

TOMO XXI

N° 6

**Academia  
Nacional de Agronomía y Veterinaria**

Buenos Aires

República Argentina

**ALGUNOS PROGRESOS EN VIROLOGIA**

Conferencia pronunciada por el

DR. VICTOR J. CABASSO

De la División Laboratorios Lederle. American  
Cyanamid Comp.  
Pearl River - New York

Sesión Pública del 10 de agosto de 1967



1968

# ACADEMIA NACIONAL DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

Buenos Aires - Arenales 1678

\*

## MESA DIRECTIVA

<i>Presidente</i>	Ing. Agr. José María Bustillo
<i>Vicepresidente . . .</i>	Dr. José Rafael Serres
<i>Secretario General</i>	Dr. Osvaldo A. Eckell
<i>Secretario de Actas</i>	Dr. Alejandro C. Baudou
<i>Tesorero</i>	Ing. Agr. Eduardo Pous Peña

## ACADEMICOS DE NUMERO

Dr. Arena, Andrés R.  
Dr. Baudou, Alejandro C.  
Ing. Agr. Burkart, Arturo E.  
Ing. Agr. Brunini, Vicente C.  
Ing. Agr. Bustillo, José María  
Dr. Cárcano, Miguel Angel  
Ing. Agr. Casares, Miguel £'.  
Dr. Eckell, Osvaldo A.  
Dr. Fernández Ithurrat, Edilberto  
Dr. García Mata, Enrique  
Ing. Agr. Ibarbia, Diego J.  
Dr. Newton, Oscar M.  
Dr. Pires, Antonio  
Ing. Agr. Pous Peña, Eduardo  
Dr. Quiroga, Santiago S.  
Ing. Agr. Ragonese, Arturo E.  
Dr. Rosenbusch, Francisco  
Dr. Rottgardt, Abel A.  
Ing. Agr. Sauberán, Carlos  
Dr. Schang, Pedro J.  
Dr. Serres, José Rafael  
Dr. Solanet, Emilio

## INTRODUCCION

Los virus son forzosamente parásitos que para su reproducción dependen totalmente de las células vivas. Esto los distingue de otros microorganismos, la mayoría de los cuales metabolizan rápidamente y se propagan en medio artificial. Una de las diferencias más importantes entre los virus y las bacterias más comúnmente conocidas es su resistencia a sulfonamidas y antibióticos, según lo ilustra la figura N<sup>o</sup> 1. Recientemente se encontraron algunos compuestos químicos que interfieren en los pasos iniciales que conducen a la síntesis de algunos virus, pero que son totalmente inactivos contra las partículas de virus maduros.

Otra de las diferencias que frustró a la mayoría de los primeros investigadores es la invisibilidad de los virus. Mucho tiempo después que las bacterias pudieron distinguirse claramente por medio del microscopio óptico, el virólogo todavía debía llegar a conclusiones observando los efectos de estos agentes invisibles en huéspedes naturales o de laboratorio. Técnicas especiales de microscopía resolvieron el problema.

### **La Microscopía y sus revelaciones**

Gracias al microscopio electrónico, se descubrió que los virus son organismos en partículas bien delimitadas y de forma y tamaño definidos. Pueden tener forma de bastón, como el virus del mosaico del tabaco (Fig. N<sup>o</sup> 2 a) de renacuajo, como el virus bacteriano con cola de la figura N<sup>o</sup> 2 b. o simplemente ser esféricos, como parecen ser los virus poliomielíticos (Fig. 2 c).

Fig. 1

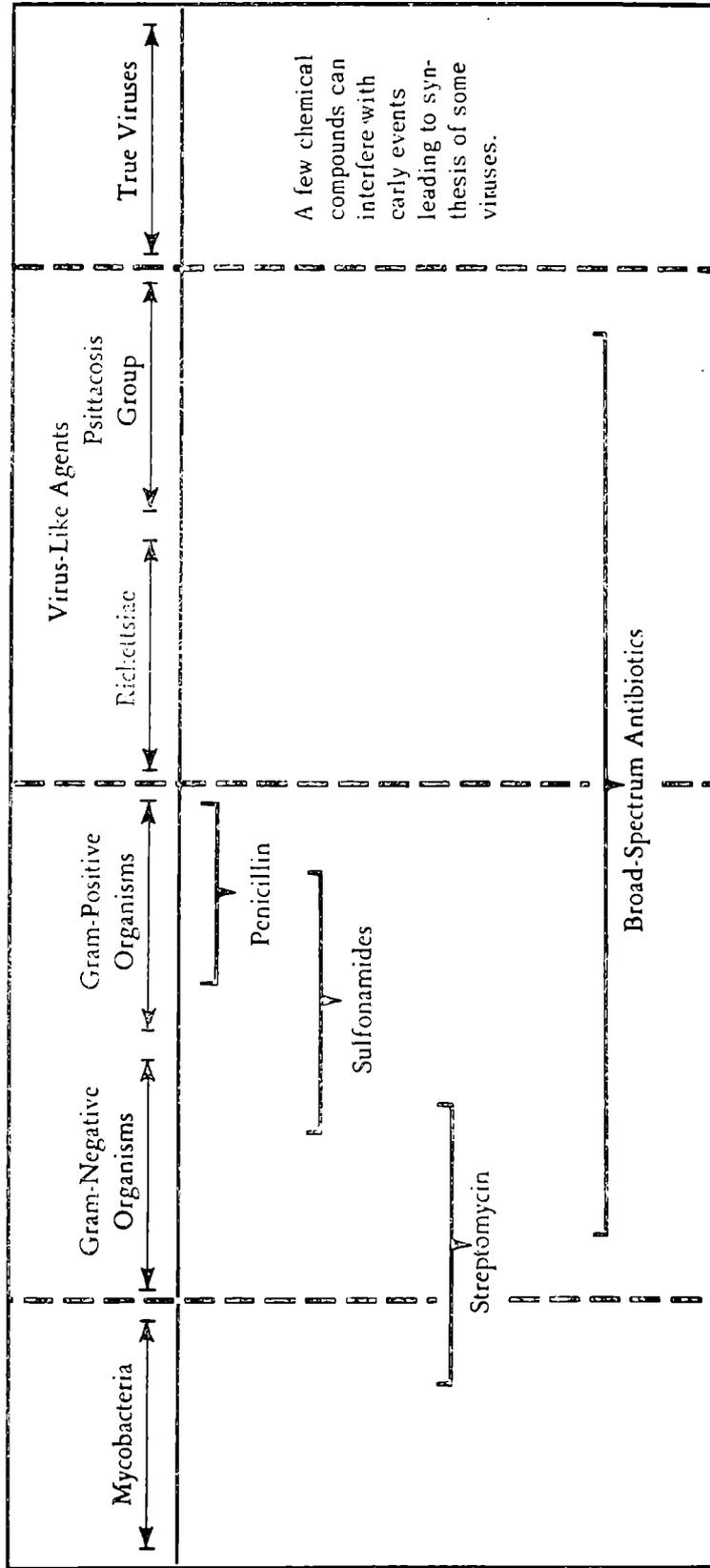


FIG. 1.—Tabla del efecto antibiótico y quimioterápico contra la infección provocada por bacterias y por virus.

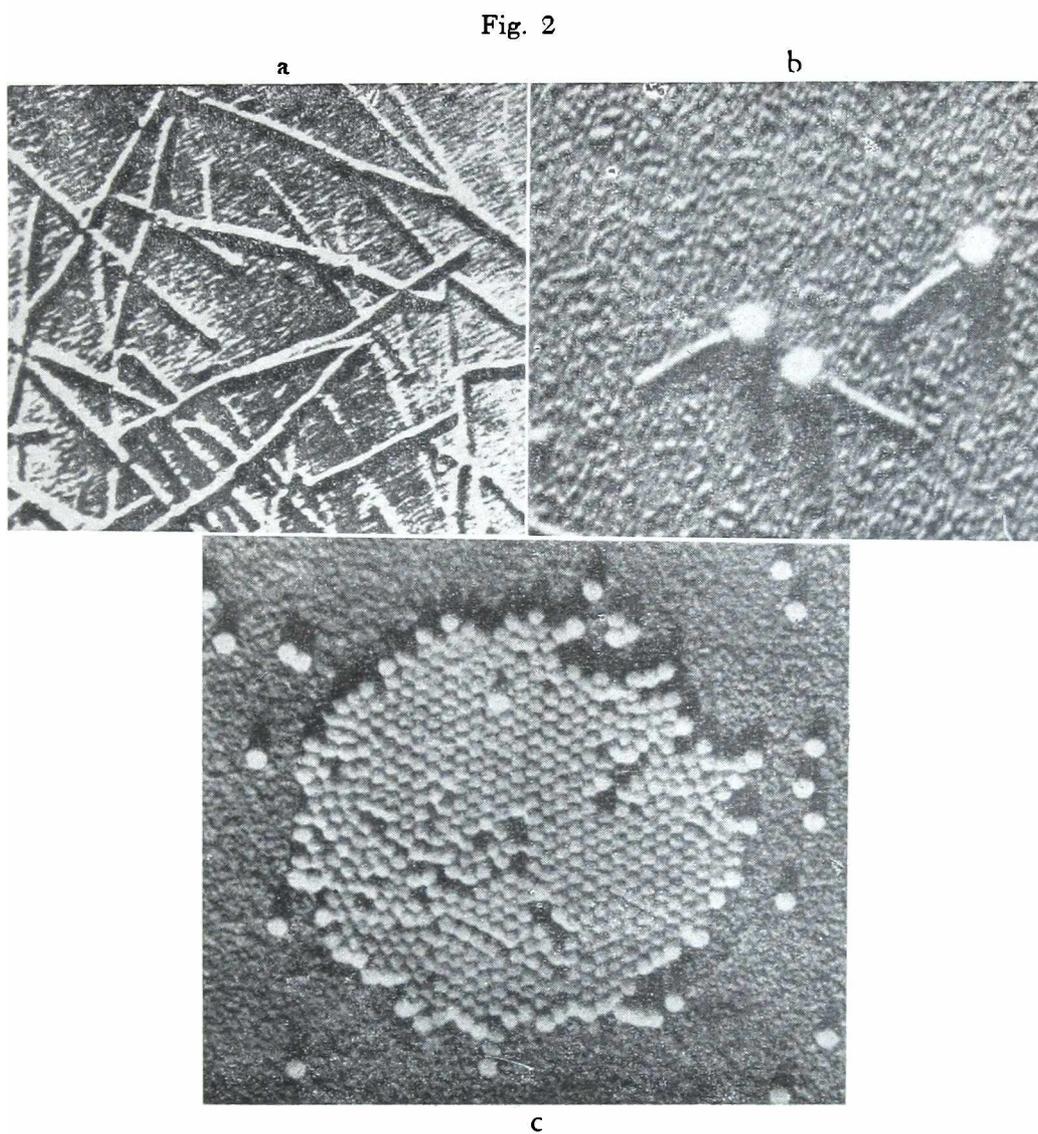


Fig. 2.—a) Virus del mosaico del tabaco amplificado 60.000 veces, b) Bacteriófago amplificado 104.000 veces. Nótense las cabezas y la estructura helicoidal de las colas, c) Poliovirus del tipo 2 (MEF-i cepa) amplificado 200.000 veces. Las partículas individuales están levemente achatadas y parecen más grandes que las que írman parte del conjunto cristalino (publicado por primera vez por el Dr. O. E. Schwerdt, y utilizado con licencia).

Fig. 3

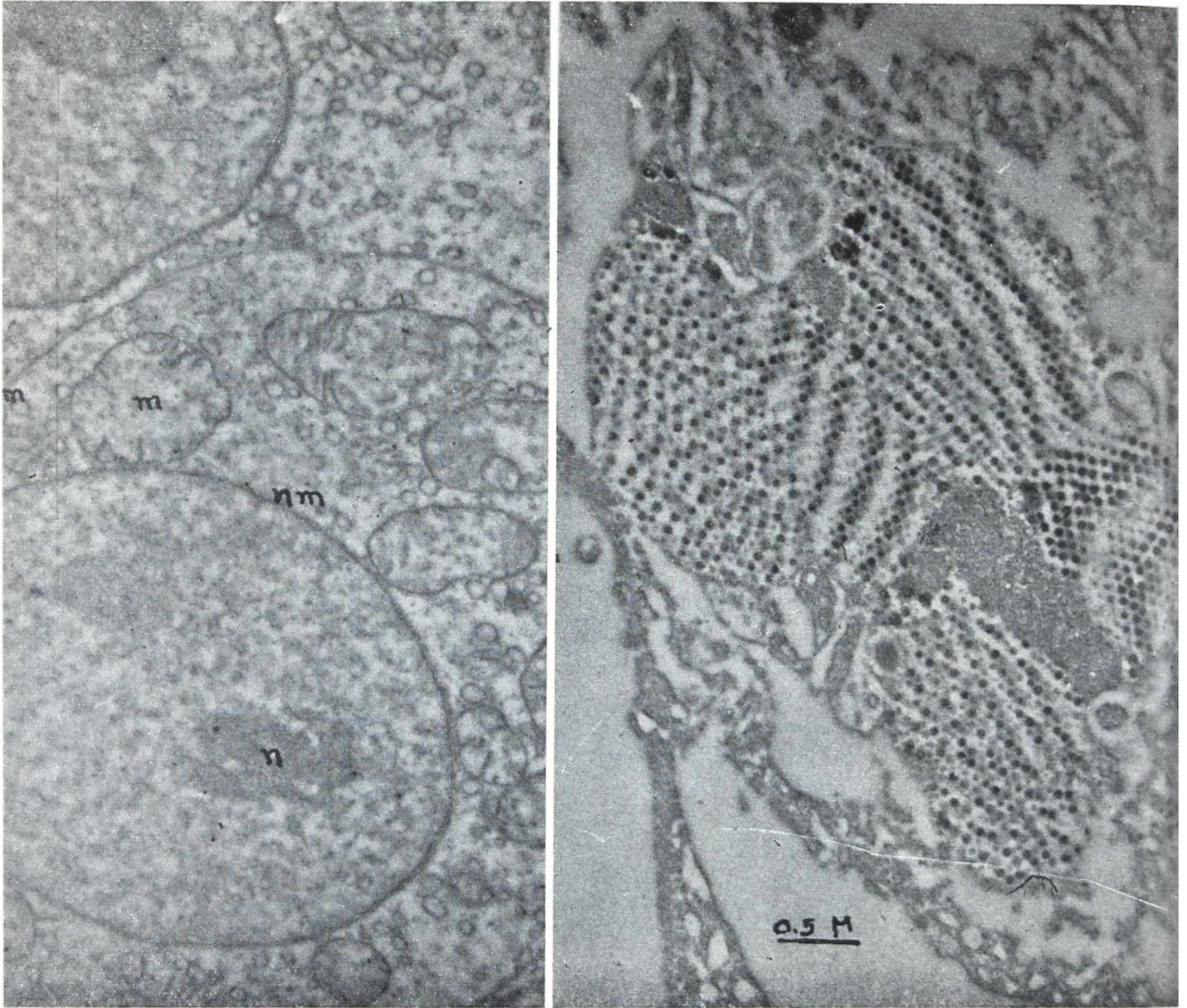
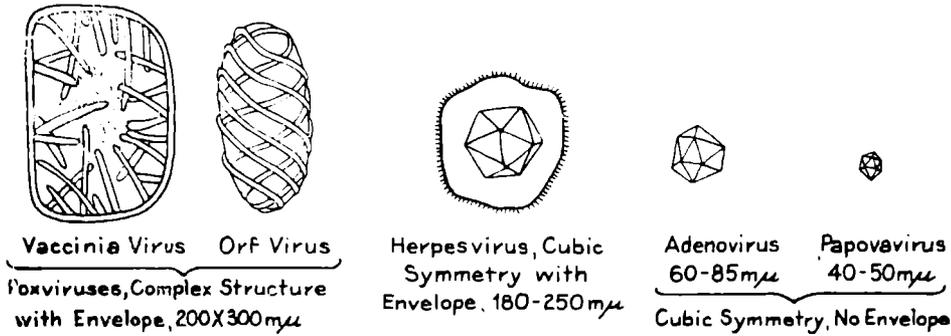


Fig. 3.—a) Parte de una capa de células de hígado de embrión de pollo no infectado amplificada 23.500 veces; *cm*: membrana de la célula; *nm*: membrana del núcleo; *Tí*: núcleo; *m*: mitocondria. b) Célula de hígado de embrión de pollo 48 horas después de producida la infección con virus gallus (GAL) del tipo adenoide, etapa final de la infección, amplificada 39.600 veces. El núcleo está ocupado con grupos de virus del tipo cristal con distintas orientaciones. La membrana nuclear se está desintegrando. Quedan solamente fragmentos del citoplasma. (Publicado por primera vez por el Dr. G. R. Sharpless, y utilizada con licencia).

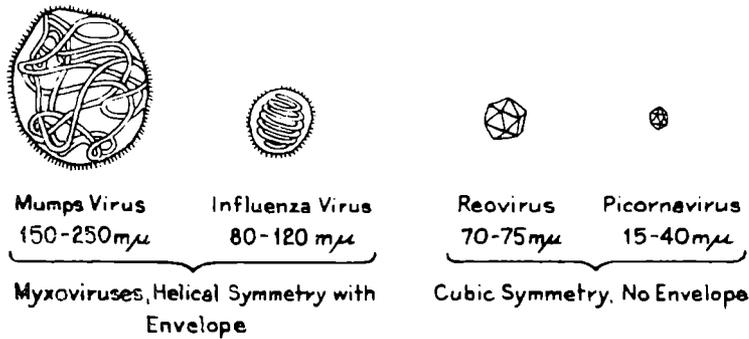
g

Fig. 4

### DNA Viruses



### RNA Viruses



### Relative Sizes of Viruses of Vertebrates, and Major Fine Structures

FIG. 4.—Tamaños relativos de virus de vertebrados, y estructuras finas principales (Modificada de un artículo del Dr. R. W. Horne y usada con licencia).

Fig. 5

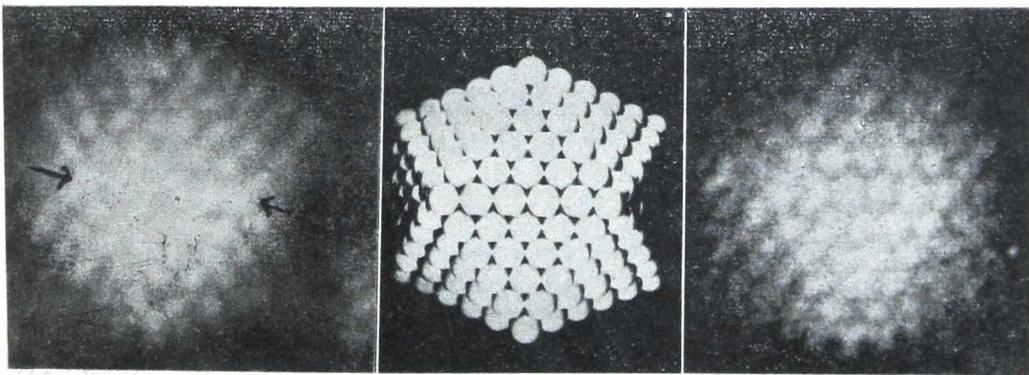


FIG. 5.—Centro: modelo de un solo adenovirus canino. A ambos lados: fotografías de partículas individuales preparadas por medio de una técnica de ácido fosfotúngstico y amplificado 1.100.000 veces. Las capsomeras están alineadas en caras con forma de triángulo equilátero, seis en cada arista. Las flechas indican 2 capsomeras en simetría (de 5 veces) que son los miembros terminales de una arista de 6 unidades. (Publicado por primera vez por M. C. Davies y usada con licencia).

Este primer descubrimiento despertó en los virólogos el deseo de mayor información, especialmente en lo que concierne a la estructura de la partícula virosa individual. Pero por el momento parece haberse llegado al límite del alcance del microscopio electrónico. Éste ha llegado a registrar en placas fotográficas la sombra de los virus, ampliados entre 10.000 y 30.000 veces. Sin embargo, con instrumentos más poderosos y técnicas más depuradas para seccionar, fijar y sombrear se han abierto nuevas perspectivas. Una mejor definición de los instrumentos y un seccionamiento ultra fino a través de las células hizo posible el estudio de la delicada estructura de la unidad biológica (Fig. 3 a). Incluso fue posible observar in situ, la reproducción de un virus y la destrucción de la célula. La figura N° 3 muestra un adenovirus que se ha multiplicado y ha ocupado casi completamente el núcleo de una célula infectada.

Por medio de la revelación de la fina estructura y configuración de muchos virus, el microscopio electrónico ha contribuido significativamente al ordenamiento taxonómico y racional de los virus, como se ilustra por medio de los diagramas de varias formas y tamaños de virus animales en la Fig. N° 4. La micrografía electrónica de un adenovirus verdadero muestra la fina estructura de una sola partícula del virus (Fig. N° 5). La partícula del virus es poliédrica, o más exactamente icosaédrica, y tiene 20 caras en forma de triángulo equilátero. Cada cara del triángulo está formada por 6 subunidades o capsomeras, haciendo un total de 252 capsomeras en toda la partícula. Este número de capsomeras es constante para todos los adenovirus, sin considerar las especies de cultivos de las cuales se derivan, pero es diferente para otros grupos de virus que tienen la misma configuración. Por ello, los poliovirus, que también son icosaedros, pero cuyo diámetro es de un tercio del de un adenovirus. tienen en total solamente 32 capsomeras.

Por lo tanto, se dice que los adenovirus y poliovirus, que no tienen capa ni envoltura, son “desnudos”. Por el contrario, los virus del herpes, que son también icosaedros, poseen una envoltura, al igual que los virus con estructura helicoidal, como los de las paperas (parotiditis) y la gripe.

Otra contribución importante de la microscopía fue la introducción de anticuerpos marcados con fluoresceína en el estudio de los virus<sup>2</sup>. Como todas las técnicas serológicas. el método se basa en la

Fig. 6

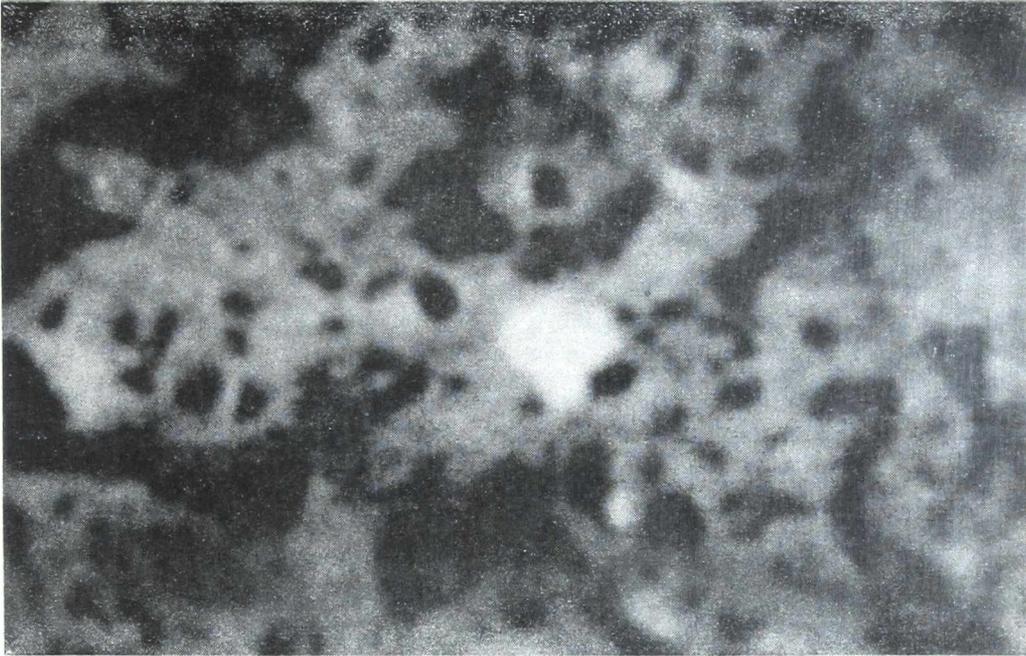


Fig. 6.—Fotomicrografía fluorescente de tejido de hígado de perro infectado con virus de hepatitis infecciosa canina. Completamente madurado, el cuerpo incluido rodeado de una membrana nuclear de fluorescencia muy brillante denota la presencia de un virus antígeno en ambas estructuras. (Publicado originalmente por el Dr. D. L. Coffin y col., y usado con licencia).

reacción íntima entre las sustancias antigénicas y sus correspondientes anticuerpos. Las moléculas anticuerpos están químicamente combinadas con fluoresceína antes de mezclarse con el virus. El complejo resultante, virus-anticuerpo, se hace visible con microscopio óptico, ya que el límite de la coloración fluorescénica se hace más viva por la luz ultravioleta. En la figura N° 6 se ve claramente la inclusión intranuclear oprimida del virus en la célula del hígado de un perro, infectada con virus de hepatitis canina \ La técnica de anticuerpos fluorescentes se aplica ampliamente tanto en investigación como en diagnóstico. Es más rápida que otros métodos serológicos sin sacrificar la especificidad del antígeno-anticuerpo, lo que constituye otra ventaja sobre los demás procedimientos microscópicos.

### **Contribución de los Estudios Bioquímicos**

Los progresos efectuados en el campo de la bioquímica virósica también han sido de importancia. Se descubrió la existencia de virus formados por una capa exterior de subunidades que consisten en su totalidad de proteínas, alrededor de un centro ya sea de ácido ribonucleico o desoxiribonucleico. En ningún caso un solo virus contenía ambos ácidos nucleicos. Se descubrió también que los ácidos nucleicos libres de los virus vegetales, bacterianos, o animales, eran capaces de inducir tanto la infección de una célula como la reproducción de virus completos, aclarando que la capa de proteína no juega ningún papel en este proceso. Sin embargo, no existe casi duda de que esta capa facilita la adhesión de la partícula intacta del virus a la célula del huésped, y favorece una distribución más económica del ácido nucleico vital en las infecciones naturales. Es más. los estudios inmunológicos han demostrado que los anticuerpos provocados por infección están destinados solamente a actuar contra las proteínas de la capa exterior, ya que no pueden neutralizar la infectividad del ácido nucleico del mismo virus. Con el descubrimiento del carácter infeccioso de los ácidos nucleicos, y de los pasos básicos de la síntesis viral dentro de la célula, la virología ha penetrado en el nivel molecular de la relación huésped-virus.

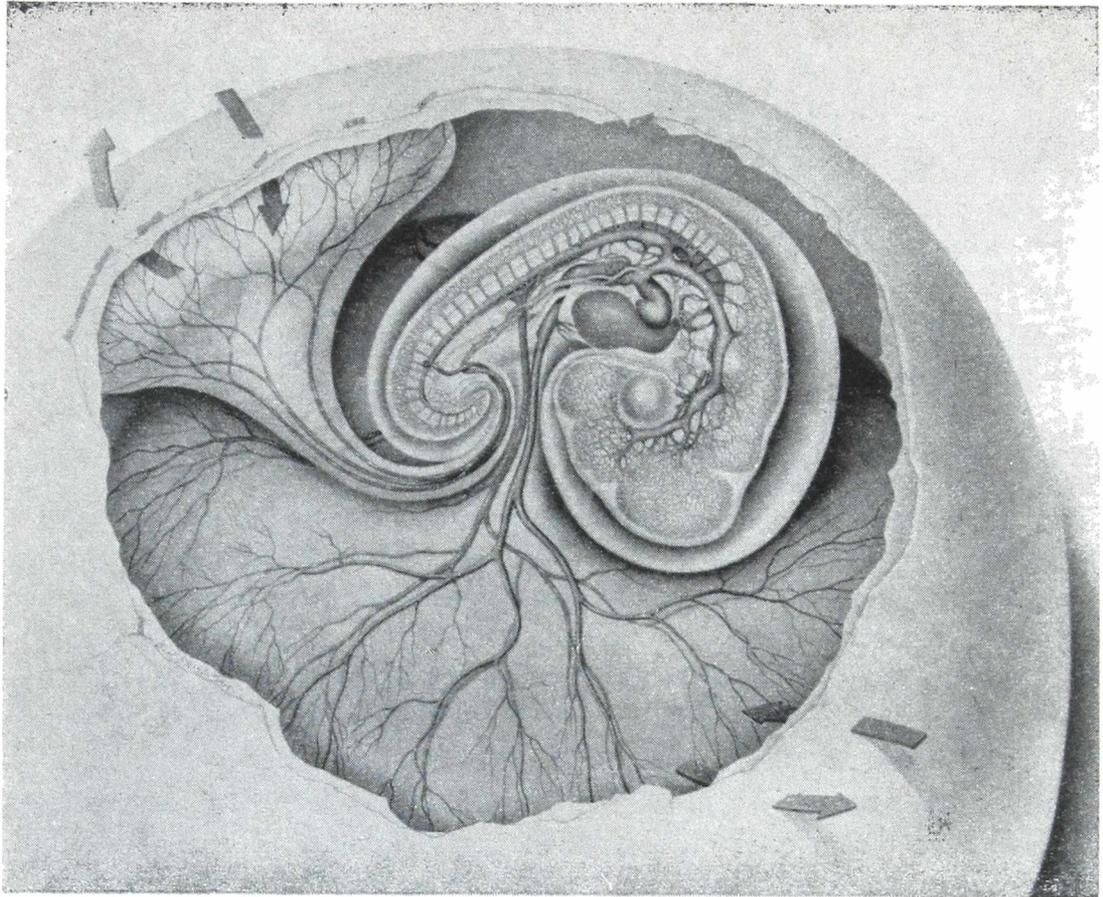
## CULTIVO DE VIRUS

El estudio de un microorganismo o la preparación de la vacuna contra esíe depende de un método conveniente de propagación del agente en cuestión en el laboratorio. Durante muchas décadas, algunos virus solamente podían propagarse en sus huéspedes originales. Por ejemplo, aprovechando la similitud entre los virus de la viruela y la “vacuna”, enfermedad leve del ganado se desarrolló una vacuna efectiva para proteger al hombre contra la temida viruela. El virus de la “vacuna” se podía obtener en cantidades ilimitadas infectando terneros jóvenes en el laboratorio, lo que hacía innecesario la preparación de una vacuna para los virus más malignos de la viruela. En lo que respecta a enfermedades virosas de animales domésticos, el cólera porcino se estudió mediante la infección artificial de cerdos susceptibles. Cuando se descubrió que sus visceras y sangre estaban muy cargadas de virus, se hizo posible el desarrollo de una vacuna contra el cólera porcino. En forma similar, el progreso efectuado en el estudio de la fiebre aftosa dependió de la inoculación experimental del ganado, y en esta forma se desarrolló una vacuna bastante efectiva.

Aunque la propagación de los virus en sus huéspedes naturales ora útil, el campo de acción era limitado y evidentemente este método no podía aplicarse a los virus que provocan enfermedades humanas. Debían encontrarse cultivos de laboratorio convenientes para la propagación de estos últimos, lo que se logró para una cantidad de ellos. Como ejemplos podemos citar el virus de la gripe, que se propagó en ratones o en hurones, y el virus de la poliomielitis, que causa parálisis en ciertas especies de monos y en los ratones. La técnica del “huésped animal no natural” resolvió una cantidad de importantes problemas inmunológicos; un ejemplo clásico es el de la vacuna para proteger al hombre y a los animales domésticos contra

Fig. 7

a



b

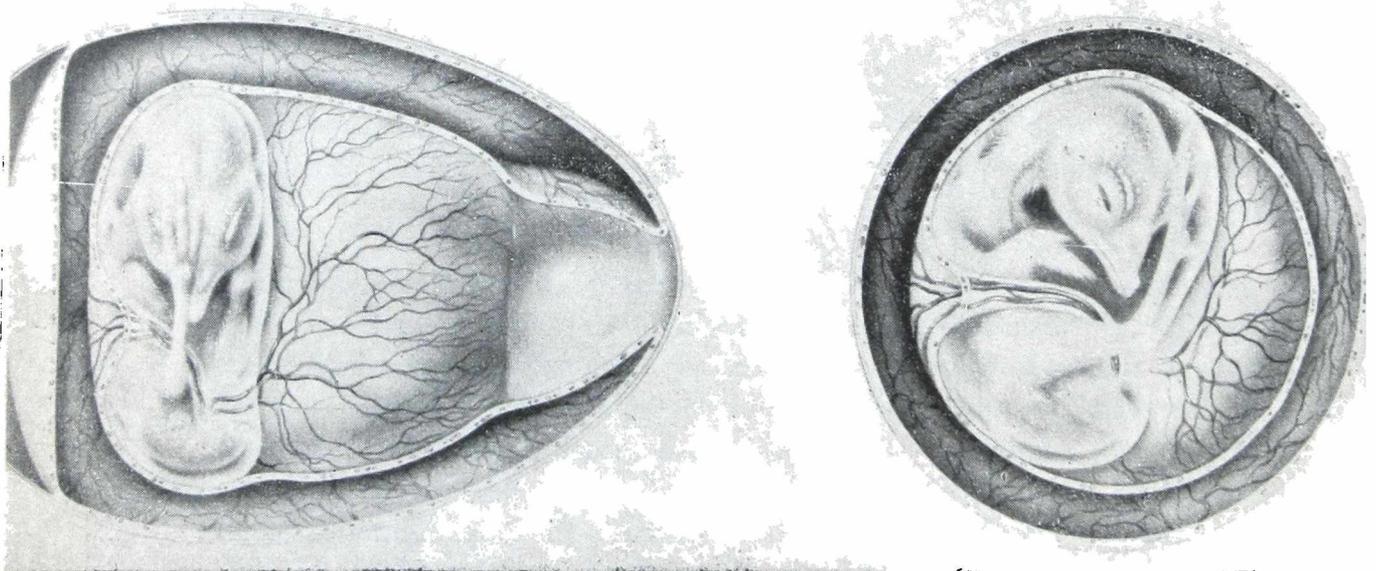


Fig. 7.—a) Diagrama de embrión de pollo en el 3'-' a 5" días do desarrollo. Nótese vi sistema vascular hasta y desde la cavidad de la yema y la membrana alantoidea. Ei embrión está encerrado en el seco amniótico. Las flechas indican el pasaje de O... y CO., a través de los poros de la cáscara del huevo, b) Diagrama de un embrión de pollo de 13 a 15 días de edad en corte longitudinal del huevo. Nótese la membrana corioalantoide que rodea la pared interior de la cáscara del huevo casi totalmente y forma la cavidad alantoidea. c) Diagrama de un embrión de pollo de 13 a 15 días de edad, en corte transversal del huevo.

leí rabia. Esta vacuna se preparó con los tejidos de conejos u otros animales en cuyo cerebro se habían inyectado los virus <sup>5- 6</sup>. Aunque la teoría de usar animales como huéspedes de laboratorio fue de gran utilidad, no se aplicó al estudio de todos los virus. Muchos de los virus conocidos, y otros todavía no descubiertos, tuvieron que esperar el advenimiento de dos cultivos adaptables, el embrión de pollo y los tejidos.

### **El embrión de pollo en Virología**

Al embrión de pollo se le conoce como “tubo de cultivo de tejido natural”. Para comprender mejor por qué su empleo es tan ventajoso en virología, será conveniente repasar las etapas de su desarrollo inicial y algunos de sus procesos fisiológicos. Como toda vida embrionaria. el embrión de pollo exige cuatro requisitos principales: 1) Protección de los peligros exteriores, 2) nutrición, 3) respiración, y 4) eliminación de los residuos metabólicos.

La resistente capa externa, que a su vez está rodeada de una membrana más suave, conocida por todo el que ha descascarado un huevo duro, proporciona la primera protección contra los peligros exteriores. Esta membrana evita que se rompa completamente la capa resistente en caso de rajarse. La membrana amniótica, o bolsa, que rodea al embrión y está llena de fluido amniótico acuoso, constituye otra protección. Actúa como amortiguador de golpes. La membrana amniótica se forma durante los primeros días del desarrollo del embrión. y junto con el corión, o serosa, originan la capa superior del mesodermo (Fig. N<sup>o</sup> 7 a).

La yema del huevo proporciona la nutrición. En los primeros tiempos del desarrollo del embrión, una membrana rica en vasos sanguíneos rodea la yema, constituyendo en esta forma la bolsa de yema que transporta los elementos nutritivos contenidos en la yema hasta el embrión (Figs. 7 a y 7 b). La estructura y función de la bolsa de yema son similares a las de la mucosa intestinal.

El embrión en gestación, que está sumergido en fluido, evidentemente no puede utilizar sus pulmones en formación. La respiración se logra con la ayuda de un órgano externo transitorio, la membrana corioalantoides. En el tercer día de incubación aparece una “burbuja” alargada, la alantóide, desde el interior del cuerpo del embrión, ori-

ginada en la pared ventral del intestino posterior (Fig. 7 a). Sigue creciendo rápidamente, envuelve el espacio disponible e inmediatamente recubre la pared interior de la cáscara en su totalidad, y se fusiona con el corión ya formado (Figs. 7 b y 7 c). Esta membrana está altamente vascularizada, y las células de sangre que circulan en ella liberan  $\text{CO}_2$  a través de los poros de la cáscara del huevo, se cargan de  $\text{O}^*$  y vuelven al embrión (Figs. 7 a, 7 b y 7 c). Es por ello que si los poros de la cáscara del huevo se obstruyen, el embrión se asfixia inmediatamente.

La eliminación se produce también por medio de la membrana corioalantoide. Mientras el intercambio de gases tiene lugar a través de su superficie exterior, los residuos transportados por la sangre se eliminan a través de su superficie interna dentro de la cavidad que la rodea (Figs. 7 b y 7 c). En un principio la cavidad alantóidea está ocupada por solución fisiológica simple, que progresivamente se va cargando de residuos a medida que el embrión progresa.

### **Revisión Histórica**

El primer intento de cultivar virus en huevos de gallina fue realizado por Copeman en la década de 1880 <sup>7</sup>.

Logró infectar terneros con una suspensión del contenido de huevos a los que había inoculado virus de “vacuna” y que habían sido incubados a  $37^\circ\text{C}$  durante un mes. Como los huevos no contenían embriones, no era probable que los virus se multiplicaran en ellos. En cambio, es probable que algunos de los inóculos permanecieran con vida.

En 1911, Rous y Murphy <sup>8</sup>. por primera vez utilizaron realmente el embrión de pollo para el estudio del problema de los virus. Después de incubar embriones de 7 a 8 días de desarrollo, inoculados con suspensiones de tejidos y líquidos filtrados de células de sarcoma de pollo N<sup>o</sup> 1 (sarcoma de Rous), encontraron tumores en los tejidos lesionados por la inyección, particularmente en la membrana corioalantoide. Sin embargo, como este virus de tumor se encuentra naturalmente en los pollos, se podría esperar que también esto ocurriera en los embriones, lo que igualmente se aplica al virus de la peste aviaria, que Jouan y Staub intentaron propagar en 1920 <sup>9</sup>.

Aunque Gay y Thompson cultivaron virus de “vacuna” en los embriones de pollo en 1929 <sup>10</sup>, la total realización de la potencialidad del huevo en la investigación virológica se debe a Goodpasture y sus colaboradores. En 1911. Woodruff y Goodpasture <sup>11</sup> inocularon virus de viruela aviar en la membrana corioalantoide y obtuvieron lesiones bien definidas con las características de las que acompañan a la enfermedad natural. El año siguiente Goodpasture. Woodruff y Buddinger informaron acerca del éxito de los cultivos de virus de “vacuna” y de herpes simples en embriones de pollo <sup>12</sup>.

Luego sucedieron numerosos estudios que generalizaron la aplicación del embrión de pollo en la investigación virológica, mejorando las técnicas de los pioneros. En 1933. Burnet<sup>13</sup> describió una modificación a la técnica de Goodpasture para la inoculación corioalantoidea. Como se ilustra en la Fig. 8. esta técnica aumenta el área disponible para la infección virosa, desplazando la bolsa de aire natural del huevo con una bolsa artificial colocada por encima de la corioalantoide. Pronto se desarrollaron otras técnicas para la inoculación en otros lugares. En 1937. Gallavan y Goodpasture inocularon en la cavidad amniótica <sup>14</sup>. y Cox en 1938 obtuvo un cultivo abundante de agentes de rickettsiosis en la bolsa de yema <sup>15</sup>. Más adelante se hicieron inoculaciones satisfactorias por las vías intravenosa, intracerebral, cavidad alantoidea y otras.

### **Técnicas de inoculación**

El embrión de un pollo de 6 ó 7 días de edad está lo suficientemente desarrollado como para que sirva para la multiplicación del virus. El tipo de célula con quien un determinado agente viroso tiene afinidad puede seleccionarse de entre una variedad de tejidos y membranas rápidamente cultivadas, cualquiera de las que puede alcanzarse con técnicas microquirúrgicas especiales. Estas técnicas, desarrolladas a través de los años gracias al ánimo y genio de muchos investigadores —gran parte en la industria farmacéutica—, se explican mejor con los dibujos de la figura 8 que con palabras.

Las contaminaciones bacterianas en las preparaciones virosas constituyeron una de las primeras dificultades. Cuando dichas preparaciones contaminadas se inoculan en el embrión, la bacteria, que prolifera rápidamente, mata al embrión antes que el virus pueda multiplicarse. Antibióticos como la penicilina y la estreptomycinina.

Fig. 8

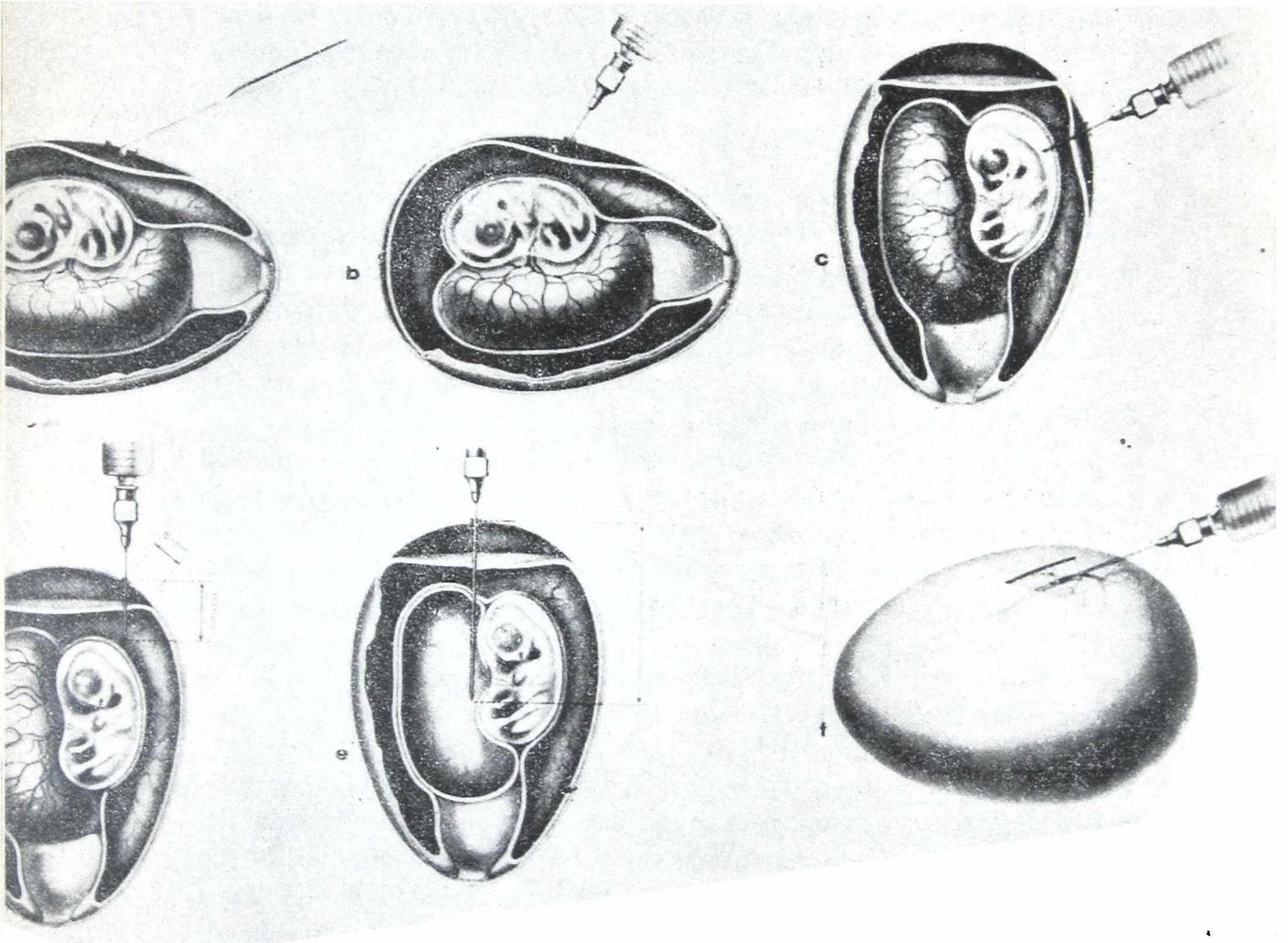


Fig. 8.—Técnicas de inoculación en el embrión de pollo, a) Inoculación en la membrana corioalantoide luego del desplazamiento del saco de aire natural, llevada a cabo mediante una pipeta capilar a través de una abertura triangular de 1/2 pulgada (1.27 cm.). b) Método alternativo de inoculación en la membrana corioalantoide, llevada a cabo por medio de una aguja hipodérmica y jeringa a través de una perforación de 1/16 de pulgada (0,15 cm.). c) Inoculación en el saco amniótico. d) Inoculación en la cavidad alantoidea. e) Inoculación en la cavidad de la yema.

f) Inoculación intravenosa.

mezclados con el virus antes de la inoculación, han resuelto el problema en su mayor parte. El antibiótico inhibe a la mayoría de las bacterias sin afectar al virus, que se propaga libremente en el tejido embrionario.

Varios factores, además de la edad del embrión y la vía adecuada de inoculación, influyen en el cultivo de virus en los embriones de pollo. Las condiciones óptimas para propagar un determinado agente vírico exigen un cuidadoso estudio de la concentración del virus a inyectar, así como de la temperatura y período de incubación.

### **Contribuciones del Embrión de Pollo a la Investigación Viológica y a la Profilaxis**

Después del trabajo de los pioneros, los investigadores en virología reconocieron rápidamente el gran potencial del embrión de pollo: éste constituía una herramienta simple que evidentemente poseía ventajas sobre otros animales de laboratorio. En primer lugar, el embrión está bien protegido del mundo exterior. Cuando procede de un grupo controlado, se puede asegurar la ausencia de virus latentes, que tan a menudo complican las investigaciones cuando se usan ratones u otros mamíferos. En segundo lugar, la introducción de virus extraños es en el embrión de pollo un problema técnico mucho más simple que en cualquier animal que viva en forma independiente: la infección experimental del embrión de pollo se puede comparar al cultivo de bacterias en tubos de ensayo. La tercera ventaja consiste en que el embrión de pollo no requiere alimentación ni cuidado de jaula.

Otra de las desventajas del estudio de virus en animales que viven en forma independiente es la posibilidad de que una infección anterior no descubierta dé origen a anticuerpos de virus relacionados con los que están bajo estudio, o de que se formen tejidos en los animales infectados experimentalmente en el momento en que se producen anticuerpos homólogos. El embrión de pollo está prácticamente libre de tales complicaciones, ya que es improbable que posea anticuerpos contra virus extraños a su especie. Desde el momento en que el embrión debe tener 18 días para que pueda producir anticuerpos contra la infección experimental, no existe el riesgo de la formación de una mezcla de virus y anticuerpos homólogos a los 9 ó 10 días.

Fig. 9

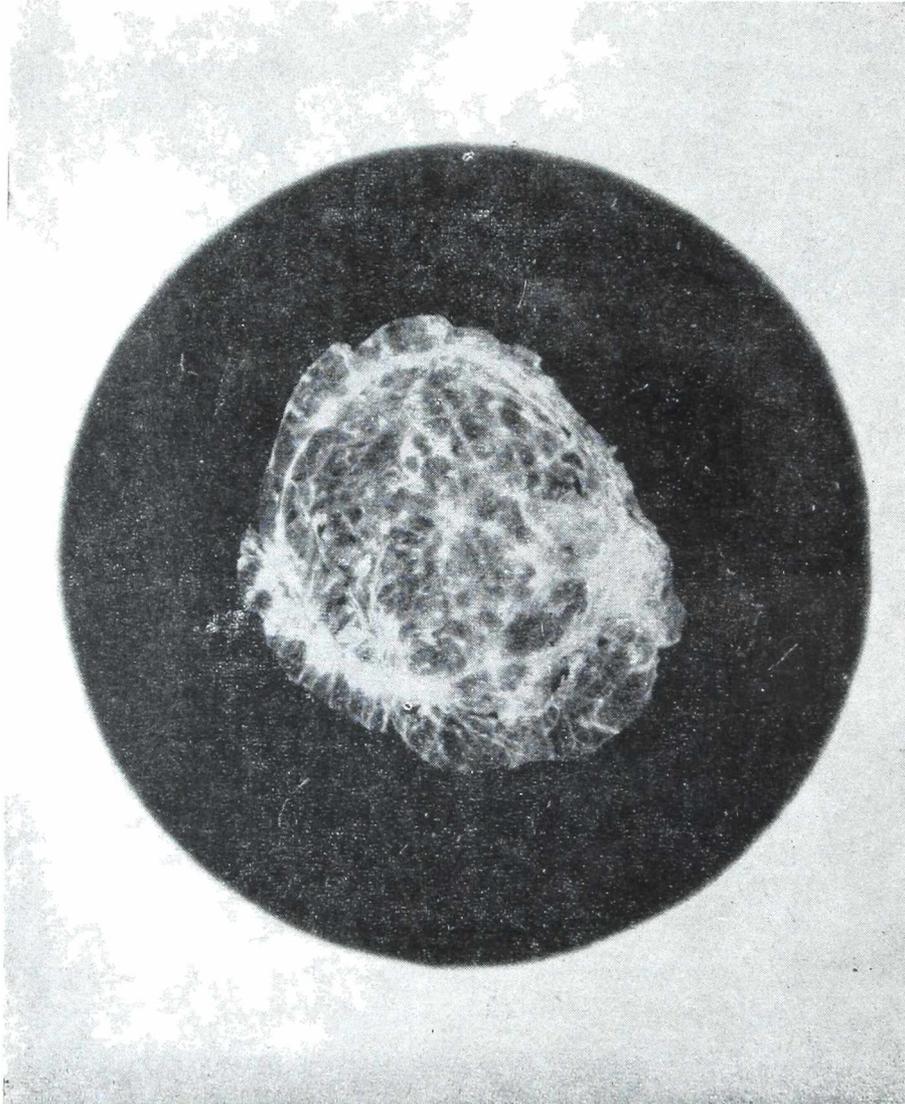


FIG. 9.—Lesiones necróticas e inflamatorias formadas en la membrana corioalantoidea por virus distemper canino adaptado al embrión de pollo.

Muchos agentes virosos se han adaptado para su crecimiento en el embrión de pollo. Entre ellos se incluyen virus del hombre, caballos, ovejas, perros, conejos, pollos y otras especies animales. Muchos virus que en un principio se consideraban inadaptables, actualmente se cultivan rápidamente en los embriones de pollo. Algunos corresponden al dengue, rabia, moquillo 3<sup>^</sup> poliovirus tipo 2.

Mediante la utilización de embriones de pollo, en gran escala, la industria farmacéutica ha podido preparar vacunas que han ayudado mucho a la humanidad en su lucha con las enfermedades causadas por virus.

El animal que ha sido inoculado experimentalmente debe presentar algún cambio inequívoco por el que se pueda reconocer la infección para que este método sea valioso para el investigador. La mayoría de los virus dejan marcas indelebles a medida que crecen en el embrión de pollo, y algunos, como los de la enfermedad de Newcastle y bronquitis infecciosa de los pollos, encefalomielitis equina y "lengua azul" de los ovinos, matan el embrión después de un período determinado de incubación. Los embriones muertos a menudo presentan signos característicos, por ej. el embrión atrofiado y enroscado muerto debido a la bronquitis infecciosa, o el embrión de un color rojo cereza fatalmente infectado con el virus de "lengua azul". Otros virus, al ser inoculados en la membrana corioalantoide, provocan la formación de lesiones focales bien definidas, características de una infección particular, como por ej. las lesiones del moquillo canino que se pueden ver en la Fig. N° 9. El crecimiento de aquellos virus que no matan al embrión ni dejan huellas perceptibles de infección, generalmente pueden detectarse con una adecuada técnica serológica u otras técnicas biológicas.

El cultivo de virus en el embrión de pollo tiene muchas aplicaciones prácticas en diagnósticos y medicina preventiva. Provee los medios para el aislamiento directo e identificación de algunos agentes etiológicos, para diagnósticos diferenciales: por ej.. para distinguir la viruela común de la viruela aviar. Además, el crecimiento abundante de ciertos virus en el embrión de pollo hace posible la preparación de antígenos ricos en virus, relativamente puros, utilizados en la hemoaglutinación, fijación de complemento y otras pruebas serológicas para el diagnóstico de laboratorio de infecciones virósicas.

En medicina preventiva, el embrión de pollo no solamente proporciona gran cantidad de virus para vacuna, sino que a veces modifica las propiedades de los agentes biológicos. De esta manera, los pasajes en embriones de pollo han modificado a ciertos virus de tal manera, que no sólo no producen más enfermedad en sus huéspedes naturales, sino que retienen su poder de inmunización. Estas cepas modificadas en el laboratorio, junto con otros virus ya benignos, constituyen las vacunas a virus vivo utilizadas para proteger al hombre y a los animales (Tabla 1).

Los embriones de pollo infectados también se usan para las vacunas a virus muerto, en los casos en que los virus no estén lo suficientemente modificados como para proporcionar una vacuna a virus vivo aceptable, o en aquellos en que la administración en forma viva no ofrece ventajas. En la tabla 2 se encuentra la enumeración de los mismos.

Es inapreciable la constante contribución del embrión de pollo para la investigación virológica y en la profilaxis. Si se construyeran monumentos en reconocimiento de los innumerables servicios prestados a la medicina preventiva, el embrión de pollo se haría merecedor de uno de ellos.

### **Cultivo de Tejidos**

Una valiosa arma en manos del virólogo es el cultivo de tejidos, (como su nombre lo indica, es el cultivo de fragmentos de tejido, normal o canceroso, ya sea de origen humano o animal, en algún medio adecuado. La idea se puso en práctica a mediados de siglo, pero anteriormente se enfatizó el guardar tejidos o la totalidad de los órganos disponibles en fluidos de nutrición durante períodos prolongados. Algunos tejidos crecieron lentamente y se intentó el cultivo de virus en ellos con cierto grado de éxito. Sin embargo, el virólogo no pudo encontrar pruebas directas de la multiplicación de los virus y tuvo que inocular a animales de laboratorio para demostrar la existencia de la infección.

Las contaminaciones bacterianas constituían un obstáculo, pero, como en el embrión de pollo, los antibióticos controlaron efectivamente a los contaminadores sin afectar los virus en el cultivo de tejidos. El comienzo de la década del 50 marcó el principio de grande\*

TABLA I

VACUNAS A VIRUS VIVO PREPARADAS EN EMBRIONES DE POLLO

<i>Enfermedad</i>	<i>Huésped natural</i>	<i>Origen del Virus Aislado</i>	<i>Fuente de la Vac.</i>	<i>Uso de la vac. de Rutina Expertini.</i>
		<i>Laboratorio</i>	<i>Natural</i>	
Fiebre amarilla		X		X
Viruela			X	X
Fiebre garrapata colorado		X		X
Dengue	Hombre	X		X
Rabia		X		X
Poliomielitis		X		X
Gripe		X		X
Paperas		X		X
Viruela aviar				
Laringotraqueitis			X	X
Enferm. de Newcastle	Pollos	X		X
Bronquitis infecciosa			X	X
Enferm. de Newcastle			X	X
Viruela (pigeón)	Paloma		X	X
Lengua azul	Oveja	X		X
Distemper canino	Perro, visón, bovinos	X		X
Rabia	Perro, etc.	X		X
Morriña	Bovinos	X		X

TABLA 2

VACUNAS A VIRUS MUERTOS Y DE RICKETTSIAS PREPARADAS EN  
EMBRIONES DE POLLO EN FORMA RUTINARIA

<i>Enfermedad</i>	<i>Huésped natural</i>	<i>Fuente de la Vacuna</i>
Gripe	Hombre	Fluido Alantoideo
Paperas		
Encefalitis:		
Equina oriental		
Equina occidental	Hombre, caballo	Todos los tejidos embrionarios
Japonesa B		
Tifus		
Fiebre punticular	Hombre	Cavidad de la yema
Fiebre Q de las montañas rocosas		

progresos <sup>18</sup> <sup>17</sup>. El constante avance en los medios aceleró la multiplicación de las células y se hizo posible detectar la presencia de muchos virus que se propagan, mediante la observación directa de su efecto destructivo sobre los tejidos. El método de cultivo de tejidos fue adoptado inmediatamente por laboratorios dedicados a la investigación de virus en todo el mundo. Se han introducido muchos perfeccionamientos. y el aporte del cultivo de tejidos al campo de la virología es inapreciable, revelándose un mundo totalmente desconocido.

En la figura N<sup>o</sup> 10 se presenta un ejemplo de cultivo de una sola capa de tejido de riñón. Éste es un tejido de perro, pero morfológicamente no se puede distinguir si es tejido de riñón de un ser humano, de un mono o de un conejo. En la figura N<sup>o</sup> 11 se ilustra el mismo cultivo entre dos y cuatro días después de ser inoculado con virus. En este caso el virus era de una hepatitis infecciosa canina: todos los adenovirus y muchos otros se pueden detectar por medio de una acción citopática similar.

Los virus difieren en los efectos que causan sobre las células, pero la muestra citopatológica de una familia de virus determinada es característica. Por ej. el virus de la hepatitis canina infecciosa (Fig. 11) difiere del efecto del virus del sarampión sobre las células sustentaculares (Fig. 12). La infección del virus del sarampión aparece una destrucción relativamente pequeña de las células. En cambio, las células tienden a fusionarse en células gigantes o de sincicio, consideradas como específicas de la familia de los mixovirus. que incluyen los de la gripe, papera y distemper canino, entre otros.

La observación de los efectos citopáticos de los virus permite una infinita variedad de experimentación cuantitativa. Las preparaciones de virus se pueden titular fácilmente y se pueden obtener valores absolutos de un anticuerpo de suero de un virus. Además, los virus se pueden identificar por medio de procedimientos que no requieren animales vivos. Por ejemplo, antes del advenimiento del cultivo de tejidos, los experimentos con los virus de hepatitis infecciosa canina sólo se podían llevar a cabo en cachorros susceptibles. Esto constituía un trabajo arduo y lento, y a menudo improductivo debido a la facilidad con que los animales pueden contraer infecciones naturales. Un procedimiento tan sencillo como el análisis volumétrico de los virus presentaba a veces problemas insuperables, ya que requería animales

Fig. 10

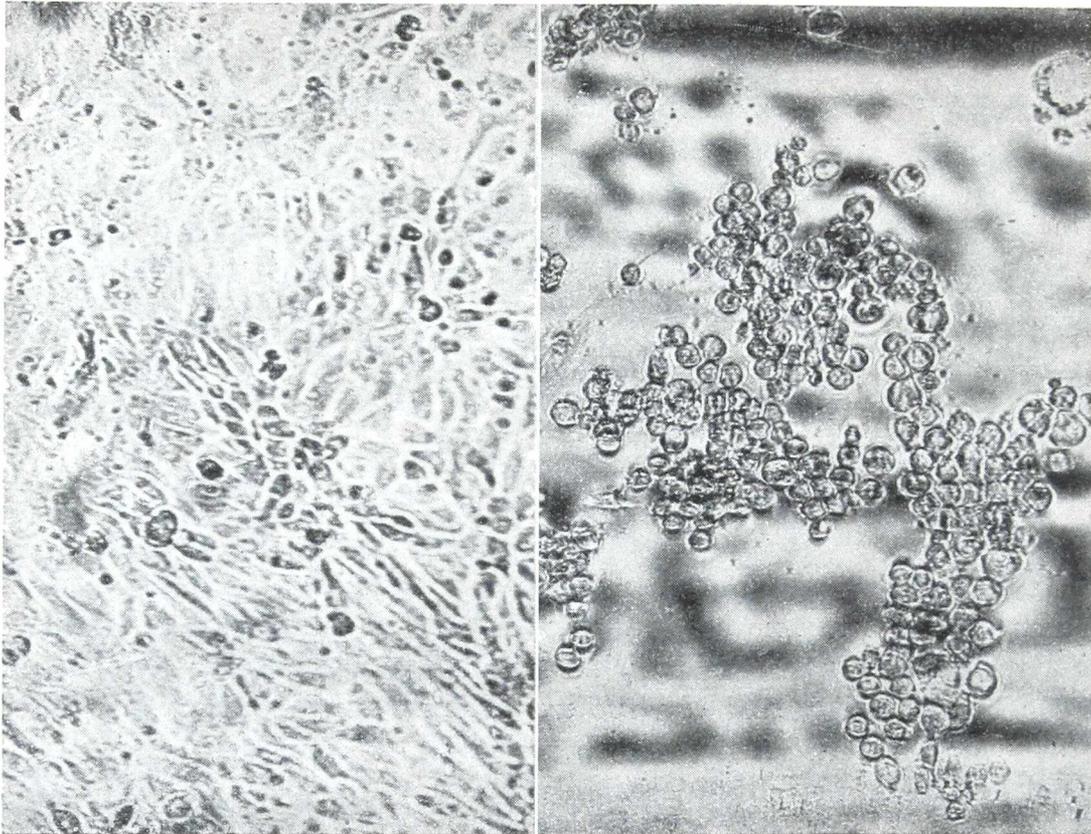


FIG. 10.—Células epiteliales de riñón de perro normal en cultivo de tejidos (sin colorear).

FIG. 11.—Efecto citopático del adenovirus canino en cultivo de tejidos de riñón de perro (sin colorear)

Fig. 12

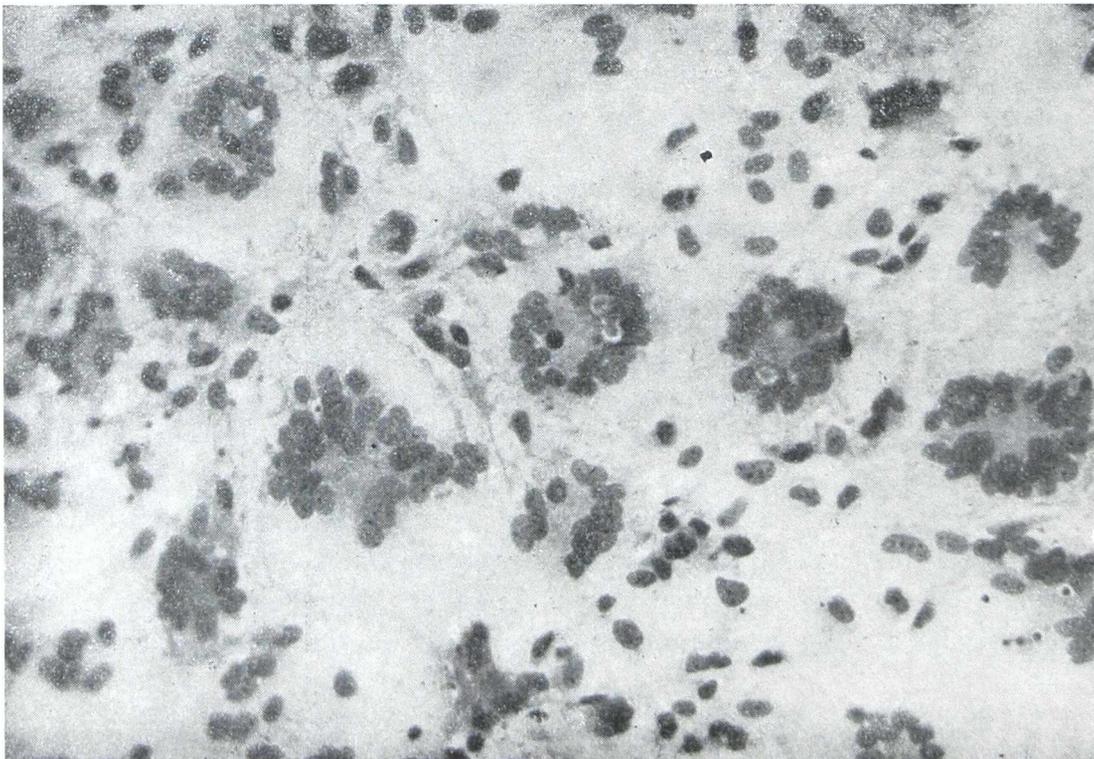


FIG. 12.—Acción del virus de sarampión en un cultivo de una línea de células establecidas derivadas de tejido de riñón de mono cercopithecus (coloración: hematoxilina y cosina).

susceptibles en una cantidad adecuada y el mantenimiento de los mismos en aislamiento estricto. Además, no se disponía de ningún método práctico exacto para determinar los anticuerpos del suero.

El cultivo de tejidos ha proporcionado medios para llevar a cabo el procedimiento de obtención de placas, especialmente valioso en el campo de la genética virosa. Con esta técnica, los investigadores pueden separar las partículas del virus y estudiar la progenie de una sola partícula. Se puede formar una placa con ciertos virus esparciendo una suspensión diluida del virus sobre una capa de células apropiadas en una placa de Petri y luego inmovilizando la capa infectada con una delgada capa de fluido nutritivo que contenga agar. Los virus individuales permanecen separados a medida que se multiplican. Una vez que el virus tiene progenie suficiente como para destruir a cientos de células contiguas, aparece un pequeño orificio circular que parece haberse abierto en la capa en el punto del primer contacto. Este orificio se puede hacer resaltar más por medio de coloración vital (Fig. 13). La técnica de las placas es de gran utilidad para obtener el número exacto de partículas de virus viables que se requieren en experimentos altamente cuantitativos y también permite la separación de colonias de virus a virulentos, de una población mixta de virus, procedimiento que se utilizó en el desarrollo de vacunas orales contra la poliomielitis.

De todos los aportes que ha hecho el método de cultivo de tejidos, el más importante es el descubrimiento, tanto en el hombre como en los animales, de varios grupos de virus cuya existencia ni siquiera se había sospechado. El virólogo se encontró en la situación embarazosa de saber que existía un virus sin conocer la enfermedad que éste causaba, situación inversa a la anterior en que aquél buscaba los virus que ocasionaban enfermedades bien conocidas.

Finalmente, el cultivo de tejidos hace posible que la industria farmacéutica cultive gran cantidad de virus, la que ya ha dado como resultado el desarrollo y la producción en gran escala de varias vacunas; algunas de ellas son completamente nuevas, otras son resultado del perfeccionamiento de vacunas anteriores efectuadas con otros métodos. Las vacunas de cultivo de tejidos, que actualmente se utilizan como rutina, se encuentran enumeradas en la tabla N° 3. Éstas se preparan con virus vivos atenuados o con cepas de virulencia atenuada. Debido a que la infección natural, ya sea por adeno-

Fig. 13

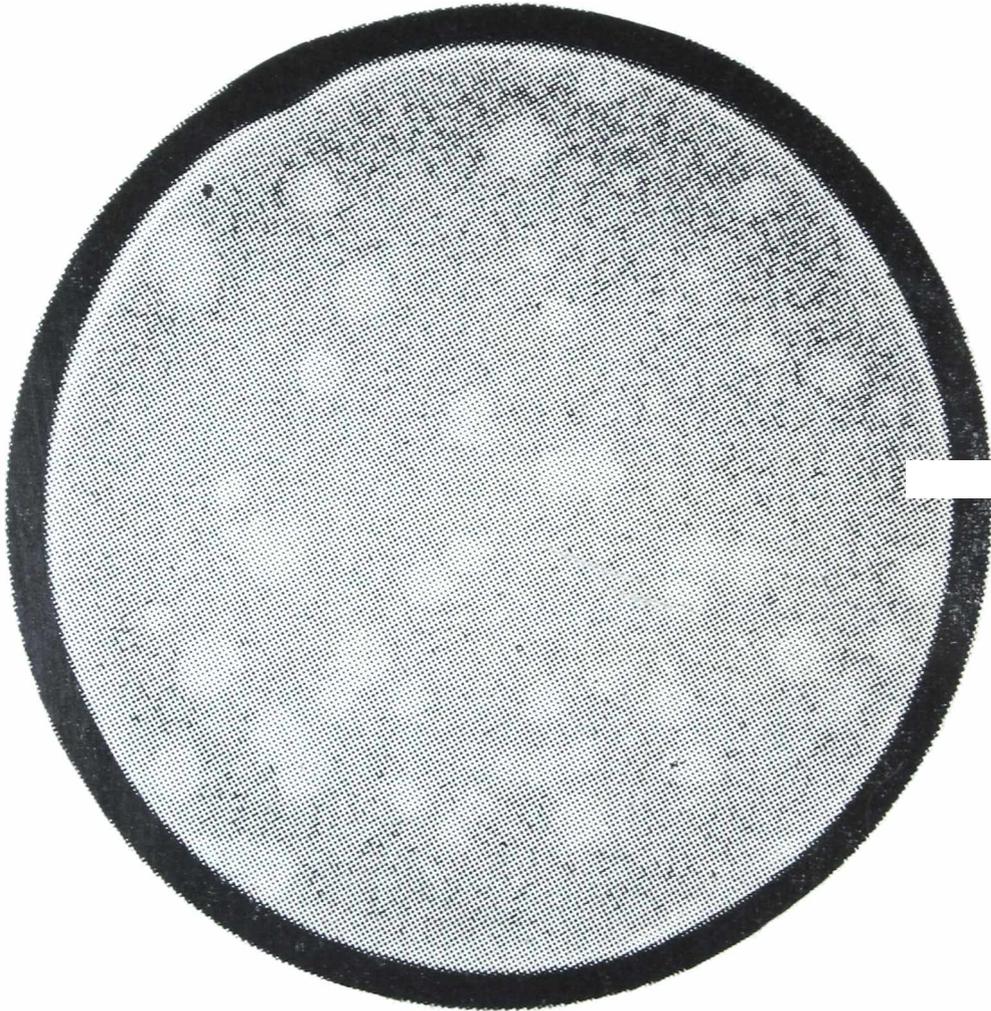


FIG. 13.—Formación de placas con adenovirus canino.

TABLA 3

VACUNAS A BASE DE VIRUS PREPARADAS EN CULTIVOS DE TEJIDOS EN RUTINA

<i>Enfermedad</i>	<i>Huéspes natural</i>	<i>Tipo de vacuna</i>	<i>Tejido fuente de la vacuna</i>
Infeción adenovirus		atenuado	riñón de mono
Sarampión	hombre	vivo atenuado atenuado	embrión de pollo embrión de pollo riñón de mono
Poliovirus		atenuado vivo	riñón de mono riñón de mono
Distemper canino			embrión de pollo riñón de perro
Hepatitis infecciosa canina	perro	vivo	tejidos de cerdos
Rinotraqueitis infecciosa bovina	bovinos	vivo	tejidos de bovinos
Cólera porcino	cerdos	vivo	tejidos de cerdos

virus o por poliovirus, implica un sinnúmero de serotipos, las vacunas contra estas enfermedades son polivalentes. Por el contrario, las vacunas para el sarampión, ya sean a virus vivo o atenuado, son monovalentes. Aunque las vacunas contra el distemper canino y la hepatitis infecciosa canina se utilizan en forma rutinaria, la compatibilidad de estos dos virus ha hecho posible combinarlas para la obtención de una vacuna bivalente altamente efectiva. Las vacunas contra la rinotraqueítis infecciosa bovina y el cólera porcino no necesitan ser polivalentes porque se conoce un solo serotipo de cada uno de estos virus que provoca la enfermedad respectiva.

Existen otras vacunas de cultivo de tejidos que se encuentran en distintas etapas de su desarrollo, entre ellas el sarampión alemán, paperas, enfermedad de las vías respiratorias y viruela en lo que respecta al hombre, rabia en el hombre y otros mamíferos, y diarrea virosa para vacunos y porcinos.

### **Conclusiones**

La Virología ha recorrido un largo camino desde la época de su modesta iniciación. Después de muchos años de aproximaciones empíricas, el estudio de los virus ha evolucionado hasta convertirse en una investigación altamente racional y cuantitativa como resultado de un franco progreso en instrumentos y técnicas.

Gran parte de este progreso se debe a la introducción del microscopio electrónico, los embriones de pollos y el cultivo de tejidos en laboratorios de virus. El microscopio electrónico ha contribuido en forma inapreciable para obtener una clasificación taxonómica válida de los virus, ya sean éstos de plantas, animales, insectos o bacterias, y gracias al embrión de pollo y al cultivo de tejidos, el reconocimiento de los virus y sus efectos en las células de cultivos ha avanzado enormemente, junto con el desarrollo de vacunas para controlar las enfermedades provocadas por virus. No existe ninguna razón para creer que la potencialidad de los nuevos métodos en virología se haya agotado. La inexorable búsqueda de la ciencia y la conquista de las enfermedades continuarán siempre.

## REFERENCIAS

- <sup>1</sup> *Horne, R. W., y P. Wildy.* "La estructura del virus revelada por la coloración negativa". *Progresos en la Investigación Virologica. 10:* 101-170. 1963.
- <sup>2</sup> *Coons, A. H., H. J. Creech, y R. N. Jones.* "Propiedades inmunológicas de un anticuerpo que contiene un grupo fluorescente". *Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 17:* 200-202, 1941.
- <sup>3</sup> *Coffin, D. L., A. H. Coons y V. I. Cabasso.* "Un estudio histológico de la hepatitis infecciosa canina por medio del anticuerpo fluorescente". *J. Exp. Med. 98:* 13-20, 1953.
- <sup>4</sup> *Jenner, E.* Una investigación de las causas y efectos de la variolae vaccinae; enfermedad descubierta en alguno de los Condados del oeste de Inglaterra. especialmente Gloucestershire, y conocida con el nombre de viruela vacuna, 1798. Reimpreso por Cassell y Cía. Ltd., se puede obtener en Pamphlet Vol. 4232. Biblioteca Médica del Ejército, Washington, D. C. 1896.
- <sup>5</sup> *Pasteur, L., C. Chamberland y E. Roux.* Nouvelle communication sur la rage. *C. R. Acad. de Ciencias. 98:* 457-463, 1884.
- <sup>6</sup> *Pasteur, L.* Methode pour prevenir la rage après morsure. *C. R. Academia de Ciencias. 101:* 765-772, 1885.
- <sup>7</sup> *Copeman, S. M.* Vacunación. Ch. 5 Macmillan & Comp., Ltd., Londres, 1899.
- <sup>8</sup> *Rous, P., y J. B. Murphy.* Injertos de tumor en el embrión en desarrollo. *Diario de la Asociación de Medicina Americana 56:* 741-742, 1911.
- <sup>9</sup> *Jouan, C., y A. Staub.* Etude sur la peste aviaire. *Am. Ins. Pasteur de Paris 34:* 343-357, 1920.
- <sup>10</sup> *Gay, F. P., y R. Thompson.* Ensayos de cultivo de virus para vacunas en el embrión de pollo en desarrollo. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 26:* 556-559, 1929.
- <sup>11</sup> *Woodruff, A. M., y E. W. Goodpasture.* La susceptibilidad de la membrana corioalantoide de los embriones de pollo con respecto a la infección provocada por el virus de la viruela aviar, 1931.
- <sup>12</sup> *Goodpasture, E. W., A. M. Woodruff y G. J. Euddinger.* Infección vacunal de la membrana corioalantoide del embrión de pollo. *Am. J. Pathol. 8:* 271-281. 1932.
- <sup>13</sup> *Burnet, F. M.* El uso del huevo en desarrollo en la investigación virológica. *Spec. Rept. Ser. Ne 220, Londres. H.M.S.O., 1933.*
- <sup>14</sup> *Gallavan, M., y E. W. Goodpasture.* Infección de los embriones de pollo con *H. tos ferina* que reproducen lesiones pulmonares de coqueluche, 1937.
- <sup>15</sup> *Cox, H. R.* Cultivo de rickettsias(P) en los tejidos embrionarios de los pollos en formación. *Proc. VI Congreso de Ciencia Pacifica, 5, Berkeley, Stanford y San Francisco, pp. 605-610, 1939.*
- <sup>16</sup> *Enders, J. H., T. H. Weller y F. C. Roblins.* Cultivo de la cepa Lansing del virus de la poliomielitis en cultivos de varios tejidos embrionarios humanos, *Ciencia 109:* 85-87, 1949.
- <sup>17</sup> *Youngner, J. S.* Cultivos de 1 ejidos de una sola capa. Preparación y standardización de suspensiones de células de riñón de mono trypsindispersed. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85:* 202-205, 1954.