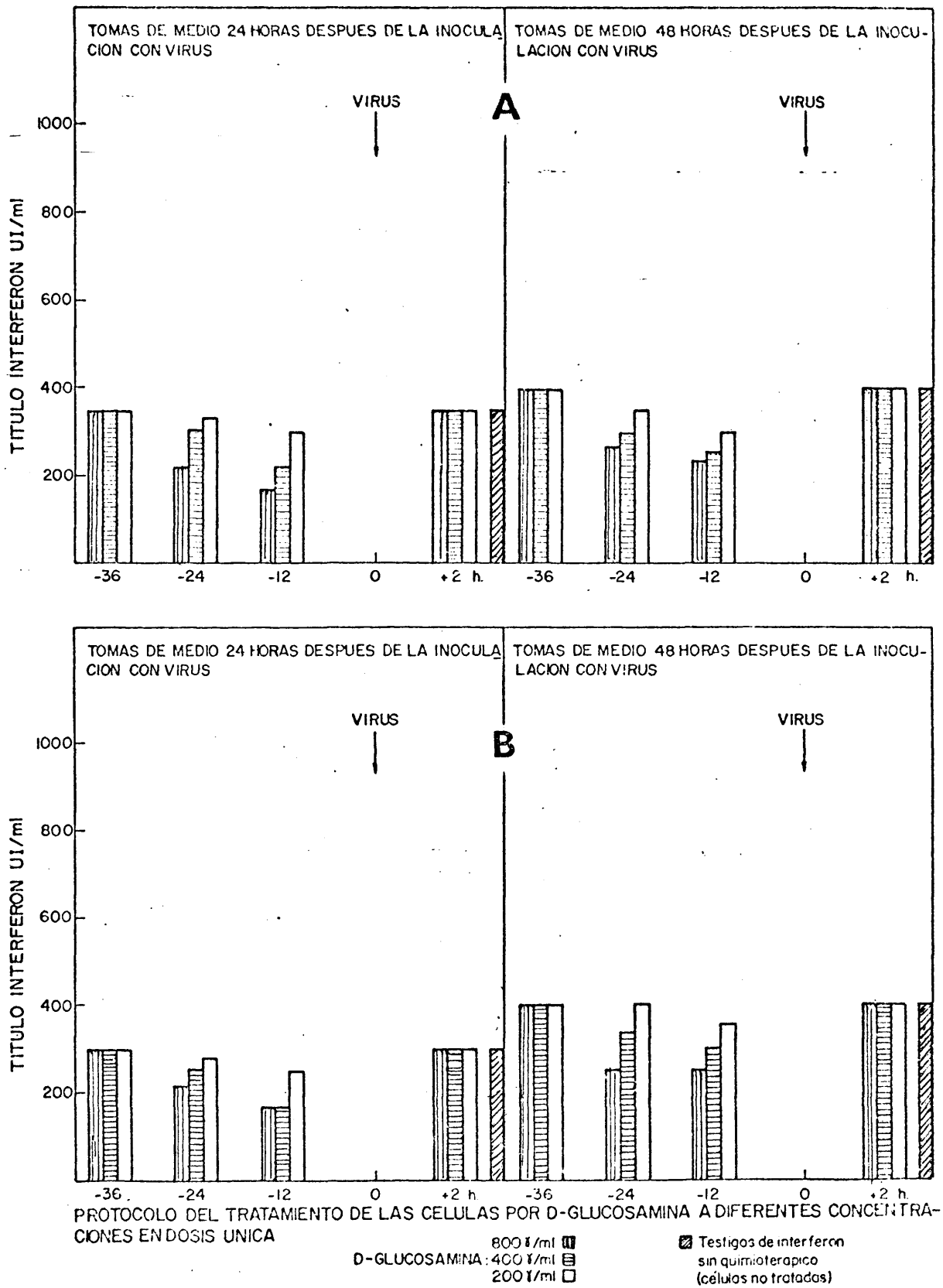


Fig. 47.- Variaciones en los títulos del interferón producido "in vitro" sobre fibroblastos inoculados con NDV (A) y virus Sendai (B) en presencia de distintas dosis de D-glucosamina.

presión es completa cuando se utiliza el adamantano a dosis de 100 γ en la inducción de interferón por los virus FP y Sendai.

Pocas diferencias se pueden apreciar entre las determinaciones efectuadas a las 24 y 48 horas del tratamiento inductor excepto en los casos de los virus FP y Sendai que en la determinación de 24 horas con 100 γ de adamantano presentaba una depresión absoluta y a las 48 horas presenta niveles detectables de interferón. Sin embargo, donde sí se aprecia una influencia clara de la inhibición del interferón por el quimioterápico es dependiendo del intervalo previo a la inducción; así cuando el quimioterápico se administra 36 horas antes no se observa ningún efecto, mientras que en tratamientos quimioterápicos precediendo 24 horas a la inducción ya se aprecian algunos efectos interferón-depresores que se hacen mucho mas patentes cuando el quimioterápico se administra 12 horas antes que el virus inductor que se hace mucho mas patente en el caso de FPV y Sendai como antes reseñamos.

Cuando el quimioterápico se administra 2 horas después que el virus tan sólo se observa alguna ligera acción depresora del interferón en las concentraciones mas elevadas; todo ello pese a que el quimioterápico, en este caso concreto, está presente en el medio nutritivo de las células. Cabe suponer, según señalaremos en las consideraciones de resultados, que estas diferencias están condicionadas por la farmacocinética de las sustancias.

Cuando se consideran los resultados correspondientes a la D-glucosamina (Figs. 46 y 47) se puede ver un comportamiento similar al presentado por la amantadina. También en

estos casos los mayores efectos se observan en las determinaciones al cabo de 24 horas y para los tratamientos previos de 12 horas. En los tratamientos correspondientes a 2 horas después de la inducción viral no se apreciaron diferencias con relación al control, excepto en el caso del virus influenza y para la dosis de 800 μ /ml.

Cuando estos experimentos "in vitro" se realizaron en presencia de rifampicina, rifamicina, bleomicina y cromomicina, se obtuvieron los resultados que se indican en los cuadros XXVII y XXVIII correspondientes a los ortho y paramixovirus respectivamente. Como en los casos anteriores en los tratamientos previos de 2 y 4 horas se eliminaba la substancia previo lavado de las células, mientras que en los tratamientos simultaneo y posterior de 2 y 4 horas el antibiótico coexiste con el inductor.

Tal como se indica en los cuadros mediante zonas recuadradas para una mejor interpretación, se obtienen resultados en los que no se aprecia ningún efecto (zonas destacadas) y otras en las que hay una variable depresión que es dependiente de la naturaleza del antibiótico, de la dosis y de los intervalos del tratamiento, siendo sin embargo independiente de la naturaleza del virus inductor.

En general, podemos decir que las moléculas ansamicínicas son las mas efectivas seguidas de la bleomicina; que los tratamientos previos resultaron los mas eficaces en la mayoría de los casos; siempre se observó una proporcionalidad condicionada por la dosis; y finalmente, esta acción depresora fue mas patente en las determinaciones efectuadas a las 24 horas.

CUADRO XXVII

VARIACIONES EN LA PRODUCCION DE INTERFERON EN FIBROBLASTOS DE POLLO (U.I/ml) INFECTADOS CON FPV E INFLUENZA (I) TERMOINACTIVADOS, EN PRESENCIA DE DISTINTOS ANTIBIOTICOS

TITULACION (2)	TRATAMIENTOS (3)	ANTIBIOTICOS Y DOSIS (4) UTILIZADAS												TESTIGOS SIN ANTIBIOTICO (5)
		RIFAMPICINA			RIFAMICINA			BLEOMICINA			CROMOMICINA			
		10	50	100	2'5	5	10	5	10	50	0'25	0'5	1	
24 h.	-4	120	0	0	80	60	0	250	50	10	250	100	0	450
	-2	170	80	0	110	70	0	200	50	0	450	200	0	
	0	300	250	120	150	110	60	300	90	0	450	330	190	
	+2	450	300	260	250	170	80	350	200	100	450	450	270	
	+4	450	450	300	300	200	100	450	450	450	450	450	350	
48 h.	-4	120	0	0	90	60	0	350	200	40	300	190	0	450
	-2	240	90	0	120	80	0	280	140	0	450	240	0	
	0	400	350	160	160	130	80	260	100	0	450	350	200	
	+2	450	450	280	300	200	100	350	280	120	450	450	300	
	+4	450	450	400	300	230	110	450	450	350	450	450	400	

24 h.	-4	200	0	0	20	0	0	300	180	80	300	200	0	600
	-2	300	100	0	100	40	0	260	100	0	600	240	0	
	0	600	200	90	200	90	40	260	80	0	600	380	160	
	+2	600	600	250	400	220	80	600	200	100	600	450	200	
	+4	600	600	450	500	330	100	600	600	300	600	500	350	
48 h.	-4	200	0	0	30	0	0	350	180	100	350	280	0	650
	-2	350	150	0	100	60	0	230	100	0	400	300	0	
	0	650	260	120	200	100	60	290	120	0	500	360	200	
	+2	650	650	280	450	250	120	650	350	200	650	550	350	
	+4	650	650	500	500	350	150	650	650	400	650	650	450	

- (1) El cuadro superior corresponde a experiencias con FPV (10^5 DICT) y el cuadro inferior a las del virus influenza (10^5 DICT).
- (2) Las determinaciones de interferón se efectuaron a las 24 y 48 h. después de la infección viral.
- (3) Los tratamientos antibióticos se instauraron en una sola dosis 4 y 2 h. antes, simultáneamente y 2 y 4 h. después de la infección viral.
- (4) Las dosis de rifampicina y rifamicina representan μ /ml mientras que para bleomicina y cromomicina se usaron ng/ml.
- (5) Células infectadas con virus, el título en U.I/ml es común para toda la serie.

CUADRO XXVIII

VARIACIONES EN LA PRODUCCION DE INTERFERON EN FIBROBLASTOS DE POLLO (UI/ml) INFECTADOS CON NDV Y SENDAI (1) TERMOINACTIVADOS, EN PRESENCIA DE DISTINTOS ANTIBIOTICOS

TITULACION (2)	TRATAMIENTOS (3)	ANTIBIOTICOS Y DOSIS (4) UTILIZADAS												TESTIGOS SIN ANTIBIOTICO (5)
		RIFAMPICINA			RIFAMICINA			BLEOMICINA			CROMOMICINA			
		10	50	100	2'5	5	10	5	10	50	0'25	0'5	1	
24 h.	-4	120	0	0	65	50	0	300	280	90	300	120	0	300
	-2	180	60	0	90	50	0	250	120	0	300	220	0	
	0	300	270	100	180	120	50	250	80	0	300	300	180	
	+2	300	300	240	260	160	70	250	120	80	300	300	260	
	+4	300	300	240	280	170	80	300	300	300	300	300	240	
48 h.	-4	150	0	0	90	60	0	300	300	100	300	180	0	300
	-2	200	80	0	120	70	0	260	140	0	300	220	40	
	0	300	300	120	200	150	50	250	100	0	300	300	200	
	+2	300	300	280	260	180	70	300	140	100	300	300	260	
	+4	300	300	280	280	180	80	300	300	300	300	300	300	

24h.	-4	140	0	0	85	70	0	400	300	120	320	140	0	400
	-2	210	80	0	120	90	0	280	140	0	400	240	0	
	0	400	400	120	210	130	50	300	80	0	400	300	120	
	+2	400	400	270	300	180	80	400	120	90	400	360	200	
	+4	400	400	400	320	210	100	400	400	300	400	400	300	
48h.	-4	170	0	0	200	100	0	500	360	160	360	180	0	500
	-2	240	160	0	250	110	0	320	160	0	500	300	0	
	0	500	500	130	280	140	70	400	100	20	500	400	140	
	+2	500	500	500	450	190	100	500	180	140	500	460	250	
	+4	500	500	500	500	250	130	500	500	500	500	500	450	

- (1) El cuadro superior corresponde a experiencias con NDV (10^5 DICT) y el cuadro inferior a las del virus Sendai
- (2) Las determinaciones de interferón se efectuaron a las 24 y 48 h. después de la infección viral.
- (3) Los tratamientos antibióticos se instauraron en una sola dosis 4 y 2 h antes, simultáneamente y 2 y 4 h después de la infección viral.
- (4) La dosis de rifampicina y rifamicina representan μ /ml mientras que para bleomicina y cromomicina se usaron ng/ml.
- (5) Células infectadas con virus. El título en U.I./ml es común para toda la serie.

Como dijimos anteriormente, los experimentos "in vivo" se efectuaron sobre pollos y la inducción se llevó a cabo con los virus sin inactivar puesto que las determinaciones de interferón en suero se habían de efectuar a las 6 horas.

En los cuadros XXIX y XXX se recogen los resultados obtenidos en presencia de adamantano, amantadina y D-glucosamina para los ortho y paramixovirus respectivamente.

Como puede verse no hay apenas diferencias, tal como sucede en las pruebas in vitro, condicionadas por la naturaleza del virus, pero si por las dosis y el tipo de molécula empleada en el tratamiento. En este caso la D-glucosamina resultó la menos efectiva por tratarse de dosis que posiblemente fueran rápidamente metabolizadas.

En cuanto al adamantano y amantadina, resultó mas activo el primero de ellos y proporcionalmente a la dosis utilizada.

En las pruebas sobre variaciones en la inducción de interferón en presencia de los distintos antibióticos se obtuvieron los resultados que se indican en los cuadro XXXI (rifamicina), XXXII (rifamicina), XXXIII (bleomicina) y XXXIV (cromomicina).

Al interpretar los resultados nos encontramos con que resultan mas activas la bleomicina y la cromomicina, que la actividad es proporcional a la dosis empleada y que el efecto inhibitor se manifiesta sobre todo para tratamientos

CUADRO XXIX

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE INTERFERON EN SUERO (UI/ml) DE POLLOS A LAS 6 HORAS DE INFECCION CON FPV E INFLUENZA (I), EN PRESENCIA DE DISTINTOS QUIMIOTERAPICOS

TRATAMIENTOS (2)	QUIMIOTERAPICOS Y DOSIS UTILIZADAS (mg/Kg de peso)						SUERO DE ANIMALES SIN TRATAR
	ADAMANTANO		AMANTADINA		D-GLUCOSAMINA		
	100	250	100	250	100	250	
- 36 h.	800	800	800	800	800	800	800
- 24 h.	800	200	800	600	800	800	800
- 12 h.	300	100	700	500	800	800	800
+ 2 h.	800	800	800	800	800	800	800

- 36 h.	900	800	1100	1100	1100	1100	1100
- 24 h.	600	400	1100	800	1100	1100	1100
- 12 h.	100	150	600	300	1100	1100	1100
+ 2 h.	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100

(1) EL CUADRO SUPERIOR CORRESPONDE A EXPERIENCIAS CON FPV (10^5 DICT) MIENTRAS QUE EL INFERIOR ES CON VIRUS INFLUENZA (10^5 DICT)

(2) LOS TRATAMIENTOS QUIMIOTERAPICOS SE INSTAURARON EN UNA SOLA DOSIS A LAS 36, 24 y 12 horas ANTES Y 2h. DESPUES DE LA INFECCION VIRAL

CUADRO XXX

VARIACIONES EN LOS NIVELES DE INTERFERON EN SUERO (UI/ml) DE POLLOS A LAS 6 HORAS DE INFECCION CON NDV Y SENDAI (1), EN PRESENCIA DE DISTINTOS QUIMIOTERAPICOS

TRATAMIENTOS (2)	QUIMIOTERAPICOS Y DOSIS UTILIZADAS (mg/Kg de peso)						SUERO DE ANIMALES SIN TRATAR
	ADAMANTANO		AMANTADINA		D-GLUCOSAMINA		
	100	250	100	250	100	250	
-36 h.	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200
-24 h.	1200	300	1200	900	1200	1200	1200
-12 h.	400	100	1200	700	1200	1200	1200
+ 2 h.	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200

-36 h.	800	500	1000	1000	1000	1000	1000
-24 h.	700	300	1000	800	1000	1000	1000
-12 h.	250	100	1000	400	1000	1000	1000
+ 2 h.	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

(1) EL CUADRO SUPERIOR CORRESPONDE A EXPERIENCIAS CON NDV (10^5 DICT) MIENTRAS QUE EL INFERIOR ES CON VIRUS SENDAI (10^5 DICT)

(2) LOS TRATAMIENTOS QUIMIOTERAPICOS SE INSTAURARON EN UNA SOLA DOSIS A LAS 36,24 y 12 horas ANTES Y 2h. DESPUES DE LA INFECCION VIRAL

INTERACCION DE LA RIFAMPICINA SOBRE LA INDUCCION DE INTERFERON CON VIRUS, EN POLLOS					
TIPO DE TRATAMIENTO Y DOSIS UTILIZADAS	TITULOS DE INTERFERON EN SUERO (UI/ml) CON DIFERENTES VIRUS INDUCTORES 10 ⁵ DICT/0.3 ml				
	NDV	SENDAI	FPV	INFLUENZA	
CONTROL SIN ANTIBIOTICO	1200	800	900	1200	
10mg DE RIFAMPICINA EN 0.3ml (iv)	0	0	0	0	0
4 h. ANTES QUE EL INDUCTOR	20	20	15	20	20
2 h. ANTES QUE EL INDUCTOR	180	160	180	200	200
SIMULTANEAMENTE CON EL INDUCTOR	1100	700	800	1000	1000
2 h. DESPUES QUE EL INDUCTOR	1200	800	900	1200	1200
4 h. DESPUES QUE EL INDUCTOR					
250mg DE RIFAMPICINA EN 0.3ml (iv)	0	0	0	0	0
4 h. ANTES QUE EL INDUCTOR	10	15	20	20	20
2 h. ANTES QUE EL INDUCTOR	170	180	220	240	240
SIMULTANEAMENTE CON EL INDUCTOR	1000	800	900	1100	1100
2 h. DESPUES QUE EL INDUCTOR	1200	800	900	1200	1200
4 h. DESPUES QUE EL INDUCTOR					

CUADRO XXXII

INTERACCION DE LA RIFAMICINA SOBRE LA INDUCCION DE INTERFERON CON VIRUS, EN POLLOS				
TIPO DE TRATAMIENTO Y DOSIS UTILIZADAS	TITULOS DE INTERFERON EN SUERO (UI/ml) CON DIFERENTES VIRUS IN- DUCTORES 10 ⁵ DICT/0.3 ml			
	NDV	SENDAI	FPV	INFLUENZA
CONTROL SIN ANTIBIOTICO	1200	800	900	1200
4 h. ANTES QUE EL INDUCTOR	0	0	0	0
2 h. ANTES QUE EL INDUCTOR	0	0	0	0
SIMULTANEAMENTE CON EL INDUCTOR	40	30	30	50
2 h. DESPUES QUE EL INDUCTOR	110	100	100	120
4 h. DESPUES QUE EL INDUCTOR	300	200	250	260
250mg DE RIFAMICINA 100mg EN 0.3ml (iv)	0	0	0	0
4 h. ANTES QUE EL INDUCTOR	0	0	0	0
2 h. ANTES QUE EL INDUCTOR	0	0	0	0
SIMULTANEAMENTE CON EL INDUCTOR	30	25	25	30
2 h. DESPUES QUE EL INDUCTOR	70	80	100	80
4 h. DESPUES QUE EL INDUCTOR	250	200	400	300

CUADRO XXXIII

INTERACCION DE LA BLEOMICINA SOBRE LA INDUCCION DE INTERFERON CON VIRUS, EN POLLOS				
TIPO DE TRATAMIENTO Y DOSIS UTILIZADAS	TITULOS DE INTERFERON EN SUERO (UI/ml) CON DIFERENTES VIRUS INDUCTORES 10 ⁵ DICT/0.3 ml			
	NDV	SENDAI	FPV	INFLUENZA
CONTROL SIN ANTIBIOTICO	1200	800	900	1200
4 h. ANTES QUE EL INDUCTOR	0	0	0	0
2 h. ANTES QUE EL INDUCTOR	0	0	0	0
SIMULTANEAMENTE CON EL INDUCTOR	400	300	300	450
2 h. DESPUES QUE EL INDUCTOR	1200	800	900	1200
4 h. DESPUES QUE EL INDUCTOR	1200	800	900	1200
4 h. ANTES QUE EL INDUCTOR	0	0	0	0
2 h. ANTES QUE EL INDUCTOR	0	0	0	0
SIMULTANEAMENTE CON EL INDUCTOR	300	200	250	300
2 h. DESPUES QUE EL INDUCTOR	1200	800	900	1200
4 h. DESPUES QUE EL INDUCTOR	1200	800	900	1200

CUADRO XXXIV

INTERACCION DE LA CROMOMICINA SOBRE LA INDUCCION DE INTERFERON CON VIRUS, EN POLLOS				
TIPO DE TRATAMIENTO Y DOSIS UTILIZADAS	TITULOS DE INTERFERON EN SUERO (UI/ml) CON DIFERENTES VIRUS IN- DUCTORES 10 ⁵ DICT5c/0.5ml			
	NDV	SENDAI	FPV	INFLUENZA
CONTROL SIN ANTIBIOTICO	1000	800	800	1200
4 h. ANTES QUE EL INDUCTOR	0	0	0	0
2 h. ANTES QUE EL INDUCTOR	100	100	80	100
SIMULTANEAMENTE CON EL INDUCTOR	250	300	250	300
2 h. DESPUES QUE EL INDUCTOR	1000	800	800	1100
4 h. DESPUES QUE EL INDUCTOR	1000	800	800	1200
4 h. ANTES QUE EL INDUCTOR	0	0	0	0
2 h. ANTES QUE EL INDUCTOR	0	0	0	0
SIMULTANEAMENTE CON EL INDUCTOR	100	100	70	80
2 h. DESPUES QUE EL INDUCTOR	1000	800	800	1000
4 h. DESPUES QUE EL INDUCTOR	1000	800	800	1200

previos a la inducción ya que para tratamientos sucesivos de 2 y 4 horas después de la inducción se obtienen los mismos títulos que sin antibiótico, en cuanto a diferencias en función de la naturaleza del virus parece ser el FPV el que resulta ligeramente mas sensible.

En los tratamientos con ansamicinas es mas activo, en la depresión del interferón, la rifamicina; pero también aquí se observa un mayor efecto cuando se instauran tratamientos previos, aunque con estas moléculas a diferencia con lo que sucedía con los otros antibióticos se aprecian depresiones variables para los tratamientos simultaneos e incluso posteriores; con la rifamicina, que se mostró el más activo de los dos, se observan depresiones incluso del 60% cuando se administra el antibiótico 4 horas después del inductor.

V. CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS

Al considerar los resultados obtenidos, una vez mas se aprecia el problema que entraña conseguir avances en la Quimioterapia antiviral obviando los inconvenientes de alterar el metabolismo de la célula huésped o las dificultades de accesibilidad del quimioterápico a la estructura molecular del virus. De aquí que se hayan utilizado, tan sólo, algunas sustancias con posibilidad de aplicación a viriasis humanas y animales aunque variando determinados parámetros de dosis, vía y modo de administración para conocer -además de la capacidad biológica- la capacidad condicionante de los trastamientos variables y sí existe posibilidad de reversión en función del modo de aplicación del quimioterápico.

El hecho de que no hayamos encontrado ningún estudio sistemático comparativo entre el efecto de varias sustancias de distinta naturaleza y mecanismo de acción y teniendo en cuenta, además, la respuesta del huésped, nos obliga a comentar y evaluar los resultados desde distintos puntos de vista, tanto en cuanto a la naturaleza del virus como a la significación de la estructura molecular y nivel de acción del quimioterápico

empleado; por otra parte, también consideraremos los datos obtenidos como una resultante del complejo fenómeno de interacción virus-quimioterápico-huesped y de la significación que el método experimental puede tener en dichos resultados. Es por esto por lo que la gran cantidad de datos obtenidos serán considerados: a) en relación con el método de estudio; b) en cuanto a la naturaleza del virus empleado; c) según la estructura molecular y nivel de acción del quimioterápico; d) en función de la variabilidad de distintos parámetros condicionados por el tratamiento; y e) como una resultante de la respuesta global del huesped.

1.- Criterios en la selección de métodos para evaluación de quimioterápicos antivirales.

Como en otros campos de la Microbiología, hemos utilizado pruebas "in vitro" e "in vivo". Las pruebas "in vitro" han sido de dos tipos: (a) el contacto directo, que mide el grado inmediato de inactivación y (b) los experimentos sobre cultivos celulares en los cuales pudimos medir los efectos antivirales que pueden estar relacionados con la adsorción, penetración desvestimiento, biosíntesis, ensamblado y salida del virion de la célula huesped.

Las pruebas "in vivo" utilizadas, se pueden considerar también de dos tipos: (a) los que miden respuestas condicionadas directamente por algún sistema del organismo huesped o bien, (b) las que determinan la supervivencia del huesped como criterio de eficacia.

Tenemos que reconocer que a lo largo de la redacción de esta Memoria nos hemos visto muchas veces en la duda de sí

podríamos catalogar el cultivo celular como método "in vitro", como su propia etimología indica o bien considerarlo como "in vivo" puesto que se está actuando sobre células vivas; por todo ello hemos procurado en la descripción de experimentos dejar bien claro a que tipo de pruebas "in vitro" nos estábamos refiriendo.

En cuanto se refiere a las pruebas "in vivo" hemos optado por diversas razones por la técnica de inoculación sobre embriones o "in ovo", variantes suficientemente orientadora por actuar sobre un sustrato con un mecanismo metabólico suficientemente desarrollado, por ser susceptible de infección por cualquiera de los cuatro virus ensayados y porque en el se puede estudiar perfectamente la supervivencia como un criterio de actividad antiviral del compuesto en estudio.

A efectos de cuantificación del poder viricida se considerap por la mayoría de los autores que una diferencia de 2 logaritmos decimales en los valores DICT obtenidos en células tratadas con cualquier droga comparada con los DICT obtenidos en células testigo indica actividad; igual significado tiene la diferencia entre 2-3 logaritmos en base 2 para las prácticas de hemaglutinación.

En nuestro caso el método de contacto directo "in vitro" ha mostrado su eficacia para cromomicina mientras que este método ha dado resultados menos satisfactorios para amantadina, adamantano y D-glucosamina.

En las técnicas sobre fibroblastos se pueden estudiar periodos de contacto previo mas prolongados que en las técnicas "in ovo" quizá ello sea debido a problemas farmacocinéticos ante la complejidad del segundo sistema o a una capacidad detoxificante del organismo que no puede aparecer en las células.

Una ventaja a tener en cuenta en estos estudios es la menor cantidad de substancia requerida para ensayar sobre cultivos celulares frente a la necesaria en embriones aunque la respuesta embrionaría se aproxima mas a la propia experimentación clínica.

No se puede juzgar la aplicabilidad de una substancia antiviral sín conocer la interacción con la respuesta del huesped; esto lleva a la necesidad de utilizar técnicas que valoren la producción de interferón y la respuesta inmunitaria. De estas técnicas hemos de señalar que la que proporciona valores mas reales del fenómeno es la titulación sérica de los niveles de interferón.

En cuanto a la respuesta inmunitaria consideramos que los títulos de anticuerpos humorales son los que pueden definir mejor si aparece un fenómeno de inmunosupresión condicionado por la aplicación del quimioterápico y la presencia de anticuerpos circulantes que son los encargados de la neutralización biológica del virus y que en definitiva irán a potenciar el efecto del quimioterápico antiviral.

2.- Variabilidad de efectos del quimioterápico en función de los caracteres bioquímico-estructurales del virus.

Ya en las consideraciones previas para la actualización del tema señalamos las ventajas de elegir los Mixovirus como modelo biológico para estudiar relaciones virus-quimioterápico-huesped: a) por estar dotados de una membrana cuya síntesis puede proporcionarnos una sensibilidad diferenciada distinta a la de otros virus desnudos; b) su naturaleza de RNA-virus

con posibilidad de desarrollar cuadros lentogénicos, síndromes carcinoides y un amplio espectro de virulencia y citopaticidad; c) versatilidad condicionada por su capacidad mutagénica y d) dificultades de control inmunológico con diferencias tan acusadas como entre la máxima protección obtenida en peste aviar atípica con virus de cepas mutadas o atenuadas y la mínima conferida por la vacunación antigripal por los frecuentes cambios en la composición antigénica del virus influenza. Esto unido a que se comparan datos entre orthomixovirus (influenza y FPV) y paramixovirus (NDV y Sendai) que son agentes taxonómicamente relacionados nos permite comprobar efectos diferenciales de los quimioterápicos en función de la naturaleza del virus. Efectivamente, pese a que ambos son de morfología esférica sin embargo presentan diferencias de tamaño y en cuanto a las espículas, en los orthomixovirus, son de dos tipos, unos con actividad hemaglutinante y otros con acción neuraminidásica, mientras que en los paramixovirus ambas actividades coexisten en una misma formación espicular. En cuanto a la sensibilidad de estos virus, las diferencias morfológicas pueden condicionar las variaciones de sensibilidad observadas frente a los distintos quimioterápicos tanto "in vitro" como "in vivo". Así, en términos generales y se observa que los orthomixovirus son mas sensibles que los paramixovirus no apreciandose diferencias entre los componentes de cada grupo. Estas diferencias de sensibilidad pueden ser apreciadas tanto si se mide en función de su actividad hemaglutinante como en su poder citopático.

Resulta curioso señalar que cuando se comparan los efectos en función de las actividades hemaglutinante y citopática aparece una mayor diferencia en la sensibilidad de ambas actividades en "ortho" que cuando se estudiaron los paramixovirus; ello puede ser debido a que los virus FP e influenza tienen independientes las espículas hemaglutinantes cuya fun-

ción puede quedar totalmente afectada.

Otra posible diferencia a señalar es que en presencia de cromomicina pese a ser algo mas sensible el FPV medido por la disminución en su poder infectivo, se aprecia una ligera capacidad de reversión de este efecto viral a las 48 horas, fenómeno que no se aprecia en el caso de NDV.

3.- El efecto antiviral en función de la naturaleza del quimioterápico y su nivel de acción bioquímica.

En nuestro caso cabe distinguir entre aquellas sustancias que han sido utilizadas preferentemente como quimioterápicos antivirales, tales como cromomicina, adamantano, amantadina y D-glucosamina y aquellas otras que hemos ensayado para conocer su posible intervención en la respuesta del huésped frente a una infección viral tratada por quimioterápicos de distintos mecanismo de acción bioquímica. Entre estos existen además de los anteriormente citados, antibióticos tales como bleomicina, rifampicina y rifamicina; de ellos nos ocuparemos en el apartado referente a respuesta del huésped.

En cuanto a la acción antiviral propiamente dicha nos hemos ocupado de las posibilidades de inhibir la replicación viral a nivel de la penetración del agente infeccioso alterando la fase de desvestimiento del virión (amantadina y adamantano), mediante inhibiciones en la síntesis de ácidos nucleicos (cromomicina) y por alteraciones en la formación de membranas virales en las células infectadas (D-glucosamina).

En cuanto al efecto antiviral de estas substancias, utilizadas a dosis no tóxicas para el huésped, tanto si se trata de fibroblastos como si es de embriones de pollo, es variable y depende de varias circunstancias relacionadas con la concentración, modalidad del tratamiento y método de ensayo.

Así la cromomicina, en efecto no alcanza a producir variaciones en los títulos hemaglutinantes, mientras que sí se aprecia una cierta actividad antiviral "in vitro" frente a NDV y FPV para contactos de 90 y 120 minutos entre el antibiótico y el virus, ensayando la actividad residual tanto en fibroblastos como sobre huevos embrionados; esta acción, mas que por los tratamientos de contacto previo "in vitro", parece producirse "in vivo" durante la incubación de los fibroblastos o embriones con los virus cromomicin-tratados.

El adamantano y amantadina presentan ligeros efectos antivirales por tratamientos de contacto "in vitro" a distintas temperaturas y tiempos (hasta 4 horas). Sin embargo cuando establecimos una modalidad experimental semejante, en pruebas de protección "in vivo" sobre huevos embrionados de diez días, obtuvimos resultados mucho mas claros y definitivos. En estas condiciones parece claro que, a unidad de dosis, la amantadina es mas activa que el adamantano y que esta protección "in vivo" se hace mas patente cuando la dosis infectiva viral es de 100 DLE₅₀ y para un tratamiento previo de 1-2 horas de intervalo.

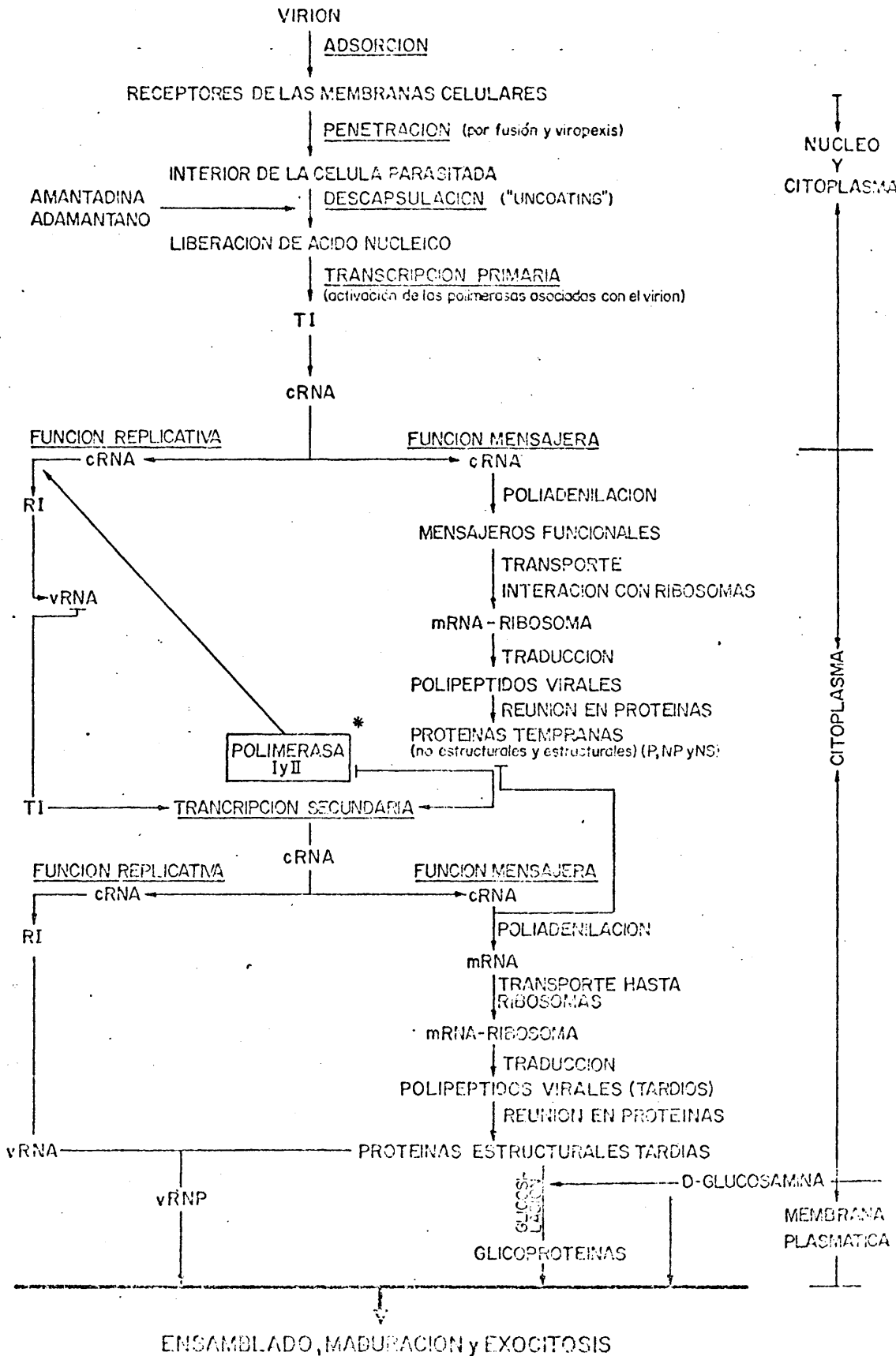
También con la D-glucosamina, el efecto antiviral resulta poco patente "in vitro" mientras que -como en los casos anteriores- mediante experiencias de protección "in ovo" se comprueba una ligera acción protectora frente a todos los virus ensayados.

Con el fin de establecer un examen comparativo del efecto de las tres sustancias se establecieron experimentos de protección, en series paralelas, sobre fibroblastos sometidos a contactos previos de 1 a 4 horas con el quimioterápico para asegurarnos de que este quedaba perfectamente incorporado a las células en cultivo. En todos los casos aparece claramente que los orthomixovirus son mas sensibles que los paramixovirus; que los contactos mas efectivos son los de 4 horas y el efecto es proporcional a la dosis. En estos ensayos se aprecia una clara depresión del título hemaglutinante del FPV en presencia de D-glucosamina.

Al intentar hacer algunas consideraciones sobre el nivel de acción de estos efectos es oportuno establecer un esquema de la replicación viral (Fig. 48) sobre el que se indiquen los distintos niveles de acción para mejor interpretar las diferencias de comportamiento entre las distintas sustancias utilizadas.

Como puede verse, en la replicación viral se pueden distinguir tres fases de distinta localización según se trate de la membrana, del citoplasma o con participación del nucleo. Por los resultados obtenidos, cabe interpretar que la amantadina sea mas efectiva cuando se interpone poco antes a la infección viral por actuar en el ciclo multiplicativo antes de la transcripción primaria. Haciendo un rápido recorrido sobre las distintas hipótesis que hasta la fecha han sido emitidas sobre la posible acción inhibitoria de la amantadina nos encontramos con hipótesis poco claras e incluso contradictorias aunque todas ellas están de acuerdo en que se inhibe una etapa temprana de la multiplicación viral siendo mucho mas sensible los virus pertenecientes al grupo orthomixovirus. Así HOFFMANN

ESQUEMA GENERAL DEL PROCESO GENERAL DE MULTIPLICACION DE LOS MIXOVIRUS



* Identificados solamente en CRITHACIDIOS

y cols. (1965) piensan que la amantadina inhibe la penetración viral, KATO y EGGERS (1969) el desvestimiento del virus; KALNI-NYA e INDULEN (1976) la transcripción primaria, SKEHEL y cols. (1977) obtienen resultados que no están de acuerdo con la mayoría de los investigadores citados y confirman que se encuentran en presencia de un mecanismo aún no suficientemente aclarado que actúa a nivel de desvestimiento. Por último, recientemente, LUBECK y cols. (1978) han encontrado, trabajando con mutantes de virus influenza A, que existe relación entre el efecto inhibitorio de la amantadina y la expresión del gen que codifica la proteína M, ya que la síntesis de esta proteína es inversamente proporcional al efecto inhibitorio de la amantadina.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta Memoria y teniendo en cuenta las hipótesis anteriormente citadas así como la seguridad de la imprescindible presencia en el ciclo multiplicativo de orthomixovirus de un factor nuclear sensible a la actinomicina D y resistente a la cicloheximida (factor que implica una actividad RNA polimerasa dependiente de DNA) para iniciar la multiplicación viral, nos hace pensar que la actividad antiviral de este quimioterápico pueda estar relacionada con la inhibición o depresión de ese "factor iniciador"; lo que significaría que el quimioterápico amantadina interferiría de alguna manera a nivel de la transcripción celular, bien formando enlaces de hidrógeno con el DNA celular de tal manera que evitaría la actividad normal de la RNA polimerasa dependiente del DNA o bien afectando directamente a esta última. De todas formas el mecanismo de inhibición de la multiplicación viral por la amantadina no debe ser tan sencillo ya que ni todos los orthomixovirus son igualmente sensibles, ni todos los paramixovirus son igualmente insensibles.

El adamantano, fue incluido por nosotros en el grupo de quimioterápicos antivirales en los cuales íbamos a desarrollar el trabajo objeto de la presente Memoria precisamente por mostrar, en pruebas llevadas a cabo en nuestro Laboratorio, un apreciable efecto depresor de interferón, posee una estructura semejante a la amantadina, de la cual sólo se diferencia por carecer del grupo NH_2 en posición 1, no presenta actividad antiviral significativa posiblemente por tener una fármaco-cinética mas lenta, lo cual implicaría la necesidad de tratamientos previos mas largos que los usados en nuestro protocolo experimental para producir un efecto cuantitativamente semejante al producido por la amantadina.

Los resultados obtenidos por nosotros en los estudios de la influencia de estos quimioterápicos sobre la producción de interferón, tanto "in vitro" como "in vivo", parecen sostener la idea de que estas sustancias deprimen la transcripción celular ya que tanto el adamantano como la amantadina son depresores de la producción del interferón, lo que implicaría una menor biosíntesis de mRNA de interferón. Así mismo la mayor efectividad de adamantano en la depresión de los niveles de interferón en amplios intervalos de tratamientos previos a la inducción de interferón confirmaría nuestra hipótesis de que el adamantano presenta una fármaco-cinética mas lenta.

Los efectos de la D-glucosamina se aprecian mas en función del poder hemaglutinante del virus que en el infectivo y ello es debido a que inhibe la glicosilación de ciertas proteínas constitutivas de las espículas portadoras de la capacidad hemaglutinante. A la vista de los resultados obtenidos por NAKAMURA y COMPANS (1978) la presencia de D-glucosamina hace que se

produzcan polipéptidos de las hemagglutininas que se pueden considerar aberrantes, del tipo HA' que incorporan deficientemente la fucosa y que son diferentes a la molécula precursora HA₀ y de la hemagglutinina normal HA, así como otros productos intermedios HA₀₁ y HA₀₂ en los que si pueden haber incorporación de fucosa pero que son heterogeneos en cuanto al grado de glicosilación. La capacidad hemaglutinante de estas partículas virales con espículas aberrantes es significativamente mas baja que la de los virus normales no sometidos a tratamiento glucosamínico. También según SCHNITZER y cols. (1975), la acción de la D-glucosamina, afectando las fases finales del ciclo de multiplicación viral altera funciones atribuidas a glicoproteínas virales que se relacionan con la hemadsorción hemaglutinación y fusión celular mientras que no afecta a los antígenos que intervienen en la fijación de complemento.

Debe tenerse en cuenta, además, que siendo la neuraminidasa una glicoproteína quedaría también afectada por este inhibidor de la glicosilación y aunque en proporción, al menos en orthomixovirus, es mucho menos que la hemagglutinina, podría también interferir, en menor grado, en la liberación del virión que la neuraminidasa desempeña un papel en la salida del virión a través de la membrana celular.

La diferencia del comportamiento inhibitorio de la D-glucosamina frente a ortho y paramixovirus puede deberse también a diferencias en la composición y ordenamiento de los azúcares en la fracción glucídica de ambas glicoproteínas por lo cual podría explicarse también el diverso grado de glicosilación final y por tanto su funcionalidad.

En cuanto a su poder depresor de la producción de interferón "in vitro" podría ser debido a la reducción del "pool UTP" (KLENK y cols. 1972) con lo que se vería afectada la producción de mRNA de interferón y a la síntesis de glicoproteínas de interferón parcialmente glicosiladas o aberrantes con lo que la función interferón se vería disminuida.

4.- Actividad antiviral en función de distintos parámetros biológicos.

Independientemente de las características del virus y de la naturaleza del quimioterápico, que junto con las técnicas de ensayo configuran el modelo biológico de estudio existe una serie de circunstancias a tener en cuenta en los resultados y que pueden inducir a errores interpretativos al llegar el momento de evaluar como positiva o negativa la aplicación de un determinado quimioterápico.

En primer lugar habrán de considerarse las dosis a utilizar, estas estarán a su vez condicionadas por la solubilidad y toxicidad del producto y sus posibilidades de neutralización o eliminación por el huésped.

En nuestro caso, en los ensayos sobre fibroblastos el adamantano y amantadina han sido suficientemente efectivos a dosis de 50 y 100 γ /ml de medio de mantenimiento, mientras que la D-glucosamina en los mismos ensayos ha presentado su actividad a dosis de 400 y 800 γ /ml. Para pruebas sobre huevos embrionados se ha efectuado el aporte del quimioterápico siempre en volúmenes de 0,2 ml por embrión y a este volumen referimos la dosis empleada que fueron de 400-600 γ para adamantano,

de 200-400 γ para amantadina y de 1000-2000 γ para D-glucosamina

En ambos casos de pruebas de dosificación del quimioterápico ha venido condicionada por su toxicidad y como regla general hemos empleado la máxima dosis atóxica, que no coincide para los tres quimioterápicos utilizados y aunque este proceder entraña diferencias cuantitativas en las dosis inoculadas hemos considerado preferible utilizar la substancia en la mas alta dosificación posible. Como era lógico esperar los efectos fueron proporcionales a las dosis utilizadas para cada una de las substancias, excepto en las pruebas de contacto directo de quimioterápico y virus "in vitro" en que la mayoría de los resultados fueron negativos.

Otro parámetro a considerar es el momento de aplicación de los quimioterápicos que en nuestros experimentos de protección antiviral han sido introducidos en ambos sistemas (cultivos de fibroblastos y embriones) en periodos de 4, 3, 2 y 1 h en dosis única previa a la infección viral. Los resultados obtenidos por nosotros indican que son necesarios contactos de 3 a 4 horas del quimioterápico sobre las células en cultivo, mientras que para el embrión la máxima actividad se obtiene cuando la substancia es inoculada 1 hora , o como mucho, 2 horas previamente al virus, ello puede estar condicionado por el mecanismo metabólico mas perfeccionado del embrión como dejamos indicado anteriormente.

En cuanto al modo de administración del quimioterápico varía según los propósitos de cada caso. Así para los cultivos celulares han sido preparadas soluciones de las distintas substancias en medios de mantenimiento celular hasta alcanzar la di-

lución final prefijada por ml de medio que ha de ser añadido al cultivo celular a los tiempos deseados mientras que en las pruebas de ensayo sobre huevos embrionados, el quimioterápico es inoculado en el huevo embrionado a las dosis requeridas, siempre, en volúmenes de 0,2 ml y en saco alantoideo.

Al considerar estos resultados queremos resaltar la necesidad de que se precisen exactamente las condiciones experimentales en el momento de evaluar la actividad de un quimioterápico, máxime cuando se hace con propósitos comparativos.

5.- Respuesta del huésped en presencia de algunos antibióticos y quimioterápicos antivirales.

Según es sabido la defensa del organismo frente a una agresión de origen vírico, se caracteriza por una inmunorrespuesta específica que sigue a la aparición de un interferón activo y que entre la síntesis de anticuerpos y la de interferón existen diferencias biológicas en el momento de la aparición, en su espectro de actividad, en el modo y sitio de acción y también en la resistencia a variaciones de pH (RONDA y ALONSO, 1977).

En cuanto al comportamiento de los antibióticos y quimioterápicos aquí utilizados, habremos de considerar -en relación con los primeros- que dan origen a una inmunosupresión ya demostrada recientemente en nuestro Departamento (BARASOAIN, 1976) y por tanto no juzgamos necesario repetir este tipo de experimentos y en cuanto a los quimioterápicos que puede producirse un efecto variable. Así hemos visto que el adamantano no producía ningún efecto en las series experimentales en que

utilizabamos orthomixovirus como agente antigénico mientras que aparecían efectos ligeramente inmunodepresores en los casos en que ensayamos con paramixovirus. Cabe pensar que ante un efecto tan débil como el presentado por esta sustancia en el desarrollo de la respuesta inmune, han de ser condicionantes diferenciales en los resultados el distinto carácter inmunogénico que pueda existir entre ortho y paramixovirus; ya que según hemos apuntado en otras ocasiones los paramixovirus presentan algunas peculiaridades de comportamiento serológico que pueden conllevar dificultades de control inmunológico y ello quizá sea debido posiblemente a una deficiente capacidad antigénica en nuestras condiciones experimentales.

Sin embargo en el caso de la amantadina, siempre aparece definido un patente efecto inmunodepresor con todos los virus utilizados; para esta sustancia, de acción depresora más potente sobre el sistema inmunitario, las diferencias inmunogénicas entre ambos grupos de virus se manifiestan en función del grado de inmunosupresión y que también resulta ser mayor con los paramixovirus.

Cuando este mismo planteamiento experimental se lleva a cabo en presencia de glucosamina observamos que, por el contrario, se produce un curioso fenómeno de discreta inmunostimulación de la respuesta humoral del huésped frente al estímulo antigénico viral; este efecto potenciador de anticuerpos, detectados como unidades inhibitoras de hemaglutinación, es de la misma intensidad en las cuatro series virales ensayadas no existiendo diferencias condicionadas por la naturaleza del virión. Examinando la cinética de esta estimulación vemos que se empieza a detectar desde el octavo día. A la hora de interpretar este

fenómeno de inmunoestimulación por el aminoazúcar vemos que es semejante a lo observado por JORBA (1977) en estudios de interacciones fármaco-huesped en los que la glucosamina era capaz de aumentar la supervivencia de ratones, en un grado variable, dependiendo de la especie bacteriana y también -en otro tipo de ensayos- aumentaba la reactividad inmunológica de los macrófagos. En nuestro caso cabe pensar que algún componente de membrana en el virus puede resultar estimulado en su inmunogenicidad por parentesco estructural con la hexosamina o bien que las células inmunocompetentes alcancen una mayor reactividad en las fases tempranas de la inmunorespuesta.

En cuanto a la otra forma de reacción específica del organismo huesped frente al virus -la inducción de interferón- hemos comprobado que puede no tener influencia o producirse una inhibición de variable intensidad dependiendo de la substancia, tipo de ensayo y otras circunstancias experimentales. En general hemos podido ver que los cuatro antibióticos inhiben la producción de interferón (especialmente la rifamicina) tanto "in vitro" como "in vivo" y que este efecto se produce sobre todo cuando la substancia se administra previamente a la inducción aunque con antibioticos de alto poder inhibidor o por aumento de la dosis pueden observarse también algunas disminuciones relativas en el nivel sérico del interferón. Cabe pensar que estas interacciones se producen por inhibición de RNA-polimerasas DNA-dependientes (rifamicinas) , roturas en las cadenas del DNA (bleomicina) e interacciones no covalentes con la molécula de DNA (cromomicina), durante la respuesta de las células huesped frente al inductor viral. Para algunos autores (GADALETA y cols.1970)

las moléculas ansamícinicas podrían actuar a nivel de las mitocondrias.

En cuanto a los tres quimioterápicos antivirales es preciso hacer una clara distinción según que los ensayos se realicen sobre cultivos celulares "in vitro" o en pollos. En el primer caso aparece una clara acción inhibidora de distinta magnitud que es mas intensa con el adamantano y mas suave con la glucosamina. Esta acción se produce específicamente en los tratamientos previos a las 12 horas. Parece lógico suponer que esta inhibición se produzca a distinto nivel molecular, que vendrá condicionada por interferencias con la glicosilación (en presencia del aminoazucar) e impidiendo la transcripción celular, mediante alteración directa o indirecta de la actividad normal de la RNA polimerasa DNA dependiente (con el adamantano y amantadina); la mayor actividad del primer de estos dos, pese a ser menos potente como antiviral, puede ser debida a diferencias en la farmacocinética de ambas sustancias que resulta ventajosa en el modelo experimental diseñado para valorar el interferón. En el caso de la inhibición por glucosamina pensamos que al inhibirse la glicosilación, podrían originarse moléculas de interferón mas pequeñas (oligómeros) que tendrán menor actividad biológica.

Los efectos "in vivo" son menos intensos con amantadina y glucosamina, siendo siempre más activo como inhibidor el primero de ellos y la glucosamina resulta totalmente inactiva. Ello puede ser debido a diferencias en la farmacocinética de las moléculas y sobre todo en el caso del aminoazucar, porque éste es rapidamente metabolizado a nivel hepático.

VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En la presente Memoria, en primer lugar, se hace un revisión de distintos antecedentes bibliográficos que nos permiten formarnos una idea clara de las relaciones estructura-función en los virus abarcando distintos aspectos que se refieren a la morfología, taxonomía y significación biológica de los virus en general para después, estudiar de un modo mas particular aquellos datos que se refieren a los Orthomixovirus y Paramixovirus en cuanto a su morfología y estructura, composición química y ciclo replicativo, así como un detallado examen de las analogías y diferencias que es posible encontrar entre estos dos grupos de virus entre los que destacamos el virión influenza y el NDV como mas representativos.

También, por otra parte, se revisan aquellos conocimientos de la bibliografía que pueden tener interés para interpretar nuestros datos relativos a la respuesta del huésped frente a una infección viral (interferón y producción de anticuerpos humorales), así como algunos aspectos de la quimioterapia anti viral entre los que se mencionan las distintas posibilidades de interferir la multiplicación viral y se valora de un modo crítico la varia metodología que se aplica en la investigación de este tipo de quimioterápicos.

Así, actualizando el tema, se ha comprobado que aunque se tiene un conocimiento exacto de las reacciones bioquímicas que aseguran la automultiplicación viral todavía existen algunas incógnitas en cuanto a ciertos detalles de regulación en la morfogénesis del virión y que los Mixovirus -por sus características bioquímico-estructurales y significación patogénica- constituyen un excelente modelo biológico para estudios de interacción virus-quimioterápico-huesped. Como diferencias más importantes entre los Ortho y Paramixovirus cabe señalar las derivadas de su distinta aglutinabilidad en presencia de lectinas, su comportamiento en los fenómenos de interferencia e infecciones persistentes y su variación antigénica, así como también por ciertas diferencias bioquímicas (síntesis de ciertas proteínas inducidas en la célula huesped) y estructurales (variaciones en las espículas) que nos han permitido interpretar algunas variaciones de sensibilidad frente a los distintos quimioterápicos usados.

Pese a la extensa bibliografía consultada, en cuanto a aplicación de la quimioterapia, nos ha parecido encontrar pocos datos comparativos sobre la influencia de distintos parámetros biológicos que intervienen en una interacción virus-quimioterápico y una manifiesta ausencia de datos relativos al efecto de estos antivirales en la respuesta del huesped frente a una infección viriásica. Por todo ello y para un mejor conocimiento de las relaciones virus-quimioterápico-huesped hemos intentado aportar algunos datos mediante:

a) Obtención de fibroblastos de pollo y estudio de sus condiciones de crecimiento en distintos medios experimentales.

b) Estudio de un medio idóneo para el mejor mantenimiento de fibroblastos en los sistemas biológicos de ensayo controlando la influencia de suero de ternera, hidrolizado de lac-

toalbúmina y extracto de levadura.

c) Determinación de las curvas de viabilidad celular para contactos de 48 horas en presencia de distintas concentraciones de adamantano, amantadina y D-glucosamina y confirmación de nuestros datos previos correspondientes a la viabilidad en presencia de cromomicina, bleomicina, rifampicina y rifamicina.

d) Determinación de curvas de supervivencia de huevos embrionados de 10 días en presencia de distintas concentraciones (0 a 3.000 γ /0,2 ml) de adamantano, amantadina y D-glucosamina.

e) Ensayos de infectividad viral con las cepas de FPV, influenza, NDV y Sendai para controlar las dosis infectivas o letales a utilizar según el propósito experimental en cada caso.

f) Control de un sistema , sobre fibroblastos de pollo, para estudiar interacciones FPV-cromomicina y NDV-cromomicina valorando las variaciones de título hemaglutinante y de la capacidad infectiva después de contactos variables a 37° C frente al antibiótico

g) Ensayo de interacciones virus-cromomicina sobre huevos embrionados previos contactos variables "in vitro"

h) Estudio de la acción de adamantano y amantadina sobre FPV, influenza, NDV y Sendai para ensayar la inhibición de la replicación viral en estadios tempranos de la infección de fibroblastos de pollo. En estos casos se ensayaron distintas modalidades experimentales de tratamiento "in vitro" e "in vivo"

i) Estudios de quimioterapia antiviral a nivel de revestimiento del virión por el empleo de glucosamina frente a infecciones con FPV, influenza, NDV y Sendai. Ensayos previos con galactosamina demostraron la no aplicabilidad de este aminoazúcar por su acción tóxica.

j) Estudios del poder citopático de los distintos mixovirus como un criterio de titulación en función de su patogénesis.

k) Mediante pruebas de protección en fibroblastos y embriones de pollo y para diversas modalidades de contacto se comparan las acciones quimioterápicas antivirales a nivel de estados tempranos de infección y del recubrimiento del virión. Los resultados se valoraron a través del título hemaglutinante y de su capacidad infectiva.

l) se ha planeado una serie de experiencias "in vivo" (sobre pollos Leghorn) encaminadas a controlar la respuesta del huésped cuando -infectado por mixovirus- se hacen intervenir en la interacción virus-fármaco-huésped distintos antibióticos (cromomicina, bleomicina, rifamicina y rifampicina) y quimioterápicos (adamantano, amantadina y D-glucosamina en distintas situaciones de tratamiento experimental (previo, simultaneo o post-infección viral)).

m) Se han realizado gran número de determinaciones de inhibición de la hemaglutinación para detectar la formación de anticuerpos antivirales en suero de pollos tratados y no tratados con los tres quimioterápicos.

n) Se ha efectuado una serie de experimentos previos para conocer la termoresistencia de los 4 mixovirus que habríamos de utilizar como inductores de interferón. El grado de termoinactivación se controló mediante titulación del poder citopático y hemaglutinante.

o) Ante la falta de datos en relación con la producción de interferón en presencia de las sustancias anteriormente citadas se planearon una serie de experiencias "in vitro" sobre cultivos celulares e "in vivo" sobre pollos para conocer el efecto de distintos tratamientos con antibióticos y quimioterápicos en la producción de interferón con los distintos mixovirus termoinactivados en el caso de determinaciones sobre cultivos celulares y activos cuando los experimentos se llevaron a cabo sobre pollos.

A partir de los resultados obtenidos en toda esta serie de experimentos así planteados cabe sacar las conclusiones que siguen en relación con la acción antiviral de distintos quimioterápicos sobre cuatro mixovirus y de su influencia y la de algunos antibióticos que actúan a nivel de síntesis de ácidos nucleicos sobre la respuesta del huésped:

1. El medio más adecuado para nuestros propósitos experimentales es el de Hank's con una concentración de 4% de suero fetal bovino (o del 2% para medios de mantenimiento) adicionado de 2 mg de hidrolizado de lactoalbúmina y 1 mg de extracto de levadura por litro de medio.

2. En cuanto a efectos tóxicos para fibroblastos de pollo, se ha comprobado que concentraciones de adamantano y amantadina superiores a 100 γ /ml empiezan a disminuir la viabilidad celular, mientras que en presencia de glucosamina no se empiezan a producir ligeras alteraciones hasta alcanzar las 800 γ /ml y al cabo de 36 h. de contacto.
3. Datos sobre la toxicidad para huevos embrionados de 10 días revelan que dosis de 400 γ /0,2 ml de amantadina y de 600 γ /0,2 ml de adamantano son perjudiciales para la supervivencia del embrión mientras que la glucosamina no presenta acciones tóxicas hasta casi alcanzar concentraciones cinco veces más elevadas.
4. Las dosis infectivas idóneas para nuestros propósitos experimentales fueron de 10^2 DICT para determinaciones sobre fibroblastos; de 10^2 DLE cuando se utilizan huevos embrionados; de 10^4 DICT inactivados con β -propiolactona en las pruebas de respuesta inmunitaria y de 10^5 DICT para la inducción de interferón.
5. Sometiendo NDV y FPV a la acción de cromomicina "in vitro" (dosis de 10^5 DICT) durante 90 a 120 minutos e inoculando después cultivos de fibroblastos se observa una discreta actividad antiviral que se supone condicionada a un efecto "in vivo" que se manifiesta en la segunda fase de ensayo.
6. Cuando este tipo de ensayos "in vitro" se valora sobre series de huevos embrionados en dosis de 10^5 DLE, se comprueba que no hay variaciones significativas en el título hemaglutinante pero se observa una pérdida superior a un logaritmo

decimal en sus valores DLE.

7. Pese a los ligeros aumentos de supervivencia observados en algunos lotes de fibroblastos infectados con FPV, influenza, NDV y Sendai cuando se sometían a tratamientos previos con adamantano, esta substancia no presenta actividad antiviral por contacto directo "in vitro".
8. Pruebas semejantes efectuadas con amantadina sobre embriones infectados con los mixovirus, fueron algo mas alentadoras observandose una mayor tendencia hacia la efectividad (amantadina-sensibilidad) cuando se ensayaba a 37° C, aunque de todas formas los resultados no fueron muy demostrativos.
9. Por los resultados obtenidos "in vivo" sobre embriones de 10 dias infectados con NDV y FPV y tratados con distintas dosis de adamantano y amantadina se comprueba que esta última tiene efectos mas potentes sobre todo frente a FPV y para contactos previos de protección de 2 horas.
10. Asimismo se comprueba que un tipo de ensayo idóneo para determinar el efecto antiviral de estos quimioterápicos es realizar pruebas de protección "in vivo" con diferentes intervalos de tratamiento previo e incubando a 37° C.
11. Pruebas de contacto "in vitro" con D-glucosamina, frente a embriones infectados con los cuatro mixovirus, revelaron que tampoco se detecta la acción antiviral a nivel de revestimiento del virión mediante este tipo de tratamiento.

12. Cuando se aplicaron estudios de protección "in vivo" de embriones, mediante el empleo de glucosamina, se comprobó un efecto antiviral -frente a los mixovirus- que era proporcional a la concentración del aminoazúcar detectándose con mas facilidad en función de la dosis infectiva y resultando ser mas sensible el FPV.
13. En estudios comparativos sobre fibroblastos utilizando distintas dosis de los tres quimioterápicos (adamantano, amantadina y D-glucosamina) se observó que la acción antiviral mas efectiva se lograba con amantadina y precisamente inhibiendo la actividad citopática; sin embargo, en presencia de D-glucosamina el efecto antiviral se detectaba mas acusadamente en función de la depresión del título hemaglutinante.
14. Cuando estos estudios se realizaron sobre embriones se obtuvieron resultados análogos a los anteriores pero haciendose aún mas patente la mayor amantadin-sensibilidad de los mixovirus (sobre todo los Ortho) en función del grado de supervivencia después del tratamiento.
15. Al estudiar en las aves no tratadas, por usarse como control la cinética de inmuno-respuestas humorales y los títulos séricos IHA alcanzados a los 24 dias frente a los cuatro mixovirus se encontraron respuestas de mas alto nivel en las series de pollos inoculados con FPV y NDV. En todos los casos los anticuerpos circulantes se determinaron mediante inhibición de la hemaglutinación.

16. Cuando estas inmunorespuestas se estudiaron en presencia de los quimioterápicos nos encontramos que : a) el adamantano no tenía ninguna acción sobre la inmunización con orthomixovirus, aunque sí producía un ligero efecto inmunodepresor con los paramixovirus ensayados; b) en presencia de la amantadina se observó en todos los casos un claro efecto inmunodepresor que era mas intenso también para los paramixovirus; y c) los tratamientos con glucosamina, por el contrario, dieron lugar a un curioso fenómeno de inmuoestimulación de magnitud análoga en los cuatro virus ensayados.
17. En los estudios de termoinactivación a 37° C durante 72 h. se comprobó que los cuatro mixovirus pierden poder infectivo y hemaglutinante. El infectivo es mas sensible y continua descendiendo hasta desaparecer a las 36 h. (Sendai) ó 48 h. (influenza, NDV y FPV) mientras que el título hemaglutinante permanece invariable después de las 12 h de tratamiento.
18. En relación con la producción de interferón "in vitro", en presencia de adamantano o amantadina se observaron acciones depresivas de variable intensidad dependiendo de la concentración del quimioterápico y del intervalo de tratamiento previo a la inducción; los efectos mas intensos se alcanzaron con dosis superiores a las 50 γ /ml administradas 12 h antes que el virus inductor; también con la glucosamina se comprobó un fenómeno semejante aunque a dosis mayores.
19. En otras experiencias análogas sobre la producción de interferón "in vitro", pero en presencia de los 4 antibióticos citados, también se observaron varios efectos desde inhibiciones de variable intensidad a ninguna intervención depen-

diendo del tipo de molécula, de las dosis e intervalos de tratamiento. Fueron mas activas las moléculas ansamicínicas.

20. En las experiencias de inducción de interferón "in vivo", determinadas a las 6 horas, también se observaron inhibiciones de variable intensidad dependiendo del quimioterápico y la dosis; así, en este caso el adamantano resultó ser el depresor mas activo y la glucosamina el mas debil.
21. Cuando se utilizaron los 4 antibióticos antes citados, que interfieren con la síntesis de acidos nucleicos, nos encontramos que en la producción de interferón "in vivo" la bleomicina, seguido de cromomicina fueron las moléculas mas activas en los tratamientos previos a la inducción viral sin observarse acción alguna para los tratamientos simultaneos o subsiguientes a la inducción. Sin embargo con las rifamicinas, que fueron menos activas en los tratamientos previos también produjeron algunas inhibiciones con los tratamientos simultaneos o posteriores; con rifamicina SV se llega a depresiones del 60% con dosis de 10 γ administradas 4 h después de la inducción.

BIBLIOGRAFIA

- ACKERMAN, W.W., RABSON, A. y KURTZ, H. (1954) Growth characteristics of poliomyelitis virus in HeLa cell culture: lack of parallelism in cellular injury and virus increase J. Exp. Med. 100, 437
- ADA, G.L. y PERRY, B.T. (1954) The nucleic acid content of influenza virus. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 32, 453
- ADA, G.L. y PERRY, B.T. (1956) Influenza virus nucleic acid: Relationship between biological characteristics of the virus particle and properties of the nucleic acid. J. gen. Microbiol. 14, 623
- ADAMS, W.R. (1965) Extraction of a rapidly sedimenting ribonucleic acid fraction from purified Newcastle disease virus (NDV). Fed. Prod. 24, 159
- AGOL, V.I. y CHUMAKOVA, M.Y. (1963) Effect of polyanions on the multiplication of two variants of poliovirus. Acta Virol. Prague, 7, 97
- AINBENDER, E., BERGER, R., HEVIZY, M.M., ZEPP, H.D. y HODES, H.L. (1965) Radioautographic studies of poliovirus binding by human immunoglobulins. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 119, 1166
- ALEXANDER, H.E., KOCH, G., MOUNTAIN, I.M., SPRUNT, K. y VAN DAMME, O. (1958) Infectivity of ribonucleic acid of poliovirus on HeLa cell monolayers. Virology 5, 172
- ALLISON, J.L., O'BRIEN, R.L. y HAHN, F.E. (1965) Nature of deoxyribonucleic - acid chloroquine-complex. Antimicrob. Agents. Chemother. 310

- ANDRES, G.A. HSU, K.C. y SEEGAL, B.C. (1978) In "Handbook of Experimental Immunology" Vol. 2 Capitulo 37 D.M. Weir ed, pp. 527 Blackwell Scientific Publ. (Oxford)
- ANDREWES, C.H. y ELFORD, W. J. (1933) Specific precipitation in gel and its application to immunochemical analysis. Brit. J. Exptl. Pathol. 14, 367
- ANDREWES, C.H., BANG, F.B. y BURNET, F.M. (1955) A short description of the Myxovirus group (influenza and related viruses) Virology 1, 176
- ANDREWS, R.D. (1961) Specificity of interferon. Brit. Med. J. i, 1728
- ANKEL, H., CHANY, C., GALLIOT, B., CHEVALIER, M. J. y ROBERT, M. (1973) Antiviral effect of interferon covalently bound to sepharose. Proc. Natl. Acad. Sci USA 70, n°8, 2360
- ARCHETTI, I., BEREZKY, E., ROSATI-VALENTE, F. y STEVE-BOCCIARELLI, D. (1970) Elongated structures present in cells infected with influenza viruses. Arch. Ges. Virusforsch. 29, 275
- ARMBRUSTER, O. y BEISS, V. (1958) Die untersuchungen der phosphatid-komponenten von viren der Influenza gruppe. Z. Naturforsch 13b, 75
- BÄCHI, T., GERHARD, W., LINDENMANN, J., y MÜHLETHALER, K. (1969) Morphogenesis of influenza A virus in Ehrlich ascitistumor cells as revealed by thin sectioning and freeze-etching. J. Virol. 4, 769
- BALTIMORE, D. HUANG, A.S. y STAMPFER, M. (1970) Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus. II. An RNA polymerase in the virion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 572
- BALUDA, M.A. (1959) Loss of viral receptors in homologous interference by ultraviolet-irradiated Newcastle disease virus. Virology 7, 315
- BARON, S. y BUCKLER, C.E. (1963) Circulating interferon in mice after intravenous injection of virus. Science (Washington) 141, 1061
- BARON, S. (1967) "In Modern Trends in Medical Virology I" Butterworth, London, 1967, p. 77

- BARASOAIN, I. (1976) Estudio inmunobiologico de endotoxinas bacterianas. Tesis Doctoral . Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- BAUER, D.J., ST. VINCENT, L. KEMPE, C.H., YOUNG, P.A. y DOWNIE, A.W. (1969) Prophylaxis of smallpox with methisazone. *Am. J. Epidem.* 90, 130
- BAUER, D.J. (1972) Introduction to antiviral chemotherapy. *Chemotherapy of virus diseases vol. 1*, 1-33 International encyclopedia of pharmacology and therapeutics section 61 (1972) Ed. por Bauer, D.J.
- BEAN, W.J. y SIMPSON, R.W. (1973) Primary transcription of the influenza virus genome in permissive cells. *Virology* 56, 646
- BECHT, W., ROTT, R. y KLENK, H.D. (1972) Effect of concanavalin A on cells infected with enveloped RNA viruses. *J. gen. Virol.* 14, 1
- BECKER, Y., BALABANOV, H., WEINBERG, E. y KOTLER, M. (1974) Induction of C-type particles in mammalian cancer cells, in KOHN and SHATKAY control of gene expression. *Adv. Exp. Med. Biol.* vol. 44, 309 (Plenum Press, New York, 1974)
- BERNKOPF, H. (1949) Cultivation of influenza virus in the chorioallantoic membrane of deembryonated eggs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 72, 680
- BYERLY, T.C., TITUS, H.W. y ELLIS, N.R. (1933) Effect of diet on egg composition. Mortality of embryos in egg from hens on diets containing protein supplements of different origin *J. Nutrition*, 6, 225
- BIENENSTOCK, J. (1970) Immunoglobulins of the hamster. *J. Immunol.* 104, 1228
- BISHOP, D., H.L., OBIJESKI, J.F. y SIMPSON, R.W. (1971) Transcription of the influenza ribonucleic and genome by a virion polymerase I. Optimal conditions for "in vitro" activity of the ribonucleic-acid dependent ribonucleic acid polymerase. *J. Virol.* 8, 66

- BISHOP, D.H.L., OBIJESKI, J.F. y SIMPSON, R.W. (1971) Transcription of the influenza ribonucleic acid genoma by a virion polymerase. II. Nature of the in vitro polymerase product. *J. Virol.* 8, 74
- BISHOP, D.H.L., ROY, P., BEAN, W.J. Jr., y SIMPSON, R.W. (1972) Transcription of the influenza ribonucleic acid genome by a virion polymerase. III. Completeness of the transcription process. *J. Virol.* 10, 689
- BLAIR, C.D. y ROBINSON, W.S. (1968) Replication of Sendai virus. I. Comparison of the viral RNA and virus-specific RNA synthesis with Newcastle disease virus. *Virology* 35, 537
- BLOUGH, H.A., WEINSTEIN, O.B., LAWSON, D.E.R. y KODICEK, E. (1967). The effects of vitamin A on myxoviruses. II. Alterations in the lipids of influenza virus. *Virology*. 33, 459
- BOULTER, E.A. (1957) The titration of vaccinia neutralizing antibody on chorio-allantoic membranes. *J. Hyg. (London)* 55, 502
- BOYD, J.E. y SOMMERVILLE, R.G. (1974) A rapid simple and reliable method for the screening of potential antiviral compounds in vitro. *Arch. fur ges. Virusforschung* 45, 254
- BRADISH, C.J., FARLEY, J.O. y FERRIER, H.E.N. (1962) Studies on the nature of the neutralization reaction and the competition for neutralizing antibody between components of the virus system of foot-and-mouth disease. *Virology* 18, 378
- BRAMMER, K.W., McDONALD, C.R. y TUTE, M.S. (1968) Antiviral properties of 1-phenoxyethyl-3,4 dihydro and 1, 2, 3, 4 tetrahydroquinolines. *Nature* 219, 515
- BRATT, M.A. y RUBIN, H. (1968) Specific interference among strains of Newcastle disease virus III. Mechanisms of interference. *Virology* 35, 395
- BRATT, M.A. (1969) RNA synthesis in chick embryo cells infected with different strains of NDV. *Virology* 38, 485
- BRATT, M.A. y ROBINSON, W.S. (1971) Evidence for a RNA replicative intermediate in cells infected with Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 10, 139

- BROCK, T.D. (1973) "Biology of Microorganisms". Ed. española por Ricardo Guerrero, OMEGA, S.A. Barcelona
- BROWN, F. y GRAVES, J.H. (1959) Changes in specificity and electrophoretic mobility of the precipitating antibodies present in the serum of cattle recovering from foot and mouth disease. *Nature (London)*, 183, 1688
- BUCHAN, A., y BURKE, D.C. (1966) Interferon production in chick embryo cells. The effect of puromycin and p-fluorophenylalanine. *Biochem. J.* 98, 530
- BUCHER, D.J. y KILBOURNE, E.D. (1972) A₂ (N₂) neuraminidase of the x-7 influenza virus recombinant. Determination of molecular size and subunits composition of the active unit. *J. Virol.* 10, 60
- BUKRINSKAYA, A.G., BURDUCEA, O. y VORKONUVA, G.K. (1966) The intracellular site of RNA synthesis of Newcastle disease virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 123, 236
- BUKRINSKAYA, A.G., ZHDANOV, V.M. y VORKUNOVA, G.K. (1969) Fate of Sendai virus ribonucleoprotein in virus-infected cells. *J. Virol.* 4, 141
- BURKE, D.C. e ISAACS, A. (1958 a) Further studies on interferón. *Brit. J. Exp. Pathol.* 39, 78
- BURKE, D.C. e ISAACS, A. (1958 b). Some factors affecting the production of interferón. *Brit. J. Exp. Pathol.* 39, 452
- BURNESS, A., PARDOE, I. y FOX, S. (1973) Evidence for the lack of glycoprotein in the encephalomyocarditis virus particles. *J. gen. Virol.* 18, 33
- BURNET, F.M. y ANDERSON, S.G. (1946) Modification of human red cells by virus action II. Agglutination of modified human red cells by sera from cases of infectious mononucleosis. *Brit. J. Exp. Pathol.* 27, 236
- BURNET, F.M. (1955) The influence of host immunity on the virus: Immunological drift. "In principles of animal virology," 380-390. Academic Press, New York.
- BURNS, W.H. y ALLISON, A.C. (1975) Virus infections and the immune responses they elicit. "In antigens," vol. III Ed. por M.Sela, pp. 479-559 Academic Press, New York (1975)

- BURT, A.M. y COOPER, P.D. (1961) A sensitive and accurate plate assay for poliovirus neutralizing antibody. *J. Immunol* 86, 646
- CALIGUIRI, L.A., KLENK, H.D. y CHOPPIN, P.W. (1969) The proteins of the parainfluenza virus SV5. I. Separation of virion polypeptides by polyacrylamida gel electrophoresis. *Virology* 39, 460
- CALIGUIRI, L.A. y COMPANS, R.W. (1974) Analysis of the "in vitro" product of an RNA-dependent RNA polymerase isolated from influenza virus-infected cells. *J. Virol.* 14, 191
- CAMPBELL, J.B., MAES, R.F., WIKTOR, T.J. y KOPROWSKI, H. (1968) The inhibition of rabies virus by arabionsyl cytosine. Studies on the mechanism of action. *Virology* 34, 701
- CASPAR, D.L.D. (1963) Assembly and stability of the tobacco mosaic virus particles. *Advand. Prot. Chem.* 18, 37
- CAVALIERI, R.L., HAVELL, E.A., VILCEK, J. y PESTKAS (1977) Induction and decay of human fibroblast interferon mRNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 30
- CEBRA, J.J. y SMALL, P.A. (1967) Polypeptide chain structure of rabbit immunoglobulins. III. Secretory γ -A-Immunoglobulin from colostrum. *Biochemistry* 6, 503
- CIAMPOR, F. (1972) Electron microscopy of tissue culture cells, infected with myxoviruses. I. Nucleo-cytoplasmic changes in Ao/WSN influenza virus infected chick embryo cells. *Acta Virol.* 16, 9
- CLARKE, D.H. (1964) Further studies on antigenic relationships among the viruses of the group B tickborne complex. *Bull World Health Organ* 31, 45
- COHEN, S.S. (1948) The synthesis of bacterial viruses. II. The origin of the phosphorus found in the desoxyribonucleic acid of the T₂ and T₄ bacteriophages. *J. Biol. Chem.* 174, 295
- COHEN, S.M., BULLIVANT, S y EDWARDS, G.A. (1961) A morphologic study of FL cells infected with parainfluenza 3 virus. *Arch. Ges. Virusforsch* 11, 493

- COLE, F.E. y HETRICK, F.M. (1965) Persistent infection of human conjunctive cell cultures by myxovirus parainfluenza 3. *Can. J. Microbiol.* 11, 513
- COLLINS, B.S. y BRATT, M.A. (1973) Separation of the messenger RNA's of NDV by gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2544
- COMPANS, R.W. y CHOPPIN, P.W. (1968) The nucleic acid of the parainfluenza virus SV5. *Virology* 35, 289
- COMPANS, R.W., HOLMES, K.V., DALES, S. y CHOPPIN, P.W. (1966) An electron microscopic study of moderate and virulent virus-cell interactions of the parainfluenza virus SV5. *Virology* 30, 411
- COMPANS, R.W. y DIMMOCK, N.J. (1969) An electron microscopic study of single cycle infection of chick embryo fibroblasts by influenza virus. *Virology* 39, 499
- COMPANS, R.W., KLENK, H.D., CALIGUIRI, L.A. y CHOPPIN, P.W. (1970) Influenza virus proteins. I. Analysis of polypeptides of the virion and identification of spike glycoproteins. *Virology* 42, 880
- COMPANS, R.W. (1973 a) Influenza virus proteins. II. Association with components of the cytoplasm. *Virology* 51, 56
- COMPANS, R.W. (1973 b) Distinct carbohydrate components of influenza virus glycoproteins in smooth and rough cytoplasmic membranes. *Virology* 55, 541
- COMPANS, R.W. y CALIGUIRI, L.A. (1973) Isolation and properties of an RNA polymerase from influenza virus-infected cells. *J. Virol.* 11, 441
- COMPANS, R.W., CONTENT, J. y DUESBERG, P.H. (1972) Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J. Virol.* 10, 795
- COMPANS, R.W. y CHOPPIN, P.W. (1975) Reproduction of myxovirus. Reproduction large RNA viruses pp 179-252 *Comprehensive Virology* vol. 4. Ed. por Fraenkel-Conrat y Wagner, R.R. Editorial Board.
- CONTENT, J. y DUESBERG, P.H. (1970) Electrophoretic distribution of the proteins and glycoproteins of influenza virus and Sendai virus. *J. Virol.* 6, 707

- COONS, A.H., CREECH, H.J., JONES, R.N. y BERLINER, E. (1942)
The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by
the use of fluorescent antibody. *J. Immunol.* 45, 159
- COOPER, P.D. (1955) A method for producing plaques in agar
suspensions of animal cells. *Virology* 1, 397
- COOPER, P.D. (1961) An improved agar cell-suspension plaque
assay for the poliovirus: some factors affecting effi-
ciency of plating. *Virology* 13, 153
- COURTNEY, R.J., STEINER, S.M. y BENYESH-MELNICK, M. (1973)
Effects of 2-deoxy-D-glucose on herpes simplex virus
replication. *Virology* 52, 447
- COWAN, K.M. (1973) Antibody response to viral antigens.
Adv. Immunol. 17, 195
- CREAGAN, R.P., TAN, Y.H., CHEN, S. y RUDDLE, F.H. (1975)
Somatic cell genetic analysis of the interferon system.
Federation Proceed, 34, 2222
- CREMER, N.E., RIGGS, J.L., FUJIMOTO, F. Y., HAGENS, S.J., OTA,
M.I. y LENNETTE, E.H. Jr. (1964) Neutralizing activity of
fragments obtained by papain digestion of viral antibody.
J. Immunol. 93, 283
- CROWLE, A.J. (1961) *Immunodiffusion*. Academic Press. N.Y.
- CURTIS, H. (1972) *Biology*. Worth Publisher. New York, EE.UU.
- CHANDRA, P., ZIMMER, C. y THRUM, H. (1970) Effect of distamycin
A on the structure and template activity of DNA in RNA
polymerase system. *FEBS Lett.* 7, 90
- CHANOCK, R.M., LUCKEY, A.L., COOK, M.K., ZAPIKIAN, A.Z., RECHEL-
DERFER, T., BETHESOA, M.D. y PARROT, R.H. (1959) Associa-
tion of hemadsorption viruses with respiratory illness in
childhood. *J. American Med. Ass.* 109, 548
- CHANY, C., ANKEL, H. y BOURGEADE, M.F. (1975) Antiviral mecha-
nisms. *Perspectives in Virology*. IX. Ed. Pollard, A. Academic
Press, London - New York, 269

- CHEN, C., COMPANS, R.W. y CHOPPIN, P.W. (1971) Parainfluenza virus surface projections glycoproteins with hemagglutinin and neuraminidase activities. *J. gen. Virol.* 11, 53
- CHESBRO, W.R. y HADRICK, L.R. (1958) Comparison of the tendency to stick to glass and hemagglutination produced in erythrocyte suspensions by ferric chloride and by influenza virus. *Nature (Londres)* 182, 1164
- CHEYNE, I.M., y WHITE, D.O. (1969) Growth of paramyxovirus in a nucleate cells. *Aust. J. Expl. Biol. Med. Sci.* 47, 145
- CHOPPIN, P.W., MURPHY, J.S. y TAMM, I. (1960) Studies of two kinds of virus particles which comprise influenza A₂ virus strains. III. Morphological characteristics: Independence of morphological and functional traits. *J. exp. Med.* 112, 945
- CHOPPIN, P.W. (1964) Multiplication of a myxovirus (SV5) with minimal cytopathic effects and without interference. *Virology* 23, 224
- CHOPPIN, P.W. (1969) Replication of influenza virus in a continuous cell line: high yield of infective virus from cells inoculated at high multiplicity. *Virology* 38, 130
- CHOPPIN, P.W. y COMPANS, R.W. (1970) Phenotypic mixing of envelope proteins of the parainfluenza virus SV5 and vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 5, 609
- CHOPPIN, P.W. y PONS, M.W. (1970) The RNA's of infective and incomplete influenza virions grown in MDBK and HeLa cells. *Virology* 42, 603
- CHOPPIN, P.W., KLENK, H.D., COMPANS, R.W. y CALIGUIRI, L.A. (1971) The parainfluenza virus SV5 and its relationship to the cell membrane. *Perspect. Virol.* 7, 127
- CHOPPIN, P.W., COMPANS, R.W., SCHEID, A. McSHARRY, J.J. y LAZAROWITZ, S.G. (1972) Structure and assembly of viral membranes, en "Membrane Research" (C.F. Fox, ed). pp. 163-179 Academic Press, New York
- CHOPPIN, P.W. y COMPANS, R.W. (1974) Reproduction of paramyxoviruses. "Reproduction large RNA viruses" pp. 95-178 *Comprehensive Virology* vol. 4 Ed. por Fraenkel-Conrat y R. Wagner. Editorial Board.

- CHOW, A.W., FOERSTER, J. y HRYNIUK, W. (1970) Cytosine arabinoside therapy for herpes virus infections. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1970, 214
- CHOW, N., y SIMPSON, R.W. (1971) RNA dependent RNA polymerase activity associated with virions and subviral components of myxoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 68, 752
- DALES, S. (1965) Penetration of animal viruses into cells. *Prog. Med. Virol.* Vol. 7, pp. 1-43 Ed. Karger, New York
- DAVIES, W.C., GRUNERT, R.R., HAFF, R.F., MCGAHEN, J.W., NEUMAYER, E.M., PAULSHOCK, M., WATTS, J.C., WOOD, T.R. HERMANN, E.E. y HOFFMANN, C.E. (1964) Antiviral activity of 1-adamantanamin (AMA) *Science*, N.Y. 144, 862
- DE SOMER, P., y PRINZIE, A. (1957) Poliomyelitis virus neutralizing antibodies determination by filter paper disc on solidified bottle cultures. *Virology* 4, 387
- DIMMOCK, N.J. y WATSON, D.H. (1969) Proteins specified by influenza virus in infected cells: Analysis by polyacrylamide gel electrophoresis of antigens not present in the virus particles. *J. gen. Virol.* 5, 499
- DIMMOCK, N.J. (1969) New virus specific antigens in cells infected with influenza virus. *Virology* 39, 224
- DINTER, Z., HERMODSSON, S. y HERMODSSON, C. (1964) Studies on Yuncaipa: its classification as a member of the paramyxovirus group. *Virology* 22, 297
- DOMAGK, G. (1935) Ein Beitrag zur chemotherapie der Bakteriellen Infektionen. *Deuts. Med. Wochens* 61. 250
- DOMAGK, G., BEHNISCH, R., MIETZSCH, F. y SCHMIDT, H. (1946) Uber eine neue, gegen tuberkelbazillen in vitro wirksame verbindungsklasse. *Naturwissenschaften*, 10, 315
- DORNER, F., SCRIBA, M. y WEIL, R. (1973) Interferón: Evidence for its glycoprotein nature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 1981
- DRESCHER, J., HENNESSY, A.V. y DAVENPORT, F.M. (1962) Photometric methods for the measurement of hemagglutinating viruses and antibody. *J. Immunol.* 89, 794

- DRIESSEN, J.H. y GREENHAM, L.W. (1959) Haemadsorption in vaccini infected tube tissue cultures. *Archiv. Ges. Virusforsch* 9, 45
- DROUHET, V. (1960) Lesions cellulaires provoquées par les Reovirus (virus Echo 10). Anticorps fluorescents et étude cytochimique. *Ann. Inst. Pasteur* 98, 618
- DUDA, E. y SCHLESINGER, M.J. (1975) Alterations in Sindbis viral enveloped proteins by treating BHK cells with glucosamine. *J. Virol.* 15, 416
- DUESBERG, P.H. y ROBINSON, W.S. (1967) On the structure and replication of influenza virus. *J. Mol. Biol.* 25, 383
- DUESBERG, P.H. (1968) The RNA's of Influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59, 930
- DULBECCO, R. (1952) Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 38, 747
- DULBECCO, R. y VOGT, M. (1954 a) Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exptl. Med.* 99, 167
- DULBECCO, R. y VOGT, M. (1954 b) One-step growth curve of Western equine encephalomyelitis virus on chicken embryo cells grown in vitro and analysis of virus yields from single cells. *J. Exptl. Med.* 99, 183
- DULBECCO, R., VOGT, M. y STRICKLAND, A.G.R. (1956) A study of the basic aspects of neutralization of two animal viruses. Western equine encephalitis virus and poliomyelitis virus. *Virology* 2, 162
- DULBECCO, R., VOLGT, M., y STRICKLAND, A.G.R. (1965) A study of the basic aspects of neutralization of two animal viruses. Western equine encephalitis virus and poliomyelitis virus. *Virology* 2, 162
- DURAND, D.P., CHALGREN, S.D. y FRANKE, V. (1970) Effect of chloroquine on myxovirus replication. *Antimicrob. Agents. Chemother* 1970, 105
- DURAND, D.P., BROTHERTON, T., CHALGREN, S. y COLLARD, W. (1970) Uncoating of myxovirus. en "The Biology of large RNA viruses" 197-206. Academic Press. Ed. por Barry R.D. y Mahy B.W. J.

- EAST, J.L. y KINGSBURY, D.W. (1971) Mumps virus replication in chick embryo lung cells: Properties of RNA species in virions and infected cells. *J. Virol.* 8, 161
- EASTERBROOK, K.B. (1962) Interference with the maturation of vaccinia virus by isatin- β -thiosemicarbazone. *Virology.* 17, 245
- EASTERBROOK, K.B. (1966) Controlled degradation of vaccinia virions in vitro: an electron microscopic study. *J. Ultrastruct. Res.* 14, 484
- ECKERT, E.A. (1973) Properties of an antigenic glycoprotein isolated from influenza virus hemagglutinin. *J. Virol.* 11, 183
- EGGERS, H.J. y WAIDNER, E. (1970) Effect of 2-(α -hydroxybenzyl)-benzimidazole and guanidine on the uncoating of echovirus 12. *Nature (Lond.)* 227, 952
- EGGERS, H.J., KOCH, M.A., FURST, A., DAVES, G.D.Jr., WILCZYNSKI, J.J. y FOLKERS, K. (1970) Rhodamine: a selective inhibitor of the multiplication of echovirus 12. *Science N.Y.* 167, 294
- EIDINOFF, M.L., BATES, B. y STEINGLAS, M. (1965) Requirement for DNA synthesis in proliferation of Rous sarcoma virus (RSV) *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* 6, 17
- ELEK, S.D. (1948) The recognition of toxicogenic bacterial strains in vitro. *Brit. Med. J.* I, 493
- ENNIS, H.L. y LUBIN, M. (1964) Cycloheximide: Aspects of inhibition of protein synthesis in mammalian cells. *Science, N.Y.* 146, 1474
- ENSMINGER, W.D., y TAMM, I. (1970) The step in cellular DNA synthesis blocked by Newcastle disease or Mengovirus infection. *Virology* 40, 152
- EPSTEIN, L.B. (1975) Effects of interferon on cells, viruses and the immune system. Ed. Gerald, A. Academic Press. Londres- Nueva York, 393

- EPSTEIN, L.B. y EPSTEIN, C.J. (1976) Localization of the gene AVG for the antiviral expression of immune and classical interferon to the distal portion of the long arm of chromosome 21. *J. Infect. Dis.* 133, suppl. A 56
- EVANS, M.J. y KINGSBURY, D.W. (1969) Separation of Newcastle disease virus proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Virology* 37, 597
- FALKE, D. y RADA, B. (1970) 6-Azauridine as an inhibitor of the synthesis of Herpesvirus hominis. *Acta Virol. Prague* 14, 115
- FALCOFF, R. y FALCOFF, E. (1970) Induction of the synthesis of interferon by double-stranded RNA. II. Studies on Mengo virus replicative intermediate. *Biochim. Biophys. Acta.* 199, 147
- FAZEKAS DE ST. GROTH, S. WATSON, G.S. y REID, A.F. (1958) The neutralization of animal viruses. I. A model of virus antibody interaction. *J. Immunol.* 80, 215
- FAZEKAS, DE ST GROTH S. y WEBSTER, R.G. (1963) The neutralization of animal viruses. IV. Parameters of the influenza virus-antibody system. *J. Immunol.* 90, 151
- FENNER, F. (1976) Classification and Nomenclature of viruses. Second report of the international committee on taxonomy of viruses. *Intervirology* vol. 7, Ed. Karger, A.G., Basilea (Suiza)
- FILIPIC, B., SCHAUER, P. y LIKAR, M. (1977) Similarities of cellular receptors for interferon and cortisol. *Arch. Immunol. Therap. Exp.* 25, 613
- FLEXNER, L.B., SEROTA, R.G. y GOODMAN, R.H. (1973) Cycloheximide and acetoxycycloheximide: inhibition of tyrosine hydroxylase activity and amnestic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 354
- FRIEDMAN, R.M., BARON, S., BUCKLER, C.E. y STEINMULLER, R.I. (1962) The role of antibody, delayed hypersensitivity and interferon production in recovery of guinea pigs from primary infection with vaccinia virus. *J. Exp. Med.* 116, 347
- FRANKLIN, R.M., WECKER, E. y HENRY, C. (1959) Some properties of an infections ribonucleic acid from mouse encephalomyelitis virus. *Virology* 7, 220

- FROMMAGEN, L.H., KNIGHT, C.A. y FREEMAN, N.K. (1959) The ribonucleic acid, lipid and polysaccharide constituents of influenza virus preparations. *Virology* 8, 176
- FUJITA, H. (1973) Dual effect in the mechanism of action of anti-influenza amino acid analogus. *Antimicrob. Agents. Chemother* 3, 57
- GADALETA, H.N., GRECO, M. y SACCONI, C. (1970) The effect of rifampicin on mitochondrial RNA polymerase from rat liver. *FEBS Letters* 10, 54
- GALBRAITH, A.W. (1973) Treatment of acute herpes zoster with amantadine hydrochloride (symmetrel) *Br. Med. J.* iv, 693
- GALE, F.R.S., CUNDLIFFE, E., REYNOLDS, P.E., RICHMOND, M.H. y WARING, M. (1972) The Molecular Basis of antibiotic action. pag. 174. John Wiles and Sons. London-New York-Sydney.
- GANDHI, S.S., BURKE, D.C. y SCHOLTISSEK, C. (1970) Virus RNA synthesis by ultraviolet-irradiated Newcastle disease virus and interferon production. *J. gen. Virol.* 9, 97
- GIFFORD, G.E. y HELLER, E. (1963) Effect of actinomycin D on interferon production by "active" and "inactive" chikungunya virus in chick cells. *Nature (Londres)*, 200, 50
- GLASGOW, L.A. (1970) Interrelationship of interferon and immunity during viral infections. *J. gen. Physiol.* 56, 212s
- GORDON, P. y BROWN, E.R. (1972) The antiviral activity of isopri- nosine. *Can. J. Microbiol.* 18, 1463
- GRANOFF, A., LIU, O.C. y HENLE, W. (1950) A small hemagglutinating component in preparations of Newcastle disease virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 75, 684
- GRANOFF, A. (1955) Non infections forms of Newcastle disease and influenza viruses. Studies on noninfections virus occurring within cells that are producing fully infections virus. *Virology* 1, 516
- GRANOFF, A. (1965) The interaction of Newcastle disease virus and neutralizing antibody. *Virology* 25, 38
- GREGORIADES, A. (1972) Isolation of neuraminidase from the WSN strain of influenza virus. *Virology* 49, 333

- GRESSER, I. y DULL, H.B. (1964) A virus inhibitor in pharyngeal washings from patients with influenza. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115, 192
- GRIFFITH, I.P. (1974) The fine structure of influenza virus, en "Negative strand viruses" (R.D. Barry y B.W.J. Mahy, Eds). Academic Press, Nueva York
- GRIMLY, P.M., ROSENBLUM, E.N., MIMS, S.J. y MOSS, B. (1970) Interruption by rifampicin of an early stage in vaccinia virus morphogenesis: accumulation of membranes which are precursors of viral envelopes. J. Virol. 6, 519
- GRUNERT, R.R., MCGAHEN, J.W. y DAVIES, W.L. (1965) The in vivo antiviral activity of 1-adamantaneamine (amantadine). Virology 26, 262
- GUARI, K.K., MALORNY, G. y SCHIFF, W. (1969) Immunobiological studies with the virostatics 5-ethyl-2'-deoxyuridine (E.D.U) and 1-allyl-3,5'-diethyl 1-6-chlorouracil (ACIU) Chemotherapy 14, 129
- GURGO, D., RAY, R. y GREEN, M. (1972) Rifamycin derivatives strongly inhibiting RNA → DNA polymerase (reverse transcriptase) of murine sarcoma viruses. J. Natl. Cancer, Inst. 49, 61
- GURWITH, M.J., HARMAN, C.E. y MERIGAN, T.C. (1971) Approaches to diagnosis and treatment of herpes simplex encephalitis. A report of two cases. Cali. Med. 115, 63
- HAHON, N. (1970) Neutralization of residual infectivity of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by anti-gamma globulin. J. gen. Virology 6, 361
- HAJEK, P. (1970) Neutralization of bacterial viruses by antibodies of young animals. Fol. Microbiol. 15, 9
- HALL, W.W. y MARTIN, S.J. (1973) Purification and characterization of measles virus. J. gen. Virol. 19, 175
- HAMPARIAN, V.V., HILLEMANN, M.R. y KETLER, A. (1963) Contributions to characterization and classification of animal viruses. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 112, 1040

- HAMRE, D., BERNSTEIN, J. y DONOVICK, R. (1950) Activity of p-aminobenzaldehyde, 3-thiosemicarbazone in the chick embryo and in the mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73, 275
- HAMRE, D., LOOSLI, C.G. y GERBER, P. (1958) Antigenic variants of influenza A virus (PR8 strain). IV.- Serological characteristics of a second line of variants developed in mice given a polyvalent vaccine. J. Exp. Med. 107, 845
- HAND, R. y TAMM, I. (1972) Rate of DNA chain growth in mammalian cells infected with cytotoxic RNA viruses. Virology 47, 331
- HASPEL, M.V., KNIGHT, P.R., DUFF, R.G., y RAPP, F. (1973) Activation of a latent measles virus infection in Hamster cells. J. Virol. 12, 690
- HAVELL, E.A. y VILČEK, J. (1972) Production of high-titered interferon in cultures of human diploid cells. Antimicrob. Agents Chemother 2, 476
- HELLER, E. (1963) Enhancement of chikungunya virus replication and inhibition of interferon production by actinomycin D. Virology 21, 652
- HERRMANN, E.C. Jr. GABLIKS, Y., ENGLE, C. y PERLMAN, P.L. (1960) Agar diffusion method for detection and bioassay of antiviral antibiotics. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N.Y. 103, 625
- HERRMANN, E.C. Jr (1961) Plaque inhibition test for detection of specific inhibitors of DNA containing viruses. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 107, 142
- HIATT, C.W., KAUFMAN, E., HELPRIN, J.J. y BARON, S. (1960). Inactivation of viruses by the photodynamic action of toluidine blue. J. Immunol. 84, 480
- HIRST, G.K. (1941) The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. Science 94, 22
- HIRST, G.K. (1948) The nature of virus receptors of red cells. 1. Evidence of the chemical nature of the virus receptors of red cells and of the existence of a closely analogous substance in normal serum. J. Exp. Med. 87, 301

- HIRST, G.K. (1962) Genetic recombination with Newcastle disease virus, poliovirus and influenza. Cold-Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 303
- HIRST, G.K. (1973) Mechanism of influenza virus recombination. I. Factor influencing recombination rates between temperature-sensitive mutants of strain WSN and the classification of mutants into complementation-recombination groups. Virology 55, 81
- HO, M. (1964, a) Identification and "induction" of interferon. Bacteriol. Rev. 28, 367
- HO, M. y BREINING, M.K. (1965) Metabolic determinants of interferon formation. Virology 25, 331
- HO, M. y KONO, Y. (1965) Effect of actinomycin D on virus and endotoxin-induced interferon-like inhibitors in rabbits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53, 220
- HO, P.P.K. y WALTERS, C.P. (1966) Influenza virus-induced ribonucleic acid nucleotidyl transferase and the effect of actinomycin D on its formation. Biochemistry 5, 231
- HOFFMANN, C.E., NEUMAYER, E.M., HAFF y GOLDSBY, R.A. (1965) Mode of action of the antiviral activity of amantadine in tissue culture. J. Bacteriol. 90, 623
- HOLLAND, J.J. y HOYER, P.H. (1962) Early stages of Enterovirus infection. Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol. 27, 101
- HOLLAND, J.J. y KIEHN, E.D. (1970) Influenza virus effects on cell membrane proteins. Science (Wash, D.C.) 167, 202
- HOLMES, K.V. y CHOPPIN, P.W. (1966) On the role of the response of the cell membrane in determining virus virulence. Contrasting effects of the parainfluenza virus SV5 in two cell types. J. Exp. Med. 124, 501
- HORNE, R.W., WATERSON, A.P., WILDY, P. y FARUHAM, A.E. (1960) The structure and composition of the myxoviruses. I. Electron microscope studies of the structure of myxovirus particles by negative staining techniques. Virology 11, 79
- HORNE, R.W. y WILDY, P. (1961) Symmetry in virus architecture. Virology 15, 348

- HORST, J., CONTENT, J., MANDELES, S., FRAENKEL-CONRAT, H. y DUESBERG, P. (1972) Distinct oligonucleotide patterns of distinct influenza virus RNA's. *J. Mol. Biol.* 69, 209
- HORWITZ, M.S. y HORWITZ, S.B. (1971) Intracellular degradation of HeLa and adenovirus type 2 DNA induced by camptothecin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 723
- HOWE, C., LEE, L.T., HARBOE, A. y HAUKENES, G. (1967) Immunochemical study of influenza virus and associated host tissue components. *J. Immunol.* 98, 543
- HOWE, C. y MORGAN, C. (1969) Interactions between Sendai virus and human erythrocytes. *J. Virol.* 3, 70
- HOYLE, L. (1952) Structure of influenza virus. The relation between the biological activity and the chemical structure of virus fractions. *J. Hyg.* 50, 229
- HOYLE, L., HORNE, R.W. y WATERSON, A.P. (1961) The structure and composition of the myxoviruses. II. Components released from the influenza virus particles by ether. *Virology* 13, 448
- HSING, G.D. y MELNICK, J.L. (1955) Plaque formation with Polio-myelitis, Coxsackie, and Orphan (Echo) viruses in bottle cultures of Monkey epithelial cells. *Virology* 1, 533
- HUANG, A.S., BALTIMORE, D. y BRATT, M.A. (1971) Ribonucleic acid polymerase in virions of Newcastle disease virus: Comparison with the vesicular stomatitis virus polymerase. *J. Virol.* 7, 389
- HUANG, A.S. (1973) Defective interfering viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 27, 101
- HUCK, R.A. (1964) The Classification of Viruses. *Vet. Bull.* 34, 239
- HUFFMAN, J.H., SIDWELL, R.W., KAHRE, G.P., WITKOWSKI, J.T., ALLEN, L.B. y ROBINS, R.K. (1973) In vitro effect of 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4, triazole-3-carboxamide (Virazole, ICN 1229) on deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid viruses. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 3, 235

- HUNTER, E., FRIIS, R.R. y VOGT, P.K. (1974) Inhibition of avian sarcoma virus replication by glucosamine. *Virology* 58, 449
- HUO, W.H. y WILSON, D.E. (1969) Degradation of cellular ribonucleic acid in Newcastle disease virus-infected cells. *J. gen. Virol.* 4, 245
- IGARISHI, A., FUKNOKA, T., NITHIUTHAI, P., HSU, L.CH y FUKAI K (1970) Structural components of Chikungunya virus. *Biken. J.* 13, 93
- IHLE, J.N., HANNA, M.G. Jr. SCHAFFER, W. HUNSMANN, G., BOLOGNESI, D.P. y HUPER, G. (1975) Polypeptides of mammalian oncornaviruses. III. Localization of p15 and reactivity with natural antibody. *Virology* 63, 60
- ISAACS, A. y LINDENMANN (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc. Roy. Soc. Ser. B*, 147, 258
- ISAACS, A. y HITCHCOCK, G. (1960) Role of interferon in recovery from virus infections. *Lancet* 2, 69
- ISAACS, A., KLEMPERER, H. y HITCHCOCK, G. (1961) Studies on the mechanism of action of interferon. *Virology* 13, 191
- JACKSON, G.G., MULDOON, R.L. y AKERS, L.W. (1963) Serological evidence for prevention of influenzal infection in volunteers by an anti-influenzal drug adamantanamine hydrochloride. *Antimicrob. Agents. Chemother* 1963, 703
- JAWETZ, E. (1973) Chemotherapy of herpesviruses - clinical aspects. Kaplan. *The herpesviruses*. pp. 665-688. Academic Press, Nueva York, 1973)
- JOKLIK, W.K. (1962) The multiplication of poxvirus DNA. *Cold. Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 27, 199
- JOKLIK, W.K. (1965) The molecular basis of the viral eclipse phase. *Prog. Med. Virol.* 7, 44-96. Ed. Karger, Nueva York
- JORBA, G. (1977) Estudio de algunas interacciones huesped-parasito-fármaco en presencia de aminoazúcares. Tesis Doctoral Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid
- JOSS, A., GANDHI, S.S., HAY, A.J. y BURKE, D.C. (1969) Ribonucleic acid and protein synthesis in chick embryo cells infected with fowl plague virus. *J. Virol.* 4, 816
- JUEL-JENSEN, B.E. (1973) Herpes simplex and zoster. *Br. Med. J.* i, 406

- KALNINYA, V.A. y INDULEN, K.K. (1976) Effect of amantadine derivatives on the activity of orthomyxovirus RNA-dependent RNA polimerase. *Acta Virol.* (Engl. ed.) 20, 343
- KALUZA, G., SCHOLTISSEK, C. y ROTT, R. (1972) Inhibition of the multiplication of enveloped RNA-viruses by glucosamine and 2-deoxy-Dglucose. *J. gen. Virol.* 14, 251
- KALUZA, G., SCHMIDT, M.F.G. y SCHOLTISSEK, C. (1973) Effect of 2-deoxy-D-glucose on the multiplication of SFV and the reversal of the block by mannose. *Virology* 54, 179
- KATES, M., ALLISON, A.C., TYRRELL, D.A. y JAMES, A.T. (1961) Lipids of influenza virus and their relation to those of the host cell. *Biochim. Biophys. Acta* 52, 455
- KATES, M., ALLISON, A.C., TYRELL, D.A. y JAMES, A.T. (1962) Origin of lipids in influenza virus. *Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27, 293
- KATO, N. y EGGERS, H.J. (1969) Inhibition of uncoating of FPV by 1-adamantanamine hydrochloride. *Virology* 37, 632
- KAUFMAN, H.E., MATOLA, F. y DOHLMAN, C. (1962) The use of 5-iodo-2'deoxyuridine (I.D.U.) in the treatment of herpes simplex keratitis. *Archs. Ophthal, N.Y.* 68, 235
- KE, Y.J. SINGER, S.H., POSTIC, B. y HO, M. (1966) Effect of puromycin on virus and endotoxin induce interferon-like inhibitors in rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121, 181
- KELLER, R. (1966) The stability of neutralization of poliovirus by native antibody and enzymatically derived fragments. *J. Immunol.* 96, 96
- KELLER, R. (1968) Studies on the mechanism of the enzymatic reactivation of \emptyset antibody-neutralized poliovirus. *J. Immunol.* 100, 1071
- KELLEY, J.M., EMERSON, S.U. y WAGNER, R. (1972) The glycoprotein of vesicular stomatitis virus in the antigen that gives rise to and reacts with neutralizing antibody. *J. Virol.* 10, 1231
- KELLY, D.L., AVERY, R.J. y DIMMOCK, N.J. (1974) Failure of an influenza virus to initiate infection in enucleate BHK cell. *J. Virol.* 13, 1155
- KENDAL, A.P., BIDDLE, F. y BELYAVIN, G. (1968) Influenza virus neuraminidase and the viral surface. *Biochim. Biophys. Acta* 165, 419

- KENDAL, A.P. y MADELEY, C.R. (1969) A comparative study of influenza virus neuraminidases, using automated techniques. *Biochim. Biophys. Acta* 185, 163
- KENDAL, A.P. y ALLAN, W.H. (1970) Comparative studies of Newcastle disease virus. 1.- Virulence, antigenic specificity and growth kinetics. *Microbiol.* 2, 273
- KENNEDY, S. (1974) The effect of enzymes on structural and biological properties of Semlike forst virus (SFV) *J. gen. Virol.* 23, 129
- KJELLEN, L., y PEREIRA, H.G. (1968) Role of adenovirus antigens in the induction of virus neutralizing antibody. *J. gen. Virol.* 2, 177
- KILBOURNE, E.D. (1959) Inhibition of influenza virus multiplication with a glucose antimetabolite (2-deoxy-D-glucose) *Nature, Londres* 183, 271
- KILBOURNE, E.D. (1968) Recombination of influenza A viruses of human and animal origin. *Science (Wash. D.C.)* 160, 74
- KILBOURNE, E.D., LAVER, W.G., SCHULMAN, J.L. y WEBSTER, R.G. (1968) Antiviral activity of antiserum specific for an influenza virus neuraminidase. *J. Virol.* 2, 281
- KINGSBURY, D.W. (1973) Paramyxovirus replication. *Curr. Top. Microbiol.* 59, 1
- KINGSBURY, D.W. y GRANOFF, A. (1970) Studies on mixed infection with Newcastle disease virus. IV. On the structure of heterozygotes. *Virology* 42, 262
- KINGSBURY, D.W., PORTNER, A. y DARLINGTON, R.W. (1970) Properties of incomplete Sendai virions and subgenomic viral RNAs. *Virology* 42, 857
- KINGSBURY, D.W. (1973) Cell-free translation of paramyxovirus messenger RNA. *J. Virol.* 12, 1020
- KINGSBURY, D.W. y WEBSTER, R.G. (1973) Cell-free translation of influenza virus messenger RNA. *Virology* 56, 654

- KIRK, J.M. (1960) The mode of action of actinomycin D. *Biochim. Biophys. Acta* 42, 167
- KIT, S., PIEKARSKI, L.J. y DUBBS, D.R. (1963) Induction of thymidine kinase by vaccinia infected mouse fibroblasts. *J. Molec. Biol.* 6, 22
- KLEIN, G. y DOMBOS, L. (1973) Relationship between the sensitivity of EBV-carrying lymphoblastoid lines to superinfection and the inducibility of the resident viral genome. *Int. J. Cancer* 11, 327
- KLENK, H.D. y CHOPPIN, P.W. (1969) Chemical composition of the parainfluenza virus SV5. *Virology* 37, 155
- KLENK, H.D. y CHOPPIN, P.W. (1970 a) Plasma membrane lipids and parainfluenza virus assembly. *Virology* 40, 939
- KLENK, H.D. y CHOPPIN, P.W. (1970 b) Glycosphingolipids of plasma membranes of cultured cells and an enveloped virus (SV5) grown in these cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66, 57
- KLENK, H.D., ROTT, R. y BECHT, H. (1972) On the structure of the influenza virus envelope. *Virology* 47, 579
- KLENK, H.D., SCHOLTISSEK, C. y ROTT, R. (1972) Inhibition of glycoprotein biosynthesis of influenza virus by D-glucosamine and 2-deoxy-D-glucose. *Virology* 49, 723
- KLENK, H.D. y ROTT, R. (1973) Formation of influenza virus proteins. *J. Virol.* 11, 823
- KLENK, H.D., WÖLLERT, W., ROTT, R. y SCHOLTISSEK, C. (1974) Association of influenza virus proteins with cytoplasmic fractions. *Virology* 47, 28
- KOND, Y., y HO, M. (1965) The role of the reticuloendothelial system in interferon formation in the rabbit. *Virology* 25, 163
- KORANT, B.D. (1973) Cleavage of poliovirus-specific polypeptide aggregates. *J. Virol.* 12, 556

- KORANT, B.D., BAUER, J.C. y BUTTERWORTH, B.E. (1974) Zinc ions inhibit replication of rhinoviruses. *Nature (Londres)* 248, 588
- KOTLER, M. y BECKER, Y. (1971) Rifampicin and distamycin A as inhibitors of Rous sarcoma virus reverse transcriptase. *Nature New Biol.* 234, 212
- KRIZANOVA, O. y RATHOVA, V. (1969) Serum inhibitors of myxoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 47, 125
- KRUG, R.M. (1972) Cytoplasmic and nucleoplasmic viral RNP_s in influenza virus-infected MDCK cells. *Virology* 50, 103
- KUCERA, S.L., COHEN, R.A. y HERRMANN, E.C.Jr. (1965) Antiviral activities of extracts of the lemon balm plant. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 130, 474
- LAFFERTY, K.J. (1963) The interaction between virus and antibody I. Kinetic Studies. *Virology* 21, 61
- LAINE, R., KETTUNGEN, M.L., GAHMBERG, C.C., KAARAINEN, L. y RENKONEN, O. (1972) Fatty chains of different lipid classes of Semliki forest virus and host cell membranes. *J. Virol.* 10, 433
- LANCZ, G.J. y JOHNSON, T.C. (1971) Inhibition of protein synthesis in Newcastle disease virus infected L cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137, 1405
- LANDSBERGER, F.R., COMPANS, R.W., CHOPPIN, P.W. y LENARD, J.L. (1973) Organization of the lipid phase in viral membranes. Effects of independent variation of the lipid and the protein composition. *Biochemistry* 12, 4498
- LANNI, F. y LANNI, Y.T. (1953) Antigenic structure of bacteriophage. *Cold. Spring. Harbor, Symp. Quant Biol.* 18, 159
- LARIN, N.M., COPPING, M.P., HERBST-LAIER, R.H., ROBERTS, B. y WENHAM, R.B.M. (1965) Antiviral activity of gliotoxin. *Chemotherapy* 10, 12
- LAVER, W.G. y WEBSTER, R.G. (1968) Selection of antigenic mutants of influenza viruses. Isolation and peptide mapping of their haemagglutinating proteins. *Virology* 34, 193
- LAVER, W.G. y VALENTINE, R.C. (1969) Morphology of the isolated hemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus. *Virology* 38, 105

- LAYER, W.G. (1971) Separation of two polypeptide chains from the hemagglutinin subunit of influenza virus. *Virology* 45, 275
- LAYER, W.G. (1973) The polypeptides of Influenza viruses. *Adv. Virus. Res.* 18, 57
- LAZAROWITZ, S.G., COMPANS, R.W. y CHOPPIN, P.W. (1971) Influenza virus structural and non-structural proteins cells and their plasma membranes. *Virology* 46, 830
- LAZAROWITZ, S.G., COMPANS, R.W. y CHOPPIN, P.W. (1973) Proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide of influenza virus. Function of the uncleaved polypeptide HA. *Virology* 52, 199
- LAZAROWITZ, S.G., GOLDBERG, A.R. y CHOPPIN, P.W. (1973) Proteolytic cleavage by plasma of the HA polypeptide of influenza of serum plasminogen. *Virology* 56, 172
- LE CLERC, J.L. y COGNIAUX-LE CLERC, J. (1965) The production of interferón by two inactivated arbovirus. *Acta Virol.* 9, 18
- LERNER, M.R., CONSIGLI, R.A., KHARE, G.P. y EISENSTARK, A. (1969) Sequence of events after infection of chicken embryo cells with radioactively labeled Newcastle disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 30, 853
- LETNANSKY, K. (1964) The influence of 2-deoxy-D-glucose of the nucleotide content of Ehrlich ascite carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Acta* 87, 1
- LEVINE, S., PUCK, T.T. y SAGIK, B.P. (1953) An absolute method for assay of virus hemagglutinins. *J. Exptl. Med.* 98, 521
- LEVINE, S. y SAGIK, B.P. (1956) The interactions of Newcastle disease virus (NDV) with chick embryo tissue culture cells. Attachment and growth. *Virology* 2, 57
- LEVINSON, W., WOODSON, B. y JACKSON, J. (1971) Inactivation of Rous sarcoma virus on contact with N-ethyl isatin β -thiosemicarbazone. *Nature New Biol.* 232, 116
- LEVINSON, W., FARAS, A., WOODSON, B., JACKSON, J. y BISHOP, J.M. (1973) Inhibition of RNA-dependent DNA polymerase of Rous Sarcoma virus by thiosemicarbazones and several cations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 164

- LEVITT, J. y BECKER, Y. (1967) The effect of cytosine arabinoside on the replication of herpes simplex virus. *Virology* 31, 129
- LI, K.K. y SETO, I.T. (1970) Electron microscope study of ribonucleic acid of myxoviruses. *J. Virol.* 7, 524
- LINNEMANN, C.C., HEGG, M.E., ROTTE, M.S., PHAIR, J.P. y SCHIFF, G.M. (1973) Measles IgM response during reinfection of previously vaccinated children. *J. Ped.* 82, 798
- LOMNICZI, B. y BURKE, D.C. (1970) Interferon production by temperature-sensitive mutants of Semlike forest virus. *J. gen. Virol.* 8, 55
- LOMNICZI, B., MEAGER, A. y BURKE, D.C. (1971) Virus RNA and protein synthesis in cells infected with different strains of Newcastle disease virus. *J. gen. Virol.* 13, 111
- LOPEZ, R., RONDA-LAIN, C., TOMASZ, A. y PORTOLES, A. (1977) Properties of "diplophage". A lipid-containing bacteriophage. *J. Virol.* 24, 201
- LOVINGER, G.G., KLEIN, R.A, GILDEN, R.V., y HATANAKA, M. (1973) The effect of cordycepin on cell transformation by RNA tumor viruses. *Virology* 55, 524
- LUBECK, M.D., SCHULMAN, J.L. y PALESE, P. (1978) Susceptibility of influenza A viruses to amantadine is influenced by the gene coding for M protein. *J. Virol.* 28, 710
- LUDWIG, H., BECHT, H. y ROTT, R. (1974) Inhibition of herpes virus-induced cell fusion by Concanavalin A, antisera and 2-deoxy-D-glucose. *J. Virology* 14, 307
- LWOFF, A. (1959) Factors influencing the evolution of viral diseases at the cellular level and in the organism. *Bact. Rev.* 23, 109
- LWOFF, A., HORNE, R. y TOURNIER, P. (1962) A system of viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27, 51
- MAENO, K., YOSHII, S. NOGATA, I. y MATSUMOTO, T. (1966) Growth of NDV in a HV5 carrier culture of HeLa cells. *Virology.* 29, 255
- MAHY, B.W.J. y BROMLEY, P.A. (1970) In vitro product of a ribonucleic acid polymerase induced by influenza virus. *J. Virol.* 6, 259

- MAHY, B.W.J. (1970) The replication of fowl plague virus RNA, en "The biology of large RNA viruses" (R.D. Barry y B.W.J. Mahy, eds), pp. 392-415. Academic Press, New York
- MAHY, B.W.J., HASTIE, N.D. y ARMSTRONG, S.J. (1972) Inhibition of influenza virus replication by α -amanitin: Mode of action. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1421
- MAJER, M. y LINK, F.J. (1971) Sensitization of Influenza virus A21 singapore by antineuraminidase. J. gen. Virol. 13, 355
- MAJER, M. (1972) Virus sensitization. Current Topics in Microbiol. Immunol. 58, 69
- MALEY, F., MCGARRAHAN, J.F. y DEL GIACCO, R. (1966) Galactosamine: A precursor of glycogen glucosamine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 85
- MANDEL, B. (1957) Inhibition of theiler's encephalomyelitis virus (GD VII strain) by intestinal mucopolysaccharide. III. Studies influencing virus-inhibition factor. Virology 3, 444
- MANDEL, B. (1960) Neutralization of viral infectivity: characterization of the virus-antibody complex including association, dissociation, and host-cell interaction. Ann. N.Y. Acad. Sci. 83, 515
- MANDEL, B. (1961) Reversibility of the reaction between poliovirus and neutralizing antibody of rabbit origin. Virology 14, 316
- MANDEL, B. (1967) The interaction of neutralized poliovirus with HeLa cells. II. Elution, penetration, uncoating. Virology 31, 248
- MANDEL, B. (1971) Characterization of type 1 poliovirus by electrophoretic analysis. Virology 44, 554
- MARCUS, P.I. y CARVER, D.H. (1967) Intrinsic interference: A new type of viral interference. J. Virol. 1, 334

- MARCUS, P.I. y ZUCKERBRAUN, H.L. (1970) Viral polymerase protein as antiviral agents (intrinsic interference). Ann. N.Y. Acad. Sci. 173, 185
- MARX, P.A., PORTNER, A. y KINGSBURY, D.W. (1974) Sendai virion transcriptase complex: Polypeptide composition and inhibition by virion envelope proteins. J. Virol. 13, 298
- MARCHESI, V.T., TILLACK, T.W. y SCHOTT, R.E. (1972) The structure of erythrocyte membranes studies by freeze-etching. II. Localization of receptors for phytohemagglutinin and influenza virus to the intramembranous particles. J. Exp. Med. 135, 1209
- MATTERN, C.F.T. (1977) Capitulo 1 - Symmetry in Virus Architecture. The Molecular Biology of Animal viruses vol. I. Ed. Debi Prosad Nayak, Marcel Dekker, New York y Basilea
- McAUSLAN, (1963) The induction and repression of thymidine kinase in the poxvirus-infected HeLa cell. Virology 21, 383
- McCLELLAND, L. y HARE, R. (1941) The adsorption of influenza virus by red cells and a new "in vitro" method of measuring antibodies for influenza virus. Canad. Publ. Hlth. J. 32, 530
- McCONNELL, H.M. y McFARLAND, B.L. (1972) The flexibility gradient in biological membranes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 195, 207
- McDONNELL, N., RONDA-LAIN, C. y TOMASZ, A. (1975) "Diplophage": A Bacteriophage of Diplococcus pneumoniae. Virology 63, 577
- McLAREN, L.C., HOLLAND, J.J. y SYVERTON, J.T. (1959) The mammalian cell-virus relationship I. Attachment of poliovirus to cultivated cells of primate and non-primate origin. J. Exp. Med. 109, 475
- MEIER - EWERT, H., GIBBS, A.J. y DIMMOCK, N.J. (1970) Studies on antigenic variations of swine influenza virus isolates. J. gen. Virol. 6, 409

- MILLER, H. y OWEN, G. (1960) Immuno-electrophoresis of insulin-binding antibodies. *Nature* 188, 67
- MILLER, F.A., DIXON, G.J., EHRLICH, J., SLOAN, B.J. y McLEAN, I.W. jr. (1968) Antiviral activity of 9- β -D-arabinofuranosyladenine. 1. Cell culture studies. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1868 a, 136
- MILLER, P.A., LINDSAY, H.L., CORMIER, M.C., MAYBERRY, B.R. y TROWN, P.W. (1970) Rapid semi-automated procedures for assaying antiviral activity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 173, 151
- MOORE, D.H., DAVIES, M.C., LEVINE, S. y ENGLERT, M.E. (1962) Correlation of structure with infectivity of influenza virus *Virology* 17, 470
- MORGAN, C., RIFKIND, R.A., HSU, K.C., HOLDEN, M., SEEGAL, B.C. y ROSE, H.M. (1961) Electron microscopic localization of intracellular viral antigen by the use of ferritin-conjugated antibody. *Virology* 14, 292
- MOUNTCASTLE, W.E., COMPANS, R.W. y CHOPPIN, P.W. (1971) Proteins and glycoproteins of paramyxoviruses: A comparison of Simian virus 5, Newcastle disease virus, and Sendai virus. *J. Virol.* 7, 47
- MULDOON, R.L., MEZNY, L. y JACKSON, G.G. (1972) Effect of isoprinosine against influenza and some other viruses causing respiratory diseases. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2, 224
- MURPHY, B.E. y GLASGOW, L.A. (1968) Factors modifying host resistance to viral infection. III. Effect of whole body x-irradiation on experimental encephalomyocarditis virus infection in mice. *J. Exp. Med.* 127, 1035
- MURPHY, J.S. y BANG, F.B. (1952) Observation with the electron microscope on cells of the chick chorio-allantoic membrane infected with influenza virus. *J. Exp. Med.* 95, 259
- MUSCHEL, L.H. y TOUSSAINT, A.J. (1962) Studies on the bacteriophage neutralizing activity of serums. *J. Immunol.* 89, 35
- NAGAI, Y., KLENK, H.D. y ROTT, R. (1976) Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* 72, 494

- NAHON, N. y ECKERT, H. (1972) Cell surface antigen induced by influenza virus. *Infect. Immunity* 6, 730
- NAKAJIMA, H. y OBARA, J. (1967) Physicochemical studies of Newcastle disease virus. III. The content of virus nucleic acid and its sedimentation pattern. *Arch. Ges. Virusforsch* 20, 287
- NAKAMURA, K. y COMPANS, R.W. (1978) Effects of glucosamine, 2-deoxyglucose, and tunicamycin on glycosilation, sulfation, and assembly of influenza viral proteins. *Virology* 84, 303
- NATHANSON, N. y COLE, G.A. (1970) Immunosuppression and experimental virus infection of the nervous system. *Adv. Virus Res.* 16, 397
- NAYAK, D.P. y RASMUSSEN, A.F. (1966) Influence of Mitomycin C on the replication of influenza virus. *Virology* 30, 673
- NAYAK, D.P. y BALUDA, M.A. (1969) Characterization of influenza virus ribonucleic acid duplex produced by annealing "in vitro" *J. Virol.* 3, 318
- NERMUT, M.V. (1972) Further investigation on the fine structure of influenza virus. *J. gen. Virol.* 17, 317
- NEURATH, A.R. y SOKOL, F. (1963) Association of myxovirus with an adenosine diphosphatase/Adenosine triphosphatase/ as revealed by chromatography on DEAE-cellulose and by density gradient centrifugation. *Z. Naturforsch.* 18b, 1050
- NICOLSON, G.L. (1972) Topography of membrane concanavalin A sites modified by proteolysis. *Nat. New Biol.* 239, 193
- NICOLSON, G.L. (1974) The interaction of lectins with animal cell surfaces. *Int. Rev. Cytol.* 39, 89
- NOLAND, D.C., CARRUTHERS, M.M. y LERNER, A.M. (1970) Herpesvirus hominis encephalitis in Michigan. Report of thirteen cases including six treated with idoxuridine. *New Engl. J. Med.* 282, 10
- NOLL, H. (1962) Studies of RNA and protein synthesis with a myxovirus and a small polyhedral virus. *Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol.* 27, 245

- NORRBY, E. (1969) The relationship between the soluble antigens and the virion of Adenovirus type 3. IV. Immunological complexity of soluble components. *Virology* 37, 565
- NORRBY, E. y HAMMARSKJOLD, B. (1972) Immunological properties of paramixovirus and its components. *Microbios.* 5, 17
- NORTHROP, R.L. (1969) Effect of puromycin and actinomycin D on a persistent mumps virus infection "in vitro". *J. Virol.* 4, 133
- OUCHTERLONY, O. (1949) Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 26, 507
- OGRA, P.L. (1970) In the secretory immunologic system. U.S. Gov't Printing Office, Washington 1970, p. 257
- OGRA, P.L. (1973) In Comparative immunology of oral cavity U.S. Gov't Printing office, Washington, 1973, pag. 38
- OGRA, P.L., KARZON, D.T., RIGHTHAND, F. y MacGILLIVRAY, M. (1968) Immunoglobulin response in serum and secretions after immunization with live and inactivated poliovaccine and natural infection. *New Eng. J. Med.* 279, 893
- OGRA, P.L. y KARZON, D.T. (1970) The role of immunoglobulins in the mechanism of mucosal immunity to virus infection. *Ped. Clin. N. Amer.* 17, 385
- OGRA, P.L., KERR-GRANT, D., DZIERBA, J.L., UMANA, G. y WEINTRAUB D. (1971) Antibody response in serum and nasopharynx after naturally acquired and vaccine-induced infection with rubella virus. *New Eng. J. Med.* 285, 1333
- OKI, T., y HEIDELBERGER, C. (1971) Fluorinated pyrimidines 39. Effects of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine on the replication of vaccinia viral messenger ribonucleic acid and proteins. *Mol. Pharmacol.* 7, 653
- LOUDIN, J. (1949) La diffusion d'un antigène dans une colonne de gel contenant les anticorps précipitants homologues: étude quantitative des trois principales variables. *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)* 228, 1890
- OXFORD, J.S. (1973) An inhibition of the particles-associated RNA dependent RNA polymerase of influenza A and B viruses. *J. Gen. Virol.* 18, 11

- PARFANOVICH, M., HAMMARSKSÖLD, B. y NORRBY, E. (1971) Synthesis of virus-specific variants of measles virus. Arch. ges. Virusforsch, 35, 38
- PARROT, R.H., VARGOSKO, A., LUCKEY, A., KIM, H.W., CUMMING, C. CHANOCK, R. (1959) Clinical features of infection with hemadsorption viruses. New Engl. J. Med. 260, 731
- PAYNE, C.F. (1919) Distribution of mortality during the period of incubation. J. Am. Ass. Instruct. Invest. en poultry husb. 6, 9
- PHILIPSON, L. (1966) Interaction between poliovirus and immunoglobulins. II. Basic aspects of virus-antibody Interaction. Virology 28, 35
- PIAZZA, M., PANE, G., PICCIOTO, L. y LOMBARDI, D. (1967) Effect on the infectivity of various viruses by the intestinal factor of normal mice which inactivates murine hepatitis virus. Nature, London, 213, 293
- PONS, M.W., SCHULZE, I.T. y HIRST, G.K. (1969) Isolation and characterization of the ribonucleoprotein of influenza virus. Virology. 39, 250
- PONS, M.W. y HIRST, G. K. (1969) The single and double stranded RNA's and the proteins of incomplete influenza virus. Virology 38, 68
- PONS, M.W. (1970) On the nature of the influenza virus genome. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 52, 142
- PONS, M.W. (1972) Studies on the replication of influenza virus RNA. Virology 47, 823
- PONS, M.W. (1973) The inhibition of influenza virus RNA synthesis by actinomycin D and cylcoheximide. Virology 51, 120
- PORTERFIELD, J.S. (1959) A simple plaque inhibition test for antiviral agents: application to assay of interferon. Lancet II, 326
- PORTNER, A. y KINGSBURY, D.W. (1971) Homologous interference by incomplete Sendai virus particles: changes in virus specific RNA synthesis. J. Virol. 8, 388

- POSTE, G. y REEVE, P. (1972) Agglutination of normal cells by plant lectins following infection with nononcogenic viruses. *Nat. New Biol.* 237, 113
- POWELL, K.L., BUCHAN, A., SIM, C. y WATSON, D.H. (1974) Type specific protein in herpes simplex virus envelope reacts with neutralizing antibody. *Nature (London)*, 249, 360
- PREBLE, O.T. y YOUNGNER, J.S. (1973) Selection of temperature-sensitive mutants during persistent infection: Role in maintenance of persistent Newcastle disease virus infections of L cells. *J. Virol.* 12, 481
- PRUSOFF, W.H. (1959) Synthesis and Biological activities of iododeoxyuridine, and analogue of thymidine. *Biochem. Biophys. Acta* 32, 295
- PRUSOFF, W.H. (1967) Recent advances in chemotherapy of viral diseases. *Pharmac. Rev.* 19, 209
- PRUSOFF, W.H. y GOZ, B. (1973) Potential mechanisms of action of antiviral agents. *Fed. Proc. Fed. Am. Socs. Exp. Biol.* 32, 1679
- QUIGLEY, J. P., RIFKIN, D. B. y REICH, E. (1971) Phospholipid composition of Rous sarcomavirus, host cell membranes, and other enveloped viruses. *Virology* 46, 106
- QUINTRELL, N.A. y MCAUSLAN, B.R. (1970) Inhibition of poxvirus replication by streptovaricin. *J. Virol.* 6, 485
- RADA, B., BLASKOVIC, D., SORM, F. y SKODA, Y. (1960) The inhibitory effect of 6-azauracil riboside on the multiplication of vaccinia virus. *Experientia* 16, 487
- RADWAN, A.I. y BURGER, D. (1973) The role of sensitizing antibody in the neutralization of equine arteritis virus by complement or anti-IgG serum. *Virology* 53, 366
- RAJ, N.B.K. y PITHA, P.M. (1977) Relationship between interferon production and interferon messenger RNA synthesis in human fibroblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 74, 1483
- RAPPAPORT, I. (1970) An analysis of the inactivation of MS2 bacteriophage with antiserum. *J. gen. Virology* 6, 25

- RAY, EVA, K., LEVITAN, D.B., HALPERN, B.L. y BLOUGH, H.A. (1974) A new approach to viral chemotherapy: Inhibitors of glycoprotein synthesis. *The Lancet* 21, 1974
- REED, L.J. y MUENCH, H. (1938) A simple method of estimating 50% end points. *Amer. J. Hyg.* 27, 493
- REEVE, P. y WATERSON, A.P. (1970) The growth cycle of avirulent strains of Newcastle disease virus. *Microbios*, 2, 5
- REEVE, P., ALEXANDER, D.J., POPE, G. y POSTE, G. (1971) Studies on the cytopathic effect of Newcastle disease virus: Metabolic requirements. *J. gen. Virol.* 11, 25
- RENIS, H.E. (1973) Antiviral activity of cytarabine in herpes virus infected rats. *Antimicrobl. Agents. Chemother* 4, 439
- RIBEIRO DO VALLE, L.A., RAPOSO DE MELO, P., DE SALLES GOMES, L.F. y MORATO PROECA, L. (1965) Methisazone in prevention of variola minor among contacts. *Lancet* ii, 976
- RICHMAN, D.D., WONG, K.T., ROBINSON, W.S. y MERIGAN, T.C. (1970) Effect of interferon on the replication of Sendai virus. *J. gen. Virol.* 9, 141
- RIFKIN, D.B., COMPANS, R.W. y REICH, E. (1972) A specific labeling procedure for proteins on the outer surface of membranes. *J. Biol. Chem.* 247, 6432
- RIGHTSEL, W.A., SCHNEIDER, H.G., SLOAN, B.I., GRAF, P.R., MILLER F.A., BARTZ, Q.R. y EHRLICH, J. (1964) Antiviral activity of gliotoxin and gliotoxin acetate. *Nature Lond.* 204, 1333
- ROBINSON, W.S. (1971 a). Sendai virus RNA synthesis and nucleocapsid formation in the presence of cicloheximide. *Virology* 44, 494
- ROBINSON, W.S. (1971 b) Ribonucleic acid polymerase activity in Sendai virions and nucleocapsid. *J. Virol.* 8, 81
- RONDA, E. (1960) Estudio de la acción de varios compuestos de amonio cuaternario frente a los virus vacunal y encefalíticos equinos Este y Oeste. *Microbiol. Españ.* 13, 187... y 257
- RONDA, E., GARCIA-GANCEDO, A., ALONSO, M.L., VILAS, P. y LUCAS, L. (1966) Killed fowl plague virus vaccine obtained from chick embryo cells. *Microbiol. Españ.* 19, 257

- RONDA, E., RONDA, C. y VILAS, P. (1967) "In vitro" inhibition of Myxovirus by chromomycin A₃. Proc. Vth Inter. Congr. Chemoth II, 37
- RONDA, E. y ALONSO, M.L. (1974) Interferon levels in the presence of rifamycin molecules. Progr. Chemoth II, 1005
- RONDA, E. y ALONSO, M.L. (1975) Variaciones en la síntesis de interferon inducido en presencia de bleomicina. Abs. V Congr. Nac. Microbiol. Salamanca
- RONDA, E. y ALONSO, M.L. (1976) In vivo depression of either endotoxin or virus induced interferons by rifampycin and rifamicin-derivatives. Chemotherapy 6, 327. Ed. Williams y Geddes. Plenum Press. London
- RONDA, E., ALONSO, M.L. y MOYA, P. (1977) Inducción de interferon en presencia de sustancias antitumorales. Abs. VI Congr. Nac. Microbiol. Santiago de Compostela
- RONDA, E. y ALONSO, M.L. (1977) Significación biológica de los interferones en "Aspectos actuales de las relaciones huésped-parasito e intermicrobianas". Monografías Básicas de la Soc. Españ. Microbiol. Ed. Portolés y Baquero. Madrid. pags. 13-40
- RONDA, E., ALONSO, M.L. y MOYA, P. (1978) Comparative study of cyclophosphamide effect on interferon induction and immune response in chickens. Proc. I Mediterranean Congr. Chemoth.
- ROSEN, L. (1961) Hemagglutination and hemagglutination-inhibition with measles virus. Virology 13, 139
- ROTT, R. y SCHOLTISSEK, C. (1963) Investigations about the formation of incomplete forms of fowl plague virus. J. gen. Microbiol. 33, 303
- ROTT, R., SABER, S. y SCHOLTISSEK, C. (1965) Effect on myxovirus of mitomycin C, actinomycin D, and pretreatment of the host cell with ultra-violet light. Nature 205, 1187
- ROTT, R. y SCHOLTISSEK, C. (1968) Biochemical Studies on influenza virus multiplication at reduced temperature. J. gen. Virol. 3, 239

- ROTT, R., BECHT, H., KLENK, H.D. y SCHOLTISSEK, C. (1972) Interactions of concanavalin A with the membrane of influenza virus-infected cells and with the envelope components of the virus particle. *Z. Naturforsch.* 27 b, 227
- ROUX, L., y KOLAKOFSKY, D. (1974) Protein kinase associated with Sendai virions. *J. Virol.* 13, 545
- RUSTIGIAN, R. (1966) Persistent infection of cells in culture by measles virus. I. Development and characteristics of HeLa sublines persistently infected with complete virus. *J. Bacteriol.* 92, 1792
- SALK, J.E. (1944) A simplified procedure for titrating hemagglutinating capacity of influenza virus and the corresponding antibody. *J. Immunol.* 49, 87
- SALK, J.E. (1948) A plastic plate for use in tests involving virus hemagglutination and other similar reactions. *Science* 108, 749
- SALMI, A.A., NORRBY, E. y PANELIUS, M. (1972) Identification of different measles virus specific antibodies in the serum and cerebrospinal fluid from patients with subacute sclerosing panencephalitis and multiple sclerosis. *Infect. Immun.* 6, 248
- SAMSON, A.C.R. y FOX, C.F. (1974) Selective inhibition of Newcastle disease virus-induced glycoprotein synthesis by D-glucosamine hydrochloride. *J. Virol.* 13, 775
- SAMUEL, C.E. y JOKLIK, W.K. (1974) A protein synthesizing system from interferon-treated cells that discriminates between cellular and viral messenger RNAs. *Virology* 58, 476
- SATO, K., RIGHTHAND, F. y KARZON, D.J. (1971) Effect of host cell on distribution of a lysosomal enzyme during virus infection. *J. Virol.* 7, 467
- SCHAFER, W., MUNK, K. y ARMBRUSTER, D. (1952) Eigenschaften tierischer virusarten, untersucht an der Geflügelpest viren als Modell. III. Mitteilung: weitere untersuchungen über die physikochemischen und morphologischen Eigenschaften der geflügelpest viren. *Z. Naturforsch.* 76, 29

- SCHEID, A., CALIGUIRI, L.A., COMPANS, R.W. y CHOPPIN, P.W. (1972) Isolation of paramyxovirus glycoproteins. Association of both hemagglutinating and neuraminidase activities with the larger SV5 glycoprotein. *Virology* 50, 640
- SCHEID, A. y CHOPPIN, P.W. (1973) Isolation and purification of the envelope proteins of Newcastle disease virus. *J. Virol.* 11, 263
- SCHLUEDERBERG, A. (1965) Modification of immune response by previous experience with Measles. *Arch. Ges. virusforsch* 16, 347
- SCHNITZER, T.J., HODES, D.S., GERIN, J., CAMARGO, E. y CHANOCK, R.M. (1975) Effect of 2-deoxy-D-glucose y glucosamine on the growth and functions of respiratory syncytial and parainfluenza 3-viruses. *Virology* 67, 306
- SCHOLTISSEK, C.S., ROTT, R., HAUSEN, P., HAUSEN, H. y SCHÄFER, W. (1962). Comparative studies of RNA and protein synthesis with a mixovirus and a small polyhedral virus. *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* XXVII, 245
- SCHOLTISSEK, C. y ROTT, R. (1970) Synthesis "in vivo" of influenza virus plus and minus strand RNA and its preferential inhibition by antibiotics. *Virology* 40, 989
- SCHOLTISSEK, C. (1971) Detection of an unstable RNA in chick fibroblasts after reduction of the UTP-pool by glucosamine. *Eur. J. Biochem.* 24, 358
- SCHOLTISSEK, C. (1972) Influence of glucosamine on the uptake of nucleosides by chick fibroblasts and on the incorporation into RNA. *Biochem. Biophys. Acta* 277, 459
- SCHOLTISSEK, C. (1973) glycoprotein synthesis of enveloped viruses. *Adv. Biosciences* II, 193
- SCHOLTISSEK, C., ROTT, R. y KLENK, H.D. (1975) Two different mechanisms of the inhibition of the multiplication of enveloped viruses by glucosamine. *Virology* 63, 191
- SCHULMAN, J.L. y KILBOURNE, E.D. (1969) Independent variation in nature of hemagglutinin and neuraminidase antigens of influenza virus: distinctiveness of hemagglutinin antigen of Hong-Kong/68 virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63, 326
- SCHULZE, I.T. (1970) The structure of influenza virus. I. The polypeptides of the virion. *Virology* 42, 890

- SCHULZE, I.T. (1972) The structure of influenza virus. II. A model based on the morphology and composition of subviral particles. *Virology* 47, 181
- SCHULZE, I.T. (1973) Structure of the influenza virion. *Adv. Virus Res.* 18, 1
- SCHULZE, I.T. (1974) Effects of sialylation on the biological activities of the influenza virions, en "Negative strand viruses" (R.D. Barry and Mahy, B.W.J. eds), Academic Press, New York
- SENSI, P., TIMBAL, M.T. y MAFFIL, C. (1960) Rifamycin IX. Two new antibiotics of rifamycin family: rifamycin S rifamycin S.V. *Experientia*, 16, 412
- SETO, J.T. y ROTT, R. (1966) Functional significance of sialidase during influenza virus multiplication. *Virology* 30, 731
- SETO, J.T., BECHT, H. y ROTT, R. (1974) Effect of specific antibodies on biological functions of the envelope components of Newcastle disease virus. *Virology* 61, 354
- SEHGAL, P.B., TAMM, I. y VILCEK, J. (1975) Enhancement of human interferon production by neutral red y chloroquine analysis of inhibition of protein degradation and macromolecular synthesis. *J. Exp. Med.* 142, 1283
- SEHGAL, P.B., TAMM, I. y VILCEK, J. (1975) Human interferon production: superinduction by 5,6-dichloro-1-B-D-ribofuranosylbenzimidazole. *Science* 190, 282
- SEHGAL, P.B. y TAMM, I. (1976) An evaluation of messenger RNA competition in the shutoff of human interferon production. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA* 73, 1621
- SEHGAL, P.B., TAMM, I. y VILCEK, I. (1976) On the mechanism of enhancement of human interferon production by actinomycin D and cycloheximide. *Virology* 70, 256
- SEHGAL, P.B., DOBBERSTEIN, B. y TAMM, I. (1977) Interferon messenger RNA content of human fibroblasts during induction, shutoff and superinduction of interferon production. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 74, 3409
- SEVER, J.L. y ZEMAN, W. eds (1968) Conference on measles virus and subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology* 18, 1-200

- SHARP, D.G., TAYLOR, A.R. McLEAN, I.W., BEARD, D. y BEARD, J.W. (1945) Densities and sizes of the influenza viruses A (PR 8 strain) and B (lee strain) and the swine influenza virus. *J. Biol. Chem.* 159, 29
- SHEAFF, E.T. y STEWART, R.B. (1969) Interaction of interferon with cells: induction of antiviral activity. *Can. J. Microbiol.* 15, 941
- SIDWELL, R.W., DIXON, G.J., SCHABEL, F.M. Jr. y KAUMP, D.H. (1968) Antiviral activity of 9- β -D-arabinofuranosyladenine. II. Activity against herpes simplex keratitis in hamsters. *Antimicrob. Agents Chemother* 1968, 148
- SIDWELL, R.W., HUFFMAN, J.H., KHARE, G.P., ALLEN, L.B. WITKOWSKI, J.T. y ROBINS, R.K. (1972) Broad-spectrum antiviral activity of virazole: 1- β -D-ribofuranosyl-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide. *Science N.Y.* 177, 705
- SKEHEL, J.J. (1971) Estimations of the molecular weight of the influenza virus genome. *J. gen. Virol.* 11, 103
- SKEHEL, J.J. y SCHILD, G.C. (1971) The polypeptide composition of influenza A viruses. *Virology* 44, 396
- SKEHEL, J.J. (1972) Polypeptide synthesis in influenza virus-infected cells. *Virology* 49, 23
- SKEHEL, J.J. (1973) Early polypeptide synthesis in influenza virus-infected cells. *Virology* 56, 394
- SKEHEL, J.J., HAY, A.J. y ARMSTRONG, J.A. (1977) On the mechanism of inhibition of influenza virus replication by amantadine hydrochloride. *J. gen. Virol.* 38, 97
- SOKOL, F., NEURATH, A.R. y VILCEK, J. (1964) Formation of incomplete Sendai virus in embryonated eggs. *Acta Virol.* 8, 59
- STANLEY, P., GANDHI, S.S. y WHITE, D.G. (1973) The polypeptides of influenza virus. VII. Synthesis of the haemagglutinating. *Virology* 53, 92
- STEINER, S., COURTNEY, R.J. y MELNICK, J.L. (1973) Incorporation of 2-deoxy-D-glucose into glycoproteins of normal and simian virus 40-transformed hamster cells. *Cancer Res.* 33, 2402
- STEPHENSON, J.R., y DIMMOCK, N.J. (1974) Interaction of influenza virus with the host cell: inhibition of ribosome biosynthesis, en "Negative strand viruses". (R.D. Barry y B.W.J. Mahy, eds). Academic Press, New York

- STEPHENSON, J.R. y DIMMOCK, N.J. (1975) Early events in influenza virus multiplication. I. Location and fate of the input RNA. *Virology* 65, 77
- SUBAK-SHARPE, J.H., TIMBURY, M.C. y WILLIAMS, J.F. (1969) Rifampicin inhibits the growth of some mammalian viruses. *Nature, London* 222, 341
- SVEHAG, S.E. y MANDEL, B. (1964 a) The formation and properties of poliovirus neutralizing antibody I. 19S and 7S antibody formation: differences in kinetics and antigen dose requirement for induction. *J. Exp. Med.* 119, 1
- SVEHAG, S.E. y MANDEL, B. (1964 b) The formation and properties of poliovirus neutralizing antibody. II. 19 S and 7 S antibody formation: differences in antigen dose requirement for sustained synthesis, anamnesis, and sensitivity to X-irradiation. *J. Exp. Med.* 119, 21
- SVEHAG, S.E. (1965) The formation and properties of poliovirus neutralizing antibody. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 64, 103
- TAKEMOTO, K.K. y LIEBHABER, H. (1961) Virus-polysaccharide interactions. 1.- An agar polysaccharide determining plaque morphology of EMC-virus. *Virology* 14, 456
- TAMM, I., FOLKERS, K. y HORSFAL, F.L. (1952) Inhibition of influenza virus multiplication by 2,5 dimethylbenzimidazole *Yale J. Biol. Med.* 24, 559
- TAMM, I. y EGGERS, H.J. (1963) Specific inhibition of replication of animal viruses. *Science N.Y.* 142, 24
- TAN, Y.H., ARMSTRONG, J.A., KE, Y.H. y HO, M. (1970) Regulation of cellular interferon production: enhancement by antimitabolites. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 67, 464
- TAN, Y.H., CREAGAN, R.P. y RUDDLE, F.H. (1974) The somatic cell genetics of human interferon: assignment of human interferon loci to chromosome 2 and 5. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71, 2251
- TAYLOR, A.R., SHARP, D.G., BEARD, D., BEARD, J.W., DINGLE, J.H. y FELLER, A.E. (1943). Isolation and characterization of influenza A virus (PR8 strain). *J. Immunol.* 47, 261

- TAYLOR, J.M., HAMPSON, A.W. y WHITE, D.O. (1969) The polypeptides of influenza virus. I. cytoplasmic synthesis and nuclear accumulation. *Virology* 39, 419
- TAYLOR, J.M., HAMPSON, A.W., LAYTON, J.E. y WHITE, D.O. (1970) The polypeptides of influenza virus. IV. An analysis of nuclear accumulation. *Virology* 42, 744
- TEMIN, H.M. y RUBIN, H. (1958) Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture. *Virology* 6, 669
- TEMIN, H. M. (1971) The provirus hypothesis: speculations on the significance of RNA-directed DNA synthesis for normal development and for carcinogenesis. *J. Nat. Cancer Inst.* 46, iii
- THACORE, H. y YOUNGNER, J.S. (1969) Cells persistently infected with Newcastle disease virus. I. Properties of mutants isolated from persistently infected L cells. *Virology* 4, 244
- THACORE, H. y YOUNGNER, J.S. (1970) Cells persistently infected with Newcastle disease virus. II. Ribonucleic acid and protein synthesis in cells infected with mutants isolated from persistently infected cells. *J. Virol.* 6, 42
- TOMASI, T.,B. Jr. y BIENENSTOCK, J. (1968) Secretory Immunoglobulins. *Adv. Immunol.* 9, 1
- TOMASI, T.B. y GREY, H.M. (1972) Characterization of an immune system common to certain external secretations. *Progr. Allergy* 16, 83
- UHR, J.W. (1964) The heterogeneity of the immune response. *Science* 145, 457
- UNDERWOOD, G.E. (1962) Activity of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine hydrochloride against herpes simplex keratitis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 660
- VAN TUBERGEN, R.P. (1961) The use of radioautography and electron microscopy for the localization of tritium label in bacteria. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 219

- VASQUEZ, C. y TOURNIER, P. (1962) The morphology of reovirus
Virology 17, 503
- VILCEK, J. y NG, M.H. (1971) Post-transcriptional control of
interferon synthesis. J. Virol. 7, 588
- VILCEK, J. y HAVELL, E.A. (1973) Stabilization of interferon
messenger RNA activity by treatment of cells with meta-
bolic inhibitors and lowering of the incubation temperatu-
re. Proc. Nat. Acad. Sci USA 70, 3909
- VOGEL, J. y SHELOKOV, A. (1957) Adsorption-hemagglutination test
for influenza virus in monkey kidney tissue culture.
Science 126, 358
- VOGT, A., KOPP, R., MAASS, G. y REICH, L. (1964) Poliovirus
type 1: Neutralization by papaindigested antibodies.
Science 145, 1447
- VON MAGNUS, P. (1954) Incomplete forms of influenza virus.
Adv. Virus. Res. 2, 59
- WAGNER, R.R. (1963) The interferons: cellular inhibitors of
viral infection. Ann. Rev. Microbiol. 17, 285
- WAGNER, R.R. y HUANG, A.S. (1965) Reversible inhibition of
interferon synthesis by puromycin. Evidence for an
interferon-specific messenger RNA. Proc. Nat. Acad. Sci.
USA 54, 1112
- WALDER, R. (1971) Electron microscopic evidence of Navira
virus structure. J. gen. Virol. 11, 123
- WALL, M.E., WANI, M.C., COOK, C.E., PALMER, K.H., McPHAIL, A.T.
y SIM, G.A. (1966) Plant antitumor agents. 1. The isolation
and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia
and tumor inhibitor from Camptotheca acuminata. C.E.J.
Am. Chem.Soc. 88, 3888
- WALL, R. y TAYLOR, M.W. (1970) Mengovirus RNA synthesis in
productive and restrictive cell lines. Virology 42, 78
- WALLBANK, A.M., MATTER, R.E. y KLINIKOWSKI, N.G. (1966) 1. Ada-
mantamine hydrochloride: inhibition of Rous and Erh. sar-
coma virus in cell culture. Science N.Y. 152, 1760

- WALLIS, C. y MELNICK, J.L. (1967) Virus aggregation as the cause of the nonneutralizable persistent fraction. *J. Virology* 1, 478
- WATERSON, A.P. (1962) Two kinds of myxovirus. *Nature (Lond.)* 193, 1163
- WATERSON, A.P. (1964) Measles virus. *Arch. Ges. Virusforsch.* 16, 57
- WEBER, K., NOTANI, G., WIKLER, M. y KONOGBERG, W. (1966) Amino acid sequence of the f₂ coat protein. *J. Mol. Biol.* 20, 423
- WEBSTER, R.G. y LAVER, W.G. (1967) Preparation and properties of antibody directed specifically against the neuraminidase of influenza virus. *J. Immunol.* 99, 49
- WEBSTER, R.G., LAVER, W.G. y KILBOURNE, E.D. (1968) Reactions of antibodies with surface antigens of influenza virus. *J. gen. Virol.* 3, 315
- WEBSTER, R.G. (1970) Estimation of the molecular weights of the polypeptide chains from the isolated hemagglutinating and neuraminidase subunits of influenza virus. *Virology* 40, 643
- WEBSTER, R.G. y LAVER, W.G. (1971) Antigenic variation in influenza virus. *Progr. Med. Virol.* 13, 271
- WECKER, E., HUMMELER, K. y GOETZ, O. (1962) Relationship between viral RNA and viral protein synthesis. *Virology* 17, 110
- WEINSTEIN, L. y CHANG, T.W. (1973) The chemotherapy of viral infections. *New Engl. J. Med.* 289, 725
- WHEELOCK, E.F. y TAMM, I. (1961) Biochemical basis for alteration in structure and function of HeLa cells infected with Newcastle disease virus. *J. exp. Med.* 114, 617
- WHEELOCK, E.F. (1962) The role of protein synthesis in the eclipse period of Newcastle disease virus multiplication in HeLa cells as studied with puromycin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 48, 1358

- WHEELOCK, E.F. (1963) Intracellular site of Newcastle virus nucleic acid synthesis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 114, 56
- WHITE, D.O., DAY, H.M., BATCHELDER, E.J., CHEYNE, I.M. y WANSBROUGH, A.J. (1965) Delay in the multiplication of influenza virus. Virology 25, 289
- WHITE, D.O., TAYLOR, J.M., HASLAM, E.A. y HAMPSON, A.W. (1970) The polypeptides of influenza virus and their biosynthesis en "The biology of large RNA viruses" (R.D. Barry and B.W.J. Mahy eds) pp. 602. Academic Press, Londres
- WHITE, D.O. (1974) Influenza viral proteins: Identification and synthesis. Curr. Topics Microbiol. Immunol. 63, 1
- WIEBE, M. E y JOKLIK, W.K. (1975) The mechanism of inhibition of reovirus. Replication by interferon. Virology 66, 229
- WIKTOR, T.S., GYORGY, E., SCHLUMBERGER, H.D., SOKOL, F. y KOPROWSKI, H. (1973) Antigenic properties of rabies virus components. J. Immunol. 110, 269
- WILSON, D.E. (1968) Inhibition of host-cell protein and ribonucleic acid synthesis by NDV. J. Virol. 2, 1
- WRIGLEY, N.G., SKEHEL, J.J., CHARLWOOD, P.A. y BRAND, C.M. (1973) The size and shape of influenza virus neuraminidase. Virology 51, 525
- YOUNGNER, J.S., STINEBRING, W.R. y TAUBE, S.G. (1965) Influence of inhibitors of protein synthesis on interferon formation in mice. Virology 27, 541
- ZIMMERMANN, T. y SCHAFER, W. (1960) Effect of p-fluorophenylalanine on fowl plague virus multiplication. Virology 11, 676
- ZIMMERMAN, J.E. y RASKA, K. (1972) Inhibition of adenovirus type 12 induced DNA synthesis in G1-arrested BHK₂ cells by dibutyryl adenosine cyclic 3':5' monophosphate. Nature New Biol. 239, 145
- ZISMAN, B., WHEELOCK, E.F. y ALLISON, A.C. (1971) Role of macrophages and antibody in resistance of mice against yellow fever virus. J. Immunol. 107, 236

ADDENDUM A LA BIBLIOGRAFIA

- ANDRES, G.A., MORGAN, D., HSU, K.C., RIFKIND, R.A. y SEEGAL, B.C. (1962): Electron microscopic studies of experimental nephritis whit ferritin-conjugated antibody: the basement membranes and cisternae of visceral epithelial cells in nephritic rat glomeruli. *J. Exp. Med.* 115, 929
- BYERLY, T.C., TITUS, H.W., y ELLIS, N.R. (1933) Effect of diet on egg composition. II.- Mortality of embryos in egg from hens on diets containing protein supplements of different origin. *J. Nutrition*, 6, 225
- ETCHISON, J., DOYLE, M., PENHOET, E. y HOLLAND, J. (1971) synthesis and cleavage of influenza virus proteins. *J. Virol.*, 7, 155
- HIERHOLZER, J., y SUGGS, M.T. (1969). Standardized viral hemagglutination and hemagglutination-Inhibition tests, I.- Standardization of erythrocyte suspensions. *Appl. Microbiol.* 18, 816
- LEVINTHAL, J.D., CEROTTINI, J.C., AHMAD-ZADEH, C., y WICKER, R. (1967) The detection of intercellular adenovirus type 12 antigens by indirect immunoferritin technique. *Int. J. Cancer* 2, 85.
- MORGAN, C., RIFKIND, R.A. y ROSE, H.M. (1962) The use of ferritin-conjugated antibodies in electron microscopic studies of influenza and vaccinea viruses. *Cold, Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27, 57
- SEVER, J.L. (1962) Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunol.* 88, 320
- SINGER, S.J. (1959) Preparation of an electrondense antibody conjugate. *Nature (London)* 183, 1523
- SMITH, C.W., METZGER, J.F., ZACKS, S.I. y KASE, A. (1960). Immune electron microscopy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104, 336
- STICH, H.F., KALNINS, V.I., MacKINNON, E. y YOHN, D.S. (1967) Electron microscopic localization of adenovirus type 12 antigens. *J. Ultrast. Res.* 19, 556
- TAKATSY, G. FURESZ, J., y FARKAS, F. (1954) Studies on the quantitative relationships of influenza virus antibody union by menas of a simple antibody absorption test. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 5, 241
-
- WALKER, D.L. (1968) Persistent viral infection in cell cultures, in "Medical and applied virology" (Sanders, M., y Lenette, E.H. eds) pp. 99-110. Warren H. Green, Inc. St. Louis
- WERNER, G.H. (1977) Medicaments antiviraux: Le point après le Congrès International de Chimiotherapie. *Med. et Hyg.* 35 3829.