



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PERMISIVIDAD AL  
VIRUS DE INFLUENZA QUE PRESENTAN  
DIFERENTES LINEAS CELULARES APLICANDO  
DISTINTOS METODOS DE INOCULACION”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
P R E S E N T A :  
**NORMA ALICIA CHAVARRIA TORRES**

ASESOR: BIOL IRMA LOPEZ MARTINEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. JUNIO 2000.

260384



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U N A M  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
P R E S E N T E

AT'N: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Estudio comparativo de la permisividad al virus de influenza  
que presentan diferentes líneas celulares aplicando distintos  
métodos de inoculación."  
que presenta la pasante: Norma Alicia Chavarria Torres  
con número de cuenta: 9460158-5 para obtener el TÍTULO de:  
Química-Farmacéutica-Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 24 de Abril de 2000

PRESIDENTE

M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL

Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya

SECRETARIO

Biol. Irma López Martínez

PRIMER SUPLENTE

QBP Judith Martínez Zamitiz

SEGUNDO SUPLENTE

QFB Marcela Hernández Vargas

*Este trabajo de Jesús es dedicado a mis P.A.P.A.S que más me han apoyado en la vida  
y que con su ejemplo, su confianza y su amor me han permitido llegar hasta esta meta,  
poris los quiero mucho y estoy muy orgullosa de ustedes por todo lo que me han enseñado  
y lo que son. Va dedicada también a mis dos hermanitas, S.M.D.U, que por ser la mayor  
me diste un buen ejemplo y ayuda incondicional, y A.D.Y que aunque eres mi pequesita  
me has enseñado muchos cosas en la vida; a toda mi familia muchísimas gracias  
por este logro que no es mio sino de ustedes y sobre todo por la paciencia que me tuvieron  
a lo largo de mi carrera profesional.  
Los quiero muchísimísimo.*

*A ti Abraham que tanto me has ayudado y apoyado en situaciones difíciles  
y me has enseñado el valor de muchas cosas, lo amo por  
el amor incondicional que me has  
demostrado y por tu sinceridad.  
Ρεχυερδα φυνητοσ πορ σιεμπρε Διοσ λο θυιερα ασι*

*A mi Tía Mita, Tía Mayo y primos por el interés mostrado  
en mi vida los quiero muchísimo*

*La alegría de corazón es la vida del hombre  
Un corazón ruidante viene bien en las comidas,  
se preocupa de lo que come.  
S. 30, 22-25*

*A todos mis amigos que compartimos momentos felices, tristes y  
dificiles en la carrera porque a partir de eso aprendi aun mas  
en la universidad a Rocío, Kari, Augusto, Martha,  
Mayra, Adrián, Angélica, gracias.*

*A Vera y Belo mis solidarios amigos, gracias por los momentos  
alegres y dificiles; y por los conocimientos que nos enseñaron  
a crecer, sin su apoyo no hubiera terminado este  
trabajo. Los quiero mucho  
y recuerden siempre  
saldremos adelante.*

*Gracias a mi Asesora de Tesis Irma López y a Rita  
por compartir conmigo sus conocimientos  
y brindarme su apoyo así como  
los recursos necesarios para terminar  
esta tesis.*

*A todos mis maestros por sus enseñanzas y  
el tiempo que invierten en seguir  
enseñándonos a todos.  
"Muchas gracias"*

# INDICE

1. INTRODUCCION	3
2 GENERALIDADES	4
2.1 Historia	4
2.2 Clasificación y Nomenclatura	6
2.3 Estructura viral, composición y morfología	7
2.3.1 Hemaglutinina	9
2.3.2 Neuraminidasa	10
2.4 Ciclo de replicación	11
2.5 Patogénesis en humano	13
2.5.1 Características clínicas	13
2.5.1.1 Adultos	13
2.5.1.2 Niños	14
2.5.2 Complicaciones	15
2.5.2.1 Complicaciones en el tracto respiratorio superior	15
2.5.2.2 Complicaciones en el tracto respiratorio inferior	15
2.5.2.3 Manifestaciones extrapulmonares de influenza	16
2.6 Diagnóstico	18
2.7 Prevención y Control	20
2.7.1 Inmunoprofilaxis	20
2.7.2 Quimioprofilaxis	22
3. CULTIVO CELULAR	23
3.1 Características de las líneas celulares susceptibles al virus de influenza	25
3.1.1 MDCK	25
3.1.2 VERO	25
3.1.3 HEp-2	26
3.1.4 NCIH-292	26
4. OBJETIVOS E HIPOTESIS	27
5. MATERIALES Y METODOS	28
5.1 Tripsinización de células	28
5.2 Métodos de inoculación	29
5.2.1 Método de inoculación simple	29
5.2.2 Método de inoculación simple con incorporación de tripsina al medio de mantenimiento	29
5.2.3 Método de inoculación con aplicación de centrifugación	30
5.2.4 Método de inoculación con aplicación de centrifugación e incorporación de tripsina al medio de mantenimiento	30
5.3 Cosecha del virus a partir de cultivo celular	30
5.4 Prueba de hemaglutinación	31
5.5 Prueba de Inmunofluorescencia indirecta	31
5.6 Esquema general de trabajo	33

6 RESULTADOS	34
6.1 Línea celular HEP-2	38
6.2 Línea celular NC1H-292	38
6.3 Línea celular VERO	38
6.4 Línea celular MDCK	42
6.5 Comparación entre líneas celulares permisivas al virus de influenza	45
7. DISCUSION DE RESULTADOS	48
8 CONCLUSIONES	51
9 ANEXO	52
10. REFERENCIAS	53

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Productos del genoma del virus de influenza .....	7
Fig 1. Esquema del virus de influenza .....	8
Fig 2. Esquema del trómero hemaglutinina .....	10
Fig 3. Ciclo de replicación del virus de influenza .....	12
Fig 4. Esquema de la metodología seguida para el diagnóstico del virus de influenza .....	19
Fig 5. Método de obtención de un cultivo celular .....	23
Tabla 2. Volúmenes de aforo para los diferentes recipientes utilizados en cultivo celular .....	29
Fig 6.1. Monocapa normal de línea celular HEp.2 y efecto citopático (ECP) que causa el virus de influenza B .....	34
Fig 6.2. Inmunofluorescencia indirecta positiva para el virus de influenza B en línea celular HEp.2 .....	35
Fig 6.3. Monocapa normal de línea celular VERO y ECP que causa el virus de influenza B .....	35
Fig 6.4. Inmunofluorescencia indirecta positiva para el virus de influenza A/H3N2 en línea celular VERO .....	36
Fig 6.5. Monocapa normal de línea celular MDCK y ECP que causa el virus de influenza B .....	36
Fig. 6.6. Inmunofluorescencia indirecta positiva par el virus de influenza B en la línea celular MDCK .....	37
Fig 6.7. Comparación de Métodos de inoculación en línea celular HEp.2 para el virus de influenza B .....	39
Fig 6.8. Comparación de métodos de inoculación en línea celular VERO, con influenza A/H1N1 .....	40
Fig 6.9. Comparación de Métodos de inoculación en línea celular VERO con influenza A/H3N2 .....	40
Fig 6.10. Comparación de métodos de inoculación en línea celular VERO con influenza B .....	41
Fig 6.11. Comparación de métodos de inoculación en línea celular MDCK con influenza A/H1N1 .....	43
Fig 6.12. Comparación de métodos de inoculación en línea celular MDCK con influenza A/H3N2 .....	43
Fig 6.13. Comparación de métodos de inoculación en línea celular MDCK con influenza B .....	44
Fig 6.14. Comparación de líneas celulares, métodos de inoculación y días para la observación de efecto citopático para influenza A/H1N1 .....	46
Fig 6.15. Comparación de líneas celulares, métodos de inoculación y días para la observación de efecto citopático para influenza A/H3N2 .....	46
Fig 6.16. Comparación de líneas celulares, métodos de inoculación y días para la observación de efecto citopático para influenza B .....	47

## 1. INTRODUCCIÓN

El virus de influenza es un agente que causa enfermedades respiratorias en el ser humano: existen tres tipos del virus de influenza: A, B y C, siendo los tipos A y B los que más se encuentran circulando dentro de una población; causando el primero pandemias y el segundo epidemias, debido a su rápida e impredecible variación antigénica(15). Los eventos más dramáticos causados por el virus de influenza durante este siglo han sido tres pandemias, de las cuales la primera fue en 1918 y las otras dos en 1957 y 1968. Los tipos de influenza que causaron pandemias se extendieron rápidamente alrededor del mundo y causaron enfermedad en grupos de personas de todas las edades. Cada una de estas pandemias estuvo asociada con altas proporciones de morbilidad, altas pérdidas económicas, y, en el caso de la pandemia ocurrida entre 1918 y 1919, existió una alta proporción de casos fatales (42).

En la actualidad las infecciones por virus de influenza continúan provocando un alto porcentaje de mortalidad y morbilidad, especialmente en personas de la tercera edad, pacientes con enfermedades crónicas y niños menores de 1 año (3). Estudios epidemiológicos realizados en el continente americano indican que cerca del 5 al 20% de la población es infectada por el virus de influenza anualmente. La mortalidad por neumonía asociada a influenza es la causa de hasta 33% de las muertes totales de niños menores de 1 año y de hasta 27% de las de niños de 1 a 4 años (3). Además un alto porcentaje de las personas de la tercera edad corren el riesgo de presentar complicaciones respiratorias, principalmente neumonía, por haber adquirido influenza. Estas complicaciones pueden causar desde una hospitalización hasta la muerte de las personas.

Debido a lo anterior es de vital importancia efectuar un monitoreo acerca de los tipos de virus de influenza que se encuentran circulando dentro de una población, para lo cual se requieren de nuevas técnicas de diagnóstico más eficaces, y sobre todo que nos permitan aislar y por lo tanto identificar de forma inmediata a este virus. En la actualidad uno de los sistemas que permiten el aislamiento y cultivo del virus de influenza es la utilización de las líneas celulares, exclusivamente la línea celular MDCK (Mady-Darby-Canine-Kidney) (22). Sin embargo, es importante contar con otras líneas celulares que permitan la detección y propagación del virus de influenza, lo cual ofrece ventajas en cuanto al tiempo de detección de una muestra positiva al virus de influenza y la producción de vacunas; ya que aunque en la línea celular MDCK se pueden replicar cantidades adecuadas del virus de influenza, debido a su origen, no existe licencia para destinar su uso a la elaboración de vacunas en humanos (19). Además, en estudios recientes se ha observado que la utilización de centrifugación o la incorporación de tripsina al medio de mantenimiento durante la inoculación de las células con la muestra, favorece la entrada del virus a las células y acelera la aparición del efecto citopático (ECP) con lo cual se obtienen resultados rápidos que son importantes para detectar casos positivos de influenza y así poder tomar a tiempo medidas de prevención y control para evitar la aparición de una nueva pandemia (31).

## 2. GENERALIDADES DEL VIRUS DE INFLUENZA

### 2.1 HISTORIA

El virus de influenza es un agente que causa enfermedades respiratorias en el ser humano. Los primeros datos que se tienen del virus datan del año 412 a.C. en escritos de Hipócrates en los cuales describe una epidemia causada por este agente. También existen numerosos episodios que fueron descritos en la Edad Media; y se tienen datos desde 1500 hasta 1800 colectados por Webster y Hirsch quienes proporcionan algunas características acerca de como ocurrieron las epidemias por este virus y como éstas causaron un alto grado de morbilidad y mortalidad entre la población mundial(15).

La primera descripción de influenza como una infección respiratoria aguda en seres humanos, probablemente data de un brote ocurrido en la Corte de Elizabeth I. Desde esos tiempos hasta la fecha, las epidemias y pandemias causadas por el virus de influenza tipo A han continuado apareciendo en intervalos irregulares e impredecibles, alcanzando un pico en este siglo con la pandemia de 1918, conocida como la "Influenza Española" la cual causó 20 millones de muertes en el mundo entero en un periodo de entre 2 y 3 años. Otras pandemias de importancia histórica son la pandemia de 1958 conocida como la "Influenza Asiática" y la de 1968 conocida como la "Influenza de Hong Kong" (45).

Para completar la historia de la influenza en seres humanos, debemos resaltar que en 1920 Richard E. Shope mostró que la influenza porcina podría ser transmitida por medio de moco filtrado lo cual sugirió que el agente causal era un virus (15); y que el primer aislamiento de laboratorio fue en el año 1932.

Para 1932, mucha gente estaba convencida de que había un virus responsable de la influenza y otro que causaba el resfriado común. En esos días, el cultivo de tejidos estaba en su infancia y los virus eran aislados inyectando filtrados libres de bacterias en animales de experimentación. El consejo de Topley, fue el de realizar filtrados a partir de lavados de garganta de pacientes con influenza e inocularlos en una gran variedad de animales. Por su parte Laidlaw había empezado a utilizar hurones para una serie de estudios de valoración sobre el distemper canino, y, como resultado o no, de la plática con Topley; Laidlaw, junto con Wilson, Smith y Andrew, empezaron a trabajar ese invierno utilizando hurones como animales de experimentación obteniendo buen éxito. Los hurones inoculados intranasalmente desarrollaron una enfermedad respiratoria aguda febril, la cual fue contagiosa para sus camadas. Otros animales, incluyendo conejos y puercos parecían ser inmunes contra la infección.

Existe una anécdota la cual nos cuenta que la influenza fue transmitida de un hurón infectado a uno de los científicos más jóvenes (Sir Charles Stuart-Harris) al cual se le tomo una muestra y el virus fue reaislado para obtener la cepa clásica WS del virus de influenza A. Más tarde se encontró que la infección podía ser transmitida artificialmente de hurones a ratones, induciendo en algunos de los casos una neumonía fatal. Estos hallazgos dirigieron a un progreso rápido en los conocimientos de las propiedades inmunológicas y patológicas del virus de influenza. En 1940, un segundo virus fue aislado; y, se encontró

dirigieron a un progreso rápido en los conocimientos de las propiedades inmunológicas y patológicas del virus de influenza. En 1940, un segundo virus fue aislado; y, resultó ser diferente en su estructura antigénica al compararlo con las cepas de 1933 (16). Este virus fue posteriormente llamado virus de influenza B, para distinguirlo de el descrito por Smith y sus colegas en 1933. Un tercer tipo, el virus de influenza C, fue aislado en 1949 por Taylor (45).

En 1940 Burnet descubrió que el virus podía crecer en la cavidad amniótica y el líquido alantoideo de embriones de pollo, lo cual sugirió una alternativa nueva para el aislamiento y cultivo del virus. Este método dirigió el descubrimiento de las propiedades hemaglutinantes del virus (23), y el uso de técnicas de inhibición de la hemaglutinación para su estudio serológico. Estas dos técnicas simples han contribuido de gran manera al conocimiento del virus de influenza. Más tarde un trabajo bioquímico realizado por Gottschalk en 1957, mostró que el virus de influenza contiene una enzima neuraminidasa, la cual, junto con la hemaglutinina (HA) es el componente antigénico más importante de la partícula viral.

A partir de esa fecha, se han llevado acabo avances acerca de la naturaleza y descripción del RNA viral, lo cual explica la habilidad presente en los genes virales para reaparecer con cierta frecuencia(32); se han descubierto compuestos antivirales que inhiben la replicación del virus: entre ellos podemos citar a la amantadina y rimantadina (10); y más recientemente se ha descrito la secuencia completa de el genoma del virus.

## 2.2 CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA

El virus de influenza pertenece a la familia Orthomyxoviridae (del griego *myxa* que significa "moco") (15); y se encuentra dividido en tres tipos con base a la antigenicidad presentada en sus nucleoproteínas y proteínas de la matriz; los cuales son conocidos como: A, B y C.

a) Virus de la influenza tipo A: pertenece al género *Influenzavirus*. Infecta a una gran proporción de animales de sangre caliente, principalmente aves y mamíferos, entre ellos el humano. Es el virus responsable de las pandemias debido a su gran variación antigénica y se encuentra dividido en subtipos con base a las diferencias de dos de sus proteínas virales llamadas: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA).

b) Virus de la influenza tipo B: pertenece al género *Influenzavirus*. Infecta únicamente humanos y suele provocar epidemias y enfermedades respiratorias que casi siempre ocurren durante el invierno.

c) Virus de la influenza tipo C: pertenece al género *Influenza C*. El humano es también su único hospedero. Se presenta en forma asintomática y cuando llega a causar enfermedad es de forma muy ligera. No causa epidemias y por lo mismo no tiene tanto impacto como la influenza tipo A o tipo B.

La Organización Mundial de la Salud ha fijado reglas de nomenclatura que actualiza periódicamente sobre la base de nueva información. La nomenclatura de los virus de la influenza se basa en su tipo antigénico y en información epidemiológica, que incluye huésped original, lugar y año de aislamiento. Para el virus de influenza A, una descripción antigénica sigue a la designación de cepa e indica el carácter antigénico de los subtipos de hemaglutinina y neuraminidasa (28). Así pues los virus de la influenza son designados de la siguiente forma: primero el tipo de virus (A, B o C); segundo el hospedero (por acuerdo, si el hospedero es el humano no se escribe); tercero el lugar de aislamiento; cuarto el número de aislamiento y quinto el año de aislamiento. Cada designación es separada con diagonales. Para el caso del virus de influenza tipo A; los subtipos HA y NA son designados entre paréntesis (HxNy). Ejemplo:

A/Singapore/6/86(H1N1).  
A/Swine/Iowa/15/30(H3N2).  
B/Beijing/184/93.

### 2.3 ESTRUCTURA VIRAL, COMPOSICIÓN Y MORFOLOGÍA

El virus de influenza es un virus envuelto, de nucleocápside helicoidal y pleomórfico, ya que al observarlo al microscopio después de inocularlo en diversos sistemas de cultivo algunas cepas las observamos de forma esférica y otras son extremadamente heterogéneas en cuanto a forma, longitud y filamentos. El virus de influenza tiene un diámetro de 80 a 120nm y su nucleocápside mide de 6 a 9nm de diámetro (27).

En el presente trabajo describiremos las características morfológicas del virus de influenza tipos A y B; del virus de influenza tipo C no se darán las características ya que no tiene la misma importancia clínica que los anteriores.

El virus de influenza tipo A o B es un virus con un material genético tipo ARN negativo de una sola cadena, el cual se encuentra segmentado en ocho partes, cada una de las cuales codifica para proteínas tanto funcionales como estructurales (Tabla 1). Los segmentos del material genético del virus se encuentran envueltos por las nucleoproteínas (NP) formando el complejo Ribonucleótido-protéico (RNP). El complejo RNP se encuentra rodeado por una membrana donde la proteína de matriz (M1) constituye una parte integral. También encontramos dentro de la partícula viral tres proteínas con actividad de polimerasa (PA, PB1 y PB2) las cuales son responsables de la replicación y transcripción del ARN. Ambos virus codifican proteínas no estructurales denominadas NS1 y NS2, la primera la encontramos tanto en el virion como en células infectadas; mientras que la segunda solo se encuentra en el virion. (27)

Tabla 1. Productos del genoma del virus de influenza.

Producto gen	Peso Molecular (Da)	Características estructurales y funcionales
1 y 2	PB1 96 000	Actividad de transcriptasa y en la iniciación de la transcripción. Proteína básica.
	PB2 87 000	Actividad de transcriptasa y endonucleasa.
3	PA 85 000	Actividad de transcriptasa y en la elongación de la cadena. Proteína ácida.
4	HA 77 000	Trímero, principal componente antigénico el cual une al virus con la célula
5	NP 56 100	Envuelve el ARN en el RNP fosforilado
6	NA 50 100	Tetrámero involucrado en la liberación del virus
7	M1 27 900	Proteína del core viral.
	M2 15 000	Canal iónico, facilita el desnudamiento del virus.
	M3 desconocido	Péptido. Se desconoce su función
8	NS1 25 000	Proteína no estructural de función desconocida
	NS2 12 000	Proteína no estructural de función desconocida.

Modificado de Karl A. Brokstad: *A Short Introduction to Influenza*, 1998

La superficie del virus de influenza presenta proyecciones superficiales que miden de 8 a 10 nm de largo y se encuentran situadas a intervalos de 8nm (28). En el virus de influenza tipo A, estas proyecciones corresponden a tres proteínas que son: la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (NA) y componentes de la proteína M2; esta última proteína esta presente solo en cantidades pequeñas y no se encuentra en cepas de influenza tipo B. Fig. 1

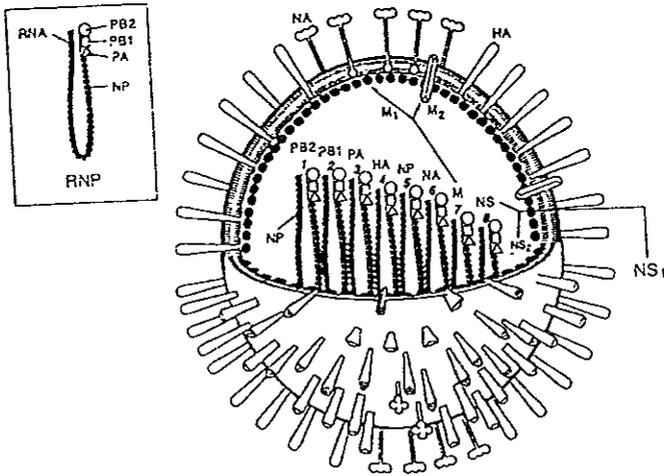


Fig. 1. Esquema del virus de influenza. Fields, BN. *Virology*. 1996.

A continuación se describirán las principales características funcionales y estructurales de las proyecciones del virus, ya que éstas son importantes para su diagnóstico e infección

### 2.3.1 Hemaglutinina

Se conoce como hemaglutinina (HA) por la habilidad del virus para aglutinar eritrocitos mediante la unión al ácido siálico contenido en la célula del hospedero. Es una proteína que se presenta en la superficie viral como proyecciones en forma de aguja. Cada una de las proyecciones tiene un tallo hidrofóbico de 25 - 28 aminoácidos por medio del cual se ancla a la membrana del virus. Según estudios realizados en el microscopio electrónico se pueden tener cerca de 500 de éstas proyecciones en un sólo virus. Mide aproximadamente 5nm en su extremo más ancho y su extremo estrecho se encuentra insertado en la membrana lipídica (45).

La HA tiene un peso molecular de 77 000 y es un trímero de subunidades idénticas, cada una de las cuales comprende dos glicopolipéptidos unidos por un puente disulfuro los cuales son conocidos como HA<sub>1</sub> (328 a.a.) y HA<sub>2</sub> (221 a.a.) (7). La estructura trimérica de la molécula HA esta conformada de dos distintas regiones: una región larga fibrosa que contiene residuos tanto de HA<sub>2</sub> como de HA<sub>1</sub>, presenta estructura de  $\alpha$ -hélice que le sirve de anclaje a la membrana del virus y una región globular en forma de hoja  $\beta$ -plegada la cual contiene el sitio de reacción con los eritrocitos y el determinante antigénico.(44). Fig 2.

Sus funciones principales son las siguientes:

1. La HA se une a el ácido siálico contenido en los receptores de la superficie celulares, contribuyendo de esta forma a la adhesión de la partícula viral con la célula del hospedero.
2. La HA es responsable para la penetración del virus dentro del citoplasma celular al mediar la fusión de la membrana con la partícula viral y formar el endosoma para que posteriormente se pueda liberar la nucleocápside viral en el interior de la célula.
3. Es el antígeno principal del virus que provoca la producción de anticuerpos neutralizantes. Se encuentra asociada con la aparición de las epidemias por influenza ya que presenta cambios en su estructura antigénica (19).

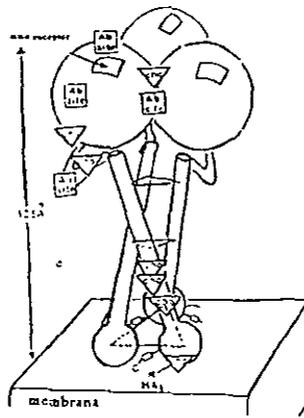


Fig. 2. Esquema del trímero de HA, el cual muestra los sitios de adhesión a los carbohidratos, el sitio de unión con el receptor y el anclaje a la membrana del virus. Wilson I.A. *Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein*. 1989.

### 2.3.2 Neuraminidasa (NA)

La NA es un homotetrámero cuyo peso molecular es de 220 000. Tiene forma de hongo por lo cual cuenta con un tallo y una cabeza (15). Cada proyección en forma de hongo mide 8 nm de largo. Posee dos dominios hidrofóbicos, uno permite el anclaje a la membrana del virus y el otro (insertado en medio de una de sus subunidades) contiene el sitio activo enzimático y el determinante antigénico. La cabeza de la molécula tiene forma de caja con un modelo proteico único. Cada monómero tiene 6 hojas  $\beta$ -plegadas, y cada hoja  $\beta$ -plegada contiene cuatro cadenas polipeptídicas (45).

Sus funciones principales son las siguientes:

1. Actividad biológica removiendo el ácido siálico de las glicoproteínas y principal determinante antigénico que dirige la variación antigénica.
2. La neuraminidasa (acilneuramíl-hidrolasa, EC 3.2.1.18) cataliza la ruptura del enlace  $\alpha$ -cetosídico entre un ácido siálico terminal y una D-galactosa o D-galactosamina adyacentes.
3. Permite el transporte del virus a través de la capa de mucina presente en el tracto respiratorio, habilitando al virus para encontrar el camino a la célula blanco (15).

## 2.4 CICLO DE REPLICACIÓN

La penetración del virus de influenza a la célula ocurre por un proceso denominado *endocitosis mediada por un receptor*; en el cual, la HA del virus se une a los residuos de ácido siálico presentes en las glicoproteínas o glicolípidos de la superficie celular ocurriendo la fusión y la formación del fagosoma. La NA no se requiere en el proceso; sin embargo se cree puede estar disminuyendo el pH a través de su actividad hidrolasa la cual promueve el proceso de penetración del virus a la célula (15).

Una vez que el virus se encuentra dentro de la célula en el fagosoma, éste se une con los lisosomas provocando la acidificación del fagolisosoma y activando las proteasas y lipasas, las cuales, van a destruir la envoltura del virus y el ARN viral (ARNv) es liberado. El ARNv liberado migra hacia el núcleo en donde se llevará a cabo la transcripción y replicación del virus.

La transcripción del ARNv requiere enzimas tanto del virus como del huésped. Para las primeras fases de la multiplicación del virus es necesaria la presencia del ADN funcional del huésped.

Como ya se mencionó el virus de la influenza contiene una ARN-polimerasa dependiente de ARN (ARN-transcriptasa) dentro del virión para transcribir los segmentos ARN virales en los ARN mensajeros. La asignación de las proteínas virales a las actividades de la ARN-transcriptasa no es precisa, pero se sugiere que su actividad de la transcriptasa viral requiere de las proteínas P1 y P3 funcionales, mientras que la actividad de replicasa requiere también de las proteínas P2 y NP activas para la síntesis de nuevas cadenas negativas del ARNv. En las células infectadas se forman dos clases de ARN complementario (ARNc): 1) Transcripciones incompletas poliadeniladas de los ARN virales que están asociados con polisomas y sirven de ARNm, y 2) transcripciones completas no poliadeniladas, que son los modelos para los ARN virales.

La transcripción primaria del virus dentro de la primera hora de infección, puede ocurrir sin síntesis proteica y sólo produce ARNm. La replicación de los ARNc no poliadenilados requiere de la síntesis de las proteínas virales, aparentemente para modificar la ARN-polimerasa y permitir la producción de copias completas. Los ARN complementarios son predominantes durante las 2 a 3 primeras horas de la infección y después predominan los ARN virales. Ambas clases de ARN complementarios y los ARN virales se forman separadamente para cada segmento de ARN viral a través de las habituales formas de replicación intermediarias. Los ARN virales son posiblemente sintetizados en el núcleo (9).

La nucleocápside es sintetizada en el citoplasma y rápidamente transportada al núcleo, donde se encuentra una cantidad significativa de ARNv. A continuación la nucleocápside se desplaza hacia el citoplasma y emigra a la membrana celular. Las proteínas HA y NA permanecen en el citoplasma durante toda la replicación.

Unas cuatro horas después de la infección la proteína M viral se asocia con la superficie interna de la membrana plasmática celular y zonas aisladas de la membrana aumentan de grosor e incorporan moléculas de HA y NA, que sustituyen gradualmente las proteínas del huésped en estos segmentos. Cuando segmentos de la nucleocápside helicoidal inciden sobre la membrana alterada, ésta sufre una gemación y forma partículas virales que son liberadas a medida que van siendo completadas (9). Fig 3.

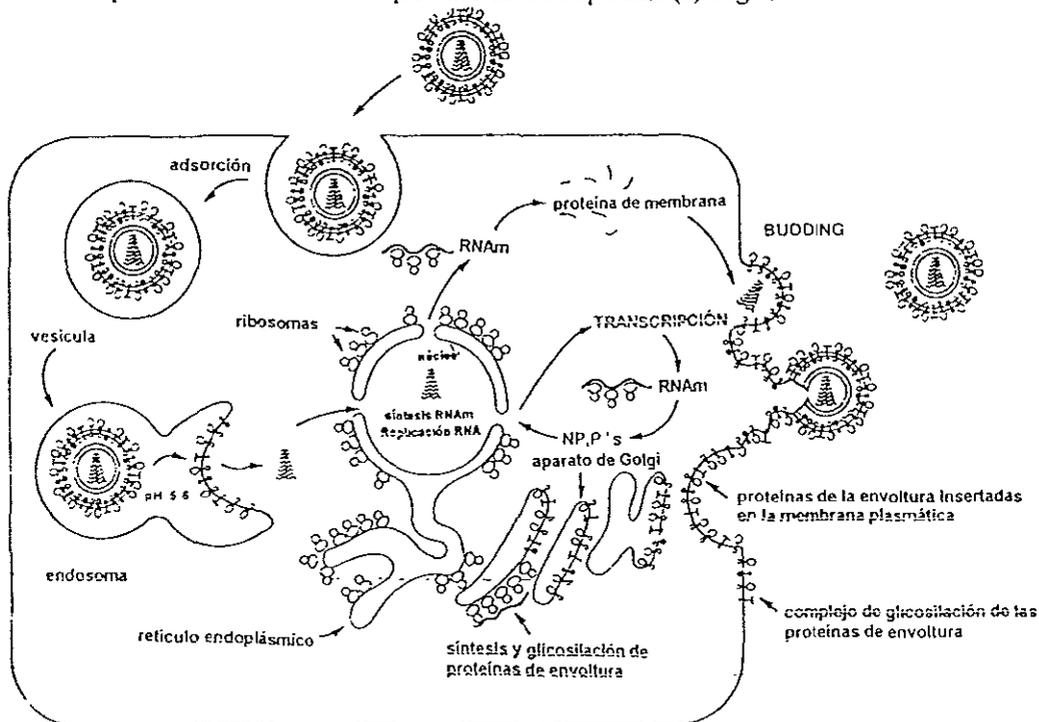


Fig 3. Ciclo de replicación del virus de influenza. Fields, BN. *Virology* 1996.

## 2.5 PATOGÉNESIS EN HUMANO

El virus de la influenza se transmite de persona a persona por medio de aerosoles; es decir, por gotitas de saliva producidas por un enfermo al estornudar o toser. Este virus puede entrar al cuerpo a través de las mucosas de ojos, nariz y boca. Después de que una persona ha sido infectada con el virus, la infección puede transmitirse 3 o 4 días después de la aparición de los síntomas (27).

Al entrar el virus al huésped ocasiona cambios en el tracto respiratorio, tanto en el superior como en el inferior. Los cambios incluyen inflamación aguda difusa de la laringe, traquea y bronquios; observándose también inflamación de las mucosas y edema. Una vez dentro del tracto respiratorio, el virus se deposita en las vías respiratorias inferiores, ocasionando transformaciones en las células ciliadas que incluyen: pérdida de los cilios, aumento en el número de vacuolas e hinchazón. Se presenta también edema submucosal e hiperemia con infiltración de neutrófilos y células mononucleares. El antígeno viral se presenta predominantemente en células epiteliales y mononucleares. Después de 3 a 5 días del comienzo de la enfermedad, la mitosis se inicia y con ello empieza la regeneración del epitelio. Durante este tiempo un proceso de regeneración y necrosis celular puede presentarse simultáneamente. La recuperación completa del epitelio puede ocurrir un mes después de que aparecen las anomalías en el funcionamiento del pulmón o presentarse hasta que el paciente se recupera de los síntomas de la fase aguda (27).

### 2.5.1. Características Clínicas

#### 2.5.1.1. Adultos

La infección por el virus de influenza puede transcurrir en un rango que va desde la aparición de una respuesta clínica con síntomas, una forma de infección asintomática, o una neumonía primaria viral que puede progresar rápidamente a una enfermedad que traiga consigo fatales consecuencias. El periodo de incubación oscila entre 24 horas hasta 4 o 5 días, dependiendo de la dosis de virus que penetra y el estado inmune del hospedero. El comienzo de la enfermedad es por lo general abrupto y va acompañado de dolor de cabeza, escalofríos, y sequedad en la garganta, a lo cual sigue la aparición de una fiebre alta (39-40°C), mialgias y anorexia. La tos puede estar acompañada de espasmos y dolor. El signo más típico de la infección es la presencia de la fiebre, que en ocasiones puede llegar hasta los 41°C después de 24 horas de haber adquirido la enfermedad. La fiebre empieza a disminuir al segundo o tercer día de que comenzó la enfermedad. La mayoría de los estudios epidemiológicos indican que desaparece en el sexto día y tiene una duración media de 3 días. En un pequeño número de casos se llega a presentar un periodo secundario febril (11)

Puede presentarse también, anomalías en conjuntiva como infecciones o un lagrimeo excesivo de la misma. Todos los síntomas pueden acompañarse de obstrucción nasal, rinorrea y estornudos.

Conforme la fiebre va disminuyendo, los signos y síntomas respiratorios como la rinitis y la tos pueden llegar a intensificarse. La tos cambia frecuentemente a una tos seca que produce mínimas cantidades de un esputo, el cual es mucoso y puede llegar a ser purulento. Después de que la fiebre y los síntomas en el tracto superior respiratorio desaparecen, la tos y la debilidad persisten 1 a 2 semanas más. La influenza es más frecuente y duradera en personas fumadoras (26).

#### 2.5.1.2 Niños:

Las manifestaciones clínicas en niños son similares a las observadas en adultos, pero existen algunas diferencias entre estos dos grupos de edades. En los niños la fiebre llega a producir convulsiones. Al menos el 14% de la fiebre está asociada con los síntomas del tracto respiratorio. Los niños (especialmente los menores a 3 años) presentan una gran incidencia de manifestaciones gastrointestinales como el vómito y el dolor abdominal. En neonatos aparece una fiebre inexplicable que puede tener consecuencias fatales. La otitis media, el crup, y la miocarditis son frecuentes.

Es importante hacer mención de que los virus de influenza A y B son principalmente responsables de enfermedades graves del tracto respiratorio inferior en niños (5). Estudios realizados en niños muestran que el virus de la influenza, principalmente el tipo A, es causa importante de laringotraqueobronquitis (crup), neumonía, faringitis y bronquitis. En la era del virus de influenza tipo A, cepa H2N2, se asoció con el 8% de presencia de crup y todos estos casos requirieron de una hospitalización. En la era del virus de influenza tipo A, cepa H3N2 se presentó un 24% de niños con crup. El crup se presenta generalmente en niños menores a un año de edad. La influenza asociada con el crup es grave, severa y en la mayoría de los casos los niños deben permanecer intubados (6).

## 2.5.2 Complicaciones

### 2.5.2.1 Complicaciones en el tracto respiratorio superior:

Las infecciones por el virus de la influenza aumentan el riesgo de desarrollar otitis media, sobre todo en niños. Aproximadamente un 12% de los niños que adquieren la influenza desarrollan esta complicación. De un 24 a un 33% de los niños hospitalizados por la enfermedad también la presentan (27).

### 2.5.2.2 Complicaciones en el tracto respiratorio inferior:

Dos diferentes síndromes de neumonía severa pueden ser consecuencia de una infección por influenza ya sea en niños o en adultos:

#### a) Neumonía primaria viral:

La neumonía primaria viral se presenta en individuos de alto riesgo entre los cuales tenemos: personas de la tercera edad o pacientes con enfermedades cardiopulmonares.

El caso típico de esta enfermedad se desarrolla abruptamente después del comienzo de la infección por influenza y progresa dentro de las 6 a 24 horas a una neumonía severa caracterizada por una respiración rápida, taquicardia, cianosis (en 80% de los pacientes), fiebre alta (mayor a 40°) e hipotensión. La enfermedad progresa rápidamente a una hipoxemia y muerte dentro del primer y cuarto día; la presencia de taquipnea y cianosis pronostica una consecuencia fatal. Los hallazgos patológicos en la traquea y bronquios son similares a los observados durante la enfermedad sin complicaciones, sin embargo se presenta bronquiolitis.

La neumonía presentada es una neumonitis intersticial acompañada de hiperemia severa y ensanchamiento de las paredes alveolares con infiltración de leucocitos, dilatación capilar y trombosis. Las paredes alveolares llegan a desprenderse del epitelio. El edema y exudado intraalveolar están presentes; las membranas hialinas cubren las paredes alveolares; y ocurre entonces una hemorragia intraalveolar. La necrosis ocurre con ruptura de las paredes de los alveólos y bronquiolos.

Los sobrevivientes pueden desarrollar fibrosis intersticial difusa con una disminución en la capacidad de difusión del monóxido de carbono y en la tensión arterial de oxígeno (15)

#### b) Neumonía bacteriana y viral.

Es tres veces más común a la neumonía primaria viral; y se presenta debido a la pérdida de la capa mucociliar. Las bacterias involucradas son principalmente: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*. Clínicamente, este síndrome es indistinguible de la neumonía primaria viral, a excepción de que los síntomas de neumonía aparecen un poco después del comienzo de los síntomas de influenza. El rango de casos fatales para ambos síndromes es de un 10 a un 12%. Sin embargo, la coinfección con *Staphylococcus aureus* tiene un mayor rango de fatalidad que puede estar por arriba de un 45% (15).

#### 2.5.2.3 Manifestaciones extrapulmonares de Influenza:

##### a) Viremia

Es poco común en la infección por el virus de influenza. El virus se ha aislado de sangre en muy bajas cantidades al cuarto día del comienzo de la enfermedad. En una infección natural o experimental, se ha recuperado el virus a partir de sangre durante el primer al tercer día del periodo de incubación pero no después. El virus fue detectado en mínimas cantidades en la sangre de dos pacientes con neumonía viral primaria fatal o al sexto día después del comienzo de la enfermedad, y fue recuperado a partir de necropsia del hígado y bazo de uno de los pacientes. En resumen la presencia de viremia ha sido probada porque el virus estuvo presente en títulos bajos de tejidos extrapulmonares tales como corazón, hígado, bazo, riñón y meninges obtenida de pacientes muertos por neumonía (15).

##### b) Miositis

En niños, la miositis se localiza en los músculos, y está caracterizada por dolor al caminar. Tiene un comienzo como una enfermedad respiratoria disminuida; los músculos se encuentran hinchados; los niveles de enzimas musculares se encuentran elevados; el curso de la enfermedad es comúnmente benigno y reversible. Puede presentarse necrosis en el músculo y un infiltrado celular inflamatorio.

En adultos, se presenta dolor generalizado y debilidad muscular, aumento en los niveles séricos de enzimas musculares, mioglobinemia y mioglobinuria. Una falla aguda renal puede seguir a esta forma de enfermedad. La patogénesis de la miositis permanece incierta. La necrosis de las células musculares puede o no presentar inflamación (15).

## c) Síndrome de Reye

Es una enfermedad metabólica y neurológica que se presenta en niños y adolescentes. Esta es caracterizada por una encefalopatía no inflamatoria progresiva, la cual se acompaña de infiltración de grasas procedentes de vísceras, principalmente hígado, y que resulta en una disfunción hepática severa. Lo cual está indicado por el aumento en los valores de transaminasas séricas y amoníaco. La administración de dosis terapéuticas de salicilatos es un factor de riesgo para el desarrollo de este síndrome (1). El comienzo de los síntomas hepáticos y del Sistema nervioso central (SNC) inician cuando se presenta una disminución de los síntomas en el tracto respiratorio. El rango de casos fatales varía y se ha estimado entre un 22 y 42% (16).

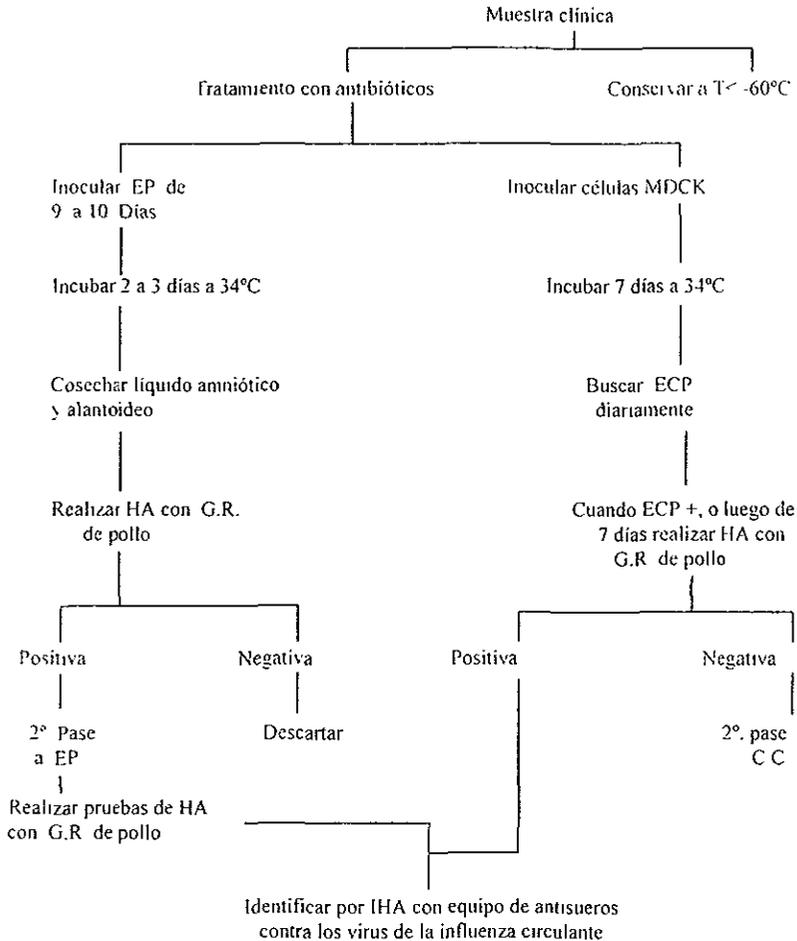
## 2.6. DIAGNOSTICO

El diagnóstico de presunción de influenza puede establecerse frecuentemente basándose en consideraciones clínicas y epidemiológicas. Por regla general, la confirmación por el laboratorio de un diagnóstico clínico es demasiado costosa para casos individuales o esporádicos, pero se emplea para confirmar la presencia del agente en la comunidad, determinar su tipo específico y realizar estudios epidemiológicos. El diagnóstico puede establecerse por tres procedimientos generales: 1) aislamiento del virus, 2) demostración del aumento de anticuerpos específicos; 3) presencia de antígenos específicos en las células de las vías respiratorias de las secreciones nasales, gargarismos o exudado faríngeo (9).

El aislamiento del virus se realiza frecuentemente inoculando secreciones nasales y faríngeas en el saco amniótico de embriones de pollo de 9 a 10 días de edad. Tras la incubación, durante 2 o 3 días, la presencia del virus puede comprobarse en el líquido amniótico o alantoideo por prueba de hemaglutinación. Para detectar los virus de influenza A y B se utilizan eritrocitos de humano tipo O Rh positivo o de pollo. Para el aislamiento del virus de la influenza pueden usarse también células de riñón de perro (MDCK). Cuando los aislamientos de virus en cultivo celular tienen un título de hemaglutinina constantemente bajo, puede ser ventajoso su pasaje a huevos para elevar el título viral. Los virus recién aislados, tanto en embriones de pollo como en cultivos celulares, son tipificados regularmente por medio de pruebas de inhibición de la hemaglutinación, sirviéndose de antisueros normalizados. Fig 4.

Las técnicas inmunológicas constituyen los métodos utilizados más frecuentemente para el diagnóstico de la infección por influenza (15). Considerando que la mayoría de las personas tienen anticuerpos para los virus de influenza ya en el momento de la infección, es esencial demostrar un incremento de anticuerpos mediante comparación de los títulos de muestras de suero obtenidas durante la fase aguda y de convalecencia de la enfermedad. La técnica de inhibición de la hemaglutinación es la más utilizada para este objeto.

Las técnicas de inmunofluorescencia proporcionan un método para establecer el diagnóstico de influenza cuando el paciente se encuentra aún en la fase aguda de la enfermedad. El procedimiento exige sólo un examen de células descamadas de la región nasofaríngea, tras su reacción con anticuerpos conjugados con fluoresceína; el examen revela la presencia de antígenos específicos (9).



**Fig 4.** Esquema de la metodología seguida para el diagnóstico de virus de influenza. Abreviaturas: MDCK: células de riñón de perro; EP: embrión de pollo; ECP: efecto citopático; HA: hemaglutinación; G.R.:Glóbulos rojos; C.C.: cultivo celular; IHA: inhibición de la hemaglutinación. Modificado de Lennete. HE. *Manual de Microbiología Clínica* 1987.

## 2.7 PREVENCIÓN Y CONTROL

Existen dos medidas disponibles las cuales reducen el impacto de influenza:

2.7.1 La inmunoprofilaxis: la cual involucra el uso de vacunas.

2.7.2 Quimioprofilaxis: involucra el uso de fármacos antivirales.

### 2.7.1 Inmunoprofilaxis (Vacunas):

La vacuna disponible es una vacuna trivalente la cual contiene dos cepas de influenza tipo A (H1N1, H3N2) y una cepa de influenza B. Esta vacuna varía año con año debido a los cambios antigénicos del virus; y es propuesta en base a estudios epidemiológicos que son registrados por la Organización Mundial de la Salud la cual determina que cepas virales comprenderá la vacuna; así pues, se tiene que para la temporada de 1998-1999 las cepas vacunales son: Influenza A/Sidney/5/97(H3N2), A/Beijing/262/95 (H1N1) y B/Beijing/185/93.

Independientemente del tipo de cepas vacunales, existen dos tipos de vacunas

a) Vacuna inactivada: es realizada a partir de virus crecidos en embrión de pollo y puede ser de dos tipos: una con el virus completo, la cual proporciona mayor inmunogenicidad y otra que contiene al virus fraccionado. La inactivación de la vacuna se logra por la utilización de formaldehído o  $\beta$ -propiolactona seguida por disgregación con detergente. Para la que contiene al virus fraccionado se requiere de una purificación adicional de las glicoproteínas de superficie. Su administración es por vía parenteral; principalmente intramuscular y se aplica una sola dosis.

b) Vacuna atenuada. se obtiene a partir de varios pases en cultivo o por un rearrreglo genético con una cepa menos patogénica (A/Ann-Arbor/6/60 (H2N2)). Su administración es vía oral o intranasal y se encuentra en proceso de evaluación (45).

La mayoría de los niños y adultos jóvenes desarrollan altos títulos de anticuerpos inhibidores de hemaglutinina postvacunación. Estos títulos protegen contra la enfermedad causada por cepas similares contenidas en la vacuna o variantes relacionadas que pueden surgir durante los brotes. Personas mayores y con enfermedades crónicas pueden desarrollar bajos títulos de anticuerpos a comparación de los anteriores, e incluso pueden quedar susceptibles; sin embargo, la vacuna previene en estos casos de enfermedades del tracto respiratorio o complicaciones secundarias y por lo tanto reduce el riesgo de su hospitalización y muerte.

La vacuna debe aplicarse a partir de octubre y hasta la mitad de noviembre para el hemisferio norte, y en abril y mayo para el hemisferio sur. Debe repetirse anualmente debido a los cambios antigénicos que presenta el virus en su superficie y es de primordial

importancia aplicarla en grupos de alto riesgo los cuales están dados en base a las complicaciones de salud que puedan presentarse. Estos grupos son:

1. Personas mayores de 65 años de edad.
2. Residentes de casas de ancianos y cuidados crónicos.
3. Niños y adultos con enfermedades crónicas, pulmonares y cardíacas.
4. Personas con enfermedades metabólicas crónicas, incluyendo diabetes, enfermedades renales, hemoglobinopatías e inmunosuprimidos.
5. Personas de 6 meses a 18 años de edad a los cuales se les de un tratamiento prolongado con ácido acetilsalicílico ya que corren el riesgo de presentar el Síndrome de Reye después de haber padecido influenza.
6. Mujeres embarazadas del primer trimestre en adelante.

La eficacia de la vacuna depende de la edad e inmunocompetencia de la persona que recibe la vacuna y del grado de similitud entre las cepas incluidas en la vacuna con las que se encuentren circulando. Para adultos jóvenes y niños la eficacia es de un 70%, para ancianos viviendo en comunidad es eficaz previniendo hospitalización por neumonía en un 70% y para ancianos viviendo en asilos es de un 50 a 60% eficaz en prevenir hospitalización y 80% en prevenir muerte.

Las reacciones adversas incluyen: 1)alergia a la albúmina de huevo y enfermedad febril; 2) reacciones locales como lo son el dolor, enrojecimiento e induración en el sitio de vacunación; 3) reacciones sistémicas que incluyen fiebre, malestar, mialgias, urticaria, angiedema, anafilaxia, Síndrome de Guillain-Barre; los cuales se presentan de 12 a 16 horas después de la aplicación de la vacuna.

Existen perspectivas de vacunas nuevas, sobre todo para lograr la sustitución del embrión de pollo, entre éstas perspectivas tenemos una vacuna recombinante adaptada al frío, mutantes sensibles a la temperatura, inserción de genes del virus de influenza en el genoma del virus vaccinia y empleo de adyuvantes como el N-acetil muramil L-alanil D-isoglutamina (27).

2 7.2 Quimioprofilaxis: se utilizan dos medicamentos, la amantadina y la rimantadina los cuales intervienen con la replicación del virus de influenza tipo A y presentan las siguientes características:

- Su eficacia es de un 70 a 90% previniendo enfermedad.
- Se usan en profilaxis y tratamiento ya que reducen la severidad y duración de signos y síntomas de influenza cuando se administran durante las primeras 48 horas de su comienzo.
- No se utilizan como sustitutos de la vacuna.
- Su administración debe ser diariamente durante el periodo en el cual se mantenga el brote de influenza en la comunidad.
- Los medicamentos pueden ser administrados dos semanas después de la vacunación y no interfieren con la misma.
- Se administran a los grupos de alto riesgo.
- La dosis es de 100mg/día y en ocasiones es recomendable la administración de 200mg/día (15).

Los efectos adversos pueden ser neurológicos y gastrointestinales. Dentro de los neurológicos se presenta: ansiedad, dificultad en la concentración, mareos, ataxia e insomnio. Los gastrointestinales son: náusea, vómito y boca seca. Estos efectos son benignos y terminan al suspender el medicamento o pueden disminuir a la semana de haber empezado la medicación (40).

Las interacciones farmacológicas se presentan con estimuladores del Sistema Nervioso Central, antihistamínicos y anticolinérgicos (45).

### 3. CULTIVO CELULAR

Un cultivo celular se define como el conjunto de células que provienen de un tejido el cual es disgregado por medio de métodos mecánicos o enzimáticos. Puede ser cultivado como una monocapa adherente sobre una superficie sólida (botellas de plástico) o una suspensión en un medio de cultivo (40). Fig 5.

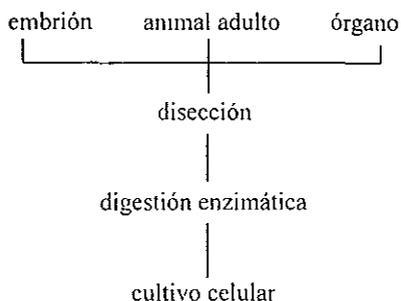


Fig 5. Metodo de obtención de un cultivo celular. *Modificación de Culture of Animal Cells, Freshney, 1987*

Como la proliferación de células se presenta en cada cultivo, la propagación de líneas celulares resulta factible. Una monocapa o suspensión celular, con un rango de crecimiento significativo puede ser dispersada por tratamiento enzimático dentro de botellas especiales para ello: éste método constituye un paso y las hijas del cultivo así formadas inician lo que se conoce como una línea celular. La formación de una línea celular a partir de un cultivo primario implica: 1) un aumento en el número total de células a través de varias generaciones; 2) que las células o líneas celulares con capacidad de crecimiento similar predominaran; lo cual trae como resultado un 3) grado de uniformidad en la población celular. La línea celular puede ser caracterizada, y estas características permanecerán durante su tiempo de vida. La derivación de la continuidad en líneas celulares por lo general implica un cambio fenotípico o una transformación (17).

Cada línea celular necesita ciertos requerimientos para su crecimiento, los cuales son determinados a través de condiciones experimentales y sobre todo por la adaptación que presentan las poblaciones celulares ante el medio utilizado. Dentro de los requerimientos tenemos los fisicoquímicos: pH, temperatura, presión osmótica, O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>; y los nutricionales: vitaminas, aminoácidos, hormonas, entre otros; los cuales son proporcionados por el medio de cultivo que son generalmente sintéticos, y la atmósfera en la cual se mantienen las líneas celulares (40).

Los cultivos celulares se utilizan para realizar un sin fin de estudios; entre los cuales tenemos el aislamiento de virus. Con respecto a éste aspecto nos ofrecen mucha ventaja, ya que podemos tener acceso directo del virus a la superficie celular, podemos llevar a cabo

la propagación del virus y por consiguiente realizar otros estudios de tipo genético, preparación como reactivos de diagnóstico y creación de vacunas (19).

Para que un virus pueda replicarse en una línea celular, es preciso contar con una línea que proporcione las circunstancias necesarias para la activación viral y que pueda ser examinada en lo que se refiere a la morfología celular. La infección viral en cultivos celulares puede ser evaluada por. 1) La observación del Efecto Citopático (ECP), el cual se define como el efecto que causa el virus en la morfología celular y éstos efectos pueden ser una lisis celular, formación de células gigantes multinucleadas o sincicios, formación de células en racimos o formación de cuerpo de inclusión; 2) la actividad metabólica evidenciable por cambios de pH en el medio de cultivo y 3) por la producción de placas líticas en algunos tipos de cultivos celulares (30).

### 3.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS LÍNEAS CELULARES SUSCEPTIBLES A LA INFECCION POR VIRUS DE INFLUENZA

#### 3.1.1 MDCK (Madin-Darby-Canine-Kidney).

Derivadas de un riñón aparentemente normal de una cocker spaniel hembra adulta. El aislamiento fue realizado en septiembre de 1958 por S.H. Madin y N.B. Darby. Inicialmente las células presentaron morfología de fibroblastos, sin embargo se realizaron pases de ellas, 6 veces en intervalos de 7 días; lo cual condujo a la formación de un epitelio por lo cual su morfología actual es de éste tipo. Las células fueron admitidas por la ATCC (American Type Culture Collection) como CCL 34 en el pase 49 (21).

La línea celular MDCK a diferentes pases, ha sido utilizada en numerosos estudios virales, ya que permite el crecimiento del virus exantemático vesicular del cerdo, el virus de la estomatitis vesicular, el virus de vaccinia, Coxsackie B-5, reovirus tipos 2 y 3, adenovirus tipos 4 y 5, y el virus de la hepatitis canina infecciosa. Son células de tipo diploide.

#### 3.1.2 VERO (Células de riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*)

La línea celular VERO fue obtenida por Y. Yasumura y Y. Kawakita en la Universidad Chiba, en Chiba Japón el 27 de Marzo de 1962 a partir del riñón normal de un mono verde africano adulto. Las células obtenidas fueron llevadas al laboratorio de Virología Tropical del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas en el pase 93 por B. Simizu el 15 de Junio de 1964. Su morfología es de tipo fibroblastos y son células diploides (21).

Las células VERO han sido extensamente empleadas en estudios de replicación viral. Esta línea celular ha sido muy utilizada para el ensayo de SV-40, SV-5, el virus del sarampión, arbovirus, reovirus, el virus de la rubeola, adenovirus y poliovirus. La línea fue admitida por la ATCC como CCL 81 en el pase 113 (21).

### 3.1.3 HEp-2 (Células de Carcinoma Epidermoide Laríngeo Humano.)

La línea celular HEp-2 fue establecida por A.E. Moore, L. Sabachewsky y H.W. Foolan en 1952. Fue obtenida a partir de tumores que habían sido producidos en ratas destetadas después de la inyección con tejido canceroso proveniente de la laringe de un hombre caucásico de 56 años de edad. El aislamiento *in vitro* fue acompañado de varias mezclas de fluido amniótico bovino, extractos de embrión, suero humano y de caballo y soluciones balanceadas de sales; por lo cual es una línea celular que resiste cambios de temperatura y requerimientos nutricionales, y difícilmente pierde su viabilidad. Presenta morfología de epitelio (21).

Las células HEp-2 fueron admitidas en la ATCC como CCL 23 en 1961. Han sido utilizadas para estudios experimentales de la producción de tumores en ratas, hámsters, ratones, embriones de pollo y pacientes voluntarios en etapa terminal de cáncer. Son susceptibles al crecimiento de 10 a 14 arbovirus, el virus del sarampión, cepas virulentas y avirulentas de poliovirus tipo 1, Adenovirus tipo 3 y virus de la estomatitis vesicular. Son células ocasionalmente poliploides y por ser cancerosas se consideran haploides.

### 3.1.4 NCI-H292 (Células de Carcinoma Mucoepidermoide Pulmonar Humano).

La línea celular NCI-H292 se obtuvo en el Laboratorio de A.F. Gazdar en Noviembre de 1980, a partir de una metástasis de un nódulo cervical proveniente de un cáncer mucoepidermoide pulmonar de una mujer negra de 32 años de edad. Las células obtenidas fueron aisladas y mantenidas en un ambiente químico definido en medio libre de suero (HITES) y más tarde se adaptaron al crecimiento de medio con suero. Las células mantuvieron sus características mucoepidermoides en el cultivo.

Son susceptibles al crecimiento del virus de la hepatitis B (HBV), por lo cual esta línea se ha seleccionada como prototipo para estudios acerca de la patogénesis de la hepatitis viral y el cáncer de hígado. Es una línea celular humana con un número de cromosomas diploide y una morfología de epitelio. Fueron incorporadas a la ATCC como CRL 1848 en el pase 64 (21).

#### 4. OBJETIVOS E HIPOTESIS

##### Objetivos:

1. Determinar y comparar la permisividad que se presenta entre líneas celulares de origen renal y laríngeo, al virus de influenza con la finalidad de implementar su utilización en el aislamiento y cultivo del mismo.
2. Establecer un método de inoculación eficiente que permita el aislamiento y cultivo del virus de influenza tipos A y B; para cada una de las líneas celulares utilizadas.

##### Hipótesis:

La utilización del método de inoculación aplicando centrifugación e incorporando tripsina al medio de mantenimiento aumentará la permisividad de las líneas celulares al virus de influenza y disminuirá el tiempo de aparición del ECP lo cual ayudará al aislamiento y por lo tanto al diagnóstico del virus de influenza tipos A y B.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Tripsinización de células

#### Material.

- Cajas para cultivo de 25cm<sup>2</sup> y 75cm<sup>2</sup>.
- Tubos shell vial de vidrio estériles
- Pipetas estériles de 1ml, 5ml y 10ml
- Pipetor o perilla
- Tubos para centrifuga (15ml)
- Medio de crecimiento (anexo)
- Solución de Tripsina/Verseno 1:9
- 1 vaso de precipitado estéril de 250ml.

El procedimiento para preparar el subcultivo es partiendo de una caja de 75cm<sup>2</sup> confluyente:

1. Decantar el medio y añadir 2ml de tripsina-verseno.
2. Agitar suavemente y decantar la solución de tripsina-verseno.
3. Adicionar nuevamente 2ml de tripsina-verseno y distribuir por toda la monocapa celular agitando suavemente durante un minuto.
4. Decantar el medio y adicionar 2ml de solución de tripsina-verseno .
5. Incubar durante 5 minutos a una temperatura de 37°C hasta que las células se desprendan de la superficie de la caja. En ocasiones es necesario golpear la caja con cierta fuerza para ayudar a desprender las células.
- 6 Adicionar 2.5ml de medio de crecimiento para inactivar la tripsina.
7. Pasar la suspensión a un tubo de centrifuga de 15ml y centrifugar a 1200rpm durante 10 minutos
8. Tirar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 2ml de medio. Pipetear varias veces para romper el conglomerado de células
- 9 Transferir la suspensión de células a cajas de 75cm<sup>2</sup>, 25cm<sup>2</sup> o tubos shell vial y aforar según tabla 2 con medio de crecimiento.
10. Incubar las cajas a 37°C en ambiente húmedo y 5% de CO<sub>2</sub> (12).

Es importante aclarar que para cada línea celular el tiempo en el que se desprenden las células es diferente, por lo cual debe vigilarse constantemente la monocapa celular para evitar que la tripsina destruya las células.

**Tabla 2.** Volúmenes de aforo para los diferentes recipientes utilizados en cultivo celular.

Recipiente de cultivo celular	volumen de aforo (ml)
Caja de 75cm <sup>2</sup>	15.0
Caja de 25cm <sup>2</sup>	5.0
Tubos shell vial	1.5

## 5.2 Métodos para inoculación

### Material

- Micropipeta de 100µl a 1000µl
- Puntas para micropipeta estériles
- Pipetor o perilla
- Cajas de 25cm<sup>2</sup> o tubos shell vial con monocapa de células confluentes
- Medio de mantenimiento (Anexo)
- Baño de hielo

### 5.2.1 Método de inoculación simple (in).

1. Decantar el medio de los tubos shell vial y realizar dos lavados de la monocapa celular con medio de mantenimiento.
2. Inocular 200µl de la muestra.
3. Incubar durante una hora a 34°C.
4. Adicionar 1.5 ml de medio de mantenimiento sin tripsina.
5. Dejar en incubación a 34°C hasta la observación del efecto citopático (ECP).

### 5.2.2 Método de inoculación con incorporación de tripsina al medio de mantenimiento (trp).

1. Decantar el medio de los tubos shell vial y realizar dos lavados de la monocapa celular con medio de mantenimiento con tripsina.
2. Inocular 200µl de la muestra.
3. Incubar durante una hora a 34°C.
4. Adicionar 1.5 ml de medio de mantenimiento con tripsina (anexo).
5. Dejar en incubación a 34°C hasta la observación del ECP.

### 5.2.3 Método de inoculación con aplicación de centrifugación (cfg).

1. Decantar el medio de los tubos shell vial y realizar dos lavados de la monocapa celular con medio de mantenimiento sin tripsina. (anexo).
2. Inocular 200µl de la muestra.
3. Centrifugar a 700g durante 20 minutos.
4. Adicionar 1.5ml de medio de mantenimiento sin tripsina (anexo).
5. Dejar en incubación a 34°C hasta la observación del ECP.

### 5.2.4 Método de inoculación con aplicación de centrifugación e incorporación de tripsina al medio de mantenimiento (cfg/trp).

1. Decantar el medio de los tubos shell vial y realizar dos lavados de la monocapa celular con medio de mantenimiento con tripsina (anexo).
2. Inocular 200µl de la muestra.
3. Centrifugar a 700g durante 20 minutos.
4. Adicionar 1.5ml de medio de mantenimiento con tripsina.
5. Dejar en incubación a 34°C hasta la observación del ECP.

**NOTA:** se debe realizar al mismo tiempo dos testigos negativo los cuales consisten de una monocapa celular con medio de mantenimiento con tripsina o sin tripsina (anexo). Cada una de las muestras se realiza por duplicado.

### 5.3 Cosecha del virus a partir del cultivo Celular

Material:

- Pipetas Pasteur estériles.
  - Pipetor o perilla
  - Tubos de criofractura estériles
  - Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a pH= 7.2; estéril
  - Baño de hielo
1. Rotular el tubo con el número de la muestra que se va a cosechar y el tiempo de incubación al que fue sometido. Colocar en baño de hielo.
  2. Destapar el shell vial y extraer el contenido del mismo, teniendo cuidado de homogeneizar bien la muestra para realizar una buena separación de las células del fondo del tubo.
  3. Depositar el líquido cosechado en los tubos de criofractura.
  4. Centrifugar el líquido extraído a 2000rpm durante 15 minutos a 4°C.
  5. Decantar el sobrenadante en un tubo limpio y adicionar al sedimento un volumen de PBS equivalente al del sobrenadante. Homogeneizar bien. (sedimento).
  6. Colocar el homogenizado a -70°C durante una hora para favorecer la ruptura de las células.

7. Descongelar y centrifugar a 700g durante 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar restos celulares. El sobrenadante pasarlo a un tubo limpio.
8. Almacenar el sedimento y el sobrenadante a 4°C. El sedimento se utilizará para la prueba de Inmunofluorescencia y el sobrenadante para la prueba de hemaglutinación.

#### 5.4 Prueba de Hemaglutinación (PHA)

Material:

- Placa de microtitulación de poliestireno de 96 pozos de fondo en “U”
  - Micropipeta multicanales
  - Micropipeta de 50µl
  - Puntillas para micropipeta estériles
  - Solución de Buffer de fosfatos (PBS) estéril
  - Solución de eritrocitos de pollo al 0.8%
  - Cosechas obtenidas a partir del cultivo del virus en las células
1. Adicionar a los pozos del 2 al 12 de la placa de microtitulación, 25µl de solución PBS.
  2. Adicionar 50µl del líquido cosechado a partir de las células, al primer pozo.
  3. Realizar diluciones seriadas dobles desde el pozo no. 1 hasta el pozo no. 12, utilizando la micropipeta multicanales a volumen fijo (25µl). No olvidar desechar los últimos 25µl.
  4. Adicionar 25µl de la suspensión de eritrocitos al 0.8% a cada pozo.
  5. Colocar las placas sobre una gasa húmeda y dejarlas a temperatura ambiente. Después de 30 minutos se toma la lectura de los títulos virales.

**NOTA:** correr a la par un testigo positivo y uno negativo. El testigo positivo consiste de una muestra positiva del virus de influenza. El título viral se determina por medio de la más alta dilución del virus que cause hemaglutinación completa.

#### 5.5 Prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFA)

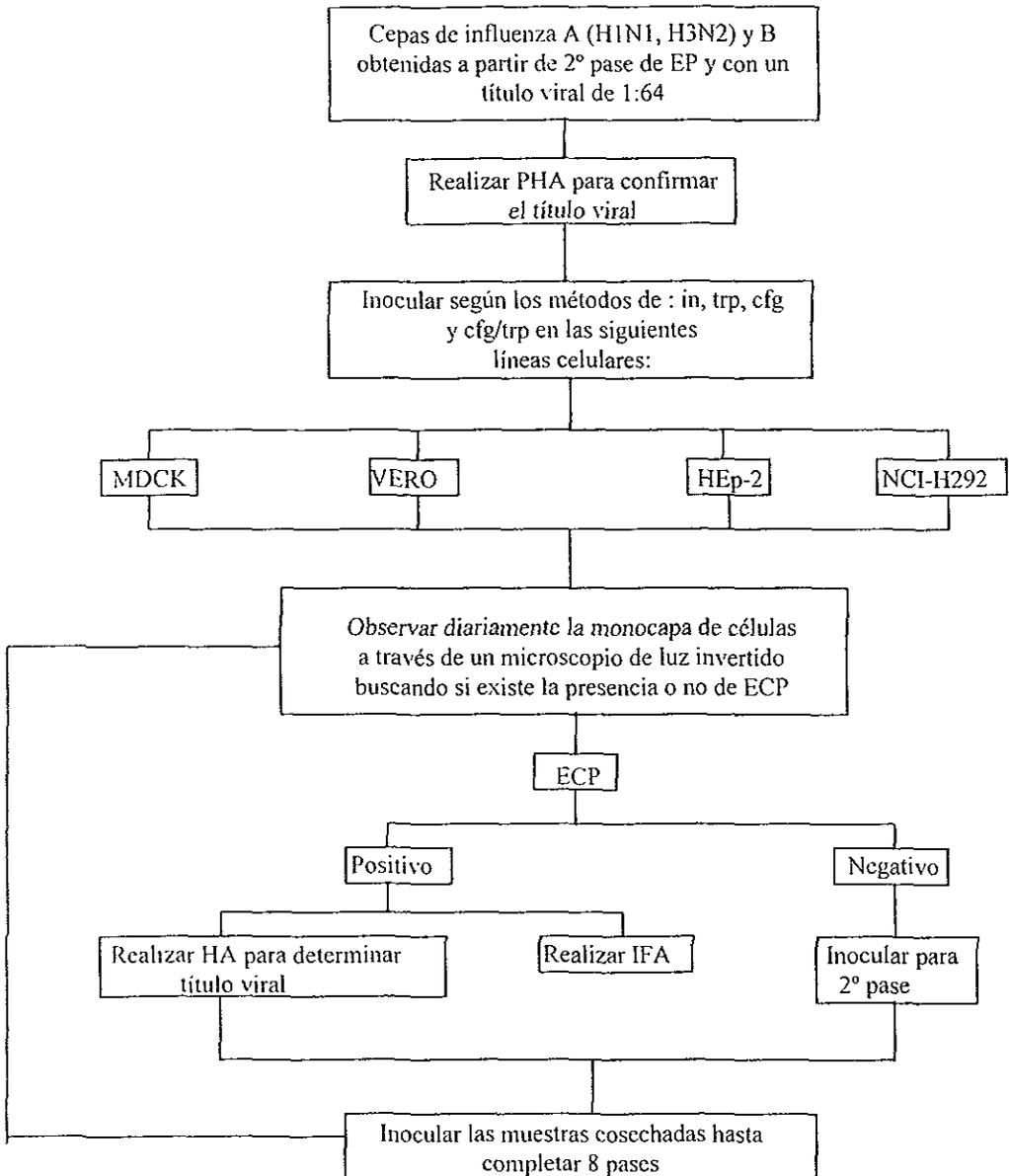
Material:

- Sedimento de células inoculadas, las cuales presentaron ECP
- Micropipeta 200µl
- Puntas para micropipeta estériles
- Portaobjetos con cubierta de teflón, para IFA
- tubos de centrifuga
- Cámara húmeda
- Estufa a 37°C
- Caja de Couplin
- Vaso de precipitados con una solución de cloro, para desechar las puntas de la micropipeta y la solución de PBS utilizada en los lavados.

- Papel secante o papel higiénico
- Microscopio de fluorescencia
- Centrifuga clínica
- Solución de PBS
- Solución de PBS-Tween (al 1% de Tween).
- Solución de Hanks
- Acetona fría
- Kit comercial para inmunofluorescencia indirecta DAKO
- Yoduro de propidio

1. Adicionar 2ml de solución de Hanks a cada uno de los sedimentos obtenidos de las células inoculadas y centrifugar por 15 minutos a 700g.
2. Eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 0.5ml de solución de Hanks.
3. Rotular los portaobjetos.
4. Con ayuda de la micropipeta colocar cada una de las muestras, por duplicado, en los pozos del portaobjetos.
5. Secar las muestras a temperatura ambiente (aproximadamente 15 minutos).
6. Colocar en una caja de Couplin los portaobjetos con las muestras ya secas y agregar acetona fría hasta que los cubra, dejar a 4°C durante 10 minutos.
7. Quitar el exceso de acetona lavando cada uno de los portaobjetos suavemente.
8. Secar a temperatura ambiente.
9. Con ayuda de la micropipeta colocar el reactivo de IFA (anticuerpos contra influenza A y B) en cada uno de los pozos de las muestras y de los testigos, procurando que cubra el pozo completamente.
10. Colocar los portaobjetos en la cámara húmeda e incubar en la estufa a 37°C durante 30 minutos.
11. Lavar con PBS-tween 20 los portaobjetos.
12. Secar los portaobjetos con ayuda de papel higiénico, procurando no tocar las muestras en los pozos.
13. Adicionar una gota de anti-anticuerpo marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína).
14. Repetir del paso 10 al 12.
15. Adicionar una gota de yoduro de propidio (0.45%) y dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
16. Lavar el Yoduro de propidio con PBS-Tween 20 y dejar que escurran los portaobjetos en la cámara húmeda y en oscuridad.
17. Agregar una gota de líquido de montaje al centro de cada uno de los pozos y colocar un cubreobjetos limpio.
18. Examinar en el microscopio de fluorescencia el área completa de cada uno de los pozos que contienen los testigos positivo y negativo, así como las muestras.

## 5.6 Esquema General de Trabajo

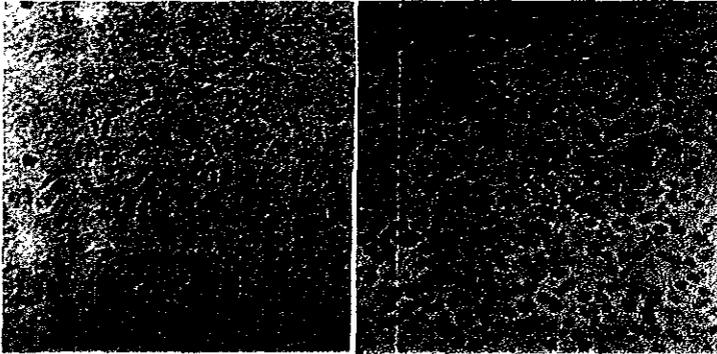


EP: embrión de pollo HA: prueba de hemaglutinación in: método de inoculación simple trp: método con incorporación de tripsina al medio de mantenimiento Cfg: método con aplicación de centrifugación Cfg/trp: método con aplicación de centrifugación e incorporación de tripsina al medio de mantenimiento

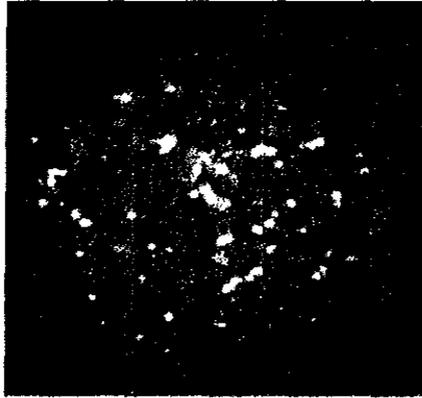
## 6. RESULTADOS

La permisividad que presentan cada una de las líneas celulares al virus de influenza se determinó en base a las observaciones realizadas a través del microscopio de luz invertido en los cultivos celulares. Tomando en cuenta que las células permisivas son aquellas en las cuales se observó ECP y se obtuvieron resultados positivos en las pruebas de hemaglutinación e inmunofluorescencia indirecta. (fig 6.1- 6.6). Así tenemos que las líneas celulares permisivas al virus de influenza A cepa H1N1(IA/H1N1) y cepa H3N2 (IA/H3N2) fueron MDCK y VERO mientras que para el virus de influenza B (IB) fueron MDCK, VERO y HEp-2.

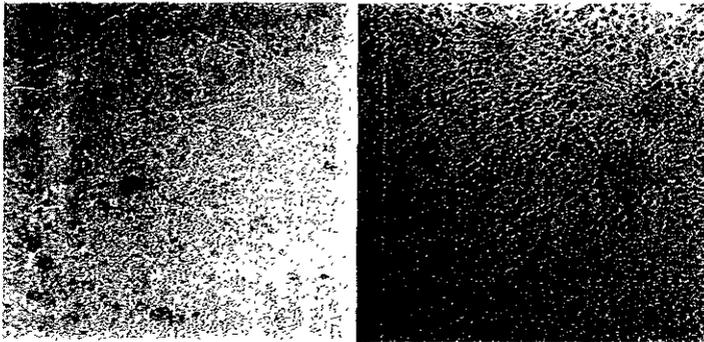
A continuación se muestran para cada una de las líneas celulares empleadas, los esquemas de una monocapa de células normales; con efecto citopático (ECP) y una inmunofluorescencia indirecta positiva.



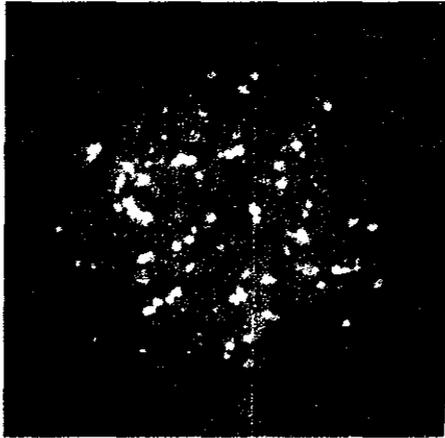
**Fig 6.1:** Monocapa normal de línea celular HEp-2 (izquierda) y efecto citopático (derecha) que causa el virus de influenza B. Observación al microscopio de luz invertido, objetivo 10x. Se observa que la morfología característica de la línea se ha perdido y las células están redondeadas.



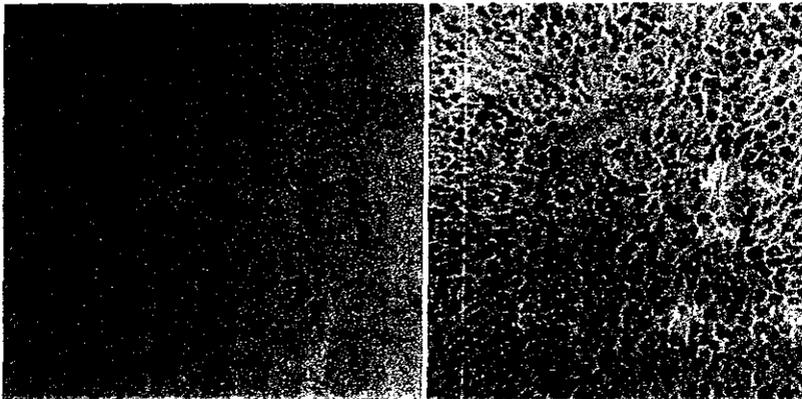
**Fig 6.2:** Inmunofluorescencia indirecta positiva para el virus de influenza B en línea celular HEp-2. Las células verdes fluorescentes son positivas a éste virus y las rojas son las negativas



**Fig 6.3:** Monocapa normal de línea celular VERO (izquierda) y Efecto citopático (derecha) que causa el virus de influenza B. Obsevación al microscopio de luz invertido con el objetivo 10X. Se observa que la morfología característica de la línea se ha perdido y las células se muestran redondeadas con gránulos en su interior.



**Fig 6.4:** Inmunofluorescencia indirecta positiva para el virus de influenza A/H3N2 en línea celular VERO. Las células verdes fluorescentes son positivas a éste virus y las rojas son las negativas.



**Fig 6.5:** Monocapa normal de línea celular MDCK (izquierda) y efecto citopático (derecha) que causa el virus de influenza B. Observación al microscopio de luz invertido, objetivo 10x.



**Fig 6.6** Inmunofluorescencia indirecta positiva para el virus de influenza B en línea celular MDCK. Las células verdes fluorescentes son positivas a éste virus y las rojas son las negativas.

### 6.1 Línea celular HEp-2:

Esta línea celular no fue permisible para el virus IA cepas H1N1 y H3N2, ya que a ningún pase se logró obtener un título hemaglutinante (tHA) y al realizar las pruebas de IFA, éstas fueron negativas.

Para el caso de IB los cuatro métodos empleados permitieron el aislamiento del virus ya que a un primer pase se obtuvieron títulos hemaglutinantes y al realizar la prueba de IFA éstas resultaron positivas (Figura 6.1, 6.2). En cuanto a la eficiencia del método podemos decir que el de tripsina es el más eficiente ya que a un bajo pase nos permite obtener un tHA (1:64); sin embargo no podemos descartar a los métodos de cfg y cfg/trp que a un segundo pase nos producen un tHA de 1:64 (figura 6.7).

### 6.2 Línea celular NCI-H292.

No se logró el aislamiento y cultivo de los IA/H1N1 y H3N2 e IB por ninguno de los métodos empleados por lo tanto se considera que ésta línea celular no es permisible al virus de influenza .

### 6.3 Línea celular VERO.

La línea celular VERO fue permisible para los virus IA/H1N1, IA/H3N2 e IB de acuerdo a las pruebas de cultivo celular e IFA realizadas.

Para IA/H1N1 se obtuvieron títulos hemaglutinantes a partir de un segundo pase mediante tres de los métodos de inoculación utilizados. En cuanto a la eficiencia de cada uno de los métodos podemos decir que el método de cfg/trp y cfg son los más adecuados ya que a un segundo pase obtenemos un tHA de 1:64 y el tiempo en el cual se observó el ECP es de 4 días (figuras 6.8 y 6.14). Para IA/H3N2 los métodos de trp y cfg permiten obtener tHA a un primer pase sin embargo este título es muy bajo. A un segundo pase el tHA aumenta para el método de cfg y cfg/trp (fig 6.9)

Para IB todos los métodos de inoculación empleados nos muestran tHA a partir de un primer pase; sin embargo se obtienen tHA mayores al utilizar cfg/trp y trp (1:128), por lo tanto la observación del ECP es a un menor número de días (figura 6.16). Los otros dos métodos también permiten el aislamiento del virus sin embargo los tHA obtenidos no son tan altos por lo cual se considera que el virus no se está replicando tan rápido como con los otros métodos (Figura 6.10) y se consideran por lo tanto menos eficientes. Es importante mencionar que en el método de trp el tHA tiende a disminuir por lo cual la utilización de centrifugación es una mejor alternativa ya que en ésta el tHA va en aumento.

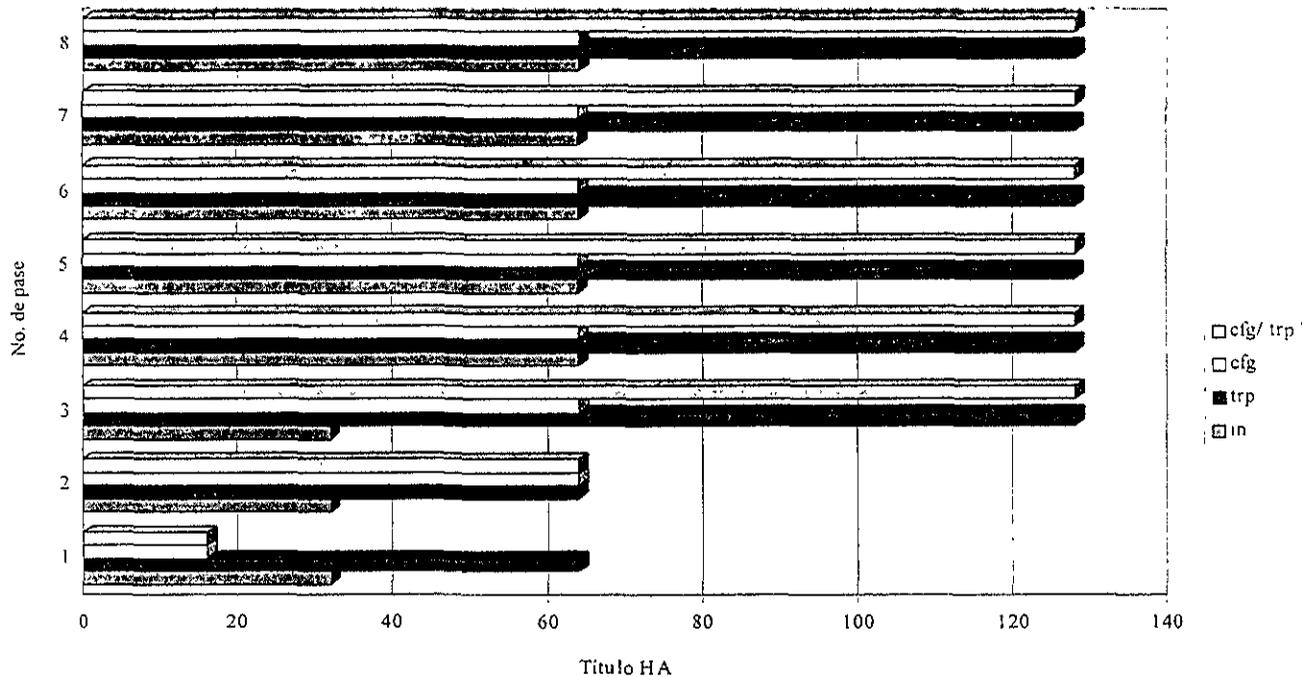
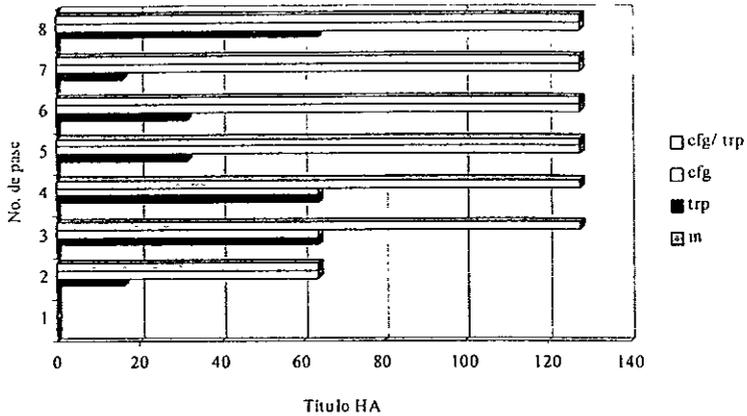
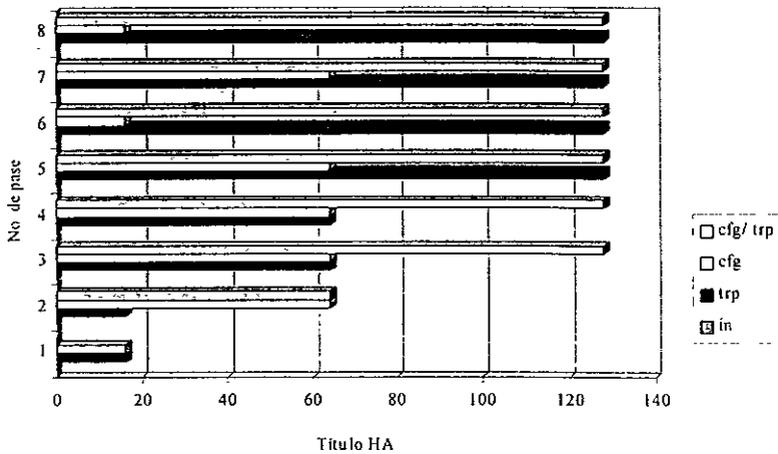


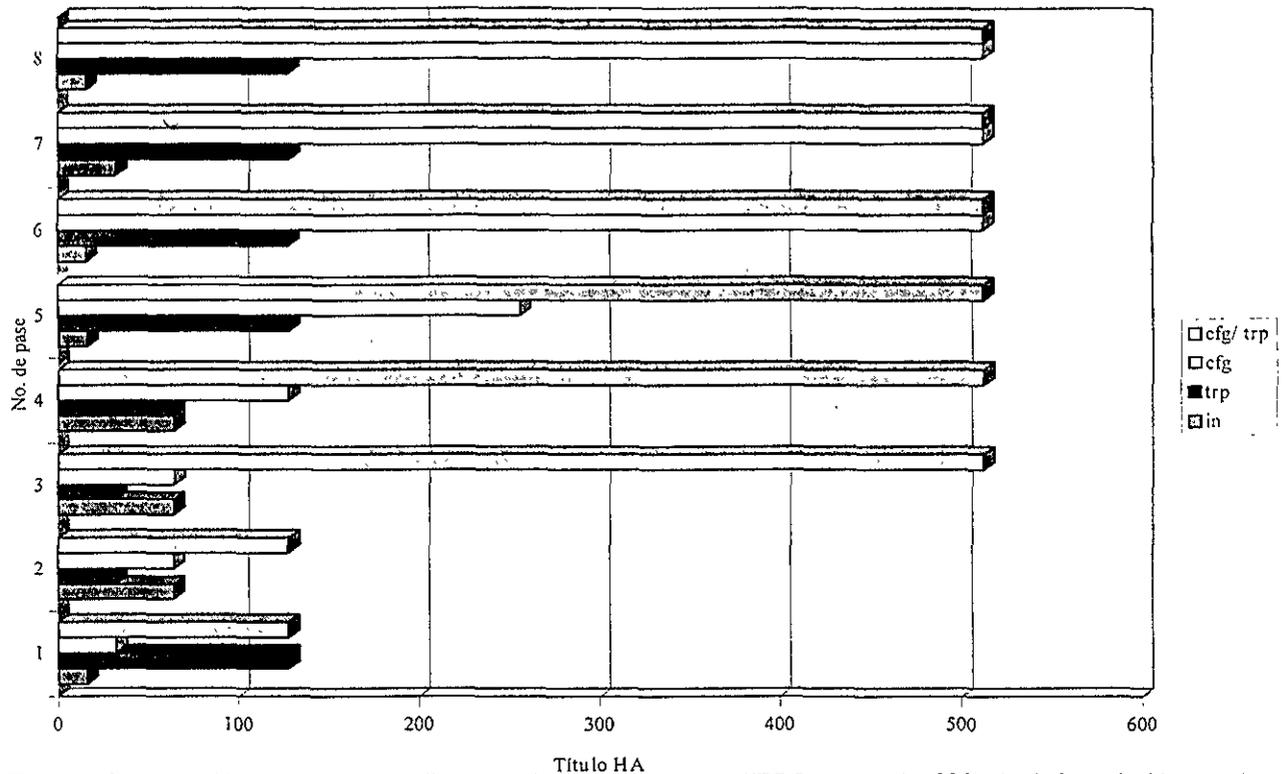
Fig 6.7: Comparación de Métodos de Inoculación en línea celular Hep-2, IB. In: método de inoculación simple, Trp: método de inoculación con incorporación de tripsina al medio de mantenimiento, Cfg: método de inoculación con aplicación de centrifugación, Cfg/trp: Método de inoculación con aplicación de centrifugación e incorporación de tripsina al medio de mantenimiento. El tHA máximo obtenido fue de 1:128 el tHA mínimo de 1:16. tHA= título hemaglutinante



**Fig 6.8: Comparación de Métodos de Inoculación en línea celular VERO con IA/H1N1.** In: método de inoculación simple. Trp: método con incorporación de tripsina al medio de mantenimiento. Cfg: método con aplicación de centrifugación. Cfg/trp: método con aplicación de centrifugación e incorporación de tripsina al medio de mantenimiento. El tHa máximo fue de 1:128 y el mínimo de 1:16.



**Fig 6.9: Comparación de Métodos de Inoculación en línea celular VERO con IA/H3N2.** In: método de inoculación simple Trp: método con incorporación de tripsina al medio de mantenimiento. Cfg: método con aplicación de centrifugación Cfg/trp: método con aplicación de centrifugación e incorporación de tripsina al medio de mantenimiento. El tHa máximo fue de 1:128 y el mínimo de 1:16.



**Fig 6.10: Comparación de Métodos de Inoculación en línea celular VERO con IB.** In: Método de inoculación simple. Trp: método con incorporación de tripsina al medio de mantenimiento. Cfg: Método con aplicación de centrifugación. Cfg/trp: método con aplicación de centrifugación e incorporación de tripsina al medio de mantenimiento. El tHA máximo obtenido es de 1:512 y el mínimo de 1:16.

#### 6.4 Línea celular MDCK.

La línea celular fue permisible para ambos tipos de virus de influenza empleados. En cuanto a la eficiencia de los métodos; para IA/H1N1 podemos decir que la utilización de cfg/trp es eficiente ya que a partir de un segundo pase el tHA que se obtiene es de 1:128 y aumenta conforme el número de pase manteniéndose constante a partir del cuarto pase (figura 6.11). Para este caso la utilización de trp y cfg también son útiles ya que a un tercer pase se obtienen tHA de 1:128 (figura 6.11). Con IA/H3N2 se obtuvieron tHA con todos los métodos a un primer pase; teniendo para los métodos de cfg y cfg/trp un tHA de 1:32 mientras que para los métodos de inoculación y tripsina 1:16. A un segundo pase el título aumento para los métodos de trp, cfg y cfg/trp por lo cual se considera a éstos como eficientes (figura 6.12).

Para IB con todos los métodos se obtiene tHA a un primer pase; sin embargo podemos observar (figura 6.13) que al utilizar los métodos de trp y cfg/trp el tHA es mayor (1:128) y el número de días para observar ECP es tan sólo de dos días (Figura 6.16), lo cual indica que ambos métodos son eficientes. Podemos agregar que la utilización de centrifugación es eficiente ya que a un segundo pase el tHA aumenta a 1:128 y por lo tanto el número de días para observar el ECP disminuye; motivo por el cual se considera un método adecuado para el aislamiento del virus ya que conforme aumentamos el número de pase el tHA aumenta.

En la tabla 6.1 se resumen los resultados que se obtuvieron para cada una de las líneas celulares.

**Tabla 6.1** Métodos eficientes para el cultivo del IA/H1N1, IA/H3N2 e IB de acuerdo a la permisividad que presentaron cada una de las líneas celulares utilizadas.

Línea celular	IA		IB
	H1N1	H3N2	
MDCK	cfg/trp	cfg, cfg/trp	trp, cfg/trp
VERO	cfg/trp	trp, cfg/trp	cfg/trp
HEp-2	S/A	S/A	trp, cfg/trp
NCI-H292	S/A	S/A	S/A

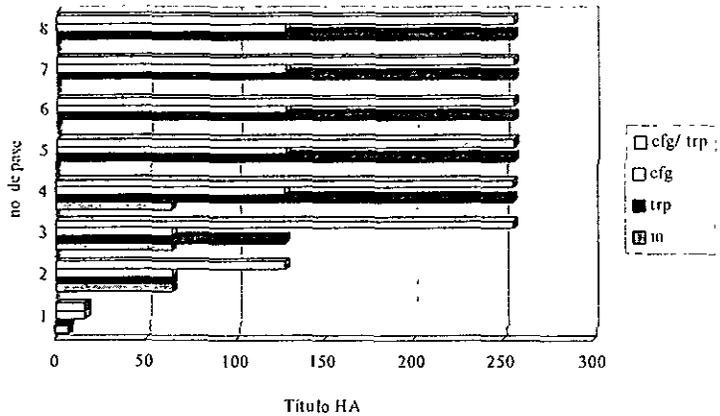


Fig 6.11: Comparación de Métodos de Inoculación en línea celular MDCK con IA/H1N1. In: método de inoculación simple. Trp: método con incorporación de tripsina al medio de mantenimiento. Cfg: método con aplicación de centrifugación. Cfg/trp: método con aplicación de centrifugación e incorporación de tripsina al medio de mantenimiento. El tHA máximo es de 1.256 y el tHA mínimo de 18.

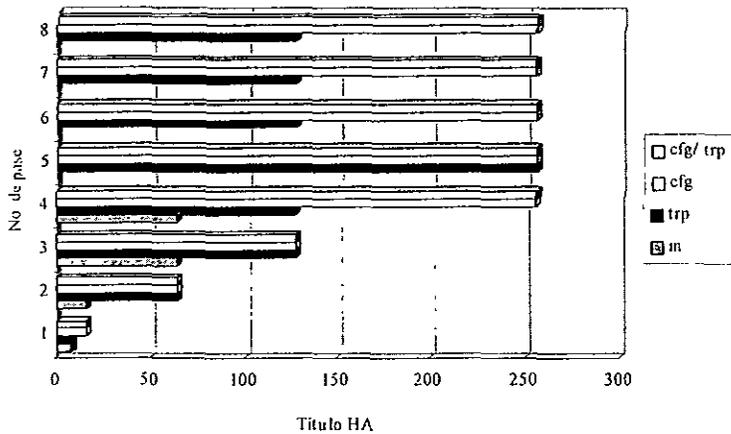
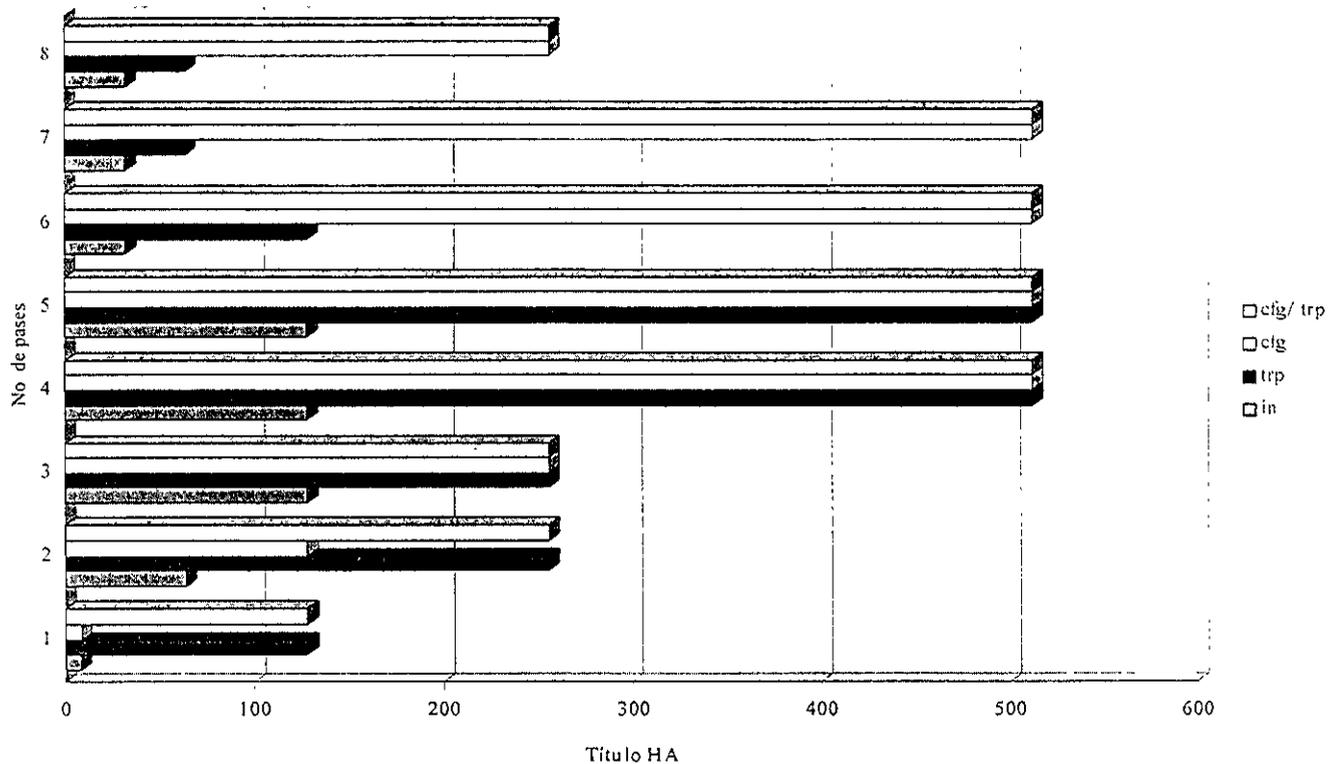


Fig 6.12: Comparación de Métodos de inoculación en línea celular MDCK con IA/H3N2. In: método de inoculación simple. Trp: método con incorporación de tripsina al medio de mantenimiento. Cfg: método con aplicación de centrifugación. Cfg/trp: método con aplicación de centrifugación e incorporación de tripsina al medio de mantenimiento. El tHA máximo obtenido es de 1.256, y el mínimo de 18.



**Fig 6.13: Comparación de Métodos de Inoculación en línea celular MDCK con IB.** In: método de inoculación simple. Trp: método con incorporación de tripsina al medio de mantenimiento. Cfg: método con aplicación de centrifugación. Cfg/trp: método con aplicación de centrifugación e incorporación de tripsina al medio de mantenimiento. El tHA máximo obtenido es de 1:512 y el tHA mínimo de 1:8.

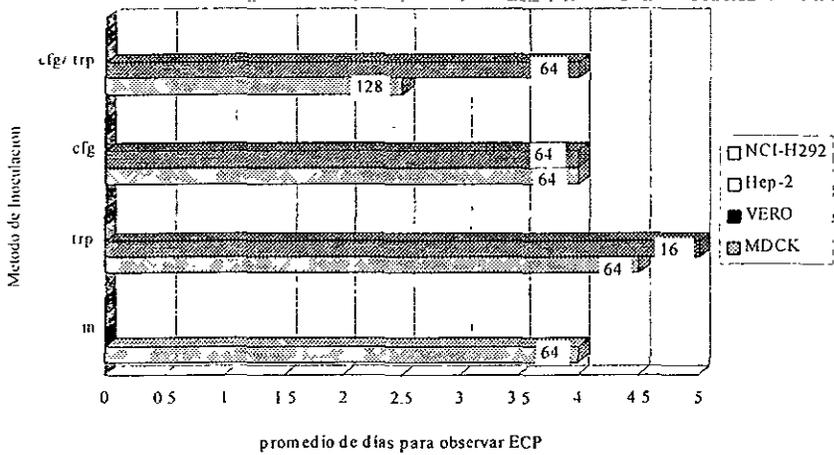
## 6.5 Comparación entre líneas celulares permisivas al virus de influenza

Para realizar la comparación entre líneas celulares de origen renal y laríngeo se realizaron gráficas de métodos de inoculación contra promedio de días para la observación de ECP (figuras 6.14, 6.15 y 6.16). El promedio de número de días para la observación de ECP se obtuvo en base a los datos de dos muestras ya que todas se inocularon por duplicado. Las gráficas se realizaron a un segundo pase ya que a éste pase es cuando se determina un caso positivo o negativo para el virus de influenza; además que si tomamos en cuenta un pase mayor indica más tiempo a la hora de obtener un aislamiento.

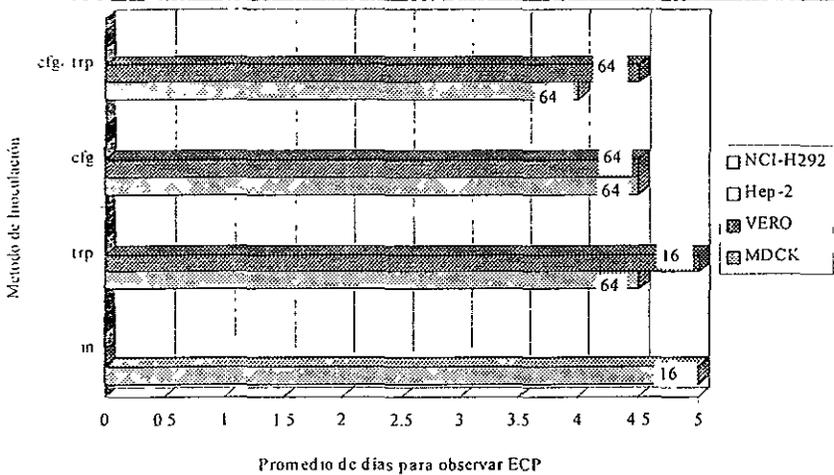
En la figura 6.14 podemos observar que solamente las líneas celulares de origen renal (MDCK y VERO) fueron permisivas al IA/H1N1 mientras que las líneas de origen laríngeo no. De estas dos líneas celulares la que ofrece mayores ventajas es la línea celular MDCK ya que al utilizar todos los métodos de inoculación obtengo tHA lo cual indica la presencia y replicación del virus; además de que con el método de cfg/trp el número de días para observar el ECP es de 2.5 días y el tHA de 1:128 lo cual permite detectar al virus de forma más rápida.

Para IA/H3N2 las líneas celulares permisivas fueron las de origen renal. Entre ambas la permisividad al virus es muy similar, a pesar de que la línea celular MDCK permite el aislamiento y cultivo del virus utilizando todos los métodos (figura 6.15).

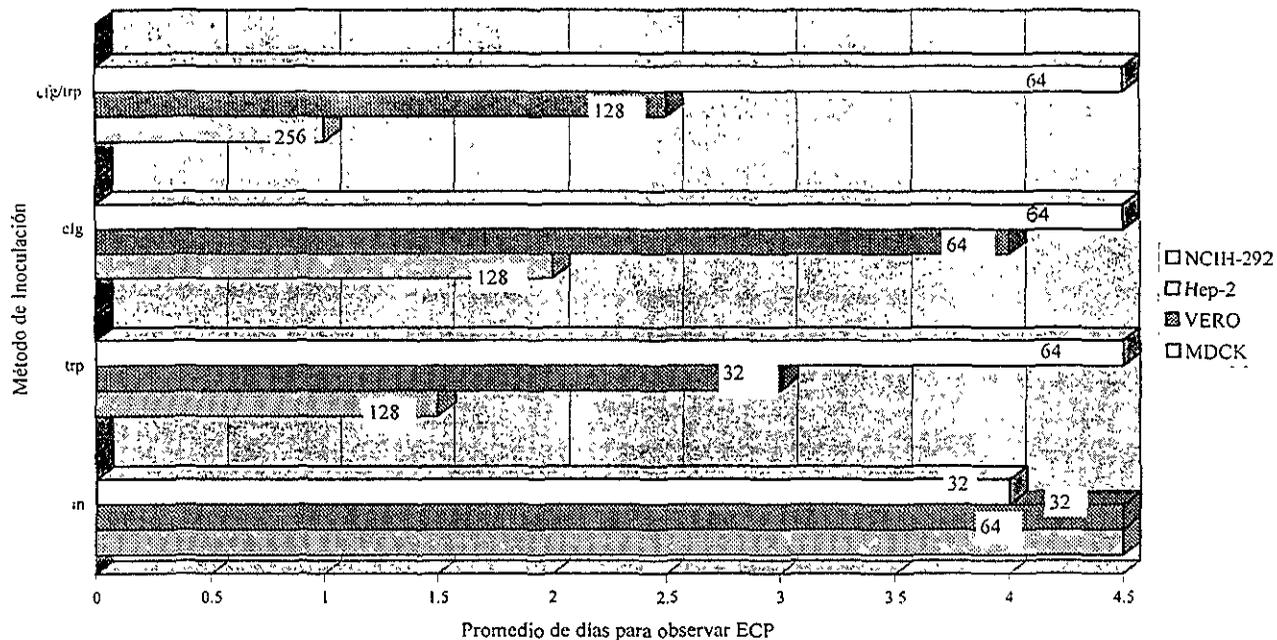
Al comparar las líneas celulares permisivas para IB (Figura 6.16) podemos decir que las que permiten la replicación del virus son las dos de origen renal y sólo una de origen laríngeo (HEp-2). La línea celular MDCK es la que ofrece mayores ventajas, ya que al utilizar el método de cfg/trp obtengo un tHA de 1:256 y requiero de solo un día para la observación del ECP lo cual acelera el diagnóstico. Sin embargo las otras líneas celulares también pueden ser utilizadas para aislar o cultivar el virus ya que nos proporcionan tHA considerables que nos indican que el virus se está replicando y puede determinarse entonces su presencia en una muestra.



**Fig 6 14:** Comparación de líneas celulares, métodos de inoculación y días para la observación del ECP para IA/H1N1. La gráfica muestra los resultados obtenidos al 2o. pase de la experimentación. Los recuadros en blanco muestran el THA obtenido. Las barras punteadas señalan las líneas celulares de origen renal. Las líneas celulares de origen laríngeo no fueron permisibles a esta cepa del virus



**Fig. 6.15:** Comparación de líneas celulares, método de inoculación y promedio de días para observar el ECP para IA/H3N2. La gráfica muestra los resultados obtenidos al 2o. pase de la experimentación. Los recuadros en blanco muestran el THA obtenido. Las barras punteadas señalan las líneas celulares de origen renal. Las líneas celulares de origen laríngeo no fueron permisibles a esta cepa del virus de influenza



**Fig 6.16: Comparación entre líneas celulares, métodos de inoculación y promedio de días para observar el ECP para IB.** La gráfica muestra los resultados obtenidos al 2o. pase de la experimentación. Los recuadros en blanco muestran el tHA obtenido. Las barras punteadas señalan las líneas celulares de origen renal. La barra lisa muestra la línea celular de origen laríngeo. La línea celular NCIH-292 no fue permisible a esta cepa de virus.

## 7. DISCUSION DE RESULTADOS

El número de líneas celulares utilizadas para el aislamiento y propagación del virus de influenza tipos A y B es limitado. Se tienen reportes de que las líneas celulares MDCK y VERO presentan permisividad ante el virus de influenza (19, 32); sin embargo, esta permisividad no es para todos los tipos de virus de influenza pues ello depende principalmente de la afinidad que presenta la hemaglutinina del virus a los receptores de las líneas celulares utilizadas y del método de inoculación. Existen estudios recientes que nos mencionan que la incorporación de tripsina al medio (16) así como la aplicación de centrifugación (37) se encuentran involucrados en la infección que presenta el virus a la línea celular; además de que incrementa el título viral lo que trae como consecuencia que el ECP aparezca en menor tiempo.

En el estudio realizado los datos obtenidos concuerdan con los de las referencias citadas, ya que al incorporar tripsina al medio de mantenimiento y utilizar la centrifugación con incorporación de tripsina se lograron obtener títulos virales de hasta 1:512 para el caso de la línea celular VERO y MDCK infectada con influenza B; además se lograron obtener éstos resultados a un pase bajo (aproximadamente a un 3er pase) y el número de días para observar el ECP disminuyó. Es importante mencionar que otro de los factores que ayudaron en la permisividad de la línea celular al virus fue la utilización de un medio de mantenimiento sin suero fetal bovino (SFB). Al inicio de la experimentación al medio de mantenimiento se le incorporaba el 0.1% de suero fetal bovino, lo cual traía como consecuencia que las células siguieran creciendo y se desprendieran, además no se lograba observar el ECP; por lo cual se decidió eliminar totalmente el SFB ya que las referencias bibliográficas (39) muestran que inhibe la actividad de la tripsina lo cual no permite la influencia de la misma sobre la infectividad del virus.

Otro de los factores que influyen en la obtención de resultados rápidos y facilita un aislamiento es la utilización de tubos shell vial. En un principio se utilizaron cajas para cultivo de 75cm<sup>2</sup>; sin embargo ello retrasaba el tiempo de experimentación, se gastaban muchos medios y reactivos; y se pensó que no sería tan aplicable para el aislamiento del virus y su diagnóstico, ya que para lograr un 100% de confluencia en la monocapa celular se requería de hasta 3 días (datos no mostrados). En la virología diagnóstica actual los tubos anteriormente mencionados son muy utilizados (14) y en nuestro caso su uso permitió la reducción de gasto de reactivos y de tiempo en la experimentación ya que para obtener un 100% de confluencia en la monocapa celular se requiere de solamente un día. Este dato no solo sirvió para obtener resultados rápidos, sino que también sirvió para implementar esta técnica en el Laboratorio de Virus Respiratorios del INDRE con la finalidad de disminuir el tiempo de diagnóstico del virus de influenza o para permitir el aislamiento rápido del mismo.

El criterio tomado para determinar la eficiencia de cada uno de los métodos utilizados se basó en el número de pase al cual se obtiene un título hemaglutinante (tHA). Si el número de pase es bajo me esta indicando menor tiempo en lograr un aislamiento

Si el número de pase es bajo me esta indicando menor tiempo en lograr un aislamiento (28); el título hemaglutinante es indicativo de la presencia del virus; si va en aumento me esta indicando la replicación viral y por lo tanto se tiene una infección productiva con liberación de partículas virales al medio; además al tener un título HA mayor el número de días para la observación de ECP disminuye (figuras 6.14, 6.15, 6.16). Por lo que podemos decir que a un número de pase bajo y la obtención de un tHA a partir de 1:64 entonces tendremos un método eficiente para el aislamiento del virus de influenza tipos A (cepas H1N1 y H3N2) y B (39).

En base a lo anterior nuestros resultados muestran que los métodos más eficientes fueron el de la incorporación de tripsina al medio de mantenimiento y la utilización de centrifugación con incorporación de tripsina; éstos resultados fueron tanto para el virus de influenza A (cepas H1N1, H3N2), como para el virus de influenza B. Estudios realizados por otros autores demuestran las ventajas que presenta la centrifugación como técnica para el diagnóstico viral (14, 35, 47). En el presente estudio se demostró que la utilización de la centrifugación colabora para el desarrollo de la infectividad de los virus de influenza tipos A (cepas H1N1, H3N2) y B; lo cual puede incrementar el número de aislamientos para este virus puesto que al utilizar éstas técnicas se incrementa la permisividad de la línea celular; permitiendo tomar medidas rápidas de prevención y control en el caso de una epidemia causada por el virus de estudio. El mecanismo por el cual la utilización de centrifugación permite la infectividad del virus, puede deberse a que al llevar a cabo la centrifugación de las células una vez ya inoculadas; las partículas virales tienen mayor contacto con las membranas celulares, facilitando así la adhesión que es el primer paso para que se de la replicación viral (18, 45). Además esto puede potencializarse al realizarse los lavados previos con medio con tripsina a la monocapa de células. Es importante aclarar que éstos dos métodos no son similares y que la tripsina no es la única causante de una adherencia más rápida del virus a la célula ya que los resultados muestran que al utilizar la centrifugación los tHA son mayores indicando entonces que la centrifugación juega un papel importante a la hora que el virus infecta a las células.

Comparando las cuatro líneas celulares probadas se tiene que las de origen renal (MDCK y VERO) fueron permisibles a los virus de influenza tipos A (cepa H1N1) y B; éstos resultados concuerdan con los obtenidos por Govorkova y Meguro; sin embargo lo datos reportados por Govorkova nos mencionan que la línea celular VERO solamente es permisible para el virus de influenza B lo cual no coincide con los obtenidos en este estudio puesto que se demostró que para esta línea también es permisible el virus de influenza A (cepas H1N1 y H3N2) y puede ser entonces utilizada para su aislamiento. Respecto a las líneas celulares de origen laríngeo (HEp-2 y NCIH-292) solamente la línea celular HEp-2 fue permisible al virus de influenza tipo B; datos que no se habían obtenido. La línea celular NCIH-292 se ha demostrado que es permisible para ciertos tipos de virus de influenza A y B de tipo animal (15). En el presente estudio no se lograron obtener aislamientos con esta línea celular por lo cual se cree que es debido al método de inoculación ya que los autores mencionados en lugar de utilizar como reactivo la tripsina

utilizan la TPCK ( L-*l*-tosilamida-2-feniletíl clorometíl cetona) lo cual puede ser el motivo de la permisividad de la célula al virus (8).

La permisividad de las líneas celulares al virus de influenza tipos A (cepas H1N1, H3N2) y B, se debe entonces al método de inoculación utilizado. La obtención de tHA en un menor tiempo se logra gracias a la utilización de los tubos shell vial. Finalmente podemos mencionar que los resultados obtenidos nos permiten aportar la utilización de 3 líneas celulares para el aislamiento de influenza tipos A y B en el Laboratorio de virus respiratorios del INDRE y no solo de una línea celular (MDCK) como se realizaba anteriormente. Las desventajas son varias ya que al depender solo de una línea celular y disponer de solo un método de inoculación el número de aislamientos del virus a partir de una muestra disminuye. En ocasiones la línea celular MDCK es trabajosa y no resiste a cambios bruscos en su ambiente entonces al utilizar varias líneas celulares como la VERO y HEp-2 las cuales son más fáciles de mantener el número de aislamientos puede aumentar; además que pueden utilizarse para el aislamiento de otros virus respiratorios (39). No solamente son importantes los resultados por lograr aislamientos del virus; sino porque al ser permisibles las líneas celulares, aportan un medio para el cultivo del virus lo cual sirve para realizar estudios de tipo genético y obtener cantidades altas del virus que permitan la realización de los mismos.

## 8. CONCLUSIONES

Se determinó que las líneas celulares permisivas al virus de influenza A, cepas H1N1 y H3N2 son MDCK y VERO; mientras que para el virus de influenza tipo B son MDCK, VERO y HEp-2. La línea celular NCI-H292 no fue permisiva para ningún tipo de virus de influenza.

- El método de inoculación más eficiente fue el de aplicación de centrifugación con incorporación de tripsina al medio para todas las líneas celulares; por lo cual se propone como un método que puede usarse para el aislamiento y cultivo del virus de influenza tipos A y B y por lo tanto en el diagnóstico.
- Las líneas de origen renal son las más permisivas al virus de influenza A, cepas H1N1 y H3N2 y B; por lo tanto se consideran más útiles para el aislamiento y cultivo de éste virus. La línea celular de origen laríngeo HEp-2 sólo es permisiva para el virus de influenza B.
- La hipótesis se acepta ya que al aplicar centrifugación e incorporar tripsina al medio de mantenimiento durante la hora de inoculación se logró reducir el tiempo de aparición del efecto citopático, lo cual reduce el tiempo en el diagnóstico y por lo tanto se tiene un método eficiente para el aislamiento y cultivo del virus de influenza tipos A y B.
- Los métodos de inoculación de incorporación de tripsina al medio de mantenimiento y aplicación de centrifugación se pueden considerar como alternativos para el aislamiento y replicación del virus de influenza A y B, por lo cual se recomiendan para su diagnóstico.

## 9. ANEXO

### 9.1 Preparación de Medios de crecimiento.

Línea celular	MEM	DMEM	RPMI-1640	DMEM
Medio de cultivo	MEM	DMEM	RPMI-1640	DMEM
SRB	8.0%	10.0%	8.0%	10.0%
NaHCO <sub>3</sub> al 4.4%	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%
HEPES	1.5%	1.0%	1.0%	2.0%
Antibiótico	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
L-Glutamina	NR*	NR	2.0%	NR
Albumina Serica	NR	2.5%	NR	NR
aminoácidos no esenciales	NR	NR	2.0%	NR

\*SFB: Suero Fetal Bovino; HEPES: ácido sulfónico etano 4.(2.hidroxi)etil-1-piperazina.  
Antibiótico: Penicilina-streptomicina. NR: no requerido.

### 9.2 Preparación de medios de mantenimiento

Línea Celular	MEM	DMEM	RPMI-1640	DMEM
Medio de cultivo	MEM	DMEM	RPMI-1640	DMEM
Tripsina 10x	2µg/ml	2µg/ml	2µg/ml	2µg/ml
NaHCO <sub>3</sub> al 4.4%	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%
HEPES	1.5%	1.0%	1.0%	2.0%
Antibiótico	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
L-Glutamina	NR	NR	2.0%	NR
Albumina Serica	NR	2.5%	NR	NR
aminoácidos no esenciales	NR	NR	2.0%	NR

NOTA: Los medios de cultivo sin complementar se prepararon de acuerdo a instrucciones proporcionadas por el distribuidor. Los reactivos utilizados en las demás pruebas se prepararon de acuerdo al Manual de Procedimientos del Laboratorio de IRA's virales del INDRE (12).

## 10. REFERENCIAS

1. Barret MJ, Hurwitz ES, Schonberger LB, Togers MF. Changing epidemiology of Reye's syndrome in the United States. *Pediatrics*. 1986; 77: 598-602.
2. Belshe RB. *Textbook of Human Virology*. 2ª edición. Mosby Year Book. 1991. St. Louis Mo.
3. Benguigui Y. *Infecciones Respiratorias en niños*. 1ª edición. OPS. 1997. Washington D.C.
4. Billie RB. *Basic Laboratory Techniques in Cell Culture*. 1ª edición. Department of Health and Human Services. 1981. USA.
5. Bisno AL, Griffin JP, Van Epps KA, Pneumonia and Hong Kong influenza: a prospective study of the 1968-1969 epidemic. *Am J Med Sci*. 1971; 261: 251-263.
6. Bonser RSA, Knight BH, West RR. Sudden infant death syndrome in Cardiff. association with epidemic influenza and with temperature, 1955-1974. *Int J Epidemiol*. 1978; 7:335-340.
7. Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature*. 1994; 371: 37-43.
8. Burleson, FG. *Virology a Laboratory Manual*. 1ª edición. Academic Press Inc. 1992. USA.
9. Davis, BD. *Tratado de Microbiología*. 2ª edición. Salvat Editores. 1978. Barcelona. España.
10. Dolin R, Reichman RC. A controled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis of influenza A infection. *N Engl J Med*. 1982; 307:580-584.
11. Douglas RG. Influenza in man. In: Kilbourne DE. *The Influenza viruses and influenza*. Academic Press. 1975; 11:395-477.
12. Escobar GA. *Manual de Técnicas de Laboratorio*. Vol I. Virología y Bacteriología. INDRE, SA. 1995. México, D.F.
13. Escobar GA. *Manual de Técnicas de Laboratorio*. Vol. II. Virología y Bacteriología. 1ª edición. INDRE, SA. 1995. México, D.F.
14. Espy MJ, Smith TF, Harmon MW, Kendal AP. Rapid detection of influenza virus by shell vial assay with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*. 1987; 24:677-679.
15. Fields, BN. *Virology*. Volume 1. 3ª edición. Lippincott-Raven Publishers. 1996. USA.
16. Frank LA, Couch RB, Griffis CA. Comparison of different tissue cultures for isolation and quantitation of influenza and parainfluenza viruses. *J Clin Microbiol*. 1979; 10 (1): 32-36.
17. Freshney, IR. *Culture of Animal Cells (A manual of Basic Technique)*. 2ª edición. Wiley-Liss. 1987. USA.
18. Gleaves CA, Wilson DJ, Wold AD, Smith TF. Detection and serotyping of herpes simplex virus in MRC-5 cells by use of centrifugation and monoclonal antibodies 16h postinoculation. *J Clin Microbiol*. 1993; 21: 29-32.
19. Govorkova EA, Kaverin NV, Gubareva B. Replication of influenza A viruses in a Green Monkey Kidney continuous cell line (VERO). *J of Infect Dis*. 1995; 172:250-253.
20. Gubareva LV, Wood JM, Meyer WJ. Codominant mixtures of viruses in reference strains of influenza virus due to host cell variation. *Virology*. 1994; 199: 89-97.

21. Hay. R. ATCC Catalogue of Cell Lines & Hybridomas. 7ª edición. American Type Collection 1992. USA.
22. Hidenori MJ, Bryant D. Canine Kidney Cell Line for Isolation of Respiratory Viruses. *J Clin. Microbiology*. 1979; 9(2):175-179.
23. Hirst GK. Studies on the mechanism of adaptation of influenza virus to mice. *J Exp Med* 1947; 86: 357-366.
24. Hurwitz ES, Nelson DB, Davis C, Morens D, Sconberger LB. National surveillance for Reye's syndrome: A five year review. *Pediatrics*. 1982; 70: 895-900.
25. Johnston SL, Siegel CS. A comparison of direct immunofluorescence, shell vial culture, and conventional cell culture for the rapid detection of influenza A and B. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1991; 14(2): 131-134.
26. Kark JD, Lebiush M, Rannon L. Cigarette smoking as a risk factor for epidemic a (H1N1) influenza in young men. *N Engl J Med*. 1982; 307:1042-1046.
27. Karl A. A short Introduction to Influenza. 1998.
28. Lennete, HE. Manual de Microbiología Clínica. 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. 1987. Argentina.
29. Louria DB, Blumenfeld HL, Ellis JT, Kilbourne DE, Rogers DE. Studies on influenza in the pandemic of 1957-1958. II. Pulmonary complications of influenza. *J Clin Invest*. 1959; 38: 213-265.
30. Martínez ZJ. Manual de Curso Práctico de Virología Médica. Universidad Nacional Autónoma de México. 1995.
31. Masata DVM, Shinichi T. Enhanced isolation of influenza virus in conventional plate cell cultures by using low-speed centrifugation from clinical specimens. *Infectious Diseases*. 1990; 9 (13): 733-743.
32. Mc Cahon D, Schild GC. An investigation of some factors affecting cross reactivation between influenza A viruses. *J Gen Virol*. 1971, 12:207-219.
33. Meguro H, Bryant D, Torrence AE, Wright PF. Canine Kidney Cell Line for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 1979; 9 (2): 175-179.
34. Monto AS, Maassab HF, Bryan R. Relative efficacy of embryonated eggs and cell culture for isolation of contemporary influenza viruses. *J Clin Microbiol*. 1981; 13 (1): 233 - 235.
35. Nadine Y. Bartholoma, BS. Successful use of shell vial centrifugation and 16 to 18-hour immunofluorescent staining for the detection of influenza A and B in clinical specimens. *Am. J. Clin Pathol*. 1989. 92; 4:487-490.
36. Oefinger PE, Shawar RM, Loo SH. Enhanced recovery of cytomegalovirus in conventional tube cultures with a splin-amplified adsorption. *J Clin Microbiol*. 1990; 28. 965-969.
37. Oxford JS, Newman R, Corcoran T. Direct isolation in eggs of influenza A (h1n1) and B viruses with haemagglutinins of different antigenic and amino acid composition. *J Gen Virol* 1991; 72: 185-189.
38. Paul J. Cell and Tissue Culture. 4ª edición. Churchill Livingstone. 1973. Great Britain.
39. Paya CV, Wold AD, Smith TF. Detection of cytomegalovirus infections in specimens other than urine by the shell vial assay and conventional tube cell cultures. *J Clin Microbiol*. 1987; 25: 755-757.

40. Paymend P, Trudel M. *Methods and Techniques in Virology*. 1ª edición. Marcel Dekker Inc. 1993 USA.
41. Rocha PE, Xu X, Hall HE. Comparison of 10 influenza A (H1N1 and H3N2) haemagglutinin sequences obtained directly from clinical specimens to those of MDCK cell and egg grown viruses. *J Gen Virol*. 1993; 74: 2513-2518.
42. Russel DM, Cain KJ, Woods GL. Detection of Influenza virus by centrifugal inoculation of MDCK cells and staining with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1989. 27(11): 2505-2508.
43. Seno M, Kanamoto Y, Takao S. Enhancing effect of centrifugation on isolation of influenza virus from clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 1990;28(7): 1669-1670.
44. Seno M, Takao S, Fukuda S. Enhanced Isolation of Influenza Virus in Conventional Plate Cell Cultures by Using Low-Speed Centrifugation from Clinical Specimens. *Am J Clin Pathol*. 1991; 95(6): 765-768.
45. Topley & Wilson. *Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*. Vol 4. Virology. 8ª edición. Mosby-Year Book. 1988. Great Britain.
46. Weiss E, Dressler HR. Centrifugation of rickettsiae and viruses onto cells and its effect on infection. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1960; 103:691-695.
47. Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3ª resolution. *Nature*. 198; 289: 366-373.
48. Woods GL, Johnson AM. Rapid 24-well plate centrifugation assay for detection of influenza A virus in clinical specimens. *J Virol Methods*. 1989; 24 (1-2): 35-42.