



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**" COMPENDIO DE VIROLOGÍA MÉDICA "**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A N:**

**DAVID ARIETA GALVÁN**

**YUNUEN MARÍA DEL CARMEN FLORES GARCÍA**

**ASESORA: M. en C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ**

**CUAUTITLÁN IZCALLI , EDO. DE MEX.**

**2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

# ÍNDICE

▪	ÍNDICE. ....	1
▪	OBJETIVOS. ....	5
▪	INTRODUCCIÓN. ....	6
▪	RESUMEN. ....	7
▪	HIPÓTESIS. ....	8
▪	RESULTADOS. ....	9
▪	UNIDAD PROGRAMÁTICA I: INTRODUCCIÓN A LA VIROLOGÍA.	
1.1	Historia de la virología. ....	11
1.2	Concepto y naturaleza de los virus. ....	27
1.3	Características comparadas entre los virus y otros microorganismos. ....	28
1.4	Factores ambientales que influyen en la activación de los virus: ....	29
	a) Físicos: Temperatura, pH y radiaciones. ....	29
	b) Químicos: Solventes, desinfectantes, colorantes y mutágenos. ....	29
1.5	Organización de los virus: ....	30
	a) Forma y tamaño. ....	30
	b) Composición Química. ....	30
	c) Simetría. ....	30
1.6	Métodos para el estudio de los virus: ....	32
	a) Físicos: Centrifugación, electroforesis, espectrofotometría. ....	32
	b) Químicos: Cromatografía, precipitación, diálisis. ....	32
	c) Microscopía electrónica. ....	32
	d) Métodos inmunológicos. ....	33
	e) Métodos de biología molecular. ....	34
1.7	Clasificación de los virus. ....	35
▪	UNIDAD PROGRAMÁTICA II: REPLICACIÓN VIRAL.	
2.1	Fases observadas durante la replicación viral. ....	44
	▪ Tipos de infección viral. ....	46
2.2	Fase de inicio. ....	46
	a. Reconocimiento (Interacciones del complejo virus-célula). ....	46

	• Inespecífico. ....	46
	• Específico. ....	46
	b. Fijación (Adherencia). ....	48
2.3	Fase de entrada: ....	49
	a. Penetración. ....	49
	b. Desnudamiento. ....	50
2.4	Fase de replicación: ....	51
	a. Síntesis temprana. ....	51
	b. Replicación del genoma. ....	52
	• Síntesis de virus con DNA. ....	52
	• Síntesis de virus con RNA. ....	53
	c. Síntesis tardía. ....	56
2.5	Fase de liberación o salida. ....	57
	a. Maduración y ensamblaje. ....	57
	b. Liberación. ....	58
2.6	Ciclo lítico y lisogénico del bacteriófago. ....	59
▪	UNIDAD PROGRAMÁTICA III: TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO VIRAL.	
3.1	El cultivo de los virus. ....	62
	a) En cultivo celular. ....	67
	• Cultivo celular. ....	67
	• Cultivo primario. ....	68
	• Cepa celular. ....	69
	• Línea celular. ....	69
	b) En embrión de pollo. ....	74
	c) En animales de laboratorio. ....	75
3.2	Requerimientos del cultivo celular. ....	75
3.3	Ensayos de infectividad viral. ....	77
	a) Físicos. ....	78
	• Centrifugación. ....	78

• Electroforesis. ....	79
• Espectrofotometría. ....	79
b) Químicos. ....	80
• Cromatografía. ....	80
• Precipitación. ....	80
• Diálisis. ....	81
c) Microscopía electrónica. ....	81
• De transmisión. ....	81
• De barrido. ....	82
d) Métodos inmunológicos. ....	83
• Hemaglutinación. ....	83
• Inhibición de la hemaglutinación. ....	86
• Hemabsorción. ....	88
• Neutralización. ....	89
• ELISA. ....	91
• RIA. ....	96
• Western blot. ....	96
• Inmunofluorescencia. ....	97
• Bio/quimioluminiscencia. ....	97
e) Métodos de biología molecular. ....	98
• PCR. ....	98
• Southern blot. ....	100
• Slot blot. ....	102
• Hibridación <i>in situ</i> . ....	102
• Northern blot. ....	103
• Captura de híbridos. ....	103
• RFLP. ....	103
f) Métodos cuantitativos. ....	104
• Métodos fisicoquímicos. ....	104
• Métodos de formación de placas. ....	105

3.4	Normas de Bioseguridad y control de calidad. ....	105
▪	UNIDAD PROGRAMÁTICA IV: PATOGÉNESIS Y EPIDEMIOLOGÍA.	
4.1	Patogénesis de las infecciones virales. ....	109
	a) Vías de entrada. ....	111
	b) Periodo de incubación. ....	115
	c) Diseminación de los virus en el organismo hospedero. ....	116
	d) Excreción. ....	119
	e) Tipos de infecciones virales. ....	121
4.2	Respuesta inmune ante los virus. ....	126
4.3	Tipos de vacunas. ....	130
4.4	Terapia viral. ....	136
4.5	Epidemiología y control de las infecciones virales. ....	160
4.6	Glosario de la unidad. ....	165
▪	DISCUSIÓN. ....	168
▪	CONCLUSIONES. ....	170
▪	GLOSARIO. ....	171
▪	APENDICE DE FIGURAS. ....	176
▪	APENDICE DE TABLAS. ....	181
▪	REFERENCIAS. ....	182

## OBJETIVO GENERAL

Realizar un compendio de Virología Médica, actualizado, de presentación homogénea y atractiva, a través de la utilización de esfuerzos anteriores por lograrlo, investigación bibliográfica y principalmente en medios electrónicos, para de este modo obtener un material didáctico de alta calidad en cuanto a contenido y de fácil entendimiento para la Comunidad Universitaria involucrada con esta asignatura.

## OBJETIVOS PARTICULARES

Elaborar un nuevo formato homogéneo, actualizado y de fácil entendimiento dirigido a los estudiantes y profesores que se relacionan con la materia de Virología Médica.

Reunir, analizar y finalmente realizar una síntesis para actualizar el material didáctico dirigido a impartir la materia de Virología Médica.

Investigar en medios electrónicos todo lo referente a novedades de la virología para de este modo renovar la presentación y actualizar la información contenida en el material didáctico de la materia de Virología Médica.

# INTRODUCCIÓN

La necesidad de un material didáctico de apoyo para impartir la materia de Virología Médica en la Carrera de Químico Farmacéutico Biólogo (QFB), especialmente en la FES Cuautitlán, ha sido una de las prioridades de los profesores involucrados con la misma.

Esta necesidad surge debido a circunstancias inherentes a la actividad docente, pero también a factores que van más allá del contenido de la propia materia, principalmente a la carga de trabajo estudiantil y a la velocidad en la que se genera más y mejor información.

Con este entendimiento se toma la decisión de presentar este trabajo como tesis, que se encuentra enfocado principalmente a que los estudiantes de Virología Médica para que tengan a su alcance un material que sea sencillo de entender, pero que no por eso la información sea deficiente, sino por el contrario, que sea un material muy claro, atractivo en cuanto a presentación, actualizado y sobre todo que contenga en su totalidad los temas que se imparten en esta materia y que su conocimiento y manejo se consideran indispensables para el desarrollo de la vida profesional del QFB.

Para esto es importante señalar que han habido múltiples esfuerzos por lograr lo anterior, pero trabajando las unidades por separado. Se hace uso de estos esfuerzos como bibliografía de base, ya que a partir del estudio y análisis de los mismos se comienza a crear un material homogéneo en cuanto a formato, concreto en lo que a información se refiere y se actualizará en ambos aspectos a través de la investigación en medios electrónicos, principalmente en Internet, logrando de esta manera alcanzar los objetivos planteados con anterioridad.

## RESUMEN

El presente trabajo constituye una propuesta para actualizar y homogeneizar, el material didáctico que se utiliza para impartir las Unidades Programáticas que conforman a la materia de Virología Médica, como parte del plan de estudios de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán perteneciente a la UNAM.

De este modo se presenta un compendio que contiene todo lo referente a:

- **Introducción a la virología:** En este capítulo se presenta una semblanza de los acontecimientos históricos de relevancia indiscutible para el desarrollo de la virología hasta nuestros días. Se establece todo lo referente a generalidades de los virus en cuanto a conceptos, naturaleza, morfología, factores que los influyen y los diversos criterios para clasificarlos.
- **Replicación viral:** Se hace un planteamiento general de los procesos de un virus para replicarse, exponiéndose los distintos mecanismos de acuerdo a sus características morfológicas, con el propósito de que al revisar los mecanismos de replicación específicos de un virus sean absolutamente comprendidos.
- **Técnicas de estudio viral:** Siendo el capítulo mas específico, se revisan todas las técnicas de estudio viral de forma completa, esto es fundamentos, metodologías y usos.
- **Patogénesis y epidemiología:** Esta es una unidad que no debe de representar ninguna dificultad para un estudiante de Virología médica, ya que a lo largo de la carrera ya se han revisado la mayoría de los conceptos que aquí están contenidos. Sin embargo también se maneja todo lo referente a la terapia viral, debido a que su conocimiento es imprescindible.

## HIPÓTESIS

Si se realiza un compendio de los esfuerzos pasados por actualizar el material didáctico para impartir la materia de virología médica, y además se lleva a cabo una investigación en medios electrónicos, entonces se obtendrá un material homogéneo, actualizado y de fácil entendimiento dirigido a los estudiantes y profesores que se relacionan con la materia de Virología Médica.

## RESULTADOS

Al cabo de la investigación y la recopilación de información, se hizo una selección minuciosa de cada uno de los temas, con el objeto de dar un formato dinámico, de tal manera que el lector pueda acceder a la información sin dificultad. A continuación se incluyeron las imágenes de un modo estratégico, para complementar el entendimiento.

Para comenzar se hizo una retrospectiva de la historia de la virología, seguido de una serie de conceptos básicos y una clasificación global de aquellas utilizadas a lo largo del tiempo. Se incluyeron algunos tópicos que van a la vanguardia, como son los aspectos de diagnóstico por biología molecular, sin dejar a un lado las técnicas de rutina básicas, los hallazgos mas recientes en materia de replicación y el cómo se comporta un virus en el organismo hospedero. También se abordó el tratamiento adecuado para combatir los efectos dañinos de estos organismos.

De esta manera, se presenta a continuación, el resultados final de toda la labor de búsqueda, organización y actualización, en base al programa de la asignatura de Virología Médica.

## UNIDAD PROGRAMÁTICA I

# INTRODUCCIÓN A LA VIROLOGÍA

### OBJETIVOS

1. Conocer los aspectos importantes de la historia de la virología.
2. Identificar las características morfológicas y químicas de los virus de interés médico.

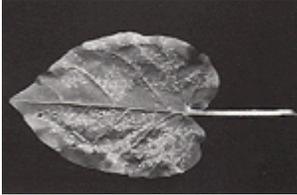
## 1.1 HISTORIA DE LOS VIRUS. (Tabla 1)

FECHA	EVENTO	
1580-1350 a.C.	<p>Hace alrededor de 3000 años que se conoce la poliomielitis. Una estela egipcia fechada entre estos años proveniente de Menphis, la capital del antiguo Egipto muestra un sacerdote, llamado Ruma con una pierna atrofiada, probablemente debido a la poliomielitis, siendo esta posiblemente la huella más antigua de la enfermedad. <sup>(74)</sup></p>	
1200-1183 a.C.	<p>Otra evidencia de la poliomielitis fue encontrada en 1905, al excavar la tumba del faraón Spitah en el valle de los Reyes, la momia del faraón que murió súbitamente a los 20 años, muestra en su pierna izquierda indicios clásicos de poliomielitis, tales como el adelgazamiento de la pierna y el pie rígidamente extendido emulando una pezuña de caballo. <sup>(84)</sup></p>	
1196 a.C.	<p>Se cree que el faraón Ramses V, sucumbió a causa de viruela, ya que la momia presenta lesiones pustulares en el rostro similares a las de pacientes actuales. <sup>(86)</sup></p>	

FECHA	EVENTO	
1000 a.C.	Se sabe que los chinos ya practicaban un método de inmunización de la viruela administrando por la nariz polvo de las costras de las pústulas o inoculando pus de la lesión en una incisión en el antebrazo de los niños. <sup>(76)</sup>	
950 a.C.	Otra evidencia de la presencia de la viruela se registró en china plasmada en una lámina donde vemos a una joven china padeciendo viruelas, lo que llamaban "flor del cielo". <sup>(88)</sup>	
430 a.C.	Hipócrates consideraba que la peste se propiciaba en las estaciones cálidas y húmedas. En su Tercer Libro de las Epidemias afirma que el estado del aire y los cambios de estación engendran la peste. Aristóteles si embargo las atribuía a la influencia de los cuerpos celestes. <sup>(95)</sup>	

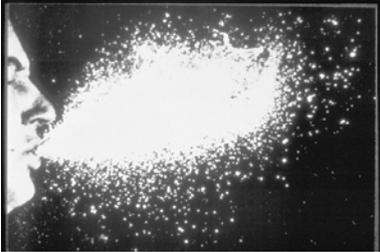
FECHA	EVENTO	
S. XVIII a.C.	<p>La primera descripción de la Rabia se hace, en el Código Eshuma en Babilonia. Desde la antigüedad ya se había establecido la relación entre la rabia humana y la rabia debida a mordeduras de los animales (especialmente perros).<sup>(93)</sup></p>	
1347-1350	<p>Hay quien afirma que la influenza se introdujo por la tripulación de un navío genovés, la que habiéndose contagiado en Kaffa (Crimea), introdujo la enfermedad en el occidente europeo. Desde Italia, la influenza alcanzó en 1348 la Provenza, el Languedoc, La Corone de Aragón, Castilla, Francia y el centro de Europa.<sup>(63)</sup></p>	
1492-1521	<p>Un soldado de la expedición de Pánfilo de Narváez arribó a México enfermo de viruela, enfermedad hasta entonces desconocida en Mesoamérica. La falta de inmunidad natural a la viruela permitió que ésta se extendiera rápidamente entre la población indígena con desastrosas consecuencias para la misma.<sup>(71)</sup></p>	

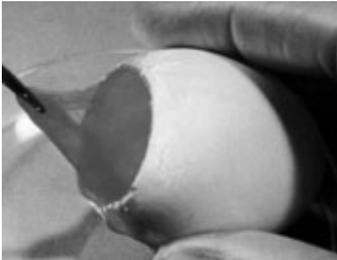
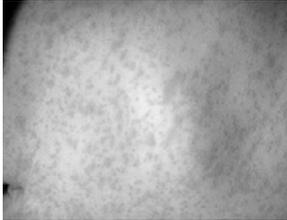
FECHA	EVENTO	
1593	<p>Para cuando el virus mosaico atacó a los tulipanes holandeses manchando sus pétalos con colores graciosos de vivas llamaradas, las ganancias de la venta de estas flores se multiplicaron dando origen a la llamada fiebre del Tulipán de L'écluse, ya que este científico fue el que comenzó su comercialización. <sup>(68)</sup></p>	
1796	<p>El científico británico Edward Jenner produce la primera vacuna, contra la viruela. Jenner descubrió que una inoculación deliberada con el virus relativamente leve de la vacuna protege a los seres humanos contra la viruela, una enfermedad que puede ser mortal. <sup>(76)</sup></p>	
1885	<p>Josef Meister, un niño alsaciano, fue la primera persona protegida con la vacuna que Luis Pasteur desarrollo contra la rabia y, además de sobrevivir, trabajaría luego como portero del futuro Instituto Pasteur. <sup>(76)</sup></p>	

FECHA	EVENTO	
1886	<p>Adolf Mayer estudiaba la enfermedad del mosaico en el tabaco, dándose cuenta tras varios experimentos que ésta era producida por un agente infinitamente mas pequeño que las bacterias. <sup>(30)</sup></p>	
1892	<p>En este año Dimitri Ivanovski demostró la transmisión del agente del mosaico del tabaco ahora conocido como virus del mosaico del tabaco (VMT). <sup>(62)</sup></p>	
1898	<p>Friedrich Loeffler y Paul Frosch pasaron por filtración al virus animal de pies y boca de un becerro a otro con una dilución de <math>10^{-6}</math>. <sup>(62)</sup></p>	 <p data-bbox="1101 1797 1339 1833">Friedrich Loeffler</p>

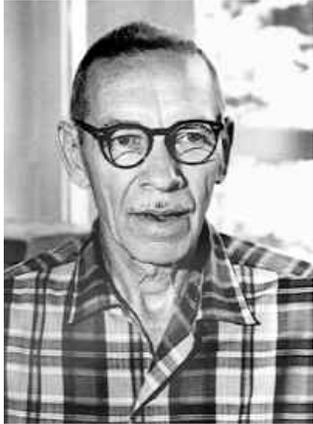
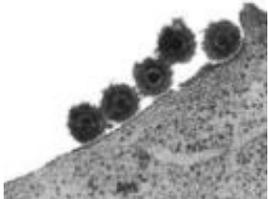
FECHA	EVENTO	
1898	<p>Martinus Beijerinck Confirmó y extendió los resultados de Iwanowski sobre el mosaico del tabaco y fue el primero en desarrollar la idea moderna de virus, al cual se refirió como fluido vivo contagioso (germen vivo soluble).<sup>(62)</sup></p>	
1900	<p>Walter Reed y su grupo trabajaron realizando experimentos con voluntarios, y comprobaron que la fiebre amarilla era transmitida por el mosquito <i>Aedes aegypti</i>. Una vez que se comprobó que la fiebre se transmitía por un mosquito se emprendieron exitosas campañas en Cuba, Panamá y Brasil.<sup>(62)</sup></p>	
1903	<p>En nuestro país fue el Dr. Eduardo Liceaga quien inició en Veracruz la campaña contra los mosquitos. En ese año se registraron en el país 3848 casos y 1583 defunciones por fiebre amarilla.<sup>(36)</sup></p>	

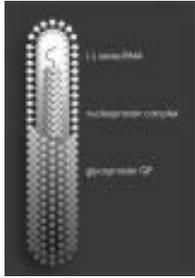
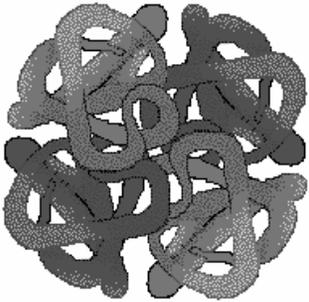
FECHA	EVENTO	
1911	<p>Peyton Rous descubrió que el cáncer puede ser inducido en pollos sanos al inyectarlos con un extracto libre de células de un tumor proveniente de un pollo enfermo, ésta fue la primera demostración de la existencia de los virus oncogénicos. <sup>(62)</sup></p>	
1916	<p>Frederick W Twort Descubrió al agente filterable responsable de la lisis bacterial y lo llamó "transformación vítrea". <sup>(62)</sup></p>	
1916	<p>Miles de personas huyen de Nueva York cuando la ciudad sufre una de las peores epidemias de la poliomielitis, que paraliza a 27,000 personas y mata a 9,000. <sup>(81)</sup></p>	

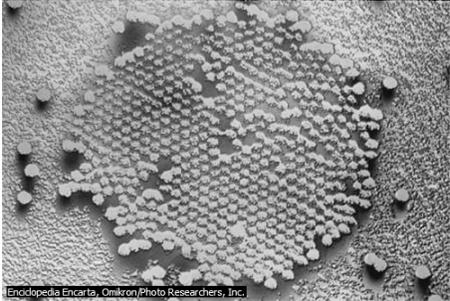
FECHA	EVENTO	
1917	Felix d'Herelle fue de los primeros en reconocer virus que infectaban bacterias siendo él quien los llama bacteriófagos. <sup>(62)</sup>	
1918 -1919	La llamada "gripe española" se cobró entonces entre 20 y 40 millones de vidas humanas, por lo que es considerada la mayor epidemia conocida. <sup>(70)</sup>	
1937	El descubrimiento de Walter Reed hizo que a la larga Max Theiler lograra la propagación del virus en embrión de pollo y produjera con éxito una vacuna atenuada que aun se usa en nuestros tiempos. <sup>(62)</sup>	

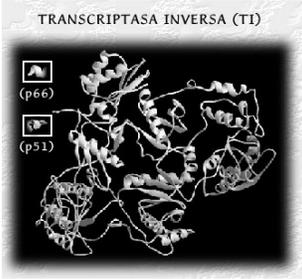
FECHA	EVENTO	
1920-1930	Woodruff y W. Goodpasture desarrollaron a lo largo de ésta década la técnica del embrión de pollo para la propagación de virus para su aislamiento y cultivo. <sup>(61)</sup>	
1930-1932	Durante estos años se comenzó a desarrollar la Microscopía electrónica, hasta llegar a 1932 cuando los Alemanes M. Knoll y E.H. Ruska producen el primer microscopio electrónico. <sup>(69)</sup>	
1941	Norman Gregg, médico australiano alertó sobre los efectos de la rubéola durante el embarazo. <sup>(98)</sup>	
1945	F M Burnet describe la fiebre amarilla proveniente de barcos de comercio Africanos. <sup>(99)</sup>	

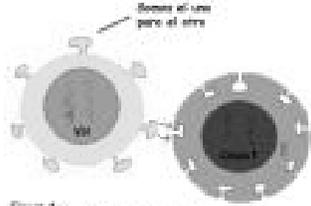
FECHA	EVENTO	
1949	J. F. Enders, F.C. Robinson y T.H. Weller, lograron cultivar al virus de la polio en tejido embrionario humano, iniciando la tecnología de cultivo celular. <sup>(21)</sup>	
1950	En ésta época científicos de la CSIRO en Australia ayudaron a introducir el virus del myxoma para matar conejos. Con el tiempo ésta medida se ha debilitado por resistencia de los animales, incrementándose la población de conejos nuevamente. <sup>(22)</sup>	 
1950 - 1960	<p>En 1954 se pone a prueba entre la población la primera vacuna contra la poliomielitis, creada por el científico Jonas Salk.</p> <p>En 1957, el investigador estadounidense, el Dr. Albert Sabin, creó la vacuna antipoliomielítica oral, derivada de un virus vivo debilitado.</p> <p>A mediados de los años 1960, la vacuna oral sustituirá a la vacuna de Salk. <sup>(76)</sup></p>	   

FECHA	EVENTO	
1952	<p>En éste año Hershey y Chase demostraron que el ADN aislado infectaba la bacteria, pero que en ausencia de ADN las proteínas no producían la infección, lo que probaba que sólo el ADN, y no las capas de proteínas, podía transmitir información genética. <sup>(62)</sup></p>	
1953	<p>Durante ésta época James Watson y Francis Crick descubren que la forma del ADN es de una doble hélice, poniéndole fin a la carrera por hacer éste descubrimiento en el mundo. <sup>(65)</sup></p>	
1954	<p>Los niños reciben la vacuna contra la poliomielitis por primera vez en México. <sup>(79)</sup></p>	
1956	<p>Se logra aislar al citomegalovirus. <sup>(97)</sup></p>	

FECHA	EVENTO	
1956	Greer y Schramm describen al priòn definiéndolo como un ácido nucleico infeccioso. <sup>(59)</sup>	
1957	Andre L. Woff establece las bases para la clasificación viral. <sup>(64)</sup>	
1957	El virólogo británico Alick Isaacs y su colega suizo Jean Lindermann fueron los primeros en identificar, en 1957, una de estas proteínas, en células de embriones de pollo. Se vio que interfería o impedía la infección de las células corporales por los virus. La llamaron interferón. <sup>(41)</sup>	
1959	Salvador E. Luria nació en Turín en 1917 y tras dedicar la mayor parte de su vida a la investigación viral, en especial en bacteriófagos, introduce el concepto de virus en éste año. <sup>(62)</sup>	

FECHA	EVENTO	
1960	Enders elabora la vacuna de sarampión. <sup>(62)</sup>	
1964	Bauden plantea enfermedades virales en plantas. <sup>(11)</sup>	
1966	Andre K. Wiff y Tyrbuer proponen una nueva clasificación viral. <sup>(64)</sup>	 <p><small>Enciclopedia Encarta, Omikron/Photo Researchers, Inc.</small></p>
1967	En Marburgo Alemania durante éste año se identificó un virus que causaba fiebre hemorrágica mortal al que se le dio el nombre de virus Marburg. <sup>(5)</sup>	

FECHA	EVENTO	
1970	Termin y Baltimore logran describir a la Transcriptasa Inversa, dando una nueva herramienta para el desarrollo de la virología. <sup>(41)</sup>	 <p>TRANSRIPTASA INVERSA (TI)</p> <p>(p66)</p> <p>(p51)</p>
1975	En 1975, Kohler y Milstein aislaron el primer anticuerpo monoclonal, con lo que logró desarrollar la técnica de ELISA, fundamental para el estudio de la virología. <sup>(62)</sup>	
1976	Fue el año en que se identificó al virus del Ebola, que atacó en Zaire matando al 80% de sus víctimas provocando una grave hemorragia interna y fiebre. <sup>(52)</sup>	
1977	Gracias al éxito de la campaña organizada por la OMS en 1967, la Viruela quedó confinada al continente africano, hasta llegar al último caso natural, registrado en durante este año en Somalia. <sup>(80)</sup>	

FECHA	EVENTO	
1981-1983	<p>Al principio de la década de 1980 se detectaron diversos fallecimientos debidos a infecciones oportunistas. Se comprobó que un gran número de estos fallecimientos se producían en varones homosexuales, inmunosuprimidos sin razón aparente. En 1983, un especialista francés en cáncer, Luc Montagnier, del Instituto Pasteur de París, consiguió aislar un nuevo retrovirus humano de un hombre que padecía un síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Este virus, conocido en la actualidad como VIH, resultó ser el agente causante del SIDA. <sup>(83)</sup></p>	
1983	<p>Tras la identificación del VIH se desarrollaron un grupo de medicamentos antirretrovirales, denominados análogos de los nucleósidos, que inhiben la acción de esta enzima; entre éstos se encuentran la zidovudina o AZT. <sup>(82)</sup></p>	
1996	<p>De esta manera, se aprobó la utilización en los bancos de sangre de una prueba de laboratorio suplementaria que permitía detectar estos antígenos y que permitía identificar el virus antes de que el sistema inmune fabricara sus anticuerpos. <sup>(41)</sup></p>	 <p>Figura 4 El virus se conecta a la célula T infectada</p>

FECHA	EVENTO	
2000	<p>Se publica el 7º reporte de la reunión de la ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), que se reúne cada 4 años, en el que se reconocen mas de 1550 especies de virus, pertenecientes a 3 ordenes, 56 familias, 9 subfamilias y 233 géneros. <sup>(77)</sup></p>	
2003	<p>En el mes de marzo la OMS lanzaba una alerta mundial advirtiendo sobre un contagioso tipo de neumonía detectado en Asia. Los científicos comenzaron a trabajar contrarreloj y en pocas semanas varios investigadores de Honk-Kong identificaron el virus que causaba la enfermedad y desarrollaron un sistema para detectarla en ocho horas, aunque el problema más grave era la falta de un tratamiento eficaz, ya que el virus se mostraba inmune a los antibióticos tradicionales. Este brote de neumonía se propagó en la región de Cantón, Hong Kong y se extendió hasta los Estados Unidos, Europa y Australia, contándose treinta países afectados debido a los viajeros. La lista pasó rápidamente a miles de enfermos y a centenares de muertos. No hay precedentes en la historia de una infección respiratoria que se haya expandido tan rápidamente como la gripe asiática, bautizada oficialmente como síndrome respiratorio agudo severo (SARS). <sup>(52)</sup></p>	 

## 1.2 CONCEPTO Y NATURALEZA DE LOS VIRUS

### CONCEPTO <sup>(10)</sup>

La palabra Virus proviene del latín, 'veneno'.

El término virus se utilizó en la última década del siglo XIX para describir a los agentes causantes de enfermedades más pequeños que las bacterias.

Los cientos de virus conocidos son causa de muchas enfermedades distintas en los seres humanos, animales, bacterias y plantas.

La definición moderna de virus y por supuesto la mas correcta es la siguiente:

“ Es un agente infeccioso que tiene material genómico, entidad microscópica, filtrable, capaz de replicarse en células procarióticas y eucarióticas, utilizando la maquinaria biosintética de la célula para generar nuevos viriones”. <sup>(74)</sup>

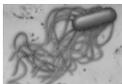
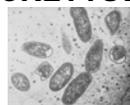
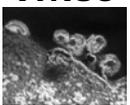
Virión: partícula viral completa, madura e infecciosa. Es la unidad estructural de los virus.

### NATURALEZA <sup>(10)</sup>

- Compuestos por:
  - RNA o DNA —nunca ambos— .
  - Capa protectora de proteínas o de proteína combinada con componentes lipídicos o glúcidos.
- El genoma puede ser:
  - Monocatenario ò Bicatenario.
  - Lineal ò Circular.
  - Segmentado o no.
- Naturaleza física:
  - Viables a temperaturas que van desde los 40° C hasta los – 196°C (N liq).
  - Resistentes a la purificación (obtención de vacunas).
  - Cristalizables (estudio de estructura).
- Naturaleza biológica:
  - Parásitos intracelulares obligados.
  - Submicroscópicos.
  - Capacidad de mutación.
  - Capacidad de infección celular.
  - Capacidad de hemaglutinación.
  - Antigénicos. <sup>(10)</sup>

### 1.3 CARACTERÍSTICAS COMPARADAS ENTRE LOS VIRUS Y OTROS MICROORGANISMOS.

Tabla 2

	<b>BACTERIA</b> 	<b>MYCOPLASMA</b>  (26)	<b>RICKETTSIAE</b> 	<b>CHLAMYDIAE</b> 	<b>VIRUS</b> 
Crecimiento en medios simples	✓	✓	✗	✗	✗
División binaria	✓	✓	✓	✓	✗
Ácidos nucleicos	✓	✓	✓	✓	✗
Ribosomas	✓	✓	✓	✓	✗
Susceptibilidad a antibióticos	✓	✓	✓	✓	✗
Susceptibilidad al interferón	✗	✗	✗	✓	✓

## 1.4 FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN A LOS VIRUS

Tabla 3 <sup>(10)</sup>

TIPO	FACTOR	MECANISMO DE ACCIÓN		OBSERVACIONES
FÍSICOS	TEMPERATURA	Al aumentarse produce: <ul style="list-style-type: none"> <li>Desnaturalización proteica de cápside.</li> <li>Disminución de la vida media.</li> </ul>		Con éste método pueden extraerse ácidos nucleicos a partir de virus inactivados.
	pH	Su sensibilidad aumenta al cambiar el pH con la presencia de factores como: <ul style="list-style-type: none"> <li>Sales en especial de Mg<sup>++</sup>.</li> <li>Proteínas.</li> <li>Cistina.</li> <li>Polisulfuros.</li> </ul>		La sensibilidad de los virus varia dependiendo del factor que se utilice.
	RADIACIONES	A través de luz UV a 260 nm de longitud de onda se afectan los ácidos nucleicos.		Éste agente resulta ineficiente debido a la presencia de mecanismos de reparación enzimáticos y genéticos.
QUÍMICOS	SOLVENTES	Inactivación de viriones encapsulados a través de éter al 20% .		No inactiva viriones desnudos.
	DESINFECTANTES	Actúan como bactericidas, los mas efectivos son: <ul style="list-style-type: none"> <li>Lysol.</li> <li>Roccal.</li> <li>Cloro.</li> </ul>		Son efectivos solo en algunos virus, y se requiere de concentraciones mas elevadas que las usadas inactivando bacterias.
	COLORANTES	Éstos se ligan al ácido nucleico viral, volviéndolo sensible a la inactivación por la luz, se utilizan: <ul style="list-style-type: none"> <li>Azul de toluidina.</li> <li>Rojo neutro.</li> <li>Proflavina.</li> </ul>		-
	ENZIMAS	Proteolíticas Son mas sensibles a éstas: <ul style="list-style-type: none"> <li>Pronasa.</li> </ul>	Lipolíticas Virus encapsulados: <ul style="list-style-type: none"> <li>Fosfolipasas A y C.</li> </ul>	Para utilizar éste método hay que saber elegir la enzima correcta.
	DETERGENTES	No iónicos Solubilizan lípidos de membrana y desnaturalizan proteínas. <ul style="list-style-type: none"> <li>Nonidet P450.</li> <li>Triton X100.</li> </ul>	Aniónicos Además de los efectos no iónicos solubilizan cubiertas y cápsides en polipéptidos separados <ul style="list-style-type: none"> <li>Dodecilsulfato de sodio.</li> </ul>	-
	MUTÁGENOS	Se utilizan 3 clases: <ul style="list-style-type: none"> <li>Análogos de las bases del DNA modificándolo en la autoduplicación.</li> <li>Alteradores químicos de las bases del DNA en reposo.</li> <li>Eliminadores de las bases del DNA.</li> </ul>		El objetivo de éste método es el de inducir progenie viral alterada.

(10)

## 1.5 ORGANIZACIÓN DE LOS VIRUS

Tabla 4

<b>ESTRUCTURA</b>	FORMA	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Esférica.</li> <li>▪ En ladrillo.</li> <li>▪ Filamentosa.</li> </ul>		
	TAMAÑO	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Oscila entre el de las bacterias mas pequeñas y el de las macromoléculas.</li> <li>▪ Se mide su diámetro en nm.</li> </ul>		
	ENVOLTURA	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Envueltos (si).</li> <li>▪ Desnudos (no).</li> </ul>		
	SIMETRÍA DE NUCLEOCÁPSIDE	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Icosaédrica.</li> <li>▪ Helicoidal.</li> <li>▪ Compleja.</li> </ul>		
<b>COMPOSICIÓN QUÍMICA</b>	ÁCIDO NULÉICO	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ DNA.</li> <li>▪ RNA.</li> </ul>	Genoma viral.	Nucleocápside.
	PROTEÍNAS	Cápside.	-	

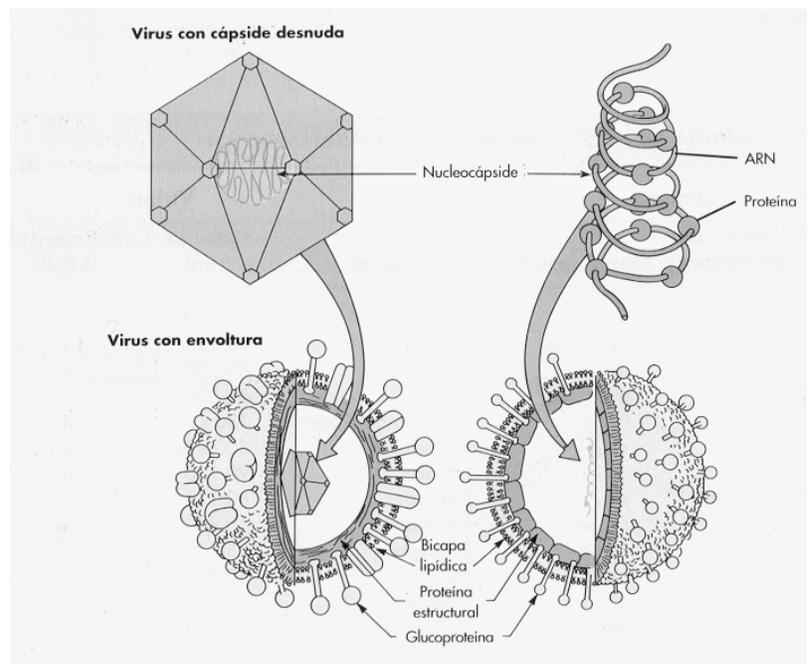


FIGURA 1: Estructuras de un virus con cápside desnuda (arriba, izquierda) y de otro con envoltura, dotados de una nucleocápside icosaédrica (izquierda) o de una ribonucleocápside helicoidal (derecha). La ribonucleocápside helicoidal está formada por proteínas víricas asociadas con un genoma RNA.<sup>(40)</sup>

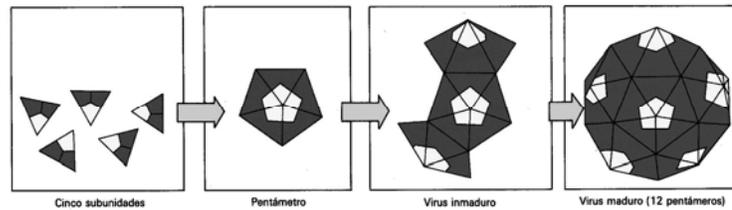


FIGURA 2: Ensamblaje de la cápside icosaédrica de un picornavirus. Las proteínas individuales se asocian en subunidades que se asocian en protómeros, capsómeros y una procápside vacía. La inclusión del genoma RNA (+) desencadena su conversión en la cápside final.<sup>(40)</sup>

Es importante desarrollar después de la estructura, la **FUNCIÓN** que cumplen cada uno de los componentes. Estructura y función siempre van juntas, pues si cambiara la estructura, simultáneamente cambiaría la función. Para éste efecto a continuación se presenta una tabla en la que podemos relacionar al componente específico del virus con su composición química y función.<sup>(40)</sup>

PARTE CONSTITUYENTE	COMPOSICIÓN QUÍMICA	FUNCIÓN
CORE	Ácido nucleico (DNA ó RNA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Código genético</li> <li>• Infectividad</li> </ul>
CAPSÓMEROS	Proteína	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cubrir y proteger al core</li> <li>• Forma y tamaño</li> <li>• Peso molecular</li> </ul>
CÁPSIDE	Formada por capsómeros	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Componente antigénico</li> <li>• Receptor en los virus desnudos</li> </ul>
MEMBRANA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína</li> <li>• Lípidos</li> <li>• Glúcidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus envueltos</li> <li>• Forma</li> </ul>
ESPÍCULAS	Glicoproteína No siempre se presentan	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus envueltos</li> <li>• Se proyectan desde la membrana</li> <li>• Antigenicidad</li> <li>• Receptor</li> </ul>
PROYECCIONES	Glicoproteína No siempre se presentan	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus desnudos</li> <li>• Nombre específico al virus</li> <li>• Antigenicidad</li> <li>• Receptor</li> </ul>

TABLA 5: Partes, Función y Composición química de los virus.

## 1.6 MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LOS VIRUS

Tabla 6

	MÉTODO	FUNDAMENTO
<b>FÍSICOS</b>	CENTRIFUGACIÓN	Principio basado en la fuerza centrípeta para separar sustancias de diferentes densidades.
	ELECTROFORESIS	Movimiento de partículas eléctricamente cargadas a través de un gas o líquido como resultado de un campo eléctrico formado entre unos electrodos sumergidos en el medio.
	ESPECTROFOTOMETRÍA	El espectrofotómetro se usa para medir la intensidad de un espectro determinado en comparación con la intensidad de luz procedente de una fuente patrón. Esta comparación permite determinar la concentración de la sustancia que ha producido ese espectro.
<b>QUÍMICOS</b>	CROMATOGRAFÍA	Técnica de análisis químico utilizada para separar sustancias puras de mezclas complejas. Esta técnica depende del principio de adsorción selectiva.
	PRECIPITACIÓN	Proceso o fenómeno de formación de un segundo estado o fase de la materia, dentro de una primera fase.
	DIÁLISIS	Método que utiliza una membrana semipermeable para separar diversos elementos, ej. Hemodiálisis.
<b>MICROSCOPIA ELECTRÓNICA</b>	DE TRANSMISIÓN	Se dirige el haz de electrones hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada del espécimen. Se debe cortar la muestra en capas finas, no mayores de un par de miles de angstroms. Se coloca una placa fotográfica o una pantalla fluorescente detrás del objeto para registrar la imagen aumentada. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces.
	DE BARRIDO	El objeto se puede colocar con muy pocos preparativos. Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz muy concentrado de electrones, Los cuales pueden dispersarse al alcanzar la muestra o provocar la aparición de electrones secundarios. Estos son recogidos y contados por un dispositivo electrónico situado a los lados del espécimen. Cada punto leído de la muestra corresponde a un píxel. Cuanto mayor sea el número de electrones contados por el dispositivo, mayor será el brillo del píxel en la pantalla. A medida que el haz de electrones barre la muestra, se presenta toda la imagen de la misma en el monitor. Se pueden ampliar los objetos 100.000 veces o más, produciéndose imágenes tridimensionales realistas de la superficie del objeto.

	MÉTODO	FUNDAMENTO
<b>MÉTODOS INMUNOLÓGICOS</b>	ELISA	Procedimiento de ensayo inmunoenzimático, el cual recurre al empleo de inmunógenos, haptenos o anticuerpos marcados con una enzima, para revelar el reactivo complementario a nivel de distintos fluidos biológicos.
	INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN	La prueba de inhibición de la hemaglutinación esta basada en la inhibición de la hemaglutinina viral por un anticuerpo específico. La prueba detecta indirectamente, la presencia de un virus hemaglutinante. Debido a que el virus es una proteína extraña, propiciará la formación de anticuerpos en el hospedero. Si el suero del hospedero inhibe la hemaglutinación de un virus que normalmente lo hace, entonces significa que el virus se encontraba en el hospedero.
	HEMADSORCIÓN	La adsorción específica de los eritrocitos al cultivo celular provee un acercamiento práctico al diagnóstico de una infección viral, antes de que el CPE sea observado o en casos en donde el agente se puede propagar sin daños aparentes a las células. Esta técnica fue desarrollada por Vogel y Shelokov. La prueba debe hacerse con sangre O positiva de humano, becerro, cerdo de guinea, oveja, rata, mono rhesus y pollo a una temperatura de 37° C, ambiente o a 4° C.
	HEMAGLUTINACIÓN	Algunos virus o el antígeno derivado de ellos, se adsorben a los eritrocitos a través de receptores en sus membranas. Como resultados los eritrocitos se aglutinan.
	RIA (RADIOINMUNOANALISIS)	Competencia por un sitio de unión específica (anticuerpo), entre una sustancia marcada radioactivamente (antígeno marcado) y una muestra similar no marcada.
	WESTERN BLOT	Técnica de separación e identificación de proteínas inmunogénicas.
	NEUTRALIZACIÓN	El suero y los virus se unen bajo ciertas circunstancias y son inoculados en un hospedero susceptible (animal, embrión de pollo ó cultivo celular). Si los anticuerpos para el virus en cuestión están ausentes, la enfermedad, lesiones o la muerte podría presentarse. Cuando los anticuerpos están presentes no se observan estas reacciones.

	MÉTODO	FUNDAMENTO
<b>MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b>	PCR	La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) utiliza una enzima llamada polimerasa para multiplicar rápidamente un pequeño fragmento de ácido nucléico.
	SLOT BLOT	Un análisis de DNA por dot blot o slot blot es similar en principio a un Southern blot, en que el DNA inmovilizado en un soporte sólido es hibridado con una sonda complementaria. Sin embargo, el DNA no es digerido ni sometido a electroforesis a través de un gel.
	SOUTHERN BLOT	Estudios de fragmentos de ADN, detectados por hibridación con sondas radioactivas.
	HIBRIDACIÓN <i>in situ</i>	Consiste en mapear un gen por hibridación molecular de una secuencia clonada de ADN marcado con radioactividad o fluorescencia, en un cromosoma extendido sobre una laminilla.
	NORTHERN BLOT	Técnica de estudio de las moléculas de ARN.
	CAPTURA DE HÍBRIDOS	La captura de híbridos es una prueba de DNA no radiactiva similar a un inmunoanálisis, el cual provee resultados cuantitativos.
	RFLP (RESTRICTION FRAGMENTS LENGTH POLYMORPHYSM)	Detección de fragmentos de DNA de distinto peso molecular (por digestión con la misma enzima de restricción) en diferentes organismos, es necesario utilizar sondas específicas para visualizar sólo ciertos fragmentos mediante la técnica de Southern Blot. Las sondas de DNA para esta técnica suelen corresponder a genes previamente conocidos, aunque a veces se usan DNA preparados a partir de amplificaciones inespecíficas; el resultado es muy preciso. Cuando se emplea la PCR en lugar de sondas radiactivas para visualizar los polimorfismos, se le denomina PCR-RFLP.

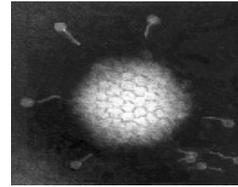
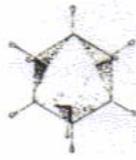
(2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

# 1.7 CLASIFICACIÓN DE LOS VIRUS

Tabla 7: En ésta clasificación solo incluiremos a virus que afectan a los animales y con importancia médica. D: Doble; S: Sencilla; H: Helicoidal; I: Icosahédrico.

FAMILIA	Adenoviridae	Hepadnaviridae	Herpesviridae	Papovaviridae	Parvoviridae	Poxviridae	Arenaviridae	Bunyaviridae	Caliciviridae	Coronaviridae	Filoviridae	Orthomixoviridae	Paramixoviridae	Rhabdoviridae	Picornaviridae	Reoviridae	Retroviridae	Togaviridae	
GÉNEROS	Mastadenovirus	Hepadnavirus	1.Simplexvirus 2.Varicellavirus 3.Citomegalovirus 4. Lymphocryptovirus	1. Papilomavirus 2. Polymavirus	Parvovirus	1. Ortopoxvirus 2. Parapoxvirus	Arenavirus	1. Bunyavirus 2. Phlebovirus 3. Nairovirus 4. Uukvirus 5. Hantavirus	Calicivirus	Coronavirus	Filovirus	1. Influenzavirus 2. Ortomixovirus	1. Paramixovirus 2. Morbillivirus	Lyssavirus	1. Rinovirus 2. Enterovirus	1. Rotavirus 2. Reovirus	1. Oncovirus 2. Spumavirus 3. Lentivirus	1. Rubivirus 2. Alphavirus	
VIRUS	Adenovirus	VHB	1. Herpes simple 1,2 2. Varicela zoster (3) 3. CMV (4) 4. Epstein Barr (5) Herpes 6,7	✓	B19	1. Viruela 2. Vaccinia	Coriomeningitis linfocítica	-Fiebre del jeñen -Encefalitis de california	Norwalk	✓	- Marburg -Ebola	1. Gripe	- Parainfluenza -Sarampiòn -Parotiditis -Sincital Resp.	Rabia	1. Rinovirus 1. VHA 2. Poliovirus 2. Enterovirus	✓	-VIH -HTLV 1,2	- Rubeola -Fiebre amarilla	
L-H-T	AC. NUC.	DNA	DNA	DNA	DNA	DNA	RNA	RNA	RNA	RNA	RNA	RNA	RNA	RNA	RNA	RNA	RNA	RNA	
	CADENA	D	D	D	D	S	D	S	S	S	S	S	S	S	S	D	S	S	
	SIMETRÍA	I	I	I	I	I	H	H	H	I	H	H	H	H	H	I	I	I	
	ENVOLTURA	*	✓	✓	*	*	✓	✓	✓	*	✓	✓	✓	✓	*	*	✓	✓	
	# CAPSOM	252		162	72	32				32						32	32		32
VIRIÓN	TAMAÑO nm	70-90	42	150-200	45-55	22	200-390	50-300	100	40	60-220	800-900 X 80	80-120	150-300	70-80 X 130-240	22-30	60-80	100	40-75
	NATURALEZA	L	C	L	C	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	RX ÉTER	R		S	R	R	R	S	S	R	S		S	S	S	R	R	S	S
DE ACUERDO A:	ANATOMO-PATOLÓGICAS	Adenovirus	VHB				Coriomeningitis linfocítica								-Rinovirus -VHA				
	LUGAR DE HALLAZGO							Encefalitis de california	Norwalk		Marburg								
	SIGLAS					B19											-VIH -HTLV 1,2		
	TÉRMINO COMPUESTO			CMV															
	DESCUBRIDOR			Epstein Barr															

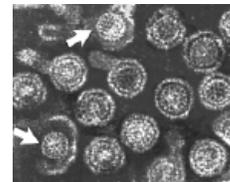
## ADENOVIRUS <sup>(85)</sup>



Virus relacionados y enfermedades que provocan:

- Adenovirus → Resfriado común.

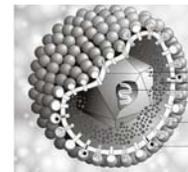
## HEPADNAVIRUS <sup>(87)</sup>



Virus relacionados y enfermedades que provocan:

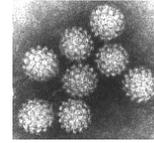
- Hepatitis B → Hepatitis, Cáncer de Hígado.
- Hepatitis D → solo incluido debido a su dependencia al VHB para su propagación.

## HERPESVIRUS



Virus relacionados y enfermedades que provocan:

- Citomegalovirus → Defectos de nacimiento.
- Virus Epstein-Barr (VEB) → Mononucleosis, cáncer nasofaríngeo.
- Herpes simple tipo 1 → Herpes labial.
- Herpes simple tipo 2 → Lesiones genitales.
- Virus herpes humano 8 (VHH8) → Sarcoma de Kaposi.
- Varicela-zóster → Varicela, Herpes zóster.

**PAPOVAVIRUS** <sup>(89)</sup>

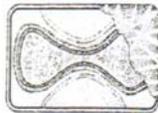
Virus relacionados y enfermedades que provocan:

- Papilomavirus → Verrugas, cáncer de cuello del útero.
- Papovavirus JC, BK, SV40.

**PARVOVIRUS** <sup>(96)</sup>

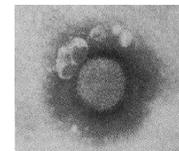
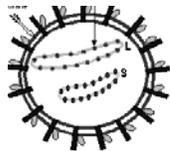
Virus relacionados y enfermedades que provocan:

- Parvovirus B19m → Eritema infeccioso, anemia crónica.

**POXVIRUS** <sup>(94)</sup>

Virus relacionados y enfermedades que provocan:

- Ortopoxvirus → Viruela (erradicada).
- Virus de la vacuna.
- Virus del Molluscum contagiosum.

**ARENAVIRUS** <sup>(67)</sup>

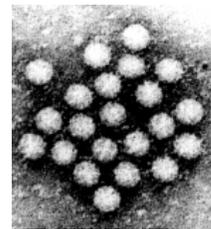
Virus relacionados y enfermedades que provocan:

- Arenavirus → Diarreas de viajero.

**BUNYAVIRUS** <sup>(72)</sup>

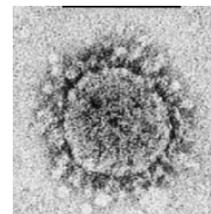
Virus relacionados y enfermedades que provocan:

- Hantaan → (HFRS) Insuficiencia renal, con fiebre hemorrágica.
- La Crosse → Encefalitis (infección cerebral).
- Hanta virus pulmonar → (HPS) Síndrome pulmonar.
- Flevovirus → Fiebre de la mosca de arena.
- Fiebre hemorragia de Crimean- Congo → (CCHFV) Fiebre hemorrágica.

**CALICIVIRUS** <sup>(78)</sup>

Virus relacionados y enfermedades que provocan:

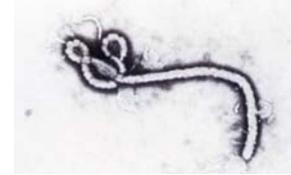
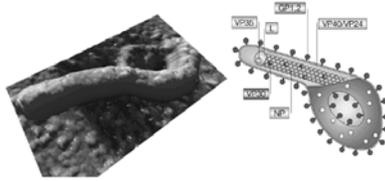
- Agente Norwalk → Gastroenteritis (diarrea y vómito).

**CORONAVIRUS** <sup>(100)</sup>

Virus relacionados y enfermedades que provocan:

- Corona → Resfriado común.

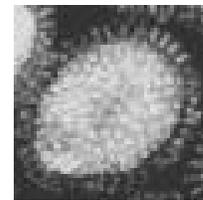
## FILOVIRUS <sup>(75)</sup>



Virus relacionados y enfermedades que provocan:

- Ébola → Fiebre hemorrágica.
- Marburg → Fiebre hemorrágica.

## ORTOMIXOVIRUS <sup>(73)</sup>



Virus relacionados y enfermedades que provocan:

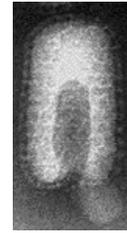
- Influenzavirus → Tipos A y B → Gripe ligera.
- Ortomixovirus → Tipo C → Gripe grave.

## PARAMIXOVIRUS <sup>(91)</sup>



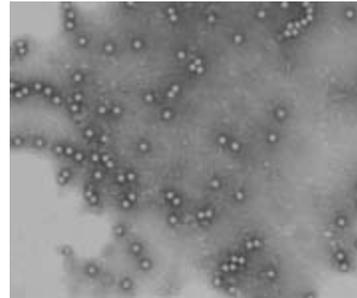
Virus relacionados y enfermedades que provocan:

- Sarampión → Sarampión.
- Paperas → Paperas.
- Parainfluenza → Resfriado común, infecciones del oído.

**RHABDOVIRUS** <sup>(92)</sup>

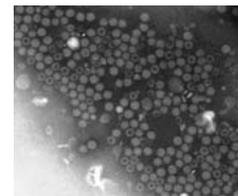
Virus relacionados y enfermedades que provocan:

- Rabia → Rabia.

**PICORNAVIRUS** <sup>(90)</sup>

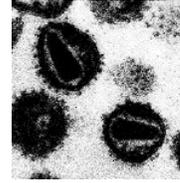
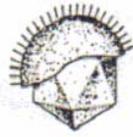
Virus relacionados y enfermedades que provocan:

- Coxsackievirus → Enterovirus.
- Echovirus → Enterovirus.
- Hepatitis A → Hepatitis.
- Poliovirus → Poliomiелitis.
- Rinovirus → Resfriado común.

**REOVIRUS**

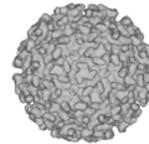
Virus relacionados y enfermedades que provocan:

- Rotavirus → Diarrea.

**RETROVIRUS** <sup>(24)</sup>

Virus relacionados y enfermedades que provocan:

- Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) → SIDA.
- Virus de la leucemia humana de las células T (VLHT-1) → Leucemia de células T del adulto, linfoma, enfermedades neurológicas.

**TOGAVIRUS** <sup>(66)</sup>

Virus relacionados y enfermedades que provocan:

- Encefalomielitis equina del este → Encefalitis.
- Rubéola → Rubéola, Defectos de nacimiento.

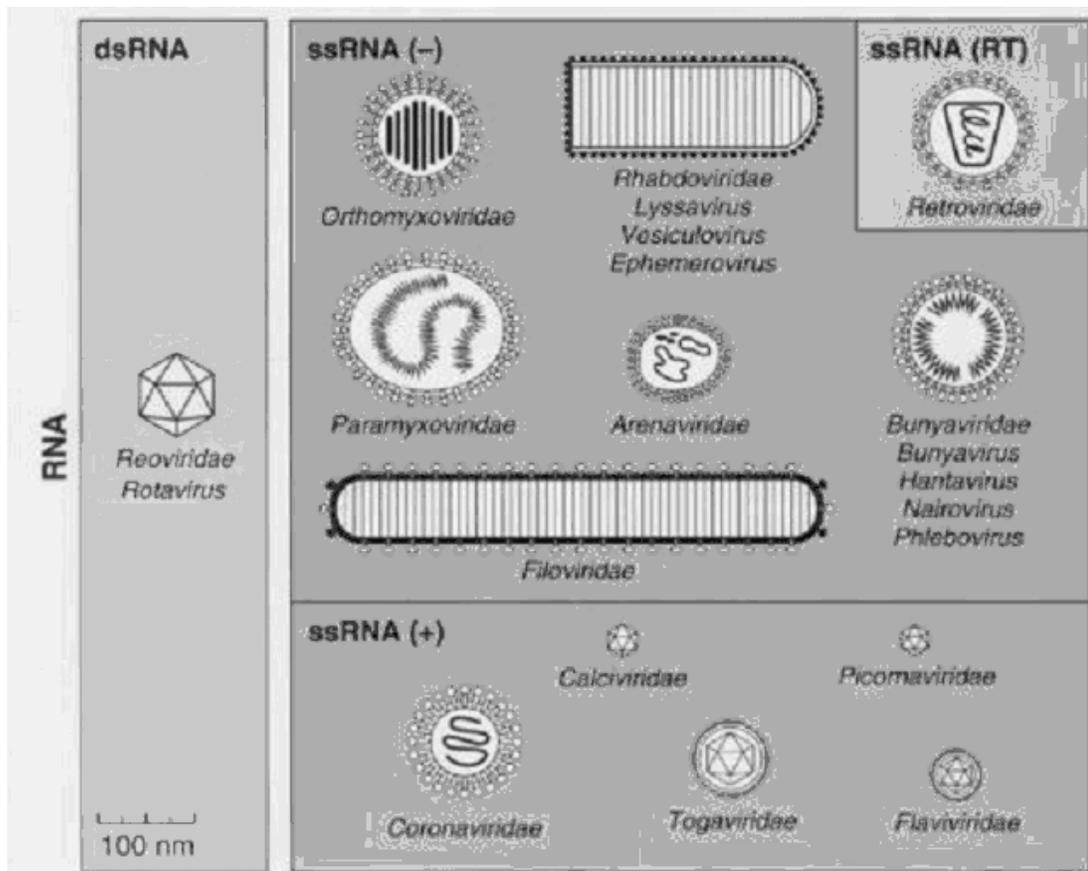
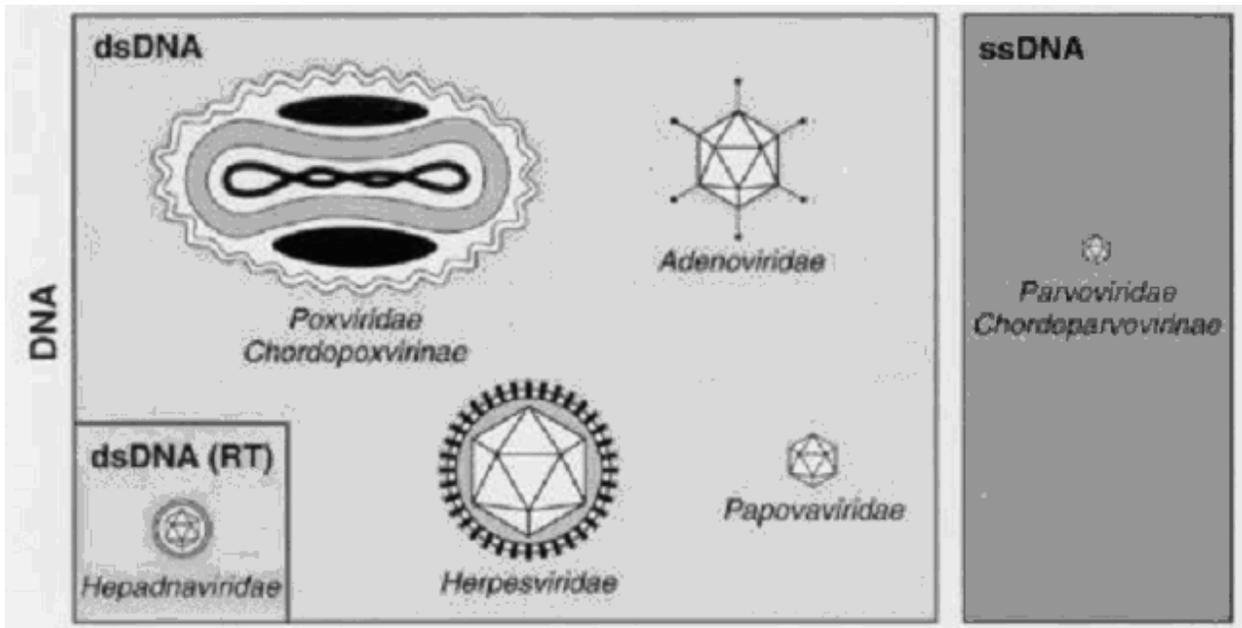


FIGURA 3: Clasificación de los virus<sup>(35)</sup>

## UNIDAD PROGRAMÁTICA II

# REPLICACIÓN VIRAL

### OBJETIVOS

3. Establecer la relación existente en el complejo virus - célula.
4. Conocer las diferentes etapas de la replicación viral de los diferentes grupos virales.

## 2.1 FASES OBSERVADAS DURANTE LA REPLICACIÓN VIRAL

Los eventos de la replicación viral son:

FASE	ETAPA	ESQUEMA	PATOGÉNICAMENTE
DE INICIO	Reconocimiento	1	ECLIPSE
	Fijación		
DE ENTRADA	Penetración		
	Desnudamiento		
DE REPLICACIÓN	Síntesis temprana	2	
	Replicación (del genoma)		
	Síntesis tardía		
DE LIBERACIÓN	Maduración	3	LIBERACIÓN
	Ensamblaje		
	Liberación		

Tabla 8: Fases de la replicación viral por etapas tanto fisiológicas como patogénicas.

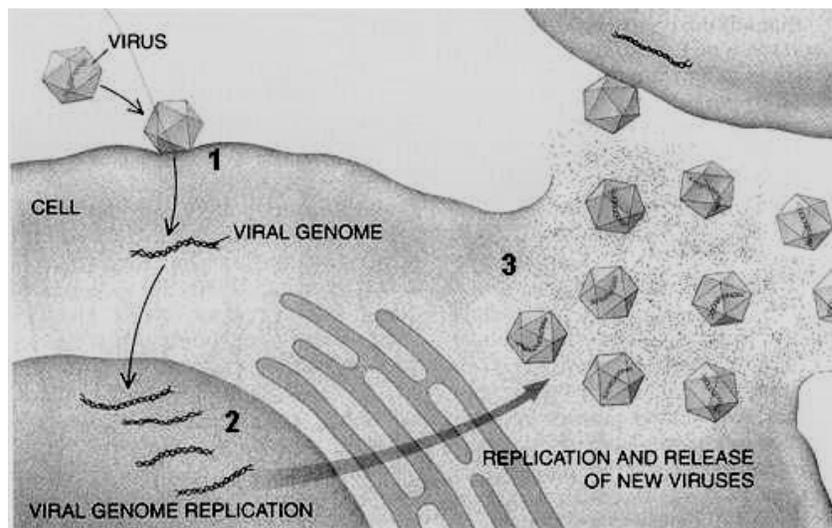


FIGURA 4: Replicación general de un virus icosaédrico desnudo.

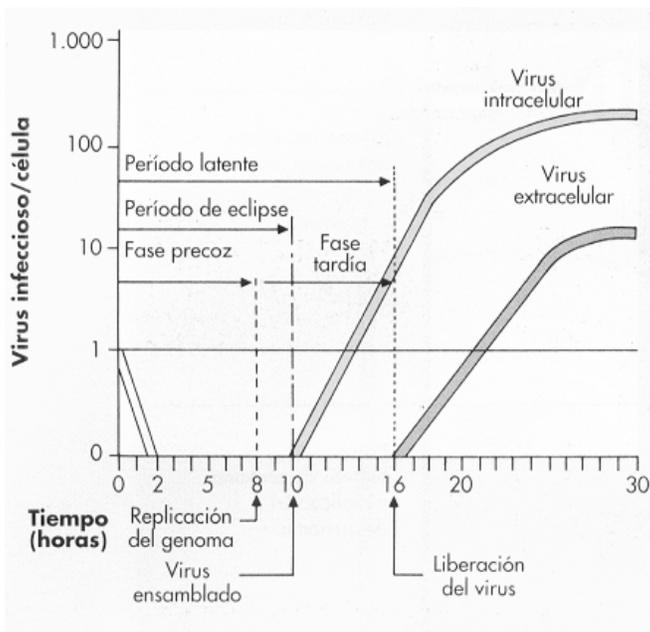
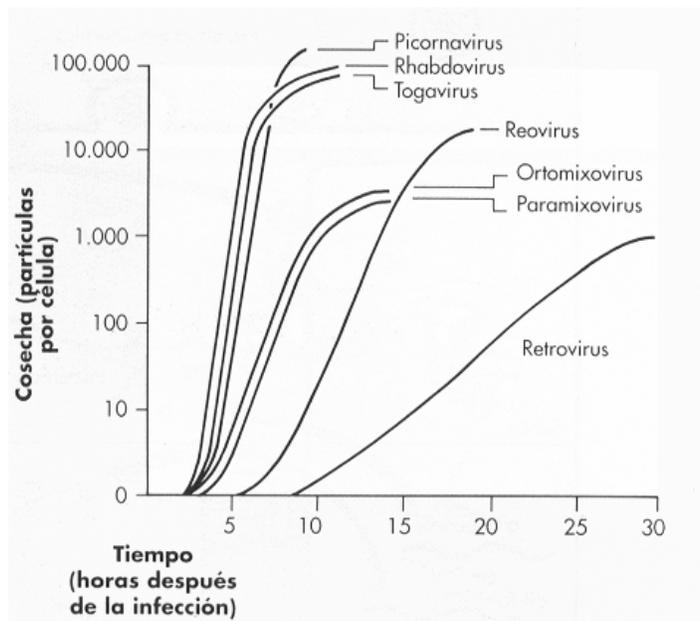


FIGURA 5: Curva de crecimiento en un solo ciclo de un virus liberado mediante lisis celular. Los diferentes estadios están definidos por la presencia o ausencia de componentes víricos visibles (período de eclipse), virus infecciosos en el medio (período latente) o síntesis de macromoléculas ( fase precoz/ tardía).<sup>(40)</sup>

FIGURA 6: Curva de crecimiento y tamaño del estallido de virus representativos.<sup>(40)</sup>



## Tipos de infección viral

1. Abortiva: infección que cumple un ciclo incompleto en el cual no se forman partículas virales infecciosas.
2. Productiva: infección que culmina con la generación de una progenie viral infecciosa.

Las células pueden responder de varias formas frente a una infección viral:

1. No se observa ninguna alteración aparente.
2. Se presenta un efecto citopático (muerte celular por lisis).
3. Se presentan cuerpos de inclusión: acúmulos de viriones o de subunidades virales no reunidas, pueden romper la estructura celular o sus funciones llegando a inducir la muerte celular.
4. Hiperplasias como la transformación celular: alteración que resulta en la generación de tumores o leucemia produciendo las siguientes alteraciones específicas:
  - Estimulación de síntesis de ADN celular.
  - Alteraciones de superficie como nuevas especificidades antigénicas.
  - Aberraciones cromosómicas.
  - Alteraciones en las propiedades de crecimiento. (3,4,6,18,46,50,60)

## 2.2 FASE DE INICIO DE LA REPLICACIÓN VIRAL

### a. RECONOCIMIENTO

Este es el primer evento que ocurre dentro del ciclo de replicación viral y consiste en la formación del complejo virus – célula que se forma en el momento que el virus, a través de sus receptores específicos, se une a los receptores celulares correspondientes. Esta unión puede ser de dos tipos:

**INESPECÍFICA:** corresponde a un tipo de infección abortiva.

**ESPECÍFICA:** corresponde al tipo de infección productiva. (3,4,6,18,46,50,60)

Las estructuras responsables de la unión específica al receptor son las proteínas de la cápside o en el caso de los virus con envoltura las glicoproteínas (prolongaciones) que forman las espículas. El mecanismo de acción de esta etapa se describe por pasos a continuación:

1. Atracción de fuerzas iónicas: A pH 7 los virus y las células tienen cargas negativas de modo que es necesaria la presencia de iones positivos, cumpliendo muy eficazmente este requerimiento los iones de magnesio. <sup>(3,4,6,18,46,50,60)</sup>
2. Interacción de sitios específicos de la partícula viral (espículas o prolongaciones y cápsides) con receptores celulares específicos: aquí es en donde se encuentra la especificidad de los virus a las células en las que se albergan. <sup>(3,4,6,18,46,50,60)</sup>. Los dos puntos anteriores se aprecian mejor en las figuras 7 y 8, respectivamente.

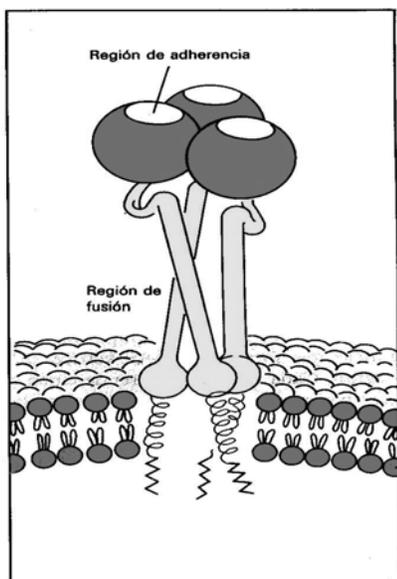


FIGURA 7: Esquema del trímero de la glucoproteína hemaglutinina del virus de la gripe A, un ejemplo de proteína espicular. La región para unión al receptor celular está descubierta en la superficie de la proteína espicular. En condiciones de leve acidosis, la HA cambia de conformación para exponer una secuencia hidrofóbica en la "región de fusión".

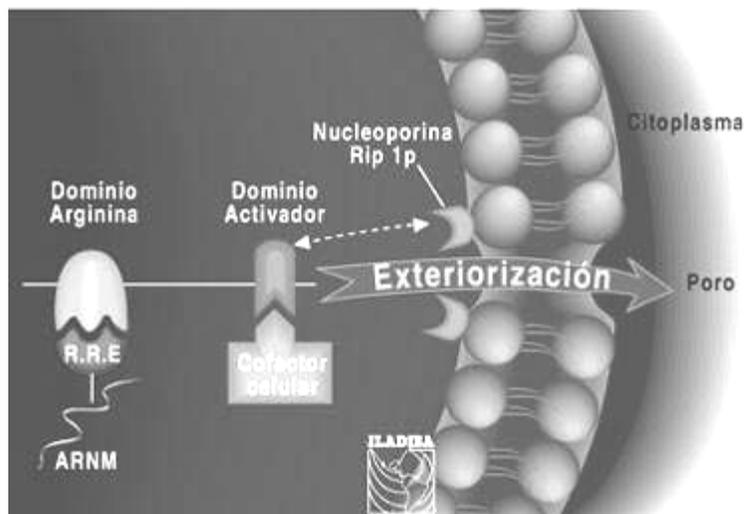


FIGURA 8: Esquema del mecanismo de reconocimiento entre la nucleoporina Rip 1p y un Dominio Activador asociado a un cofactor celular.

La interacción receptor celular – proteínas de adherencia viral es el acontecimiento inicial que determina si las células pueden ser infectadas o no por un virus. Por lo tanto tenemos:

- ◆ Célula permisiva.
- ◆ Célula no permisiva.
- ◆ Célula semipermisiva. <sup>(3,4,6,18,46,50,60)</sup>

## b. FIJACIÓN

La línea que divide los eventos de reconocimiento, fijación y penetración correspondiente a la fase de entrada, es muy fina, ya que puede englobarse en un mismo acontecimiento, pero para los términos que utilizamos en esta explicación la fijación se da únicamente cuando el virus es reconocido por la célula a través de las proteínas de adherencia del virus y este, por lo tanto comienza a introducirse a la célula, como se esquematiza en las figuras 9 y 10. (3,4,6,18,46,50,60)

Luego de adsorbido un virus a una célula, éste puede ser recuperado con sus características de partícula libre potencialmente infectante. (3,4,6,18,46,50,60)

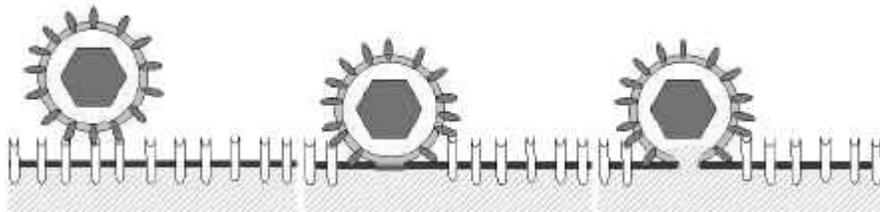


FIGURA 9: Fase de entrada de un virus icosaédrico envuelto.

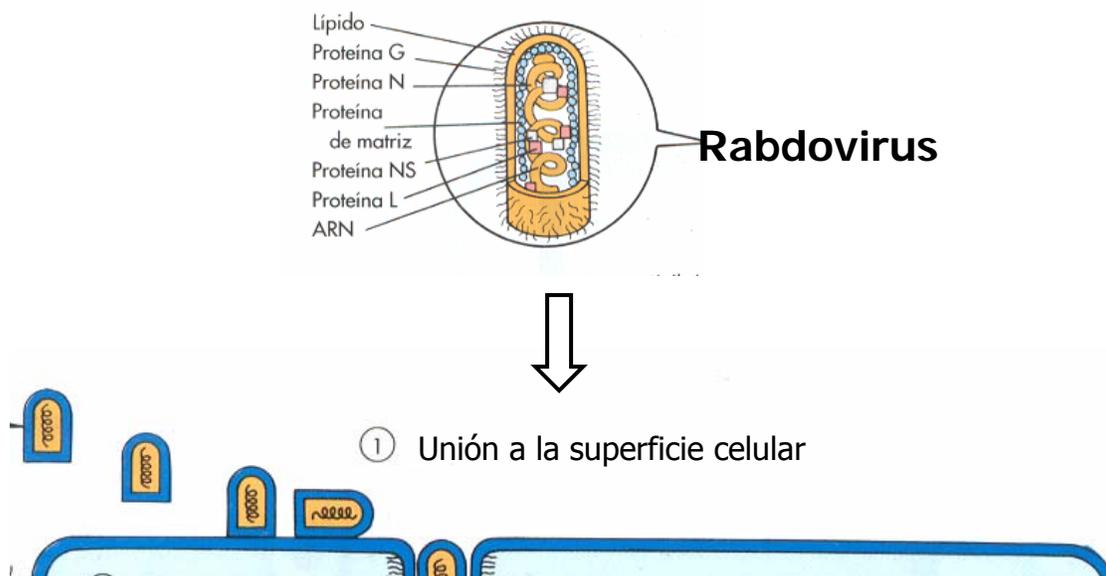


FIGURA 10: Esquema de la Fase de entrada del Rabdovirus<sup>(40)</sup>

## 2.3 FASE DE ENTRADA

### PENETRACIÓN

El segundo paso en el proceso de infección viral es la penetración del virión dentro de la célula hospedadora.

La penetración de los virus una vez adsorbidos, puede realizarse de varias maneras:

#### A. Viropexis o Endocitosis:

Proceso semejante a la fagocitosis, en el cual se produce una invaginación de la membrana plasmática, de modo que el virus queda englobado en una vesícula dentro del citoplasma celular desde la cual se lleva al aparato de Golgi en donde se libera la nucleocápside. Es el mecanismo mas común de penetración de los virus y la figura 11 lo muestra en tres etapas, en tanto la figura 12 muestra imágenes microscópicas. (3,4,6,18,46,50,60)

#### B. Penetración o inyección:

En algunos, la penetración acontece por un simple cruce de la membrana plasmática, así el genoma viral queda directamente incluido en el citoplasma. (3,4,6,18,46,50,60)

#### C. Fusión

Como su nombre lo dice, éste tipo de penetración se da por fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática. También en este caso el virus es directamente incorporado al citoplasma, lugar en donde se permite la liberación de la nucleocápside. Este proceso solo se lleva a cabo en virus envueltos. (3,4,6,18,46,50,60)

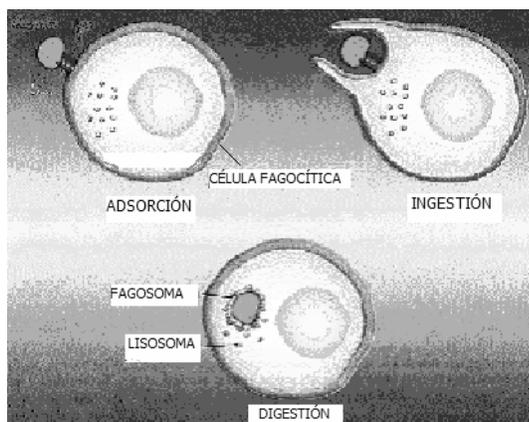


FIGURA 11: Viropexis de una partícula viral a una célula.

En algunos sistemas, se efectúa por endocitosis mediada por receptores, con captación de las partículas virales ingeridas dentro de endosomas. (3,4,6,18,46,50,60)

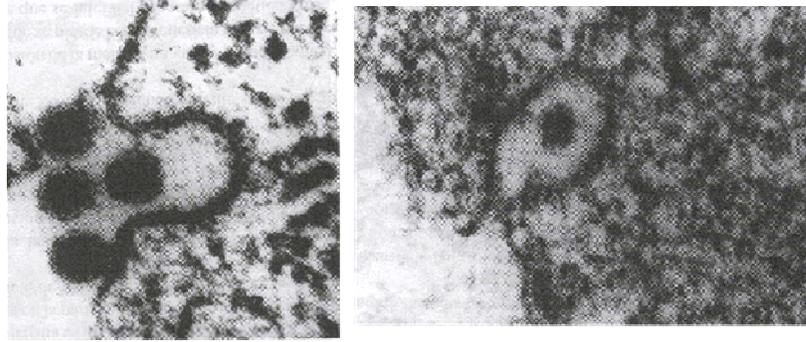


FIGURA 12: La imagen de la izquierda muestra 4 partículas virales, de las cuales una es la que está ingresando a la célula. Lo normal es el ingreso de una sola partícula. La de derecha muestra la partícula viral que ha ingresado a la célula y se encuentra en el hoyo cubierto. La membrana de la célula se ha reparado, hecho normal en la biología celular. Una vez en el citoplasma, el virus generalmente ingresa a los endosomas, a los cuales se les unen los lisosomas, que producen la liberación del ácido nucleico del virus. <sup>(23)</sup>

## DESNUDAMIENTO

El ácido nucleico necesita ser liberado de la cápside para estar disponible a su replicación, los pasos de éste proceso son los siguientes:

- Desintegración del virus, dependiendo de éste se lleva a cabo en vacuolas, núcleo o citoplasma.
- Queda libre el ácido nucleico (AN).
- El AN comanda su propia replicación y la de las proteínas necesarias para integrar nuevas partículas virales.
- La forma en que un virus pierde la cápside y su envoltura, en el caso de tenerla, es característico de cada grupo de virus.

La pérdida de la cubierta ocurre de manera concomitante con la penetración o poco después de la misma. En este momento se pierde la infectividad del virus original. Los virus son los únicos agentes infecciosos en los que la disolución del agente infectante es una etapa obligatoria de la vía de la replicación. <sup>(3,4,6,18,46,50,60)</sup>

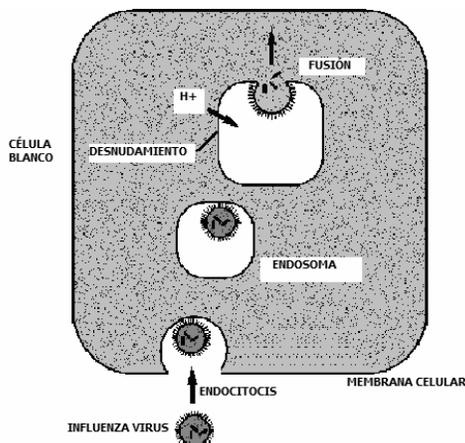


FIGURA 13: Esquema de la penetración a una célula y desnudamiento del virus de influenza. Nótese que para que sea liberado el DNA viral es necesaria una acidificación del medio.

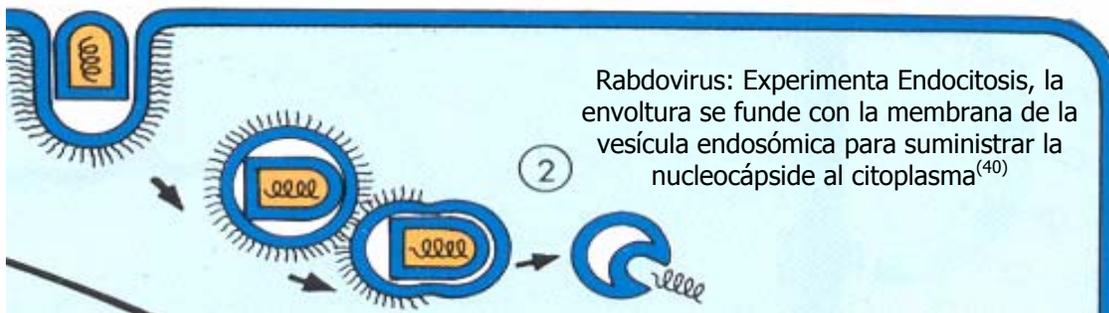


FIGURA 14: Esquema de la penetración a una célula y desnudamiento del Rabdovirus.

## 2.4 FASE DE REPLICACIÓN

### a. Síntesis temprana

Los fenómenos descritos anteriormente, adsorción, penetración y desnudamiento, culminan con la desintegración de las partículas, pero no siempre el proceso progresa hasta la replicación viral. Si interrumpimos el ciclo en esta etapa, llamada también eclipse, el ácido nucleico liberado de sus envolturas puede recobrase por disrupción de la célula hospedadora, pero habría perdido su infectividad. Si el proceso continúa, comienza la replicación del ácido nucleico y síntesis de las proteínas estructurales y no estructurales necesarias para la producción de virus.<sup>(19)</sup>

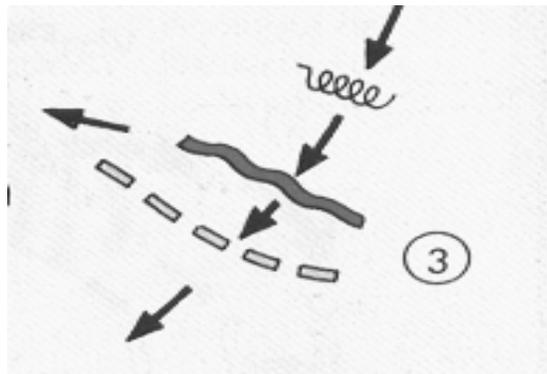


FIGURA 15: El virión del Rabdovirus debe contener una polimerasa y producir 5 ARNm individuales y una plantilla ARN (+) de longitud completa.<sup>(40)</sup>

## b. Replicación del genoma

### Replicación del Ácido Nucleico

La replicación es un fenómeno muy heterogéneo por que existe mucha variedad en los ácidos nucleicos de origen viral, debido a que el ADN o el ARN puede ser de una o dos cadenas, segmentado o no etc.

En todos los casos, el genoma viral es el elemento capaz de:

- Gobernar su autorreplicación.
- Transmitir la información estructural y funcional a la progenie resultante de una infección.
- Formación de un ARN mensajero capaz de traducir en el ribosoma celular las proteínas codificadas por el genoma viral.
- Se diferencian dos tipos conjuntos de genes.
  - Precoces: codifican las proteínas necesarias para la copia de la molécula de ácido nucleico (enzimas).
  - Tardíos: codifican proteínas estructurales y de ensamblaje. <sup>(19)</sup>

La replicación puede producirse en el núcleo o en el citoplasma de la célula dependiendo del ácido nucleico que contenga el virus:

#### ▪ Síntesis de virus con ADN

1. Una vez liberado el ácido nucleico viral migra al núcleo de la célula hospedadora. <sup>(19)</sup>
2. Transcripción de la porción de ADN vírico con los genes tempranos, éste evento es posible debido a la presencia de la ARN polimerasa (transcriptasa) proveniente de la célula hospedadora, generándose enzimas específicas para la multiplicación del ADN vírico, (excepto en poxvirus: viruela). <sup>(19)</sup>
3. Comienza la transcripción y traducción de los genes tardíos que todavía no habían empezado a expresarse. La síntesis de las proteínas de la cápside ocurre en el citoplasma de la célula hospedadora. <sup>(19)</sup>
4. Posteriormente las proteínas de la cápside migran al núcleo donde tiene lugar la maduración. <sup>(19)</sup>

Otras características de la replicación de virus con ADN, importantes de mencionar son las siguientes:

- La replicación es semiconservativa.
- Los intermediarios replicativos son:
  - Lineales para ADN lineal.
  - Circulares para ADN circular.
  - Se relaciona la formación de cuerpos de inclusión nucleares. <sup>(19)</sup>

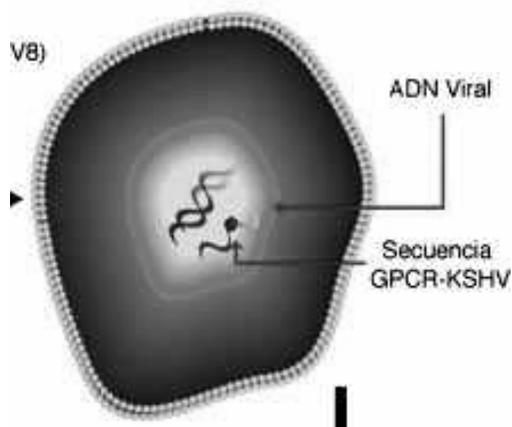


FIGURA 16: Esquema de una célula infectada por un virus que ha introducido su ADN viral.

### ▪ Síntesis de virus con ARN

La multiplicación de los virus de ARN es esencialmente la misma que la de los virus de ADN excepto que los mecanismos para generar el ARNm son distintos en los diferentes grupos de virus con ARN. Una vez que el ARN vírico y las proteínas son sintetizados, la maduración tiene lugar de una manera similar en el citoplasma. <sup>(19)</sup>

Su replicación se lleva a cabo en el citoplasma. El ARN puede actuar de 2 formas:

- Con polaridad positiva:
  - a) Un extremo del ARN actúa inicialmente como mensajero entrando en un ribosoma celular e iniciando una traducción de polimerasas, para iniciar la replicación del ácido nucleico.
  - b) Se produce un intermediario replicativo de ARN que sintetiza las moléculas de ARN virales de los descendientes, éste proceso es independiente de la replicación del ADN de la célula hospedadora.
  - c) Luego actúa la parte tardía para traducir proteínas estructurales de la cápside y ensamblaje de la partícula viral. <sup>(19)</sup>

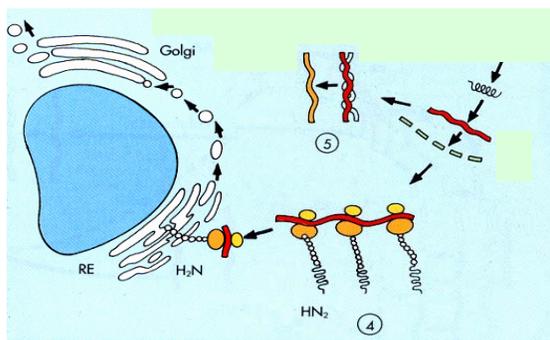


FIGURA 17: Replicación del Rabdovirus.  
 ④ Se traducen las proteínas a partir de los ARNm, incluyendo una glucoproteína (GP) que experimenta glucosilación en el retículo endoplásmico (RE), es procesada en el aparato de Golgi y pasa a la membrana celular.  
 ⑤ El genoma se replica a partir de la plantilla ARN (+), y las proteínas N, L y NS se asocian con el genoma para formar la nucleocápside. <sup>(40)</sup>

- Con polaridad negativa:
  - a) El ARN no posee la función mensajera.
  - b) Se sintetiza una molécula complementaria de la original para que ésta copia entre en el ribosoma con función mensajera.
  - c) Para que lo anterior pueda suceder se requiere la presencia de una ARN transcriptasa dependiente, que no se encuentra en la célula.
  - d) El ARN contiene la secuencia para sintetizar a la ARN transcriptasa, su genoma y proteínas estructurales. <sup>(19)</sup>



FIGURA 18: Endosoma con partículas virales en su interior. Las más oscuras (electrodensas) son virus que ingresaron al endosoma y están intactos. Las más claras son partículas virales que han empezado a desmembrarse. <sup>(23)</sup>

## MECANISMOS DE MADURACIÓN DEL ARN

### SPLICING

Es un mecanismo muy difundido, que permite que un solo gen pueda codificar para más de una proteína. En muchos de estos casos se conoce más de una vía para procesar el transcrito primario obteniendo proteínas estructural y funcionalmente diferentes o bien isoformas de una proteína. Los cortes sobre el ARNhn deben producirse con absoluta precisión. Puede ocurrir que uno o más exones sean removidos (dando una proteína más corta), o que uno o más intrones no sean removidos (dando una proteína más larga). Se conoce una familia de 6 proteínas llamadas ASF (factores de splicing alternativo) responsables de reconocer y seleccionar los lugares para los cortes alternativos, poseen la característica de contener dominios ricos en serina y arginina por lo que se las llama también **proteínas SR**. El mecanismo por el cual la célula selecciona los sitios no está claro. Los siguientes son algunos ejemplos de genes cuya expresión puede regularse por splicing:

- Alfa-tropomiosina: ésta se codifica a partir de un mismo gen pero con una secuencia primaria diferente a partir de ARNm diferentes específicos en 7 tejidos.

- El gen de la tirosin-hidroxilasa humana: Esta enzima expresa 4 isoformas diferentes, es decir, similar actividad biológica con diferentes propiedades, en este caso se expresan todas en médula suprarrenal y cerebro. El gen contiene 14 exones, al cortar y empalmar de diferente manera, la isoforma 2 tiene 12 nucleótidos más que la isoforma 1, la isoforma 3 tiene 81 más y la isoforma 4 tiene 93 nucleótidos más que la isoforma 1 (Proteómica).
- Los ARNm de las cadenas livianas de inmunoglobulinas sufren corte y empalme alternativo, esto contribuye, como veremos en inmunología, a ampliar el repertorio de anticuerpos, es decir, a reconocer más antígenos (elementos no propios) a los que pueda ser expuesto el organismo. Así permite mejorar la respuesta inmune a un antígeno en particular.
- Un mismo gen como el que codifica para la hormona calcitonina–interviniente en la regulación de los niveles de Calcio plasmático– al ser expresado en las células parafoliculares de la tiroides, cuando se expresa en las neuronas hipotalámicas produce una proteína llamada CGRP (Producto relacionado al gen de calcitonina) que actúa como neurotransmisor.
- La fibronectina que cuando es sintetizada por el fibroblasto y liberada a la matriz extracelular expresa dos intrones que no son expresados cuando la proteína es sintetizada en los hepatocitos y secretada al plasma.
- Algunos genes codificantes para factores de transcripción en células en etapas del desarrollo pueden ser ensamblados alternativamente, la producción de una u otra variante determinará la vía de diferenciación adoptada por la célula.

En la mayor parte de los casos, la diferencia entre los productos de splicing alternativo sobre un mismo ARN difieren en regiones claves que pueden afectar a la proteína en propiedades como: la compartimentalización, el tipo de ligandos al que se unirá, la afinidad con que lo hará y si es una enzima de actividad catalítica. <sup>(19)</sup>

## **POLI – A**

Secuencia de 50-250 nucleótidos de adenina que se agregan como una modificación post transcripcional al extremo 3' de ARNm de eucariontes mediante la enzima poli A polimerasa. La reacción se conoce como poliadenilación. <sup>(19)</sup>

## **ESTRUCTURA CAP**

Estructura en el extremo 5' del ARNm en eucariontes maduros, que se forma después de la transcripción mediante la unión de un fosfato terminal 5' GTP a la base terminal del ARNm. También ocurre una metilación de G originando 7MeG5'ppp5'Np..... <sup>(19)</sup>

### c. Síntesis tardía

A partir de este paso, se sintetizan el ácido nucleico y las proteínas, ambos específicos del virus, síntesis en las que intervienen los ribosomas, los retículos endoplásmicos liso y rugoso, el complejo de Golgi y posiblemente las mitocondrias. Habiéndose sintetizados ambos componentes de los virus, se produce su unión (ensamble) luego la maduración y con la maduración, finalmente la liberación de las denominadas partículas virales hijas o progenie viral. <sup>(19)</sup>

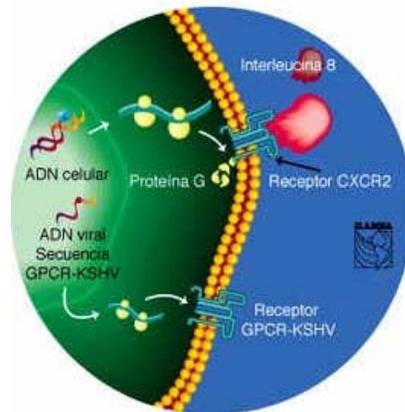


FIGURA 19: Receptores celulares de entrada y salida de virus.

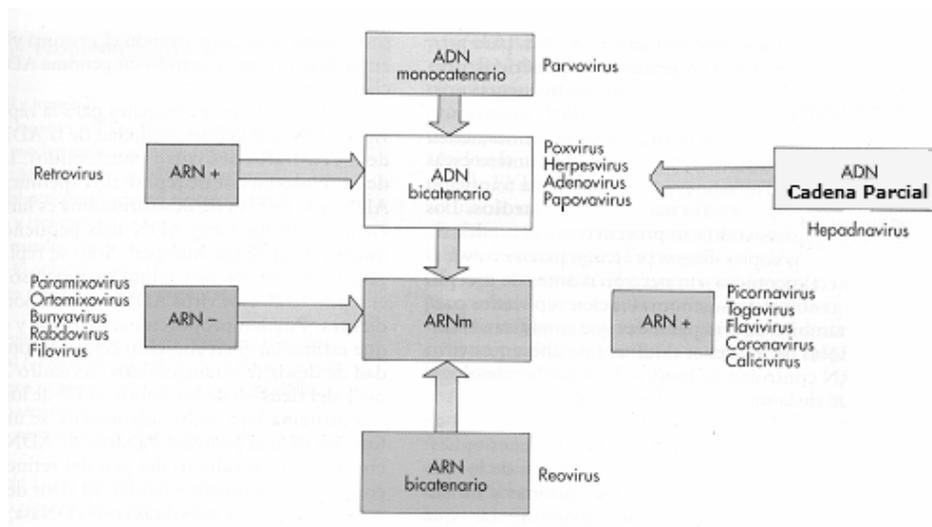


FIGURA 20: Las dos vías principales para la inhibición de la síntesis de proteínas víricas por el interferón. Un mecanismo implica la inducción de una polimerasa inusual (2-5A sintetasa), que es activada por el ARN bicatenario. La enzima activada sintetiza un trinucleótido de adenina inusual con un enlace 2' 5' fosfodiéster. El trinucleótido activa una endonucleasa que degrada el ARNm. El otro mecanismo implica la inducción de una proteína cinasa que inactiva el factor de iniciación eIF-2 mediante fosforilación de una de las subunidades para evitar la iniciación de la síntesis de proteínas. <sup>(40)</sup>

## 2.5 FASE DE LIBERACIÓN Y SALIDA

Ésta fase es el paso final en la multiplicación viral y sus mecanismos varían según el tipo de virus.

En ésta fase el ácido nucleico vírico y las proteínas de la cápside se ensamblan para formar las partículas víricas completas, que finalmente saldrán de la célula hospedadora.

Ésta fase contempla 2 etapas:

- **Maduración y ensamblaje:** es el proceso de ensamblaje de las partículas virales a través de la unión de la cápside con el genoma:
  - Cápsides icosaédricas: Pueden condensarse en ausencia de ácido nucleico.
  - Cápsides helicoidales: No pueden formarse sin ARN viral.
- **Liberación:** proceso mediante el cual los viriones salen de la célula hospedadora, a través de diversos mecanismos que dependen del tipo de virus y de las características de la célula hospedadora:
  - La célula hospedadora se desintegra liberando los viriones.
  - Liberación de viriones a ciertos períodos de tiempo mediante exocitosis.
  - Liberación de viriones a ciertos periodos de tiempo a través de canales especiales (túbulos).

El número de partículas víricas que se obtienen varía según el tipo de virus, tipo de célula y las condiciones de crecimiento. El rendimiento medio en plantas y animales va desde varios miles a cerca de un millón de viriones por célula, comparado con los varios cientos de fagos que se obtienen en una célula bacteriana. <sup>(21)</sup>

### a. Maduración y ensamblaje.

- **Envueltos:** Maduran por un proceso de gemación:
  - Se insertan glucoproteínas de cubierta específica del virus en las membranas celulares.
  - Las nucleocápsides hacen gemación a través de la membrana a nivel de estos sitios modificados y al hacerlo así, adquieren su cubierta.

La gemación ocurre a menudo en la membrana plasmática y puede abarcar a otras membranas de la célula. Los virus cubiertos no son infecciosos hasta que han adquirido su cubierta.

- **Desnudos:** Su maduración consiste en la unión de los capsómeros para formar la cápside y después ésta se une al genoma, sin embargo hay diferencias de acuerdo al ácido nucleico que contenga el virus:
  - ADN: Síntesis de ADN previa a la síntesis de elementos estructurales.
  - ARN: La síntesis de elementos estructurales y de ARN se realiza al mismo tiempo.<sup>(19)</sup>

## b. LIBERACIÓN.

- **Envueltos:** las células infectadas acaban por experimentar lisis y liberar las partículas virales.
  - La liberación se produce atravesando una membrana de la célula hospedadora, parte de la cual es llevada por el virus, que así adquiere su envoltura y sus espículas.
- **Desnudos:** Depende mucho del tipo de virus y de las características de la célula.
  - Se unen el ácido nucleico y las proteínas y luego se produce la liberación

Pueden acumularse cantidades excesivas de componentes virales y participar en la formación de cuerpos de inclusión en la célula. Como resultado de los profundos efectos dañinos de la replicación viral, se desarrollan por último efectos citopáticos y la célula muere. Aunque a veces la célula se inmortaliza.<sup>(19)</sup>

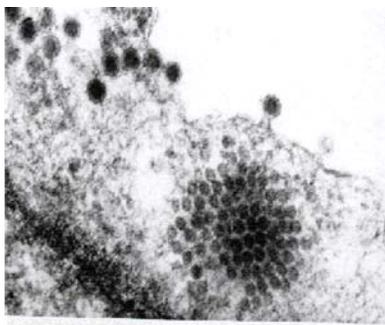


FIGURA 21: En esta imagen se puede ver una partícula viral liberándose (brotando) a través de la membrana plasmática. Debajo de ella, un grupo numeroso de ensamblajes del ácido nucleico y los capsómeros (nucleocápside) esperando su turno para brotar y así constituir la progenie viral.<sup>(23)</sup>

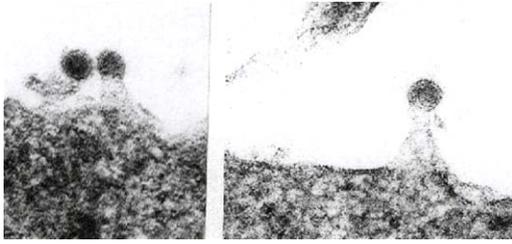


FIGURA 22: La imagen de la izquierda muestra dos partículas virales en la etapa de liberación. La imagen de la derecha muestra una partícula viral brotando y arrastrando con ella, parte de la membrana plasmática. <sup>(23)</sup>

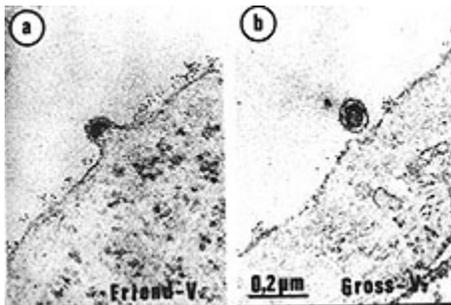


FIGURA 23: La imagen (a) muestra una partícula viral en la etapa de liberación. La imagen (b) de muestra una partícula viral una vez liberada en el medio extracelular. <sup>(23)</sup>

Los pasos que se comentaron, sin mencionar el núcleo, son los que siguen los virus que tienen como ácido nucleico al ARN. Si contienen ADN, varios de esos pasos transcurren en el núcleo.

## 2.6 CICLO LÍTICO Y LISOGÉNICO DEL BACTERIÓFAGO

Los **bacteriófagos** o **fagos** son virus que se reproducen en **células procariontes**, una vez que el material genético de los virus ha ingresado al interior de la bacteria, puede seguir dos caminos, entrar al ciclo lítico o bien al lisogénico.

No todos los virus ocasionan inmediatamente la muerte de la célula infectada, algunos, como los que invaden las células animales, convierten a estas últimas en fábricas perpetuas de virus, de tal manera que la membrana celular no se rompe a la salida de los virus sino que únicamente tiene poros.

### CICLO LÍTICO

Todos los bacteriófagos tienen un ciclo *lítico*, o infeccioso, en el que el virus, incapaz de replicarse por sí mismo, inyecta su material genético dentro de una bacteria. Utilizando las enzimas y los mecanismos de síntesis de proteínas del hospedador, el virus puede reproducirse y volverse a encapsular, fabricando unas 100 nuevas copias antes de que la bacteria se destruya y estalle.

## CICLO LISOGÉNICO

Algunos bacteriófagos, sin embargo, se comportan de diferente forma cuando infectan a una bacteria. El material genético que inyectan se integra dentro del ADN del hospedador; se replica de manera pasiva con éste, y lo hereda la progenie bacteriana. En una de cada 100,000 de estas células *lisogénicas*, el ADN viral se activa de forma espontánea y comienza un nuevo ciclo lítico.

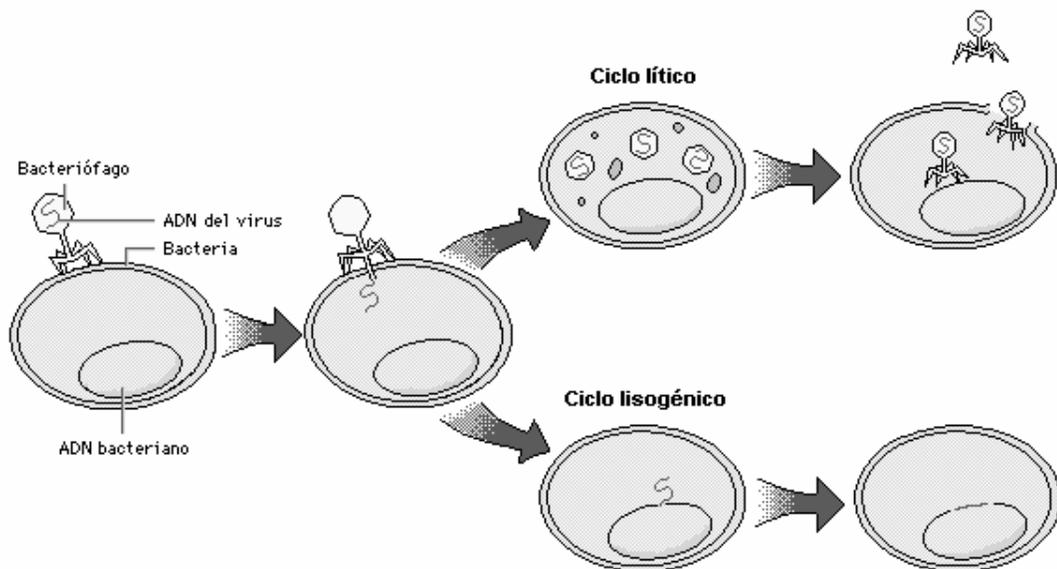


FIGURA 24: Esquema de los ciclos lítico y lisogénico de un bacteriófago.

Los bacteriófagos se emplean actualmente como vectores de clonación en el campo de la ingeniería genética y su estudio tiene implicaciones importantes en la medicina y la genética, en concreto en la comprensión de las infecciones virales, defectos genéticos, problemas de desarrollo, causas del cáncer y la resistencia de las bacterias a los antibióticos.

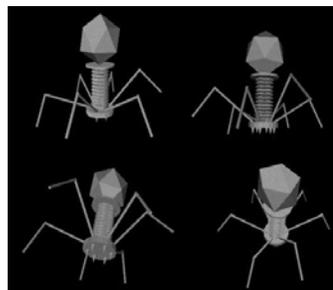


FIGURA 25: Esquema de un bacteriófago visto en diferentes ángulos de 3D.

## UNIDAD PROGRAMÁTICA III

### TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO VIRAL

#### OBJETIVOS

1. Conocer y establecer las diferencias entre cultivo primario, cepa celular y línea celular.
2. Conocer los requerimientos para trabajar cultivo celular.
3. Aplicar las diferencias de los ensayos de infectividad viral en los sistemas utilizados y seleccionar el adecuado para cada virus.

## 3.1 EL CULTIVO DE LOS VIRUS

### DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO PARA INFECCIONES VIRALES

La mayoría de las infecciones virales presentan un curso asintomático, o son tan leves que la atención médica no es necesaria. En muchos casos un diagnóstico clínico certero se puede hacer únicamente en base de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. La mayoría de los casos de sarampión, varicela, herpes zoster y exantema son diagnosticados por los mismos pacientes, sus familiares o por el médico general. En contraste hay otras situaciones clínicas que para establecer la etiología del padecimiento se requieren de muchos recursos y que justifica la investigación virológica. Como por ejemplo en las infecciones provocadas por Rhinovirus. <sup>(49)</sup>

### ¿ BAJO QUÉ CIRCUNSTANCIAS SE DEBE ORDENAR UN ESTUDIO VIROLÓGICO ?

En todo trabajo clínico el beneficio de un diagnóstico preciso es indiscutible. Las consecuencias del tratamiento de un solo paciente son obvias, el hecho de que se tomen medidas preventivas a tiempo evita que se transmita la enfermedad a otras personas. Durante epidemias el diagnóstico temprano de unos cuantos casos también beneficia a que el médico pueda dar diagnósticos etiológicos confiables al presentársele casos clínicos similares. La vigilancia epidemiológica nacional e internacional y los programas de control también requieren información de los laboratorios de diagnóstico. La decisión de la composición actual de la vacuna de la influenza es un ejemplo de esto. <sup>(49)</sup>

Las situaciones clínicas mas comunes que requieren de la examinación virológica de un laboratorio se indican en la tabla son:

TABLA 9: Situaciones clínicas mas comunes y los diversos casos en los que se puede sospechar de las mismas. <sup>(49)</sup>

SITUACIÓN CLÍNICA	CASOS
Infección respiratoria.	▪ Niños pequeños con enfermedad respiratoria severa.
	▪ Cualquier paciente en el que se sospeche influenza.
Gastroenteritis.	▪ En general todos los casos severos.
	▪ Cuando hay una epidemia en curso.

SITUACIÓN CLÍNICA	CASOS
Paperas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ En casos esporádicos o dudosos.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ En caso de horquitis, meningoencefalitis o pancreatitis en los que el diagnóstico de paperas no sea certero.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Chequeo del estatus inmunológico para vacunación adulta o individuos masculinos prepubertos.</li> </ul>
Rubéola.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cuando se sospeche de rubéola en mujeres embarazadas o en sus familiares.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ En consulta premarital o para planeación familiar y en la primera consulta de una mujer embarazada con o sin sospecha.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Todos los casos para confirmar rubéola congénita.</li> </ul>
Sarampión.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ En casos clínicos dudosos.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cuando se sospecha de SSPE.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ En casos de reinfección de causa desconocida de encefalitis.</li> </ul>
Varicela.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cuando las lesiones no son típicas.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Antes de indicar un tratamiento con fármacos citotóxicos en niños, se debe de establecer el estatus inmunológico.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ En mujeres expuestas al virus durante el tercer trimestre del embarazo.</li> </ul>
Herpes zoster.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Siempre se debe de confirmar el diagnóstico.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Examinar a donadores de sangre para preparación de hiperinmunoglobulinas.</li> </ul>
Herpes simplex.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Durante el embarazo, especialmente cuando se sospecha de herpes genital antes del parto.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ En casos severos de herpes simplex.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Casos de infección por herpesvirus generalizada en recién nacidos.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Casos de encefalitis.</li> </ul>

SITUACIÓN CLÍNICA	CASOS
Infecciones por CMV.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Chequeo de la sangre de donadores, recipientes, tejidos u órganos.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Casos de fiebre prolongada de causa desconocida.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cuando hay desordenes similares a los que se presentan en la mononucleosis, pero que las pruebas para anticuerpo heterofílico y anti-VEB son negativas.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Durante el embarazo.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ En un paciente con síndrome post-transfusional.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fiebre y neumonía en individuos inmunocomprometidos.</li> </ul>
Infecciones con VEB.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cuando se sospecha de mononucleosis y la prueba para anticuerpo heterofílico es negativa.</li> </ul>
Hepatitis.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Todos los casos de Hepatitis.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Grupos de alto riesgo son revisados continuamente en búsqueda de los estados crónicos de los tipos B y C.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Sangre y tejidos susceptibles a donación deben de someterse a las pruebas para los tipos A, B y C.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ El estatus inmunológico de grupos con alto riesgo debe de ser verificado antes de aplicar vacunas o al usar continuamente inmunoglobulinas para prevenir los tipos de Hepatitis A y B.</li> </ul>
Eritema infeccioso.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cuando el diagnóstico clínico sea incierto especialmente en periodos no epidémicos.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cuando se sospeche de la infección por Parvovirus B19 durante el embarazo.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Casos de artralgia.</li> </ul>
Meningitis, Encefalitis.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ En general todos los desordenes del sistema nervioso severos requieren de estudios microbiológicos y serológicos para que se establezca su etiología.</li> </ul>
VIH.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Los grupos de riesgo deben de examinarse de acuerdo a los programas de control nacional.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Todos los donadores de sangre y tejidos, incluyendo leche materna.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Durante las manifestaciones clínicas de cualquier fase de la infección por VIH.</li> </ul>

SITUACIÓN CLÍNICA	CASOS
Infección por HTLV.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Casos de leucemia de células T.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ En pacientes con paraparesis espástica progresiva de causa desconocida.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pacientes con riesgo de exposición.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Donadores de sangre y tejidos.</li> </ul>

## DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico virológico está basado en la demostración del virus o de alguno de sus componentes (antígenos o genoma) o en la demostración de la respuesta de un anticuerpo específico. En algunas infecciones los anticuerpos son detectables al inicio del padecimiento clínico (ej. Poliomielitis, hepatitis B [anti-HBc]), o la aparición de anticuerpos se retrasa días (ej. Rubéola), semanas o meses (ej. Hepatitis C, VIH). De todas formas un diagnóstico temprano es importante para el establecimiento de una terapia antiviral o para la medición de otras interferencias en las que se deberán considerar métodos para la demostración del virus. <sup>(49)</sup>

El virus puede ser demostrado directamente por microscopía electrónica (virus de gastroenteritis u orfvirus). Alternativamente, los virus infecciosos serán demostrados después de su inoculación en cultivos celulares ( enterovirus, adenovirus, herpes simplex, CMV), embriones de pollo (influenzavirus) o en animales de laboratorio (coxsakievirus). <sup>(49)</sup>

Los profesionales clínicos deberán seguir cuidadosamente las instrucciones de sus laboratorios para lograr muestrear y transportar los virus, especialmente si la infectividad debe ser mantenida. <sup>(49)</sup>

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y BIOFÍSICA DE LOS VIRUS** <sup>(49)</sup> TABLA 10: Pruebas de caracterización y clasificación bioquímica y física de los virus. En la tabla 9 se muestran las características de los virus para esta clasificación. <sup>(49)</sup>

CORE	SIMETRÍA	ENVOLTURA	TAMAÑO NM	ETER	PH 3.0	CALOR 56°C	ESTABILIZACIÓN CATIONICA AL CALOR	EFECTO EN CULTIVO DE TEJIDOS		VIRUS
								CPE	INCLUSIONES	
ADN	Cúbica	+	180-250	S	S	S	S	Sincital	Nucleares, centrales, eosinofilicos con halo, Feulgen +	Herpes
		-	40-50	R	R			Vacuolización, englobado		Papiloma, polioma, (ØX-174)
		-	60-85	R	R	S	S y R	Lisis	Nucleares, pequeños, eosinofilicos, feulgen+	Adenovirus
	Cúbica con cola	-								Fagos
	Helicoidal	+	200-250		S	R			Citoplasmáticos, fuelgen +	Poxvirus
RNA	Cúbica	+	15-120	S	S	S	S	Varios	Varios	Arbovirus
		-	<50	R	S					Rhinovirus
					R	S	R	Lisis rápida	Nucleares y/o citoplasmáticos, pequeños con gránulos densos	Enterovirus
			70-85		R	R	R		Citoplasmáticos	Reovirus
	Helicoidal	+	80-100	S					Citoplasmáticos	Influenza flow plague
		-	60-125	R					Nucleares y citoplasmáticos	Measles
		-								Virus de plantas

## A) EN CULTIVO CELULAR

El cultivo celular es la propagación de células dispersas tanto en suspensión como en monocapas sobre vidrio o plástico.

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

Estas técnicas tienen una serie de ventajas innegables, pero al mismo tiempo tienen unas desventajas que hay que tener en consideración y en la tabla 11 son comparadas. <sup>(34)</sup>

Tabla 11

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Permiten el control preciso y fino del medio ambiente.	Técnica sensible.
Caracterización y homogeneidad de la muestra.	Cantidad y costo.
Economía.	Inestabilidad.
Motivaciones éticas.	Validez del modelo <i>in vitro</i> .

Los estudios que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular, como lo son los siguientes:

- **ACTIVIDAD INTRACELULAR:** Mecanismos implicados en los diferentes procesos intracelulares, como por ej. transcripción de ADN, síntesis de proteínas, metabolismo energético, etc. <sup>(34)</sup>
- **FLUJO INTRACELULAR:** Movimientos intracelulares de sustancias y señales asociadas a los diferentes procesos fisiológicos, como por ej. ensamblaje y desensamblaje de los diferentes componentes intracelulares, movimientos del ARN : núcleo-citoplasma, movimiento de proteínas, etc. <sup>(34)</sup>
- **ECOLOGÍA CELULAR:** Estudio de las condiciones ambientales responsables del mantenimiento de la funcionalidad celular, de su diferenciación..., como por ej. estudio de las necesidades nutricionales, infecciones, estudio de la transformación celular (inducidas por virus o agentes químicos), cinética de la población celular, etc. <sup>(34)</sup>

- INTERACCIONES CELULARES: Procesos de inducción embrionaria, cooperación metabólica, inhibición por contacto o por adhesión, interacciones célula-célula. <sup>(34)</sup>

- CULTIVO PRIMARIO

Se llama así al cultivo que proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado de un órgano proveniente de un animal recién sacrificado. <sup>(34)</sup>

En el caso de células en cultivo primario el factor de dilución de un pase al siguiente suele ser de 1/2 a 1/5 pero no superior. <sup>(34)</sup>

El crecimiento de las células en cultivo primario prosigue a lo largo de una serie de generaciones o pases característicos de cada tipo celular y condiciones de cultivo. Así los hepatocitos de adultos no se establecen más que como cultivo primario mientras que las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) permanecen en cultivo de 3 a 9 pases, y los fibroblastos dérmicos humanos pueden superar los 20 pases. Sin embargo al final todas ellas entran en una fase de senescencia, con acumulación de numerosas anomalías, pérdida de funciones especializadas, etc., que conducen a la muerte del cultivo. <sup>(34)</sup>

Cultivos primarios de muchos tipos celulares son posibles porque las células pierden algunas de sus propiedades diferenciadas, entre ellas la característica incapacidad de dividirse, y se convierten en células que mantienen tan solo algunas de las propiedades que las caracterizaban. Esta pérdida de propiedades puede ser debida a **desdiferenciación** o **desadaptación**. La primera implica una pérdida irreversible de una propiedad diferencial del tipo celular (por ejemplo un hepatocito en cultivo pierde sus enzimas características-arginasa, aminotransferasas-no puede almacenar glucógeno ni sintetizar las proteínas del suero), mientras que la segunda implica que la característica especializada perdida no es irreversible sino consecuencia de la pérdida de la señal (por ejemplo externa, hormonal, nerviosa) y que basta con recuperarla para que se reexpresa, por ejemplo Michalopoulos y Pitot, 1975; Sattler y col., 1978, han demostrado que los hepatocitos de rata pueden reexpresar tirosina aminotransferasa en presencia de ciertas hormonas (insulina e hidrocortisona) cuando crecen sobre una matriz de colágeno. <sup>(34)</sup>

Los cultivos primarios tienen características especiales que los diferencian de las líneas celulares: conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide (2n), su crecimiento *in vitro* es limitado y hay inhibición por contacto. <sup>(34)</sup>

El estar más cercanas a las células que las originaron, se ve reflejado en una mejor actividad y funcionalidad similar a su ambiente natural, por lo que en aislamientos primarios de cepas virales éstas tienen mayor sensibilidad que una Línea Celular ya establecida. Igualmente para la producción de vacunas los cultivos primarios son recomendables por tener una baja probabilidad de que se transformen en malignos. <sup>(34)</sup>

Dentro de las desventajas está la de una mayor probabilidad de presentar virus adventicios o latentes, lo que implica el desarrollo de la adecuada tecnología para el control de calidad. <sup>(34)</sup>

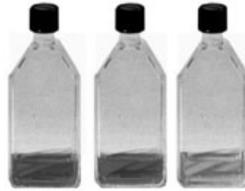


FIGURA 26: Medios para cultivo primario

- **CEPA CELULAR**

Estas cepas celulares sirven para producir mas cultivos. Se pueden subcultivar (cultivar varias veces). Entonces, una cepa celular es un cultivo de células animales obtenido a partir de un cultivo primario y cuyas células pueden ser subcultivadas varias veces. Las cepas celulares con el tiempo degeneran, no pudiendo volver a subcultivarse. <sup>(34)</sup>

Se pueden obtener cultivos primarios y cepas celulares a partir de diferentes tejidos. Para virus humanos, suelen usarse tejidos de hombre pero también de monos (africanos) y de embriones mamíferos. <sup>(34)</sup>

Pero hay células de cepas celulares que sufren una alteración y comienzan a desarrollarse de forma indefinida, formando entonces una línea celular. <sup>(34)</sup>

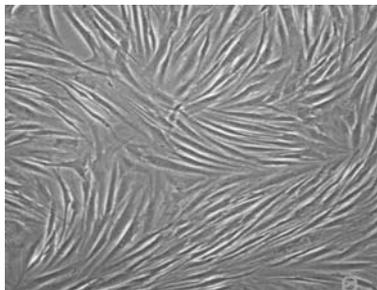


FIGURA 27: Fibroblastos humanos

- **LINEA CELULAR**

Cuando un cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de multiplicación, se convierte en una línea celular. <sup>(34)</sup>

En el caso de líneas celulares establecidas la dilución puede ser tan elevada como 1/100 o 1/1000, siendo la habitual 1/10. <sup>(34)</sup>

Las Líneas Celulares continuas están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células en las cuales se originaron. Pueden provenir de células que se derivan de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario mediante

transfección con oncogenes o con tratamiento con carcinogénicos, lo que les confiere un nuevo fenotipo. <sup>(34)</sup>

Este tipo de cultivo tiene la característica de ser haploides (n), de no tener inhibición por contacto y de crecer de manera indefinida. El paso de un cultivo primario a línea se denomina transformación. <sup>(34)</sup>

Una transformación puede inducirse fisiológicamente (interacción celular, polaridad) a través de hormonas como la hidrocortizona o utilizando inductores no fisiológicos como el dimetilsulfóxido (DMS). <sup>(34)</sup>

El cultivo de las células no presenta las mismas dificultades independientemente del tipo de célula de que se trate. Hay grandes diferencias que se relacionan fundamentalmente con el grado de diferenciación del tipo celular. Así pues en general se puede establecer como norma que una línea celular será tanto más fácil de establecer o cultivar cuanto más indiferenciada sea, con las excepciones de las líneas tumorales de células diferenciadas. <sup>(34)</sup>

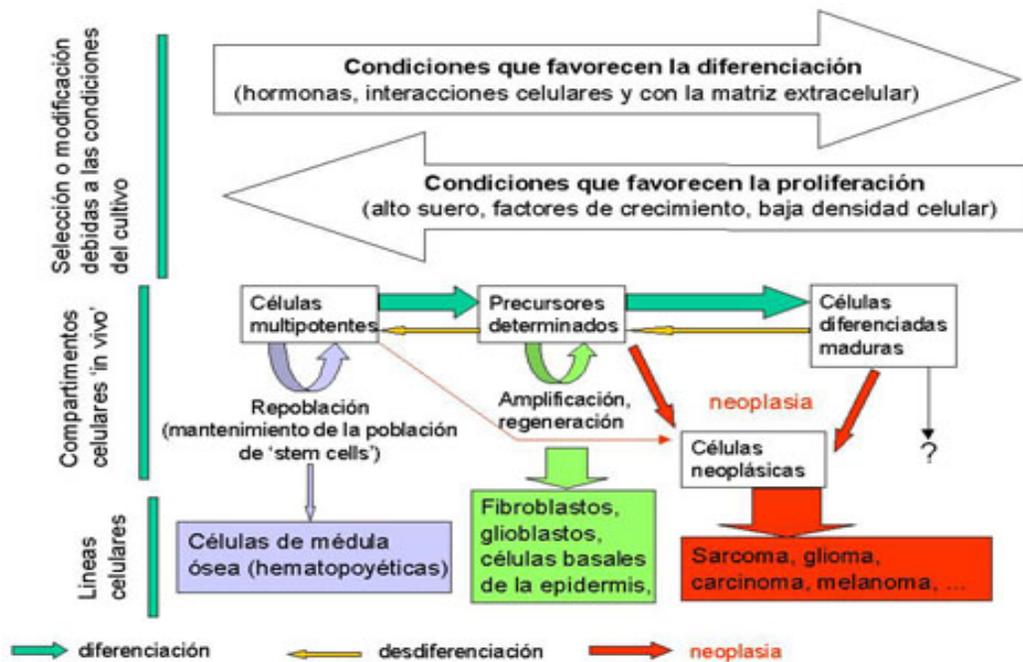


FIGURA 28. Desarrollo de un cultivo celular desde cultivo primario, cepa celular hasta convertirse en línea celular, mostrando los factores que influyen para los procesos de diferenciación, desdiferenciación y neoplasia. <sup>(40)</sup>

Tabla 12: Líneas celulares de mayor uso en el estudio de virus humanos.

LÍNEA	CARACTERÍSTICA	AÑO	PROVIENE DE	MORFOLOGÍA	NO. DE PASES	VIRUS
1° HELA	Tumor cancerígeno de cuello uterino humano.		Mujer con Cáncer.	En monocapa		
2° VERO	De riñón de mono africano ( <i>Cercopithecus aethiops</i> ).	1962	Mono que se encontraba en China, Japón.	Como fibroblastos	121 aprox.	SV-40, Sarampión, Arbovirus, Reovirus, Rubéola, Adenovirus, Poliovirus.
3° RD	<b>Rabdomiosarcoma embrional humano.</b>	1968	Rabdosarcoma embrional maligno de la pelvis de una mujer caucásica de 7 años de edad.	<b>Células grandes multi-nucleadas</b>	32 aprox.	<b>Poliovirus, Estomatitis vesicular, Herpes, Vaccinia.</b>
4° TRA-171		1969	Larvas de mosquito ( <i>Toxorhynchites amboinensis</i> ).	<b>Morfología: fibroblástica</b>	13 aprox.	<b>Virus: Arbovirus.</b>
5° CaCo2	<b>Adenocarcinoma de colon humano.</b>	1977	<b>Tumor de colon primario de hombre caucásico de 72 años.</b>	Epitelial	13 aprox.	Rotavirus, Reovirus.
6° MDCK	De riñón canino ( <i>Canis familiaris</i> ).	1958	Cocker Spaniel adulto hembra.	epitelial	49 aprox.	Virus exantemáticos, Hepatitis canina, Vaccinia, Coxsackie, Adenovirus, Reovirus.
7° CHO	De ovario de hamster chino.	1958	Biopsia de ovario.	Epitelial	400 aprox.	Estomatitis vesicular, Arbovirus.
8° PK (15)	Riñón porcino ( <i>Sus scrofa</i> ).	1955	Riñón de un cerdo adulto en Berkeley Ca.	Epitelial	129 aprox.	Exantema de virus porcino.
9° LL29	Pulmón humano.					

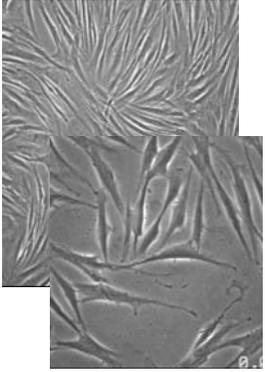
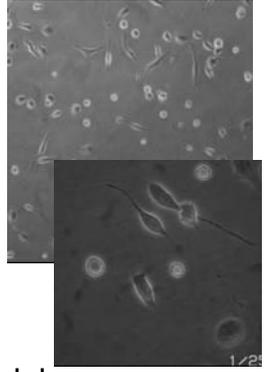
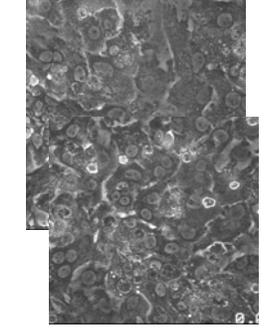
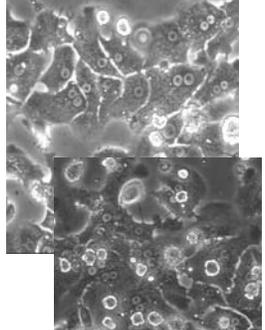
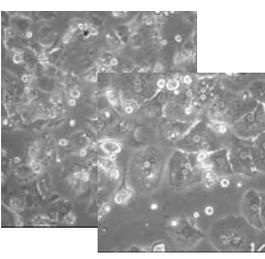
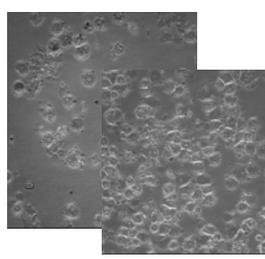
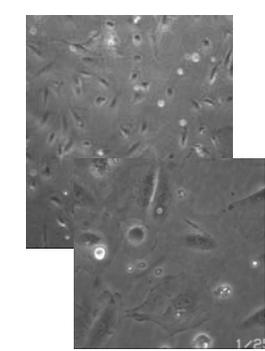
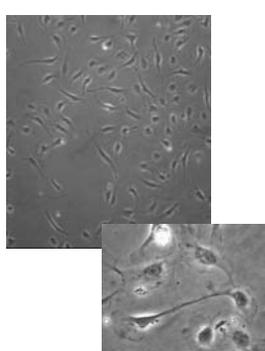
Imágen	Descripción	Imagen	Descripción
	<p>Fibroblastos humanos. Aislados mediante digestión enzimática de una biopsia de piel de un varón caucásico.</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>•Queratinocitos humanos. Aislados mediante digestión enzimática.</li> <li>•Se cultivan sobre una capa basal de alimentación ('feeder layer') de fibroblastos 3T3-SA tratados con mitomicina.</li> </ul>
Cepas Celulares			
	<p>Hepatocitos de rata. Aislados mediante perfusión con colagenasa. Mantenidos como cultivo primario hasta 2 semanas en presencia de factores de diferenciación.</p>		<p>Hepatocitos de perro. Aislados mediante perfusión con colagenasa.</p>
	<p>Hepatocitos de mono. <i>Cynomolgous</i>. Aislados mediante perfusión con colagenasa.</p>		<p>Hepatocitos humanos. Aislados mediante perfusión con colagenasa a partir de biopsias.</p>
	<p>Células del epitelio pigmentario de la retina humana (HRPE). Aislados mediante digestión con colagenasa intraocular.</p>		<p>Cel. Endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC). Obt. Por digestión con colagenasa de vasos de cordón umbilical humano. Mantenido en cultivo hasta pase 5 – 7.</p>

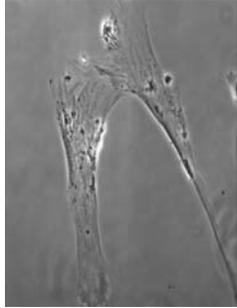
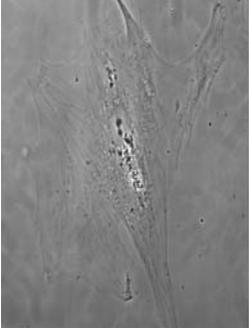
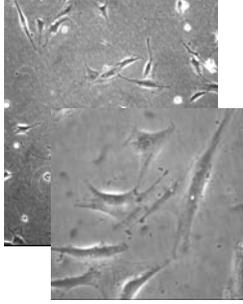
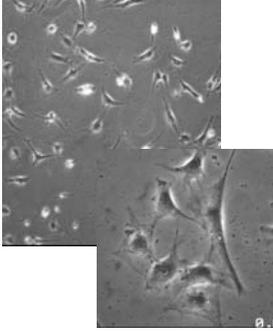
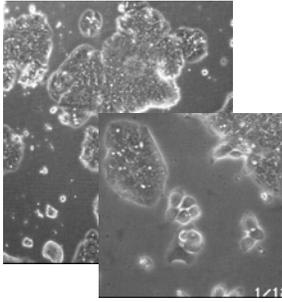
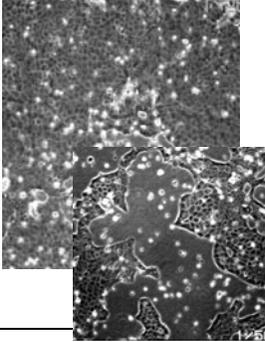
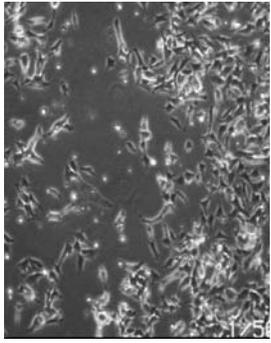
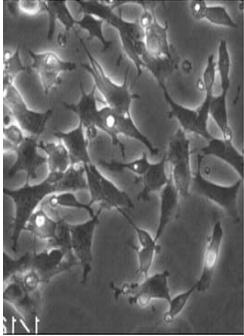
Imagen	Descripción	Imagen	Descripción
	Human smooth muscle cells (HSMS). Procedente de la capa medio de las arterias uterinas humanas.		HSMS es un buen modelo para el estudio del comportamiento de la célula muscular lisa arterial en el proceso de la arteriosclerosis.
	Fibroblastos 3T3-SA. ATCC fibroblastos de ratón.		Fibroblastos 3T3-L1. ATCC.
	M6 de línea HT-29 carcinoma de colon.		MDCK (epitelio intestinal de perro).
	SH-SY5Y Neuroblastoma.		HEPG2 (Hepatoma) Hepatocarcinoma humano.

Tabla 13: Microfotografías Electrónicas de cepas y líneas celulares.

Las células en cultivo de una línea celular (cultivo primario propagado), o de una línea continua son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, con lo que se supera el grave problema de heterogeneidad de las muestras, inherente y asociado al uso de animales de experimentación. <sup>(34)</sup>

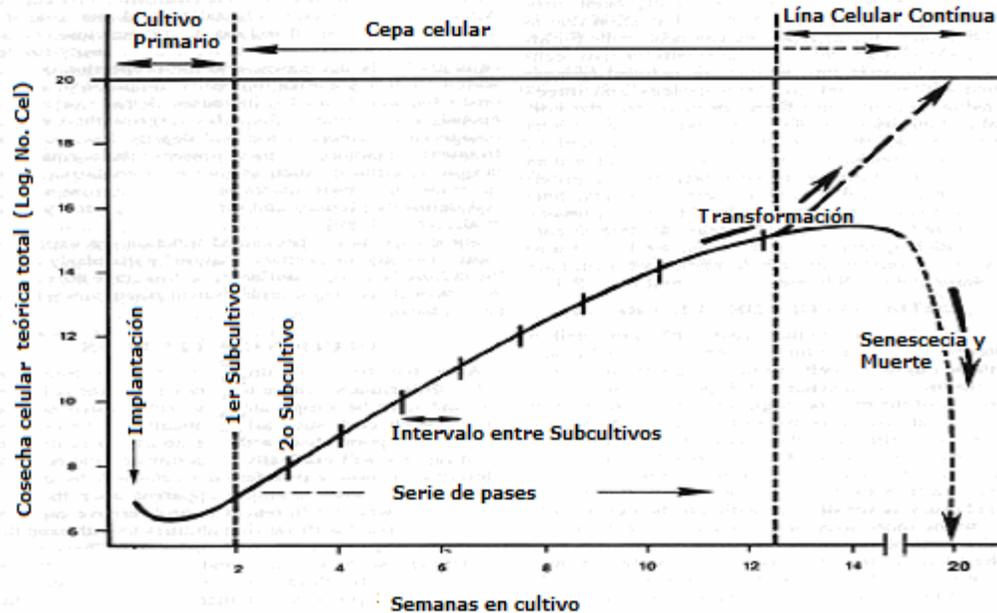


FIGURA 29: Evolución de una línea celular hipotética. Comportamiento a lo largo de las semanas. <sup>(102)</sup>

## B) EN EMBRIÓN DE POLLO

En huevos fecundados, después de 6 a 8 días a partir de la puesta. También pueden ser de otras aves. Los virus se inyectan en el interior del huevo embrionado con una jeringa y dependiendo del tipo de virus se deben inyectar en una región determinada. <sup>(34)</sup>

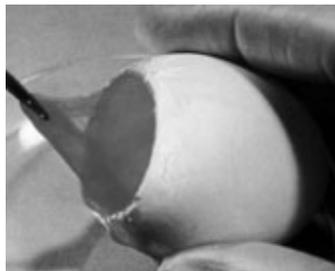


FIGURA 30: Embrión de Pollo.

## C) EN ANIMALES DE LABORATORIO

En la actualidad el uso de animales enteros se usa poco. <sup>(34)</sup>



FIGURA 31: Rata Wistar.

### 3.2 REQUERIMIENTOS DEL CULTIVO CELULAR

La validez de un cultivo celular como modelo de función fisiológica *in vivo* ha sido criticado, ya que se presentan problemas de caracterización por la alteración del desarrollo celular; la proliferación *in vitro* no se presenta de igual manera a la de *in vivo*, debido a la reducción de la relación célula-célula y la interacción matriz-célula por la no presencia de la heterogeneidad y la estructura tridimensional de las células halladas *in vivo*, además porque el medio hormonal y nutricional se ve alterado. Esto crea un ambiente que favorece la difusión, migración y proliferación de células no especializadas, pero no a la expresión de funciones diferenciadas. La provisión de un ambiente apropiado, nutriente, hormonas y sustratos son fundamentales para la expresión de funciones especializadas. <sup>(34)</sup>

En un cultivo celular la mayoría de las células crecidas a partir de un tejido sólido disgregado o de un subcultivo tienen la capacidad de adherirse en monocapa, transformarse o anclarse independientemente. Esta adherencia celular es mediada por receptores celulares específicos de superficie en la matriz extracelular y la dispersión celular podría ser precedida por la secreción de proteínas de matriz extracelular y proteoglicanos por parte de la célula. Las células se pueden anclar y difundir en el vidrio donde se cultivan por medio de ligeras cargas negativas y al plástico, como el poliestireno, si tienen una propiedad o tratamiento con descargas eléctricas o con radiación ionizante de alta energía. El cultivo en vidrio o plástico provee condiciones favorables para el crecimiento y anclaje celular. <sup>(34)</sup>

El crecimiento de las células en un cultivo celular primario depende de la supervivencia de éstas a las diferentes técnicas de disgregación y a la capacidad de adherirse al sustrato o de sobrevivir en suspensión. Si el cultivo primario es mantenido por pocas horas podría ocurrir un paso de selección futuro. Las células capaces de proliferar podrían aumentar, otros tipos de células podrían sobrevivir pero no aumentar y otras podrían ser capaces de sobrevivir en condiciones especiales. Además el crecimiento celular va ligado al espacio del cultivo, ya que unas células detienen su crecimiento, mientras que otras lo incrementan. <sup>(34)</sup>

## Niveles y normas de seguridad <sup>(1)</sup>

### American Type Culture Collection (ATCC)

- g) Nivel 1. No presentan peligros reconocidos cuando se utilizan en condiciones normales.
- h) Nivel 2. Se emplean para materiales de origen primario humano que no se conoce el riesgo de infección o que tienen la posibilidad de que en las muestras contengan VIH, TBC, hepatitis B u otros patógenos.
- i) Nivel 3. Su manejo puede presentar un riesgo potencial.
- j) Nivel 4. Extremadamente peligrosos. <sup>(1)</sup>

## EN QUÉ CONSISTE UN LABORATORIO DE CULTIVOS CELULARES

Un laboratorio de cultivo celular debe contar con una infraestructura básica en la cual se disponga de áreas independientes para llevar a cabo la preparación y esterilización de medios y reactivos, un espacio independiente para el proceso de lavado y preparación de material y un área propiamente destinada al trabajo con cultivos celulares. <sup>(32)</sup>

Dentro de la infraestructura física básica se debe contar con sistemas de refrigeración y congelación, incubadoras, centrifugas, balanzas, microscopios y cabinas de flujo laminar. <sup>(32)</sup>

Adicionalmente, se debe disponer de un buen suplemento de material plástico y de vidrio y con sistemas de esterilización apropiados para los diferentes tipos de reactivos y material utilizados. <sup>(32)</sup>

Desde el punto de vista de los sistemas de esterilización se pueden citar los siguientes:

- Calor Húmedo: Mediante el empleo de autoclaves los cuales proporcionan una temperatura de 121°C y una presión de 15 lb. Utilizados para la esterilización de soluciones cuyos componentes no se degradan por éste método, material plástico y de vidrio y equipos de filtración. <sup>(32)</sup>
- Calor Seco: Lo constituye el uso de hornos a temperatura de 200°C por espacio de 3 horas. Es empleado para la esterilización de material de vidrio particularmente. <sup>(32)</sup>
- Filtración: A través del uso de equipos con membrana de nitrocelulosa o acetato de celulosa con poro de 0.22 ó 0.1 mm de diámetro, mediante la aplicación de presión positiva o negativa. Por éste sistema se esterilizan la mayor parte de los medios de cultivo, suero, solución de antibiótico-antimicótico y suplementos. <sup>(32)</sup>

## Contaje celular

Para la siembra de las células se deben tener en cuenta los siguientes cálculos:

$$\text{Porcentaje de viabilidad (\%)} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{\# de células totales} * 100}$$

**\* >85-90% se siembra.**

\*Número de células vivas/ml = Células contadas vivas x factor de dilución x 104.

\*Número de células necesarias = Número de placas x la mitad del volumen de cada placa x células viables (1.350.000 para neuronas).

*Nota: Hemocitómetro o cámara de Neubauer, aparato para hacer contajes en el microscopio.*

El papel del suero, especialmente fetal bovino en el establecimiento y mantenimiento de líneas y cultivos celulares, es fundamental; cuando estos se han establecido en medios libres de suero, el crecimiento celular requiere, la suplementación con hormonas y otros factores de crecimiento que están involucrados en transporte de nutrientes, mantenimiento de balance de energía celular, control de síntesis de macromoléculas y factores que estimulan la formación del producto deseado. <sup>(32)</sup>

## 3.3 ENSAYOS DE INFECTIVIDAD VIRAL

### A) FÍSICOS

- CENTRIFUGACIÓN.
- ELECTROFORESIS.
- ESPECTROFOTOMETRÍA.

### B) QUÍMICOS.

- CROMATOGRAFÍA.
- PRECIPITACIÓN.
- DIÁLISIS.

### C) MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

- DE TRANSMISIÓN.
- DE BARRIDO.

## D) MÉTODOS INMUNOLÓGICOS.

- HEMAGLUTINACIÓN.
- INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN.
- HEMADSORCIÓN.
- NEUTRALIZACIÓN.
- ELISA.
- WESTERN BLOT.
- RIA.
- INMUNOFLUORESCENCIA.
- BIO/QUIMIOLUMINISCENCIA.

## E) MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

- PCR.
- SLOT BLOT.
- SOUTHERN BLOT.
- NORTHERN BLOT.
- HIBRIDACIÓN IN SITU.
- CAPTURA DE HÍBRIDOS.
- RFLP.

## F) METODOS CUANTITATIVOS

A) FÍSICOS <sup>(2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)</sup>• **Centrifugación:**

Hay dos tipos de procesos de centrifugación: *centrifugación preparativa*, cuyo objeto es aislar partículas específicas, y *centrifugación analítica*, con la que se pretenden estimar propiedades físicas de alguna partícula en concreto: sus propiedades hidrodinámicas. <sup>(2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)</sup>

Dentro de la centrifugación preparativa hay dos métodos esenciales de separación: la *centrifugación diferencial* y la *centrifugación en gradiente de densidad (zonal e isopícnica)*.

- Tipos de centrífugas.

## 1. Centrífugas de baja velocidad, de sobremesa o clínicas.

- Pequeño tamaño.
- Sin refrigeración.
- Máxima velocidad: 5000 rpm.



- Útil para partículas grandes (células, precipitados de sales insolubles...). (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

### 1.a. Microcentrifugas: variante de las anteriores.

- Velocidades altas: más de 10000 rpm y tubos cortos.
- Volúmenes muy pequeños.
- Útiles en Biología Molecular. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)



### 2. Centrifugas de alta velocidad.

- Velocidad entre 18000 y 25000 rpm.
- Refrigeradas, algunas con sistema de vacío.
- Útiles en la separación de fracciones celulares.
- Insuficientes para la separación de ribosomas, virus o macromoléculas. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)



### 3. Ultracentrifugas.

- Velocidad: a partir de 50000 rpm.
- Presentan sistemas auxiliares: sistemas de refrigeración, sistemas de alto vacío. 2 tipos:
  - Analíticas: obtención de datos precisos de propiedades de sedimentación (s, PM).
  - Preparativas: aislamiento de partículas de bajo S (microsomos, virus, macromoléculas). (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)



- **Electroforesis:**

Movimiento de partículas eléctricamente cargadas a través de un gas o líquido como resultado de un campo eléctrico formado entre unos electrodos sumergidos en el medio. Si las partículas en suspensión se desplazan hacia el cátodo, el electrodo negativo, el proceso se denomina cataforesis; si lo hacen hacia el ánodo, el electrodo positivo, se habla de anaforesis. La electroósmosis es un fenómeno relacionado en el que se mantiene inmóvil la fase sólida y el líquido se desplaza debido al campo eléctrico aplicado. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

- **Espectrofotometría:**

Se fundamenta en la medición de la intensidad de un espectro determinado en comparación con la intensidad de luz procedente de una fuente patrón. Esta comparación permite determinar la concentración de la sustancia que ha producido ese espectro. Los espectrofotómetros también son útiles para estudiar espectros en las zonas no visibles

porque sus elementos de detección son bolómetros o células fotoeléctricas. Los primeros se aplican especialmente al análisis de espectros de infrarrojos, y los segundos al de espectros ultravioletas. <sup>(2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)</sup>

## B) QUÍMICOS

- **Cromatografía:**

Técnica de análisis químico utilizada para separar sustancias puras de mezclas complejas. Esta técnica depende del principio de adsorción selectiva. A medida que la disolución va filtrándose por la columna, cada componente de la mezcla precipita a diferente velocidad, quedando la columna marcada por bandas horizontales de colores, denominadas cromatogramas. Cada banda corresponde a un pigmento diferente. <sup>(2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)</sup>

La cromatografía en columna utiliza un amplio espectro de adsorbentes sólidos, incluidas la sílice, la alúmina y la sílice gelatinosa. También los líquidos pueden ser adsorbidos en estos sólidos y a su vez sirven como adsorbentes (un proceso denominado cromatografía de reparto) permitiendo al químico elaborar columnas de diferentes propiedades para diversas aplicaciones. En la cromatografía con líquidos de alto rendimiento (HPLC), una variante de esta técnica de uso frecuente hoy en día, se utilizan líquidos adsorbidos en partículas muy pequeñas y uniformes, lo cual proporciona una sensibilidad bastante alta. Para llevar la mezcla a través de la columna se precisa una bomba. La cromatografía de capas finas es otra forma de cromatografía en columna, en la cual el material adsorbente reposa en un cristal o en una película de plástico. <sup>(2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)</sup>

En la cromatografía en papel, una muestra líquida fluye por una tira vertical de papel adsorbente, sobre la cual se van depositando los componentes en lugares específicos. Otra técnica conocida como cromatografía gas-líquido permite la separación de mezclas de compuestos gaseosos o de sustancias susceptibles de vaporizarse por calor. La mezcla vaporizada es conducida mediante un gas inerte a través de un estrecho tubo en espiral que contiene una sustancia, por la que los componentes fluyen en diferentes proporciones, siendo detectados al final del tubo. Otro método es la cromatografía por infiltración gelatinosa, basado en la acción filtrante de un adsorbente poroso de tamaño uniforme. Con este método se consigue separar y detectar moléculas de mayor masa molecular. <sup>(2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)</sup>

El uso de la cromatografía está ampliamente extendido en el análisis de alimentos, medicinas, sangre, productos petrolíferos y de fisión radiactiva. <sup>(2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)</sup>

- **Precipitación:**

Proceso o fenómeno de formación de un segundo estado o fase de la materia, dentro de una primera fase. Si por ejemplo, el aire que contiene vapor de agua se enfría por debajo del punto en que se forma el rocío, se crea un precipitado de agua líquida dentro de la fase gaseosa. Este precipitado puede adoptar la forma de niebla, lluvia o condensación en una superficie. Si una disolución se sobresatura de un componente que se vuelve sólido a la temperatura existente, este componente tenderá a cristalizar y formar núcleos, o bien

precipitará espontáneamente. Así esta sustancia podrá sedimentarse o separarse de la fase líquida por el proceso de filtración o centrifugación. También puede darse un precipitado de una fase sólida en una segunda fase sólida, como es el caso de algunas aleaciones metálicas en las que el precipitado aporta un aumento significativo de dureza y resistencia a la tracción del metal. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

- **Diálisis:**

Paso de un componente de una disolución a través de una membrana que impide el paso del resto de los componentes de dicha disolución. Para elegir el tipo de membrana que nos permita una ósmosis selectiva debemos experimentar primero hasta dar con la adecuada. Muchas membranas permiten pasar todos los componentes de la disolución, otras no dejan pasar ninguno y otras, finalmente, sólo permiten un paso selectivo. En la ósmosis clásica, se introduce en un recipiente con agua un tubo vertical con el fondo cerrado con una membrana semipermeable y que contiene una disolución de azúcar. A medida que el agua pasa a través de la membrana hacia el tubo, el nivel de la disolución de azúcar sube visiblemente. Una membrana semipermeable idónea para este experimento es la que existe en el interior de los huevos, entre la clara y la cáscara. En este experimento, el agua pasa en ambos sentidos a través de la membrana. Pasa más cantidad de agua hacia donde se encuentra la disolución concentrada de azúcar, pues la concentración de agua es mayor en el recipiente con agua pura; o lo que es lo mismo, hay en ésta menos sustancias diluidas que en la disolución de azúcar. El nivel del líquido en el tubo de la disolución de azúcar se elevará hasta que la presión hidrostática iguale el flujo de moléculas de disolvente a través de la membrana en ambos sentidos. Esta presión hidrostática recibe el nombre de presión osmótica. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

## C) MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA

- **De Transmisión:**

Dirige el haz de electrones hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada del espécimen. Para utilizar un microscopio de transmisión debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores de un par de miles de angstroms. Se coloca una placa fotográfica o una pantalla fluorescente detrás del objeto para registrar la imagen aumentada. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

- **Tinción Negativa:** consiste en mezclar una suspensión donde suponemos que están los virus, con una sal densa de electrones, por ejemplo acetato de uracilo, fosfotungstato potásico (ácido fosfotungstico). Esta mezcla se deposita en una

rejilla de microscopia electrónica y se observa al microscopio electrónico de transmisión. Con esta técnica, los virus no se tiñen en realidad, sino que se tiñe el medio. Esta es la técnica mas usada debido a que es la mas sencilla de realizar. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

- **De Barrido:**

Un microscopio electrónico de barrido crea una imagen ampliada de la superficie de un objeto. No es necesario cortar el objeto en capas para observarlo con este tipo de microscopio, sino que puede colocarse con muy pocos preparativos. El microscopio e barrido explora la superficie de la imagen punto por punto, al contrario que el de Transmisión, que examina una gran parte de la muestra cada vez. Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz muy concentrado de electrones, de forma parecida al barrido de un haz de electrones por la pantalla de una televisión. Los electrones del haz pueden dispersarse al alcanzar la muestra o provocar la aparición de electrones secundarios. Los electrones dispersados y los secundarios son recogidos y contados por un dispositivo electrónico situado a los lados del espécimen. Cada punto leído de la muestra corresponde a un píxel en un monitor de televisión. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

Cuanto mayor sea el número de electrones contados por el dispositivo, mayor será el brillo del píxel en la pantalla. A medida que el haz de electrones barre la muestra, se presenta toda la imagen de la misma en el monitor. Los microscopios electrónicos de barrido pueden ampliar los objetos 100.000 veces o más. Este tipo de microscopio es muy útil porque, al contrario que los de transmisión o los microscopios ópticos, produce imágenes tridimensionales realistas de la superficie del objeto. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

- **Sombreado:** consiste en depositar a los virus sobre una rejilla y hacer incidir sobre la misma un metal, normalmente platino, con un cierto ángulo, respecto a la rejilla. El platino, cubre a los virus, pero queda en un lado una sombra de color claro (el platino queda oscuro). Entonces al observar la rejilla, se verán los virus oscuros y la sombra clara. Entonces se observa una imagen de aspecto tridimensional. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

Mediante estas dos técnicas, se puede demostrar la presencia de virus en una muestra, pero también se pueden contar, por un método que consiste en mezclar la solución de virus que se puede cuantificar, con una de esferas de látex. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

Mediante microscopia electrónica, se cuentan tanto virus con capacidad de infectar células como virus que tengan algún defecto, y no puedan infectar células o incluso cápsides vacías.<sup>(10)</sup>

## D) MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

- **HEMAGLUTINACIÓN:**

Algunos virus o el antígeno derivado de ellos, se adsorben a los eritrocitos a través de receptores en sus membranas. Como resultados los eritrocitos se aglutinan, este fenómeno se denomina hemaglutinación.

La prueba de hemaglutinación es muy sencilla. Básicamente, una suspensión de eritrocitos se pone en contacto con:

1. Una preparación que contiene virus o sus antígenos
2. Una preparación sin virus o sin antígenos

Los eritrocitos sedimentan en la solución por gravedad ya sea en el caso uno en grumos grandes o en el caso dos como un disco al fondo del tubo de prueba.

A esta prueba se le llama Método patrón y fue desarrollado por J. Salk. En esta prueba existen limitaciones de pH, temperatura, rango de eritrocitos aglutinables, inhibidores no específicos del suero, etc.

Las especies de animales cuyos eritrocitos aglutinan varía dependiendo del virus al que se somete a esta prueba. Algunos virus tienen un rango muy amplio para esta prueba y otros muy escaso, en cuanto a las especies de animales cuyos eritrocitos aglutinan. <sup>(49)</sup>

<b>Virus</b>	<b>Eritrocitos que aglutinan</b>
Enterovirus	O humanos
Newcastle, Influenza A y B y Parainfluenza 1-4	O humanos, cobayo y pollo
Reovirus	O humanos ó bovinos
Adenovirus grupo 1	De mono rhesus
Adenovirus grupo 2 y 3	De rata

Tabla 14: Lista de los virus mas representativos y los eritrocitos que proporcionan una aglutinación.

Debe utilizarse un paquete de eritrocitos con una concentración entre 0.25 y 1.0 % (concentración final en la prueba de 0.12 a 0.33%)

Existe una relación inversa entre la concentración eritrocitaria y el título de aglutinación de un antígeno viral. Los eritrocitos de mamíferos se utilizan en una concentración ligeramente mas elevada que los provenientes de aves debido a que sedimentan mas lentamente; aumentar el número disminuye el rango de sedimentación. <sup>(49)</sup>

Los eritrocitos usualmente se consiguen comercialmente, sin embargo si se tiene que sangrar a un animal se debe de utilizar 1 parte de citrato de sodio al 5% por cada 5 partes de sangre. Posteriormente los eritrocitos deben de lavarse tres veces con solución salina al 0.85% utilizando 5 volúmenes de la solución salina en la mezcla de sangre con citrato de sodio, una vez realizado esto se debe de centrifugar a 250g por 10 min. Decantar y repetir dos veces mas. Desechar el último lavado y resuspender el paquete celular en solución salina para obtener una solución stock al 10%. Ésta solución deberá almacenarse en refrigeración a 4° C por 5 o 6 días. <sup>(49)</sup>

El pH adecuado para la mayoría de los virus es de 6.0 – 8.5, esta suspensión de eritrocitos con citrato de sodio tiene un pH de 7.2. <sup>(49)</sup>

La temperatura para la reacción de hemaglutinación es usualmente de 22 a 37° C, debido a que acelera la aglutinación y los patrones son mas agudos. Algunos virus aglutinan solo a 4° C como la Influenza C por ejemplo. <sup>(49)</sup>

El tiempo que se requiere para que los eritrocitos sedimenten dependerá de la especie. Las células de aves a 37° C sedimentan en 1 hora, mientras que las células mamíferas tardan de 4 a 8 horas. <sup>(49)</sup>

## MATERIAL

- ◆ Suspensión viral.
- ◆ Eritrocitos con citrato de sodio.
- ◆ PBS 0.01 M, pH 7.2.
- ◆ Tubos para centrifugar.
- ◆ Tubos de ensaye con fondo redondo de 12 x 72 mm.
- ◆ Pipetas estériles de 1.0 y 10 ml.
- ◆ Centrífuga y gradilla.
- ◆ Baño maría a 37° C.

## PROCEDIMIENTO:

- A) Separar el suero de los eritrocitos como se mencionó anteriormente.
- B) Preparar una suspensión de eritrocitos al 5% en PBS.
- C) Preparar por duplicado diluciones de suspensión viral con PBS de 1:10 hasta 1:640.

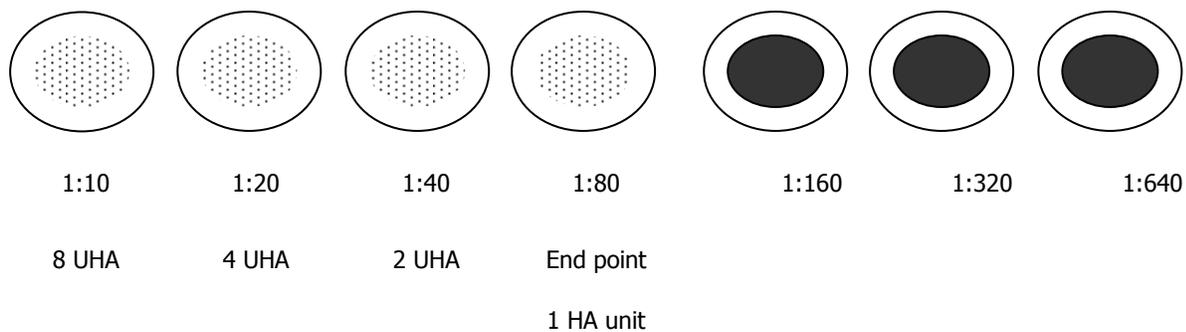
Dilución:	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	Control
PBS ml	3.6	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Virus ml	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4 y desechar	
	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4		0.0

- D) Agregar 0.4 ml de la suspensión de eritrocitos al 0.5% a todos los tubos ( el tubo control deberá contener 0.4 ml de PBS mas 0.4 ml de suspensión de eritrocitos).
- E) Agitar los tubos y colocarlos en baño maría a 37° C o asegurar esta temperatura y dejarlos reposar hasta que sedimenten los eritrocitos.

## RESULTADOS:

Los resultados de la prueba se determinan a través de los diferentes patrones formados por las células sedimentadas. Los patrones se leen al observar los tubos por abajo o colocando la gradilla sobre un espejo.

- a) En el tubo control, las células ruedan al fondo y sedimentan formando un disco finamente delineado.
- b) Las reacciones intermedias, se observan como grumos irregulares de células asociadas con un halo de células finamente agregadas.
- c) La máxima aglutinación se caracteriza por una fina cubierta rosa salmón al fondo del tubo.
- d) Los resultados de la hemaglutinación son normalmente graduados 0,1,2,3 ó 4+.
- e) El punto final se toma como la dilución mayor a la que se observa máxima aglutinación (4+). Esta dilución contendrá 1UHA (unidad hemaglutinante) por el volumen que se haya agregado, la siguiente dilución menor (mas concentrada a ésta) tendrá 2 UHA, etc.



### • INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN:

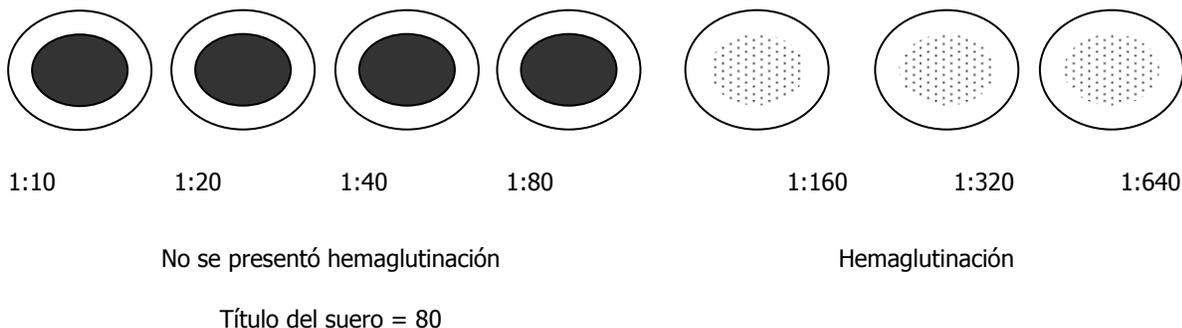
La prueba de inhibición de la hemaglutinación esta basada en la inhibición de la hemaglutinina viral por un anticuerpo específico. La prueba detecta indirectamente, la presencia de un virus hemaglutinante. Debido a que el virus es una proteína extraña, propiciará la formación de anticuerpos en el hospedero. Si el suero del hospedero inhibe la hemaglutinación de un virus que normalmente lo hace, entonces significa que el virus se encontraba en el hospedero. <sup>(49)</sup>

#### MATERIAL:

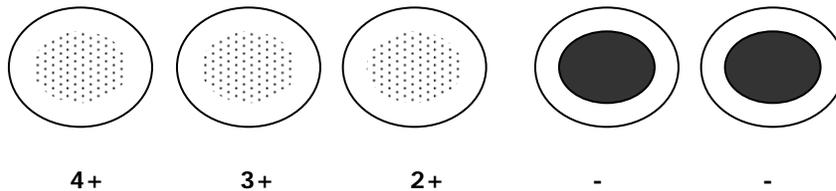
- ◆ Suspensión viral.
- ◆ Antisuero específico.
- ◆ Eritrocitos con citratos de sodio.
- ◆ PBS estéril.
- ◆ Tubos para centrifugar estériles.
- ◆ Gradilla.
- ◆ Tubos de ensaye estériles de 12 x 72 con fondo redondo.
- ◆ Pipetas estériles de 1.0 y 10 ml.
- ◆ Centrífuga.
- ◆ Baño maría a 37° C.

## MÉTODO:

- A) Hacer una serie de diluciones de antisuero en PBS por duplicado, empezando en 1:10. Distribuyendo el suero diluido en cantidades de 0.2 ml en tubos de ensaye pequeños.
- B) Titular el antígeno como en la prueba de HA. Determinar la dilución que contenga 4 unidades por cada 0.2 ml. Agregar 4 unidades de antígeno en 0.2 ml de volumen en cada tubo de antisuero.
- C) Incluir los siguientes controles:
- Suero solo, dilución 1:10, 0.4 ml.
  - Antígeno solo, 4 unidades en 0.4 ml.
  - Suero positivo, 1:10, 0.4 ml.
  - Suero negativo, 1:10, 0.4 ml.
  - Como una comprobación de las diluciones y las variaciones en los eritrocitos de un baño a otro, hay que hacer al mismo tiempo una titulación de la dilución de 4 UHA en 0.2 ml.
    - Agregar 0.4 ml de PBS a 5 tubos de ensaye.
    - Al primer tubo agregar 0.4 ml de la dilución viral, (en el caso anterior 1:10) con 8 UHA. Mezclar y transferir 0.4 ml al segundo tubo y así hasta desechar los 0.4 ml del 5to tubo.
- D) Incubar a temperatura ambiente por 30 o 60 minutos.
- E) Agregar 0.4 ml de solución eritrocitaria al 0.5 %. Agitar y colocar todos los tubos a una temperatura adecuada, hasta que los eritrocitos del control hayan sedimentado.
- F) Leer el título del suero. Este es la dilución mas alta de hemaglutinación inhibida por suero del virus y que se expresa como el recíproco de la dilución.

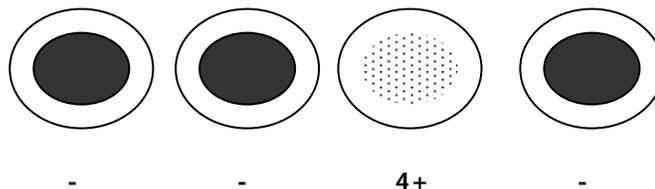


- G) Leer la titulación simultánea como sigue: Solo los primeros tres tubos deben mostrar hemaglutinación, indicando que efectivamente solo eran 4 UHA por cada 0.2 ml usados en la prueba. Si fueran mas de tres tubos los que mostraran hemaglutinación, quiere decir que la concentración del virus es mayor y habrá que diluirlo con mas PBS, si fueran menos de tres tubos entonces, hay que aumentar la concentración del virus.



- H) Leer los controles:

- El suero solo debe ser negativo.
- Antígeno solo negativo.
- Suero positivo debe ser positivo.
- Suero negativo debe ser negativo.



### • HEMADSORCIÓN:

La adsorción específica de los eritrocitos al cultivo celular provee un acercamiento práctico al diagnóstico de una infección viral, antes de que el CPE sea observado o en casos en donde el agente se puede propagar sin daños aparentes a las células. Esta técnica fue desarrollada por Vogel y Shelokov. La prueba debe hacerse con sangre O positiva de humano, calf, cerdo de guinea, oveja, rata, mono rhesus y pollo a una temperatura de 37° C, ambiente o a 4° C. <sup>(49)</sup>

#### MATERIAL:

- ◆ Células de cultivo de tejido infectado.
- ◆ Células control de cultivo de tejido.

- ◆ Eritrocitos apropiados con citratos.
- ◆ PBS estéril.
- ◆ Pipetas estériles de 1.0 y 10.0 ml.
- ◆ Tubos para centrifuga estériles.
- ◆ Matraz estéril.

#### PROCEDIMIENTO:

- B) Lavar los eritrocitos con citratos, tres veces utilizando PBS. Preparar una suspensión al 0.4% de eritrocitos ya lavados en PBS.
- C) Pour de media from control an infected tissue cultures into a contamination pan ( before CPE is visible).
- D) Agregar 0.2 ml de la suspensión eritrocitaria al 0.4% a cada tubo. Colocar los tubos horizontalmente de manera que los eritrocitos cubran la superficie de la sábana de células e incubarlos a una temperatura apropiada.
- E) Observar microscópicamente a intervalos por aglutinación de los eritrocitos y una adsorción de los eritrocitos en la sábana de células.

#### NEUTRALIZACIÓN

El suero y los virus se unen bajo ciertas circunstancias y son inoculados en un hospedero susceptible (animal, embrión de pollo ó cultivo celular). Si los anticuerpos para el virus en cuestión están ausentes, la enfermedad, lesiones o la muerte podría presentarse. Cuando los anticuerpos están presentes no se observan estas reacciones. <sup>(49)</sup>

La muestra viral puede consistir de los fluidos provenientes de un embrión de pollo, cultivo de tejidos o de extractos de tejidos infectados (cerebro, hígado, etc.). Este debe usarse directamente después de una centrifugación lenta (205 g, 15-20 min) para remover sedimentos. Esta preparación debe usarse fresca cuando sea posible o los tejidos deberán ser congelados; en caso de ser liofilizados, a  $-20^{\circ}$  C; si se congela en una ampolleta a  $-60^{\circ}$  C o menos. <sup>(49)</sup>

La selección del sistema indicador depende de la infectividad y letalidad del virus para un hospedero en particular, el costo, la disponibilidad, la facilidad para su manejo, etc. Animales (ratones, hamsters, pollos), embriones de pollo o pato ó cultivos celulares pueden utilizarse. <sup>(49)</sup>

Existen dos métodos para realizar las pruebas de neutralización:

1. Procedimiento Alfa:

Cantidades iguales y controladas de suero y diluciones crecientes de virus se incuban juntas y después se inoculan en el sistema indicador. (suero constante con diluciones de virus).<sup>(49)</sup>

2. Procedimiento Beta:

Se colocan a incubación virus en concentraciones de 10 y/ o 100 TCID<sub>50</sub> con una serie de diluciones por duplicado del suero antes de ser inoculado.<sup>(49)</sup>

El procedimiento mas reciente es mas usado con cultivo de tejidos debido a que es mas económico con respecto a la cantidad de suero que requiere y es una prueba de mucha sensibilidad. También se puede titular un *Broâder range* de anticuerpos cuando se utiliza una cantidad de virus constante. La temperatura y el tiempo de incubación de la solución viral dependerá del agente utilizado, sin embargo aún no hay un acuerdo general con respecto a que rangos utilizar para las diferentes circunstancias que se presenten durante el análisis viral.<sup>(49)</sup>

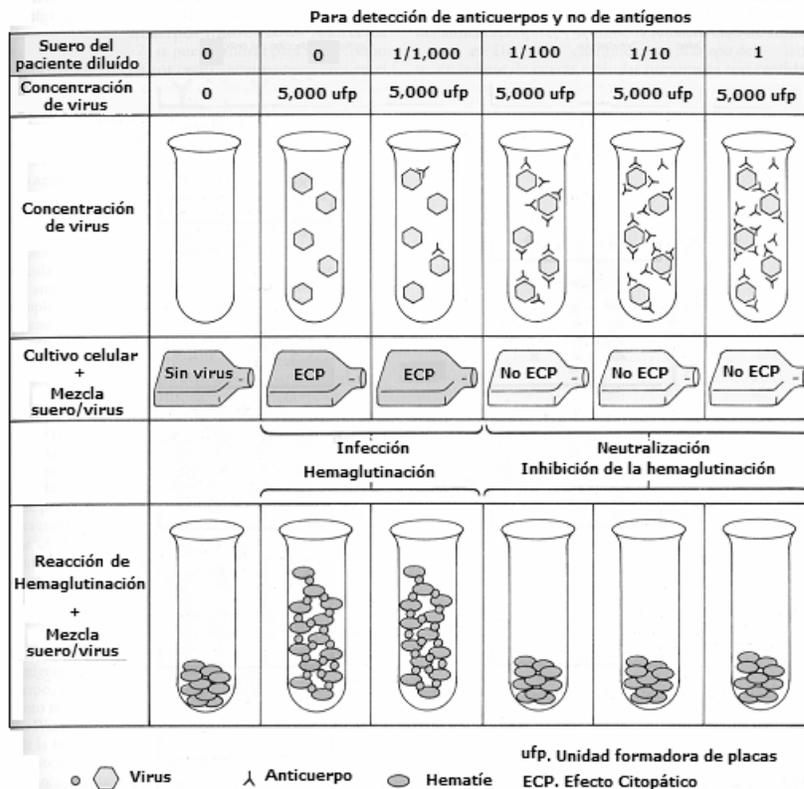


FIGURA 32: Análisis de neutralización, hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación. En el análisis mostrado se incuban suero diluido 1:10 con el virus, esto se añade después a cultivos celulares o hematíes. En ausencia de anticuerpos, el virus infecta la monocapa (indicado por ECP) y produce hemaglutinación (formación de una suspensión de hematíes similares a un gel). En presencia de anticuerpos se bloquea la infección (neutralización) y se inhibe la hemaglutinación (IH), permitiendo que los hematíes formen un grumo. El título de anticuerpos de la muestra es 100.<sup>(40)</sup>

- **ELISA:**

El análisis de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), usa antígeno inmovilizado en una superficie de plástico, perla o filtro, para capturar y separar el anticuerpo específico contra el virus, de otros anticuerpos presentes en el suero del paciente. El anticuerpo del paciente fijado se detecta después mediante un anticuerpo antihumano unido de forma covalente a una enzima (peroxidasa del rábano picante, fosfatasa alcalina o beta-galactosidasa). Se cuantifica espectrofotométricamente por la intensidad del color de un sustrato apropiado, causado por la acción enzimática. Las muchas variaciones de la técnica ELISA difieren en los medios para capturar y detectar el anticuerpo o el antígeno.

Encontramos un ejemplo de prueba ELISA usada frecuentemente, en el test rápido para embarazo basado en la detección de la hormona coriogonadotrofina humana.

La prueba ELISA se puede emplear también para cuantificar el antígeno soluble presente en una muestra clínica. El antígeno soluble es concentrado y capturado por el anticuerpo, y después se detecta mediante un anticuerpo distinto marcado con enzima.<sup>(26)</sup>

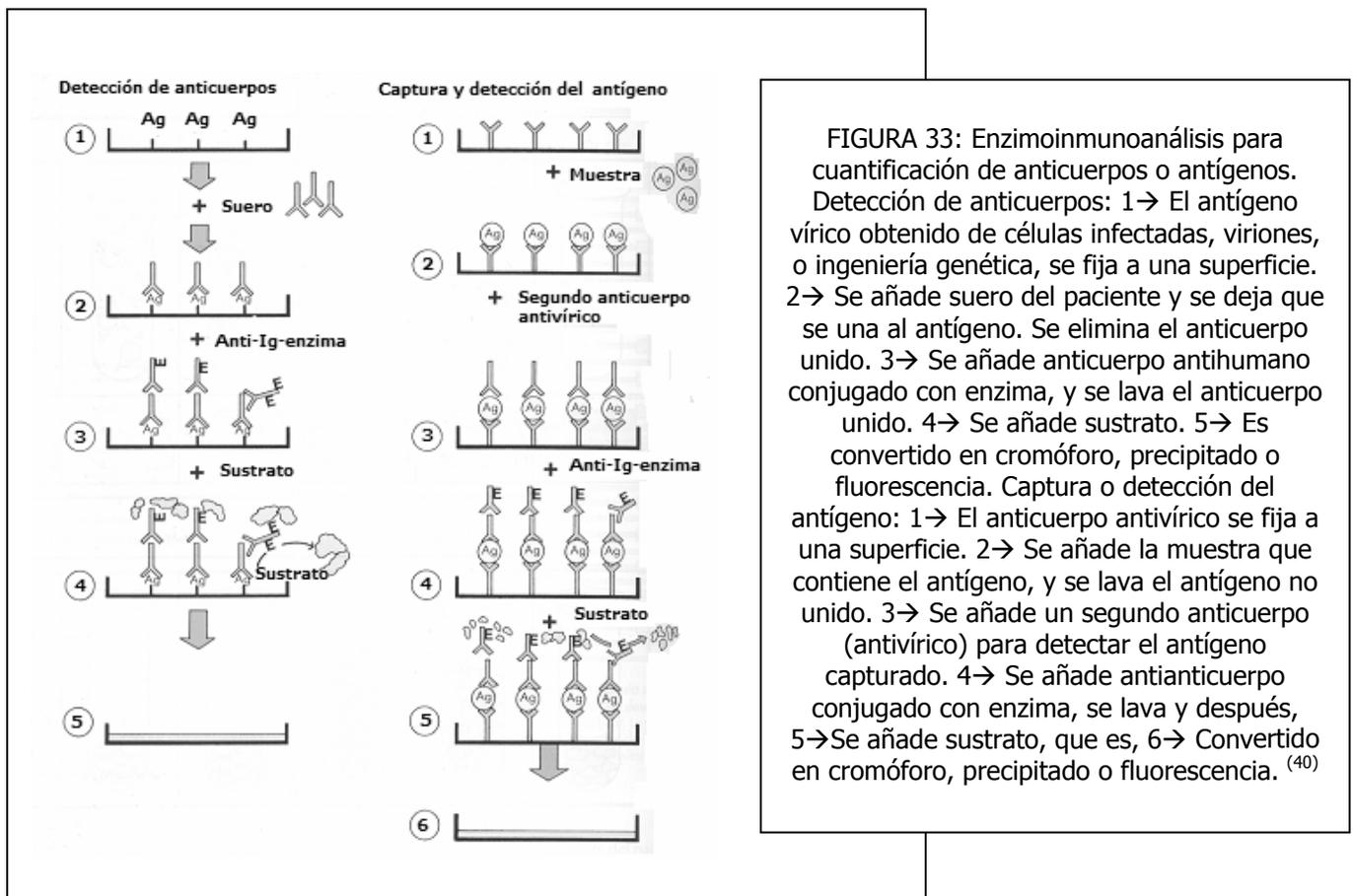


FIGURA 33: Enzimoanálisis para cuantificación de anticuerpos o antígenos. Detección de anticuerpos: 1→ El antígeno vírico obtenido de células infectadas, viriones, o ingeniería genética, se fija a una superficie. 2→ Se añade suero del paciente y se deja que se una al antígeno. Se elimina el anticuerpo unido. 3→ Se añade anticuerpo antihumano conjugado con enzima, y se lava el anticuerpo unido. 4→ Se añade sustrato. 5→ Es convertido en cromóforo, precipitado o fluorescencia. Captura o detección del antígeno: 1→ El anticuerpo antivírico se fija a una superficie. 2→ Se añade la muestra que contiene el antígeno, y se lava el antígeno no unido. 3→ Se añade un segundo anticuerpo (antivírico) para detectar el antígeno capturado. 4→ Se añade anticuerpo conjugado con enzima, se lava y después, 5→ Se añade sustrato, que es, 6→ Convertido en cromóforo, precipitado o fluorescencia.<sup>(40)</sup>

**Requerimientos de ELISA** (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

1. Soporte físico.
2. Solución lavadora.
3. Ag/Ac.
4. Muestra biológica.
5. Conjugado.
6. Sustrato.
7. Bloqueadores.
8. Enzimas/ Fluorocromos/ Isótopos radioactivos → Sustancia luminiscente. <sup>(4)</sup>

**1. SOPORTE FÍSICO**

- ◆ Partículas: Celulosa, Vidrio microcristalino, Poliacrilamida, Dextranos, Gomas de silicón, Plásticos.
- ◆ Tubos: Látex, Poliestireno.
- ◆ Papel: PNC, Nylon.
- ◆ Esferas: Nylon, Metálicas, Cloruro de polivinílico, Poliestireno, Acrílico.  
(2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

Las esferas de poliestireno son el soporte físico de preferencia debido a las siguientes características:

- a) Absorbe compuestos biológicos (macromoléculas y partículas).
- b) Excelente claridad óptica.
- c) Resistente (dureza mecánica).
- d) Buenas propiedades moldeables.
- e) Resistencia a ácidos, bases, alcoholes y en general a solventes orgánicos.
- f) Material de bajo costo. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

Forramiento: Aspectos a cuidar → Concentración de Ag/Ac, tiempo de incubación, buffer (carbonatos, boratos, fosfatos), pH y temperatura. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

## 2. SOLUCIÓN LAVADORA

Se pueden utilizar dos tipos de soluciones:

- ◆ Solución Buffer de fosfatos (PBS).
- ◆ Detergentes (Tween 20 – 80). (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

## 3. ANTÍGENO / ANTICUERPO

Este punto se refiere a las variables que vamos a medir. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

## 4. MUESTRA BIOLÓGICA

Los aspectos más importantes que debemos cuidar de nuestra muestra biológica son:

- ◆ Dilución.
- ◆ Tratamiento adecuado de la muestra y limpieza

Las muestras biológicas que pueden utilizarse para realizar esta prueba son:

- ◆ Suero.
- ◆ Líquido céfalorraquídeo.
- ◆ Calostro.
- ◆ Saliva.
- ◆ Materia fecal.
- ◆ Líquidos intraocular, auditivo, pleural etc.
- ◆ Sobrenadantes mab´s = sobrenadantes de anticuerpos monoclonales. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

## 5. CONJUGADO

El conjugado es el antígeno o el anticuerpo (dependiendo de si quiero determinar presencia de anticuerpos a antígenos respectivamente) unidos a enzimas que cumplan con las siguientes características:

- ◆ Estables.
- ◆ Altamente reactivas.
- ◆ Baratas.

- ◆ Seguras.
- ◆ Purificadas.
- ◆ Conjugables en forma estable.

Las enzimas que cumplen estas características son:

- ◆ Peroxidasa.
- ◆ Fosfatasa alcalina.
- ◆ Galactosidasa.
- ◆ Glucosa oxidasa.
- ◆ Acetil colinesterasa.
- ◆ Citocromo C.
- ◆ B – D – Gluconidasa.
- ◆ Lactato deshidrogenasa.
- ◆ Lactato peroxidasa.
- ◆ Ribonucleasa.
- ◆ Catalasa.

Los compuestos con los que éstas enzimas se pueden acoplar son:

- ◆ Glutaraldehído.
- ◆ Periodato.
- ◆ Bencidina diazotizada.
- ◆ p-Benzoquinona.
- ◆ Carbodimidas. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

## 6. SUSTRATO

Es importante cuidar que el sustrato:

- ◆ Tenga alteración sensible a la enzima.
- ◆ Sea completamente soluble.

- ◆ Con alto coeficiente de extinción.
- ◆ Barato.
- ◆ Seguro.
- ◆ Fácil de usar.

Los sustratos mas utilizado son:

- ◆ Peróxidos.
- ◆ p- Nitro fenil fosfato.
- ◆ B- Galactósido.
- ◆ Glucosa.
- ◆ Acetilcolina. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

## 7. BLOQUEADORES

También se refieren como fuentes de inespecificidad, se utilizan como soluciones para ultracentrifugación, el bloqueo propiamente y como detergentes. Estas soluciones pueden ser:

- ◆ Agregados de inmunoglobulinas.
- ◆ Complejos inmunes.
- ◆ Complemento.
- ◆ Disminución de Inmunoglobulina específica. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

## 8. CROMÓGENOS

Los mas comúnmente utilizados son:

- ◆ DAB: Diaminobencidina.
- ◆ Ácido 5 amino salicílico.
- ◆ Ortodianisidina.
- ◆ ABTS (2,2´ azino-di-(3 etilbenzotiazolin-6-sulfona).
- ◆ OPD: Ortofenilendiamina. (2,8,9,14,37,39,42,51,53,55)

- **RIA:**

Para el radioinmunoanálisis se utiliza anticuerpo o antígeno radiomarcado ( $^{125}\text{I}$ ), con el fin de cuantificar los complejos antígeno-anticuerpo. Como método de captura se puede emplear el RIA, según lo descrito previamente para el ELISA, o un método de competencia. En la técnica de competencia, el anticuerpo presente en el suero del paciente es cuantificado por su capacidad para competir con un anticuerpo radiomarcado preparado en el laboratorio, y sustituirlo en los complejos antígeno-anticuerpo. Los complejos son precipitados y separados del anticuerpo libre, y se mide la radioactividad de ambas fracciones. Después se cuantifica el anticuerpo del paciente, en la base de curvas estándar preparadas en cantidades conocidas del anticuerpo competidor. (7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)

- **WESTERN BLOT:**

Representa una variación más moderna de la técnica ELISA. Las proteínas víricas separadas mediante electroforesis, de acuerdo con su peso molecular o carga, son transferidas a un papel de filtro (nitrocelulosa, nylon), en el que producen una "mancha". Al contacto con el suero del paciente, las proteínas inmovilizadas capturan los anticuerpos, específicos para el virus y se visualizan mediante un anticuerpo antihumano conjugado con enzima. La Western blot se utiliza para confirmar los resultados de la prueba ELISA cuando se sospecha infección por VIH. (7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)

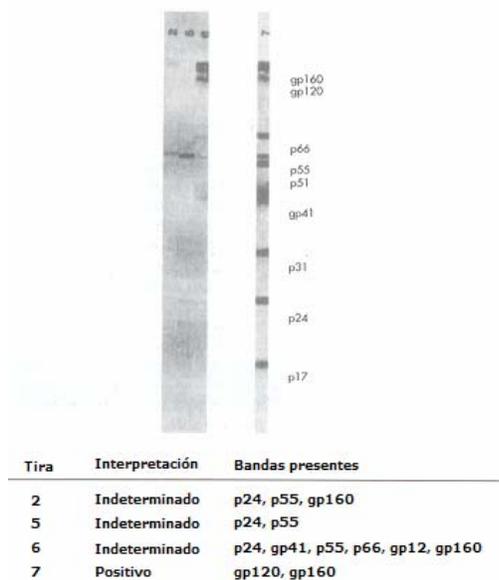


FIGURA 34: Análisis Western Blot de antígenos y anticuerpos contra el VIH. Los antígenos proteínicos de VIH se separan mediante electroforesis y se depositan en tiras de papel de nitrocelulosa (manchas). La tira se incubó con anticuerpo del paciente, se lava para eliminar el anticuerpo no unido y después se hace reaccionar con anticuerpo antihumano conjugado con enzima y sustrato cromóforo. El suero de un individuo infectado por el VIH se fijará e identificará las proteínas antigénicas mayores del VIH. Entre los cuatro sueros mostrados, sólo el suero 7 reconoce todos los antígenos y es definitivamente positivo.

- **INMUNOFLUORESCENCIA**

En este método, anticuerpos específicos conjugados con marcadores fluorescentes se utilizan como sondas para la detección de antígenos en especímenes tisulares o en células del paciente estudiado. En cada caso, la unión de los anticuerpos a los tejidos o células se visualizan directamente utilizando un microscopio de fluorescencia, al observar en un fondo oscuro los anticuerpos fluorescentes adheridos específicamente a antígenos que pueden visualizar mediante su color brillante. La ventaja de este ensayo es que permite la visualización del antígeno dentro de tipos celulares específicos en un tejido e incluso dentro de subcompartimentos celulares determinados. <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

- **BIO/QUIMIOLUMINISCENCIA**

**Directa:** Weeks y colaboradores en 1984 desarrollaron una nueva técnica basada en la quimioluminiscencia, la cual emplea como fase sólida micropartículas paramagnéticas recubiertas de anticuerpos específicos contra la sustancia a analizar y como marca el éster de acridina. Este ensayo es de tipo heterogéneo y, se caracteriza por la emisión de luz visible debido a una reacción química producida por la oxidación del éster de acridina empleado como marca. Se realizan ensayos tanto por competencia como por "sandwich". Las partículas paramagnéticas empleadas en estos ensayos ofrecen una máxima superficie de contacto (100 veces más que los métodos convencionales) y una rápida separación magnética, con una mínima unión específica. <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

Ventajas:

- Alta sensibilidad (femtogramos 10 – 15 g).
- No emplea radiactividad.
- Los resultados son rápidos (generalmente a los 15 minutos).
- Equipos automatizados de fácil manejo.

**Indirecta o amplificada:** Existe otro método quimioluminiscente, el cual emplea como marca una enzima, la fosfatasa alcalina que cataliza la hidrólisis del éster de fosfato del substrato adamantil diaxetano (el cual es un compuesto estable) para formar constantemente un anión inestable el cual produce una fuerte emisión de luz. Esta señal luminosa prolongada en lugar del relámpago de luz de los otros métodos quimioluminiscentes permite hacer numerosas lecturas con el consiguiente aumento en la precisión del ensayo. La quimioluminiscencia (tanto directa como indirecta) representa una alternativa automatizada del RIA que no sacrifica la eficiencia del ensayo, por lo que es uno de los métodos de inmunoanálisis con mejor futuro inmediato en la práctica clínica habitual. <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

**Electroquimioluminiscencia:** Está basada en la utilización de Rutenio marcado y de la Tripolyamina (TPA). Esta técnica emplea partículas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina, a las cuales se une el primer anticuerpo marcado con biotina, el antígeno de la muestra se une a este anticuerpo y posteriormente un segundo anticuerpo marcado con

rutenio se dirige a otro sitio sobre la molécula de antígeno (reacción tipo “sándwich”). Por último, las partículas magnéticas con el marcador unido fluyen a través de la celda de lectura donde son retenidas en el área de activación por un imán con el fin de registrar la emisión de luz generada. La emisión de luz del Rutenio es consecuencia de la aplicación de un voltaje a la solución de muestra, de tal modo que el rutenio trivalente es reducido a Rutenio divalente con la ayuda de un agente oxidante (TPA). <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

Ventajas:

- Excelente estabilidad del marcaje con rutenio.
- Unión mediante estreptavidina – biotina a la fase sólida (la unión es tan fuerte como el enlace covalente).
- Generación de la señal controlada eléctricamente.
- Generación de múltiples fotones por molécula marcadora. <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

## E) MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

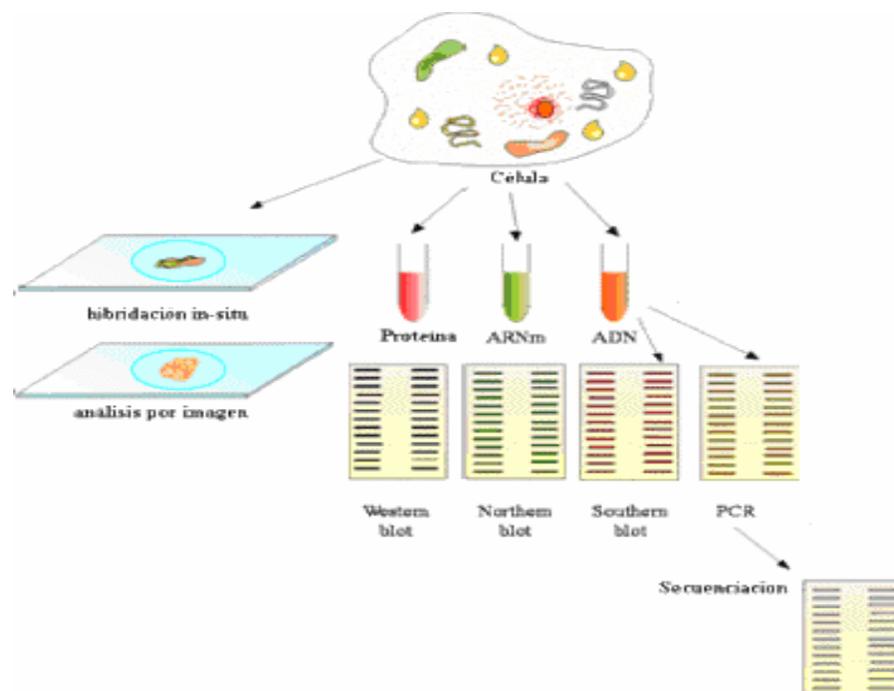


FIGURA 35: Esquema de las técnicas de análisis virológico.

### • PCR:

La reacción en cadena de la polimerasa utiliza una enzima llamada polimerasa para multiplicar rápidamente un pequeño fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN), una molécula de doble cadena en forma de escalera que transporta el material hereditario en todos los seres vivos. Cada ciclo de PCR consta de tres fases. En la primera, llamada desnaturalización, se calienta el ADN para separar las dos cadenas que lo forman. En la

segunda, llamada templado, la temperatura de la mezcla se rebaja para que los cebadores o fragmentos iniciadores del ADN se enlacen con las cadenas separadas de esta molécula. En la tercera o polimerización se eleva de nuevo la temperatura para que la enzima polimerasa copie rápidamente el ADN. En cada ciclo de PCR se duplica todo el ADN presente en la reacción, de manera que en unas pocas horas se obtienen más de mil millones de copias de un solo fragmento. <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

La reacción en cadena de la polimerasa imita el fenómeno de replicación o reproducción del ADN que ocurre de forma natural en las células vivas. La mayor parte del ADN es de doble cadena (es decir, cada cadena de ADN está apareada con otra complementaria). Durante la replicación las dos cadenas se separan y una enzima (una proteína que inicia reacciones químicas) especializada llamada polimerasa hace una copia de cada una de las cadenas, utilizando la original como plantilla o modelo. Normalmente este proceso de copia tiene lugar cuando la célula se divide y da lugar a la formación de un par de cadenas hijas por cada una de las cadenas parentales. <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

La polimerasa necesita otros dos ingredientes para copiar ADN. El primero es una reserva de los cuatro bloques básicos que constituyen la molécula de ADN, llamados nucleótidos o bases. El segundo es una fibra corta de ADN copiado, que se llama cebador oligonucleotídico; está formado por varios nucleótidos que inician la replicación. La PCR utiliza estos mismos ingredientes para copiar ADN en una ampolla. <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

La reacción tiene lugar en tres fases.

- Primera o desnaturalización: La plantilla o fragmento original de ADN se calienta hasta una temperatura de 90° a 95 °C durante 30 segundos; esto provoca la separación de las dos cadenas.
- Segunda fase, templado: La temperatura de la mezcla se rebaja hasta 55 °C durante 20 segundos para que los cebadores oligonucleotídicos se enlacen con el ADN escindido.
- Tercera fase o de polimerización: La temperatura de la mezcla se eleva hasta 75 °C para que la polimerasa copie rápidamente la molécula de ADN. <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

Estas tres fases tienen lugar en la misma ampolla y constituyen un ciclo completo de PCR, que se realiza en menos de dos minutos. Teóricamente, el ciclo de PCR se puede repetir sin límite, pero la polimerasa, los nucleótidos y los cebadores suelen renovarse al cabo de unos 30 ciclos. Estos 30 ciclos, que duran menos de tres horas, bastan para producir mil millones de copias de ADN. <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

En las versiones modernas de la PCR se utiliza una polimerasa termoestable llamada Taq que se fabrica ahora con bacterias modificadas genéticamente. <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

Como la polimerasa Taq no resulta destruida por las elevadas temperaturas a las que transcurre la PCR, basta con añadirla una vez, al principio de la reacción. <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

El uso de la PCR exige mucho cuidado. Lo más importante es evitar la contaminación de la mezcla reactiva. Es tan sensible, que permite multiplicar accidentalmente cantidades mínimas

de DNA contaminante. Se utilizan procedimientos especiales para evitar la contaminación.  
(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)

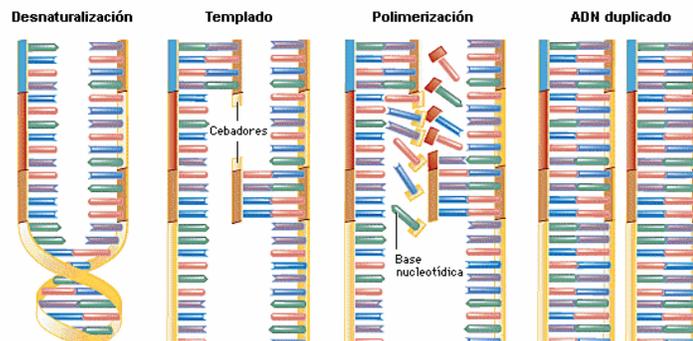


FIGURA 36: Esquema de la Reacción en cadena de la polimerasa.

- SOUTHERN BLOT:

La Hibridación del ADN por una sonda de ADN se llama técnica de Southern Blot. Las sondas génicas permiten encontrar un determinado trozo de ADN de unas pocas bases pares en una cadena de  $6 \times 10^9$  bases pares. Es decir, logra el sueño "encontrar una aguja en un pajar" y ello lo consigue gracias al marcaje con P32, que actúa como si hubiera un imán para encontrar la aguja.  
(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)

Se llama sonda o "probe" de ADN o ARN a un fragmento de cadena simple de ADN o ARN de varios cientos o miles de nucleótidos de longitud, que permite poner de manifiesto la presencia de una secuencia complementaria en una muestra biológica. Para ello es preciso marcar la sonda con técnicas radioactivas, como el fósforo 32, para facilitar su reconocimiento cuando se expone a un film de RX.  
(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)

Para poder realizar este reconocimiento se utiliza la técnica de hibridación, que consiste en desnaturalizar el ADN de doble cadena extraído del tejido deseado, mediante calor o soluciones hipotónicas, obteniendo una cadena simple, que bajo ciertas condiciones puede volver a unirse con la cadena complementaria, pero no con otros fragmentos de ADN que tengan una diferente secuencia de nucleótidos.  
(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)

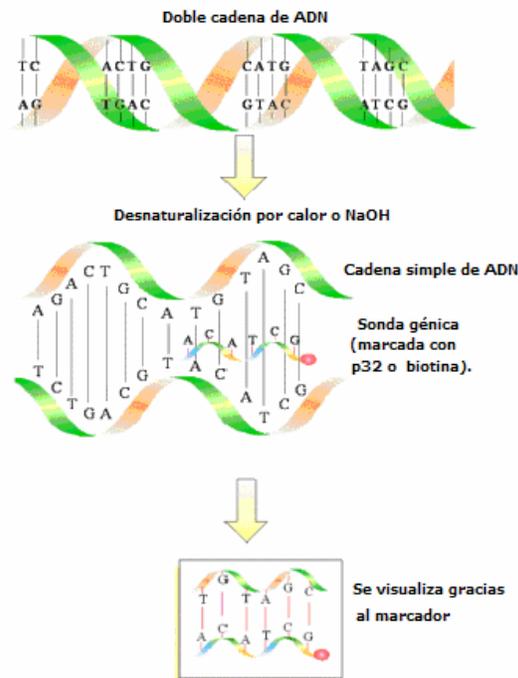


FIGURA 37: Esquema de la técnica Southern Blot.

Si al desnaturalizar el ADN problema lo colocamos frente a una sonda específica de ADN, será capaz de reconocer la secuencia deseada al unirse a ella, formando de nuevo la doble cadena. La síntesis de los oligonucleótidos que forman la sonda génica se realiza ahora en el laboratorio mediante un equipo automático que puede sintetizar más de 100 polímeros de nucleótidos en el orden deseado. Esto permite construir sondas de gran pureza, capaces de detectar donde se encuentra un gen, gracias a la localización de la cadena complementaria del ADN (Hibridación). (7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)

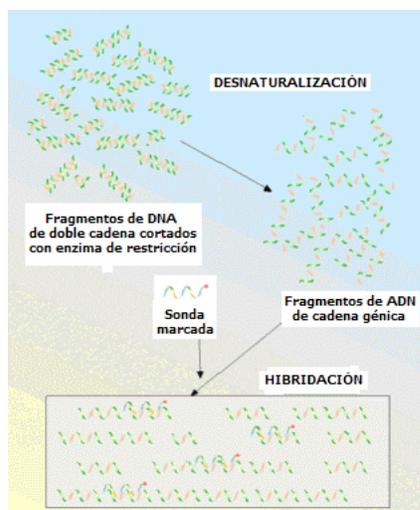


FIGURA 38: Hibridación de los ácidos nucleicos.

- **SLOT BLOT:**

Un análisis de DNA por dot blot o slot blot es similar en principio a un Southern blot, en que el DNA inmovilizado en un soporte sólido es hibridado con una sonda complementaria. Sin embargo, el DNA no es digerido ni sometido a electroforesis a través de un gel. (7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)

- **HIBRIDACIÓN INSITU:**

Es uno de los métodos más directos de "mapear" un gen, dado que se logra mediante una señal visual directa, al conseguir la hibridación de una secuencia de ADN clonado en un cromosoma en metafase, extendido en una laminilla de microscopio. La sonda génica es detectada por radioactividad, si se usa tritio como marcador radioactivo, o lo que es más común actualmente mediante técnica de fluorescencia con biotina (FISH: fluorescence in situ hybridization). Esta técnica permite a menudo la localización de una secuencia específica de ADN en una banda cromosómica si bien es obvio que las enfermedades humanas no pueden ser "mapeadas" por este método a menos que el gen causal halla sido ya identificado. La técnica de hibridación in situ, no son cuantitativas. Un avance en la cuantificación ha sido el "image analysis", mediante microscopios computarizados que permiten el análisis celular. En una de las dos pantallas se ve el campo microscópico y se puede escoger la célula a estudiar, y mediante la otra pantalla y digitalización de imágenes, se consigue determinar la presencia o ausencia de productos biológicos en la célula escogida. (7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)

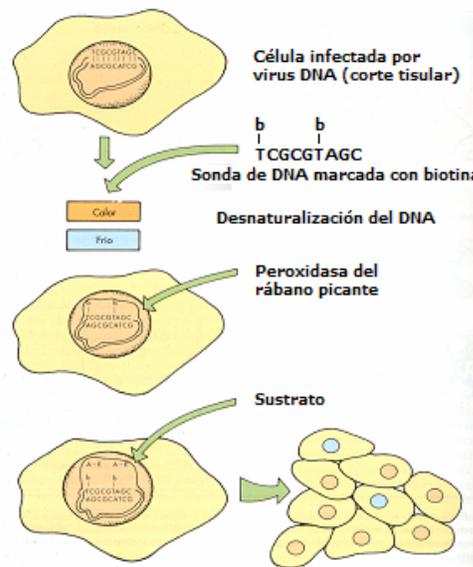


FIGURA 39: Análisis de células infectadas por virus mediante sonda de DNA. Las células infectadas se pueden localizar en secreciones tisulares preparadas histológicamente, utilizando sondas de DNA tan pequeñas como nueve nucleótidos o plásmidos bacterianos que contengan el gen vírico. Se añade a la muestra una sonda de DNA marcada. En este caso la sonda de DNA está marcada con timidina modificada con biotina pero también se puede usar la radioactividad. La muestra se calienta para desnaturalizar el DNA, y se enfría para permitir la hibridación de la sonda con la secuencia complementaria. Se añade avidina marcada con enzima para que se una a la biotina en la sonda. La adición del sustrato apropiado coloreará los núcleos de las células infectadas por el virus. (40)

- **NORTHERN BLOT:**

Con esta técnica se estudia el tamaño y la cantidad de ARN mensajero de un gen específico en una muestra de ARN total. A diferencia de ADN, el ARN no es cortado por las enzimas de restricción. La diferenciación entre los ARN de los distintos genes, se establece por la diferente longitud que tienen los segmentos de transcripción de cada gen. Por este principio, los diferentes ARNm de una muestra de tejido se separarán en un gel de agarosa de acuerdo a su tamaño y posteriormente se transfieren a un filtro de nylon o nitrocelulosa. (7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)

Siguiendo el mismo principio que en la técnica de Southern, el filtro se incuba con una sonda marcada, la que se une a la ARN de interés. Posteriormente el filtro se expone a una placa de Rx que revelará la ubicación y abundancia del ARN de estudio. La posibilidad de detectar la cantidad de ARN presente en la muestra de tejido en estudio aportará información sobre la expresión del gen en estudio (número de copias del mismo). (7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)

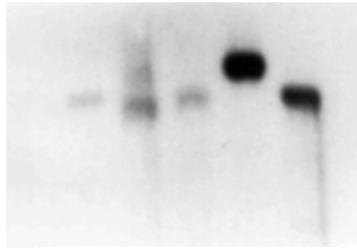


FIGURA 40: Northern Blot; Muestra el ARNm de la b-actina en diferentes tejidos.

- **CAPTURA DE HÍBRIDOS:**

La captura de híbridos es una prueba de DNA no radiactiva similar a un inmunoanálisis, el cual provee resultados cuantitativos. (7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)

- **RFLP (RESTRICTION FRAGMENTS LENGTH POLYMORPHYSM):**

Detección de fragmentos de DNA de distinto peso molecular (por digestión con la misma enzima de restricción) en diferentes organismos, es necesario utilizar sondas específicas para visualizar sólo ciertos fragmentos mediante la técnica de Southern Blot. Las sondas de DNA para esta técnica suelen corresponder a genes previamente conocidos, aunque a veces se usan DNA preparados a partir de amplificaciones inespecíficas; el resultado es muy preciso. Cuando se emplea la PCR en lugar de sondas radiactivas para visualizar los polimorfismos, se le denomina PCR-RFLP. (7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)

## F) METODOS CUANTITATIVOS

Se basan en considerar a los virus con diferentes propiedades.

### • MÉTODOS FISICOQUÍMICOS

Se basan en detectar a los virus al microscopio electrónico, como cuerpos físicos que son, o bien, se basan en una propiedad química que tienen algunos de estos, que es la capacidad de aglutinar glóbulos rojos (Ensayos de hemoaglutinación). <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

#### A ) Observación de virus al microscopio electrónico:

Se pueden aplicar numerosas técnicas de microscopía electrónica para observar virus. Pero en los análisis de rutina, para detectar y cuantificar virus solo se emplean los métodos mas sencillos. Los mas complejos ( Inclusión en resinas, cortes), solo se usan en investigación. <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

- Tinción Negativa: consiste en mezclar una suspensión donde suponemos que están los virus, con una sal densa de electrones, por ejemplo acetato de uracilo, fosfotungstato potásico (ácido fosfotungstico). Esta mezcla se deposita en una rejilla de microscopia electrónica y se observa al microscopio electrónico de transmisión. Con esta técnica, los virus no se tiñen en realidad, sino que se tiñe el medio. Esta es la técnica mas usada debido a que es la mas sencilla de realizar. <sup>(26)</sup>
- Sombreado: consiste en depositar a los virus sobre una rejilla y hacer incidir sobre la misma un metal, normalmente platino, con un cierto ángulo, respecto a la rejilla. El platino, cubre a los virus, pero queda en un lado una sombra de color claro (el platino queda oscuro). Entonces al observar la rejilla, se verán los virus oscuros y la sombra clara. Entonces se observa una imagen de aspecto tridimensional. <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

Mediante estas dos técnicas, se puede demostrar la presencia de virus en una muestra, pero también se pueden contar, por un método que consiste en mezclar la solución de virus que se puede cuantificar, con una esferas de látex. La mezcla se somete a tinción negativa o sombreado y se cuentan en el microscopio las partículas víricas y las esferas que se observan en un campo de visión, se anota y para conocer la concentración de virus en la solución se aplica una formula:

*# de partículas víricas y # de esferas de látex.* <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

#### Inconvenientes de los métodos fisicoquímicos.

- Mediante microscopia electrónica, se cuentan tanto virus con capacidad de infectar células como virus que tengan algún defecto, y no puedan infectar células o incluso cápsides vacías.
- Mediante el ensayo de hemaglutinación, también se pueden detectar virus que no sean infectivos y además hay virus en los que las espículas se sueltan del virus y se pueden contar en la hemaglutinación. <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

## • MÉTODOS DE FORMACIÓN DE PLACAS

Se parte de muestras o diluciones de virus y de placas petri que contienen cultivos de células animales; se elimina el medio líquido a continuación se añaden los virus (Un inóculo de 0.1 ó 0.2 ml de la solución de virus sobre la placa), se deja un tiempo para que los virus se unan a las células y después se añade un medio solidificado (capa fina), de agar o gelatina, se incuba durante un tiempo determinado para cada virus que puede ser de días hasta semanas, y se observa la aparición de calvas, debido a que los virus infectan a las células animales mas próximas, multiplicándose en ellas y al liberarse infectan a las células vecinas, formando las placas. Algunas de estas placas no se pueden diferenciar directamente, para observarlas hay que añadir una serie de colorantes de cultivo:

- Colorante rojo neutro: tiñe células vivas, por lo que las placas de lisis no se colorean.
- Colorante Azul de Tripán: tiñe células muertas y por lo tanto las placas aparecen de color azul.

En el caso de virus tumorígenos se cuentan los grumos o cúmulos de células que se forman sin necesidad de tinción. <sup>(7,13,15,16,17,31,33,38,45,47,48,54,101)</sup>

## 3.4 NORMAS DE BIOSEGURIDAD Y CONTROL DE CALIDAD

### Niveles de seguridad biológica en los laboratorios.

A pesar de que el desarrollo de tecnologías para la producción de agentes biológicos está ampliamente descrita en la literatura científica, de que la naturaleza es una fuente inagotable de obtención, de que existen colecciones de microorganismos en las que se puede comprar cualquiera de aquellos que están disponibles en el catálogo con garantías de pureza y un control de calidad exhaustivo, no es tan sencillo como se dice realizar la producción de agentes biológicos sin preparación y unos medios adecuados. <sup>(27)</sup>

Existe una terminología referente al nivel de seguridad de los laboratorios biológicos en los que se establecen las medidas de contención necesarias para evitar la llegada a la naturaleza de agentes biológicos. Cuando se habla de contención, se está haciendo referencia a los métodos o protocolos de utilización de materiales potencialmente infecciosos en el laboratorio y su propósito es reducir o eliminar la exposición del personal o con el ambiente exterior con estos agentes biológicos potencialmente peligrosos. Estos protocolos incluyen desde el acondicionamiento de las instalaciones hasta la protección del personal. <sup>(27)</sup>

Se han definido cuatro niveles de contención para agentes biológicos BSLs (BioSafety Levels) que recogen los protocolos apropiados según los trabajos a realizar y las rutas de transmisión conocidas o sospechadas de los agentes biológicos y la función o actividad del laboratorio. Las medidas de contención no tienen ningún significado si no se siguen de forma

terminante los protocolos. Cada laboratorio debe de desarrollar o adoptar su protocolo de seguridad biológica. <sup>(27)</sup>

**Nivel 1.** El diseño de la construcción y el equipo de seguridad son apropiados para estudiantes, laboratorios de prácticas y en general, para trabajar con agentes biológicos de los que no se conoce que sean causantes de enfermedades en seres humanos sanos y adultos. Un ejemplo serían *Bacillus subtilis*, *Naegleria gruberi*, entre otros. Hay que tener en cuenta que muchos microorganismos que generalmente no producen enfermedades en individuos sanos adultos, sí pueden transformarse en patógenos oportunistas cuando están siendo manipulados por personas inmunodeprimidas. El nivel 1 representa el nivel básico de contención donde la manipulación de agentes biológicos no son peligrosos. <sup>(27)</sup>

**Nivel 2.** El diseño de la construcción y el equipo de seguridad responden a aplicaciones clínicas y diagnósticas, también enseñanza, en las que se trabaja con agentes biológicos de riesgo moderado que están presentes en la zona, asociados a enfermedades humanas que pueden variar en severidad. En general, los niveles de protección se centran en evitar salpicaduras o producción de aerosoles. Ejemplos son virus Hepatitis B, HIV, *Salmonella* y *Toxoplasma spp.* Este nivel de contención se suele aplicar en análisis relacionados con fluidos corporales, tejidos o líneas celulares humanas. Los peligros potenciales del personal se centran en exposiciones accidentales por cortes, exposición a las mucosas o ingestión de materiales infecciosos, por lo que se ha de tener una precaución extrema con agujas contaminadas o el contacto con instrumentos que pudieran estar contaminados. En este nivel suelen manipularse agentes biológicos de los que se sabe o, por lo menos se cree, que no son transmisibles vía aerosoles, pero suelen utilizarse medidas de prevención directa como el uso de guantes, protectores de la cara y otros medios físicos. <sup>(27)</sup>

**Nivel 3.** El diseño de la construcción y el equipo de seguridad está orientado al estudio clínico, diagnóstico, enseñanza e investigación donde se trabaja con agentes biológicos autóctonos o que no pertenecen a la zona, que tienen capacidad de transmisión por la vía respiratoria y que pueden causar infecciones serias y potencialmente mortales. Ejemplos son *Mycobacterium tuberculosis* y *Coxiella burnetii*. En este nivel se pone especial énfasis en evitar la autoinoculación, la ingestión o la exposición a los aerosoles. También incluyen el acceso controlado a la zona y unos requerimientos sobre el sistema de ventilación que minimicen la liberación de aerosoles infecciosos desde al laboratorio a otras zonas. <sup>(27)</sup>

**Nivel 4.** El diseño de la construcción y el equipo de seguridad están pensados para el trabajo con agentes biológicos muy peligrosos autóctonos o importados para su estudio que plantean

un alto riesgo individual y que son transmitidos a través de aerosoles, no existiendo ningún medio clínico para ser tratados. Ejemplos serían Ebola y otros virus que producen fiebre hemorrágicas. Una vez estudiados, pueden permanecer en este nivel o pasar a inferiores según los resultados obtenidos. El riesgo principal en este nivel se centra en respirar aerosoles, exposición a través de mucosas o heridas y la autoinoculación. En el nivel 4 es necesario el aislamiento completo del personal, el edificio ha de estar separado o en una zona totalmente aislada, sistemas complejos de ventilación y un control del sistema de gestión de desechos que impida la salida al medio ambiente de los agentes biológicos. <sup>(27)</sup>

---

## UNIDAD PROGRAMÁTICA IV

### PATOGÉNESIS Y EPIDEMIOLOGÍA

#### OBJETIVOS

1. Mencionar las características de la patogénesis de las infecciones virales.
2. Enunciar la importancia de los aspectos inmunológicos de las infecciones virales.
3. Conocer la producción y control de vacunas virales.
4. Aplicar los conocimientos de replicación viral para utilizar la terapia viral.

## 4.1 PATOGÉNESIS DE LAS INFECCIONES VIRALES

Patogénesis: Mecanismo por el cual un organismo produce una enfermedad. En el caso de los virus, concierne al mecanismo por el cual un virus produce daños en una determinada población celular, de un órgano diana, con el resultado de los signos y síntomas de enfermedad en un anfitrión cualquiera. <sup>(29)</sup>

Un virus resulta ser un parásito que vive dentro de las células de un organismo, en donde obtiene el medio y los nutrimentos necesarios para su desarrollo (replicación). En algunos casos los virus no causan daño al hospedero y establecen un equilibrio con ellos, asegurando la supervivencia, esto ocurre por ejemplo en las infecciones latentes o subclínicas. <sup>(29)</sup>

La infección viral está determinada por la interacción virus-hospedero y la respuesta inmune del hospedero. <sup>(29)</sup>

La respuesta inmune limita a la infección por parte del virus y es también un factor básico de la patogénesis. <sup>(29)</sup>

Esto se resume en lo siguiente:

La relación entre un virus y su hospedero está determinada tanto por las características del virus que favorecen su establecimiento y que dañan al hospedero, así como los mecanismos del hospedero que se oponen a estos procesos. <sup>(29)</sup>

Las características virales a las que se hace referencia anteriormente son:

- **Infectividad:** Es la capacidad que tiene un agente de producir una infección y esta se define como el proceso por el cual el virus entra en relación con el hospedero constando de las siguientes etapas:
  - Entrada del virus a los tejidos.
  - Diseminación en el hospedero.
  - Excreción y transmisión a otro hospedero. <sup>(29)</sup>
- **Patogenicidad:** Capacidad que tienen los microorganismos de causar enfermedad o de provocar lesiones progresivas. <sup>(29)</sup>
- **Virulencia:** Es un término que a menudo se confunde con el anterior, pero este se refiere al grado de patogenicidad, es decir, se puede cuantificar y también se dice que los microorganismos virulentos muestran patogenicidad cuando se encuentran en el hospedero en pequeñas cantidades o que presentan elementos o características que los hacen más patógenos. Esta depende de una variedad de factores del hospedero y virales, entre los que podemos citar:
  - La cantidad de viriones presentes en el inóculo.
  - La vía de penetración de los mismos al organismo.
  - La velocidad de multiplicación de los viriones.
  - La respuesta del hospedero, inmunológica o no inmunológica.
  - La edad del huésped.

- El estado nutricional y hormonal.
  - El medio ambiente y "la raza".<sup>(29)</sup>
- Invasividad: Es la capacidad para entrar a los tejidos del hospedero. En el caso de los virus a través de receptores, multiplicarse y diseminarse.<sup>(29)</sup>

La enfermedad, signos y síntomas que se presenten son determinados por el tejido u órgano que se infecte.<sup>(29)</sup>

Un virus puede producir diferentes signos y síntomas en grado variable, desde el imperceptible hasta el más agudo. Así como también un síntoma específico puede ser causado por varios virus que tienen afinidad común por un tejido.<sup>(29)</sup>

### **Evaluación de los virus como agentes etiológicos de enfermedad en la especie humana.**

Finalmente, el concepto de la patogénesis viral no es completo sin una consideración de los fundamentos usados por los científicos para evaluar los virus y otros agentes infecciosos, como elementos etiológicos potenciales de enfermedad.<sup>(57)</sup>

Por mas de una centuria los investigadores se han basado en postulados desarrollados en los años 1880, por el microbiólogo alemán, Robert Koch, para decidir dónde un particular microbio causa una enfermedad determinada.<sup>(57)</sup>

**Los postulados de Koch** pueden resumirse así:

1. El organismo debe encontrarse en todos los casos de una determinada enfermedad y con las circunstancias debidas al curso clínico de la enfermedad y de cualquier patología asociada.
2. El organismo no debe encontrarse en ninguna otra enfermedad, ni como germen casual ni como un parásito inofensivo.
3. Después de que el organismo es aislado del cuerpo y cultivado varias veces, el organismo debe ser capaz de producir la misma enfermedad.<sup>(57)</sup>

En los últimos años, se ha hecho evidente que los postulados de Koch no son los mejores para aplicar en el estudio de la patogénesis viral. Por ejemplo, muchos virus pueden existir en estado latente en un individuo sano, -violando el segundo postulado de Koch. Muchos otros virus no crecen en cultivos puros ó fallan en producir enfermedad en animales susceptibles, (por lo que no pueden ser evaluados por su habilidad para producir enfermedad, después de ser cultivados *in vitro*). A la luz de estos hechos, David Relman y David Fredricks propusieron algunas ***normas moleculares revisadas para establecer las causas de la enfermedad microbiana.*** (*J. NIH Res. 8:39-44, Oct. 1996*).<sup>(57)</sup>

Estas normas moleculares son:

1. **Fortaleza de la asociación:** ¿Se ha detectado el virus en la mayoría (todos) de los casos de la enfermedad?
2. **Especificidad de la asociación:** ¿Se ha localizado el virus en los tejidos enfermos y no en los tejidos sanos?, ¿La frecuencia de la infección viral está reducida (bastante) en individuos sanos?
3. **Respuesta al tratamiento:** ¿El nivel viral disminuye con la mejoría ó con el tratamiento efectivo?
4. **Temporalidad:** ¿La infección viral precede y predice el comienzo de la enfermedad?
5. **Plausibilidad:** ¿Las propiedades biológicas conocidas del virus corresponden a las características de la enfermedad?
6. **Gradiente biológico:** ¿El nivel viral es mayor en los enfermos más graves que en los enfermos menos graves?, ¿El nivel viral es mayor en los tejidos enfermos que en los tejidos sanos?
7. **Consistencia:** ¿Los hallazgos son reproducibles en múltiples laboratorios y por múltiples investigadores.? <sup>(57)</sup>

Esta normativa fue formulada, en parte para ayudar a evaluar de un modo crítico, la evidencia de un agente infeccioso recientemente descubierto, ahora conocido como el Herpesvirus humano 8 (KSHV), el cual puede estar asociado con el sarcoma de Kaposi y tumores de células B en humanos (principalmente en personas con SIDA). El mismo criterio puede ser aplicado de modo estricto al HIV y su papel en el SIDA. <sup>(57)</sup>

## a) VÍAS DE ENTRADA

Dentro de la vías de entrada de los virus al organismo debemos citar:

### ▪ TRACTO RESPIRATORIO

El contagio se da por contacto directo con un sujeto infectado, por ejemplo por inhalación. Es importante recordar aquí los mecanismos de defensa que juegan un rol importante en la detención de la infección:

- La capa mucociliar cumple un papel protector que se ve disminuido por el frío, el tabaco, la polución ambiental y por ciertos virus que tienen afinidad por el epitelio respiratorio (sarampión e influenza).
- Los macrófagos de los alvéolos pulmonares.
- La IgA secretora.
- Las células secretoras de mucus ayudadas por el epitelio ciliado limpian las vías respiratorias del material extraño a través de su continuo movimiento hacia el exterior del tracto respiratorio. Tanto mecanismos de inmunidad humoral como celular actúan para proteger al huésped de las infecciones virales.

Los virus responsables de las enfermedades respiratorias producen alteración o necrosis del epitelio, permanecen localizados en el tracto respiratorio (rinovirus, adenovirus, influenzavirus, parainfluenzavirus, virus respiratorio sincinal). Por el contrario, otros virus penetran por esta vía, dan sintomatología clínica local en mayor o menor grado (virus de la viruela, varicela, sarampión, paperas, rubéola) pero las manifestaciones clínicas más relevantes se producen en otros órganos blanco del organismo. Estas son las infecciones generalizadas a punto de partida respiratorio. <sup>(56)</sup>

#### ▪ **TRACTO DIGESTIVO**

La transmisión se realiza por ingestión de agua, alimentos y objetos contaminados (fomites).

Para iniciar una infección a través del tracto digestivo un virus debe tener las siguientes propiedades:

- Estabilidad al ácido.
- Resistencia a la pérdida de infectividad en presencia de sales biliares.
- Resistencia a la inactivación por enzimas proteolíticas. <sup>(56)</sup>

La mayor parte de los virus envueltos son destruidos por el pH ácido del estómago y de las sales biliares antes de llegar al intestino delgado. Solo virus resistentes pueden infectar las células del tracto intestinal, que es su sitio de multiplicación primario. Los anticuerpos IgA secretorios locales son un medio de defensa importante para el intestino. <sup>(56)</sup>

Algunas infecciones permanecen localizadas en el intestino (gastroenteritis o rotavirus o agente de Norwalk); otros virus luego de multiplicarse en las células intestinales se diseminan a partir del foco intestinal dando una infección generalizada, como por ejemplo el Enterovirus. La mucosa orofaríngea puede ser una puerta de entrada para ciertos virus como Herpes simplex y algunos Coxsackievirus. <sup>(56)</sup>

#### ▪ **PIEL**

Cuando no está alterada es una barrera infranqueable para los virus. Sin embargo una lesión mínima puede ser la puerta de entrada. Algunos virus no se transmiten más que a través de la piel y producen infecciones localizadas en el tejido cutáneo, como los virus de las verrugas humanas (Papovaviridae) o el virus del Molluscum contagiosum (Poxviridae). Otros virus penetran directamente en los tejidos subcutáneos y luego se diseminan dando enfermedades generalizadas. <sup>(56)</sup>

La barrera cutánea se puede sobrepasar por una picadura de un artrópodo (Arbovirus) o por la inoculación accidental (agujas cortantes) o terapéutica (transfusiones), también puede sobrepasarse en el caso de mordedura de animales (rabia). <sup>(56)</sup>

## ▪ CONJUNTIVA

Los virus depositados mecánicamente en los ojos por los pañuelos, los dedos, las servilletas, pueden ser eliminados por las lágrimas, pero en un cierto número de casos la conjuntiva es infectada. <sup>(56)</sup>

Los Adenovirus tipo 8 son transmitidos por los instrumentos de oftalmología, o en las piscinas; el virus Herpes simplex tipo 1, el virus de la viruela vacuna, el Enterovirus 70, dan también patología ocular. Las conjuntivas del recién nacido son muy sensibles al virus Herpes simplex que puede estar presente en las vías genitales de las madres. <sup>(56)</sup>

## ▪ TRACTO GENITAL

Las infecciones del tracto genital permanecen en general localizadas (Herpes simplex tipo 2, Papilomavirus genital). Algunos otros virus pueden ser transmitidos por otras vías además de la sexual (CMV, VHB, HIV). <sup>(56)</sup>

## ▪ INFECCIÓN FETAL (VERTICAL)

Esta infección implica modos de transmisión particulares.

Los agentes virales que causan infección del feto o del recién nacido pueden ser agrupadas en relación con el momento del embarazo en que se produce la transmisión. <sup>(32)</sup>

- Transmisión transplacentaria: estos son virus que producen viremias o infectan células circulantes, mecanismo por el cual llegan hasta la placenta. El virus atraviesa la placenta mediante la infección de las células coriónicas o por microinfartos que alteran su permeabilidad. La integridad estructural de la placenta y una inmunidad adecuada son factores importantes para evitar la transmisión al feto. ( CMV, VIH, Herpes simplex, Varicela zoster, parotiditis, viruela, vaccinia, VHB, parvovirus B19 y enterovirus). Estas producen las infecciones llamadas congénitas y algunas de sus consecuencias son el aborto, malformaciones congénitas, signos de fetopatía o ausencia total de signos clínicos al nacer. <sup>(56)</sup>
- Transmisión durante el parto: VHS, VHB, CMV, VIH, enterovirus, papilomavirus, varicela zoster.
- Transmisión durante la lactancia materna: CMV, VHB, VIH.
- Transmisión por transfusión: VHB, VHC, VIH, CMV.
- Transmisión nosocomial: rotavirus enterovirus, influenza, virus respiratorio sincinal. Estos virus son los causantes de las infecciones perinatales.

Existen algunos factores que influyen en la entrada de los virus al un organismo:

- Las barreras inespecíficas y específicas del hospedero → pH, presencia de células ciliadas y mucosas, capas de la piel, flora normal bacteriana, macrófagos, etc.
- Fuente de procedencia del virus → Aerosoles, polvo, agua, objetos contaminados, animal o vector.
- Factores ambientales → Desección, humedad, temperatura, pH, presencia de desinfectantes.
- Susceptibilidad de células que serán infectadas por los virus.
- Estabilidad del virus.

## VÍAS DE ENTRADA DE LOS VIRUS MAS SIGNIFICATIVOS

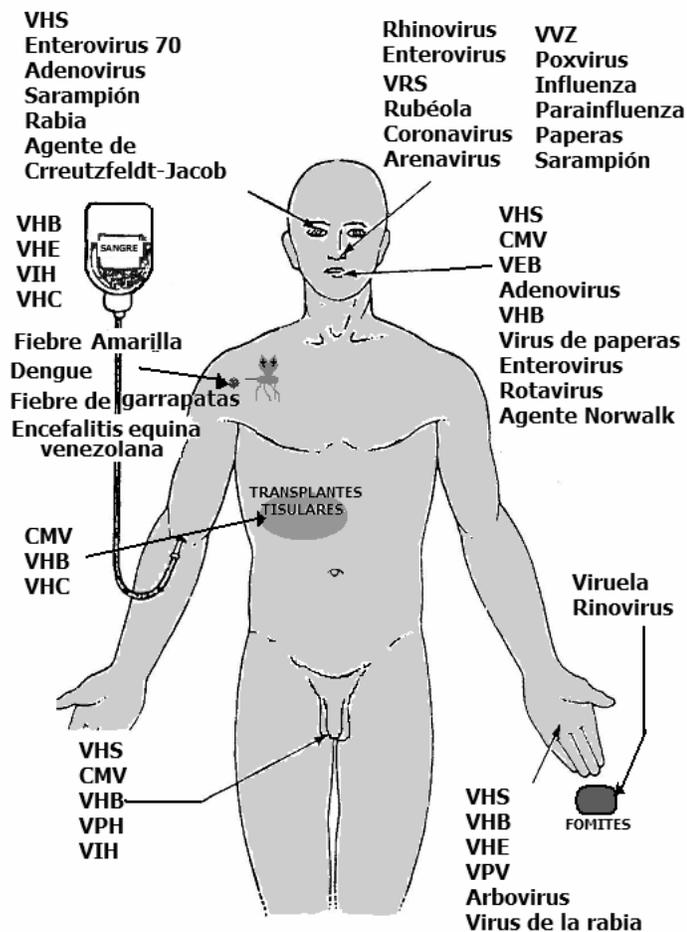


FIGURA 41: Vías de entrada de los virus humanos mas importantes.

## b) PERIODO DE INCUBACIÓN

Es el periodo entre la exposición (contagio) y los primeros signos clínicos. Este periodo depende del tipo de enfermedad y del virus al cual se tuvo la exposición:

- Enfermedades localizadas: periodo corto de 1 a 5 días. Infecciones respiratorias y los Aerovirus (producen enfermedad diseminada con periodo corto de incubación).
- Enfermedades diseminadas: periodo largo de 10 a 20 días, debido a que el virus necesita diseminarse por el organismo para encontrar a su órgano blanco. Virus del sarampión, varicela, rubéola, etc. y verrugas (localizadas con periodo largo de incubación).

Es importante la duración de los periodos de incubación porque orienta al médico sobre la posible etiología frente a un caso clínico. <sup>(56)</sup>

<b>INCUBACION MEDIA DE ALGUNAS INFECCIONES VIRALES.</b>	
<b>Virus o Enf.</b>	<b>Periodo de Incubación medio de la enfermedad (en días)</b>
Gripe	1 – 3
Herpes simple	5 – 8
Enterovirus	6 – 12
Sarampión	9 – 14
Viruela	12 – 14
Paperas	14 – 21
Rubéola	17 – 20
Hepatitis A	15 – 40
Virus Epstein Barr	30 – 40
Hepatitis B	50 – 150
Rabia	30 – 100
Influenza	1 – 2
Rhinovirus	1 – 2
Bronquiolitis, croup	3 – 5
Adenovirus respiratorio	4 – 7
Dengue	5 – 8
Poliomielitis	5 – 20
Varicela	13 – 17
Parotiditis	16 – 20
Mononucleosis	30 – 50
Verrugas	50 – 150
VIH	1 – 15 años o más

Tabla 15: Tiempo de incubación media de algunas infecciones virales.

## c) DISEMINACIÓN DE LOS VIRUS EN EL ORGANISMO HOSPEDERO

### INTRODUCCIÓN

Luego de su multiplicación en las células de la puerta de entrada o en los tejido próximos, los virus penetran en los ganglios linfoides y pasan al torrente sanguíneo para ocasionar viremia, de corta duración en general, que les va a permitir infectar a los órganos blanco. Si la viremia es prolongada, las transfusiones de sangre pueden constituirse en un excelente medio de transmisión del virus (VHB, VEB, CMV). En algunos casos los virus se diseminan a los órganos blanco por las fibras nerviosas (rabia, encefalitis herpética en ciertos casos). <sup>(56)</sup>

### VIREMIA PRIMARIA

Fase que abarca desde la penetración del virus al organismo y se inicia la diseminación produciéndose la primera replicación en los ganglios linfáticos regionales, hasta que entran a circulación sanguínea desde estos. <sup>(56)</sup>

### SEGUNDA REPLICACIÓN

Se lleva a cabo cuando el torrente sanguíneo lleva a los virus a diferentes órganos blanco, dependiendo del tropismo que los virus presentan por un tejido. <sup>(56)</sup>

### VIREMIA SECUNDARIA

Después de la infección primaria el virus puede dirigirse hacia otras zonas, los sistemas involucrados en dicho movimiento viral son:

- Retículo endotelial.
- Linfático.
- Sanguíneo.

La gran mayoría de las infecciones sistémicas son la consecuencia del transporte del virus en la sangre, mejor conocida como viremia y aquí ocurre la viremia secundaria.

Por último el virus se transporta a los órganos finales de ataque.

El cuadro general de dispersión sistémica de los virus puede variar de acuerdo a varios factores como:

- Tipo de virus, o cepa viral.
- Tropismo o afinidad del virus por los tejidos del hospedero. (algunos posibles son la piel, glándulas salivales, sistema nerviosos central, hígado, intestino, faringe).
- Estado inmunológico y fisiológico del hospedero.

- Cantidad de virus que pudo introducirse en la infección.

La localización de un virus en otro sitio depende de las capacidades del mismo para permanecer libre en sangre o asociado a células de algún órgano por el cual tenga afinidad.

Los virus que se encuentran libres pueden atravesar la barrera endotelial de los vasos e ir a otros tejidos y los que se encuentran asociados a otras células se diseminan por interacción célula – célula.

Un punto de interés resultan las células del sistema inmune que se encuentran infectadas, como los macrófagos, que circulan hasta zonas pobladas de los mismos o algunos linfocitos que pueden migrar hasta nódulos linfáticos y al bazo.

La mayoría de los padecimientos virales se autolimitan, sustituyendo la falta de una terapia efectiva. La replicación viral puede ser asintomática y puede también ser fuente de viremia o liberarse al medio ambiente en forma de secreciones o excreciones corporales. <sup>(56)</sup>

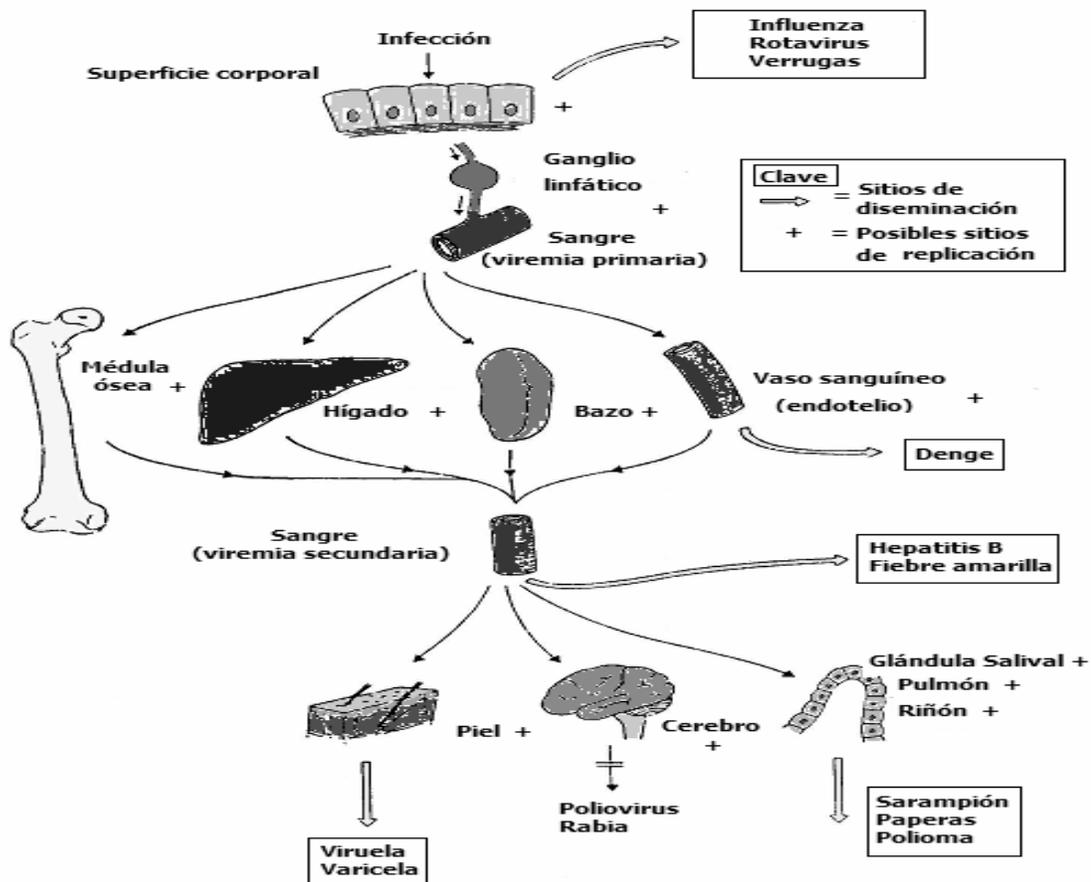


FIGURA 42: Esquema general de la diseminación viral en el humano.

## COMPROMISO DE TEJIDOS BLANCO LUEGO DE LA DISEMINACIÓN

### La Piel

La piel es uno de los blancos más frecuentes de los virus. Las manifestaciones cutáneas están presentes en un gran número de infecciones virales agudas, por toque directo del virus o por intervención de complejos inmunes. Las enfermedades eruptivas son siempre enfermedades generalizadas. <sup>(56)</sup>

- Erupciones máculo-papulomatosas: Los viriones desde la sangre invaden los endotelios de los capilares y vénulas de la dermis y provocan una dilatación local de los vasos (máculas); si hay además un edema e infiltración celular de la región se trata de una pápula. Las pueden dar infecciones con los virus del sarampión, de la rubéola, algunos Echovirus, Coxsackievirus, Adenovirus y el Parvovirus B19. <sup>(56)</sup>
- Erupciones vesiculares: Si la infección viral afecta la epidermis y conduce a un exudado con células mononucleares, aparece una vesícula, que es una fuente de diseminación de viriones por ruptura de la misma. <sup>(56)</sup>

Podemos citar como ejemplos al herpes, varicela-zoster y erupciones causadas por varios Coxsackievirus. Las vesículas pueden evolucionar a pústulas que pueden secarse y dejar una costra: erupción vesículo-pustulosa. Ejemplos: viruela, vacuna. Las erupciones no se producen sólo a nivel de la piel (exantema) sino también sobre las mucosas (enantema), lugar donde las vesículas se rompen con mucha facilidad. <sup>(56)</sup>

### Sistema Nervioso Central

La diseminación de los virus hasta los órganos blanco se realiza la mayor parte de las veces por vía hematógena: Enterovirus, virus de las paperas; en el feto: el virus de la rubéola y el Citomegalovirus. Los virus pueden lesionar las meninges (meningitis), el cerebro (encefalitis), el cerebelo (cerebelitis), la médula espinal (mielitis). El virus rábico llega al sistema nervioso central por diseminación a lo largo de los filetes nerviosos; el HIV lo hace probablemente a través de los macrófagos. Los virus destruyen preferencialmente ciertas células: los Poliovirus tienen preferencia por las células del cuerno anterior de la médula (motoneurona anterior), los Arbovirus afectan las células encefálicas y el virus del Herpes simplex puede afectar a todas las células del sistema nervioso. <sup>(56)</sup>

### Hígado

El hígado es un blanco relevante para los viriones circulantes. En general, éstos son fagocitados y destruidos allí, pero algunos se multiplican e invaden el parénquima hepático: virus de la hepatitis A y B, virus no A no B, virus de la fiebre amarilla, ciertos Poxvirus, y también el virus del Herpes simplex y el Citomegalovirus. <sup>(56)</sup>

### Tejido Hematopoyético

Es un blanco importante para Citomegalovirus (leucocitos), virus de Epstein-Barr (linfocitos B), HIV (linfocitos T4, macrófagos) y HTLV1 (linfocitos T). <sup>(56)</sup>

## Diversos

Las glándulas salivales son infectadas por el virus de las paperas (virus Urleano), por el virus Herpes simplex y el Citomegalovirus. El músculo estriado es infectado por los virus influenza y por ciertos Arbovirus. El corazón puede ser infectado por virus Coxsackie B. <sup>(56)</sup>

## ÓRGANOS BLANCO DE LOS VIRUS MAS SIGNIFICATIVOS

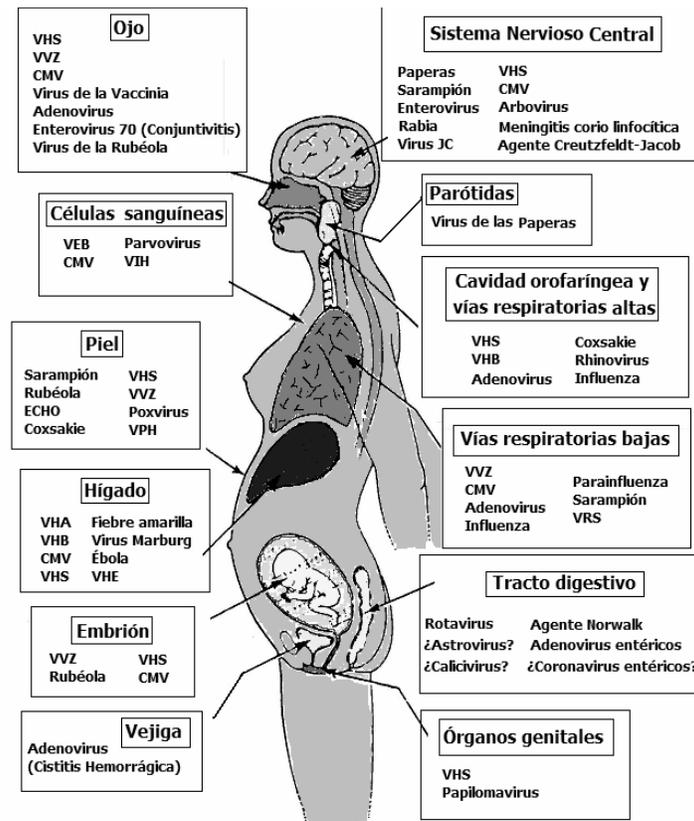


FIGURA 43: Órganos blanco de los virus mas significativos.

### d) EXCRECIÓN VIRAL

La excreción se realiza por:

#### A: TRACTO RESPIRATORIO

A través de la tos o del estornudo (sarampión, gripe, resfrío, viruela). <sup>(56)</sup>

#### B: LA SALIVA

Los virus que infectan las glándulas salivales pueden ser excretados y transmitidos por la saliva; en los niños, por los dedos y los objetos recubiertos de saliva (virus de las paperas), y en los adolescentes y adultos jóvenes también por el beso (VEB). El virus de la rabia se transmite por la saliva de los animales infectados. <sup>(56)</sup>

C: LA PIEL

- Cuando hay una erupción vesicular (viruela, herpes, varicela) se eliminan virus al exterior a través de costras. <sup>(56)</sup>
- Se pueden liberar al exterior a partir de verrugas cuando hay una lesión por abrasión. <sup>(56)</sup>

D: TRACTO INTESTINAL

Todos los virus que infectan las células intestinales se eliminan por las materias fecales y contaminan el agua y los alimentos (enterovirus, VHA, rotavirus). <sup>(56)</sup>

E: ORINA

Es una forma importante de excreción viral hacia el medio ambiente en el caso del virus de las paperas, del sarampión, de la rubéola, CMV y los arnavirus. <sup>(56)</sup>

F: ESPERMA

Por él se excretan los virus como el VHB, CMV y el VIH. <sup>(56)</sup>

G: LECHE MATERNA

Transmite el CMV, el virus de las paperas (virus Urleano) y ciertos retrovirus humanos. <sup>(56)</sup>

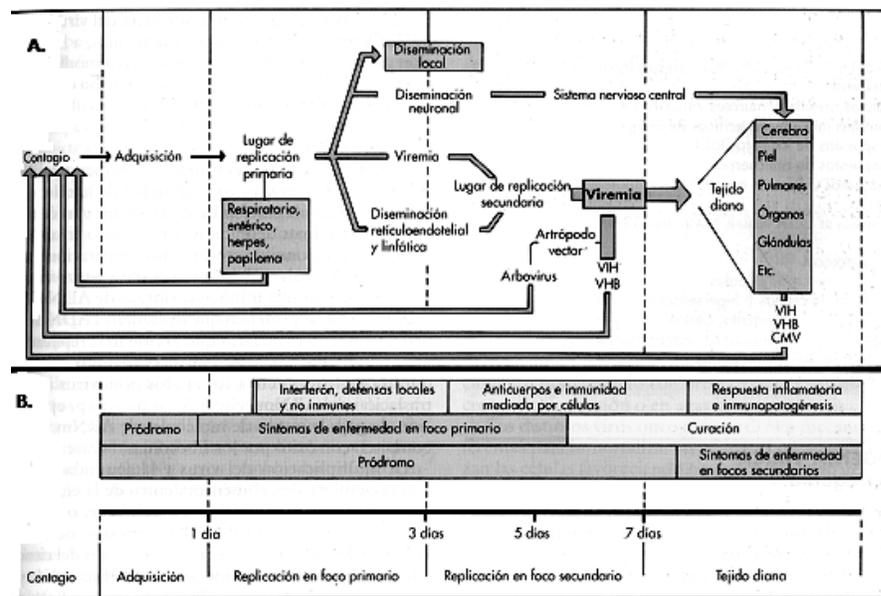


FIGURA 44: A- Fases de la infección vírica: el virus es liberado desde un individuo, adquirido por otro, se multiplica e inicia una infección primaria en el sitio de contagio. Dependiendo del virus, puede diseminarse a otros sitios corporales hasta alcanzar por último el tejido diana característico de la enfermedad. El ciclo se continúa con la liberación de nuevos virus. El grosor de la flecha indica amplificación del inóculo original mediante multiplicación. Las cajas indican un foco o causa de síntomas. B- Curso cronológico de la infección vírica: el curso de los síntomas y la respuesta inmune guardan relación con la fase de la infección y con que el virus produzca síntomas en el lugar primario o solo tras diseminación a otro foco (foco secundario). <sup>(40)</sup>

## e) TIPOS DE INFECCIONES VIRALES

### INTRODUCCIÓN

La infección vírica de una célula puede conducir a tres resultados: infección fracasada, muerte celular o multiplicación vírica sin muerte celular. Las infecciones persistentes pueden ser crónicas, latentes-recurrentes y transformadoras. La naturaleza de la infección está determinada por las características tanto del virus como de las células. Una célula no permisiva no permitirá la replicación de un tipo o cepa particular de virus. Los mutantes víricos que causan infecciones abortivas, no se multiplican y, por tanto, desaparecen. Una célula permisiva proporciona la maquinaria biosintética necesaria para permitir el ciclo replicativo completo del virus. Una célula semipermisiva puede ser muy ineficaz o permitir algunas, pero no todas las fases de la replicación vírica. <sup>(29)</sup>

La replicación del virus puede iniciar cambios en las células que conducen a histólisis, o alteraciones en el aspecto, en las propiedades funcionales o en las características antigénicas de las células. Los efectos sobre la célula se pueden deber a la utilización por parte del virus de la maquinaria para síntesis de macromoléculas, a la acumulación de proteínas o partículas víricas, o a modificación de estructuras celulares, como la incorporación de glucoproteínas en las membranas. <sup>(29)</sup>

Tipo de infección	Producción de virus	Destino de la célula
<b>ABORTIVA</b>	x	No efecto
<b>CITOLÍTICA</b>	✓	Muerte
<b>PERSISTENTE:</b>		
▪ Productiva	✓	Senescencia
▪ Latente	x	No efecto
▪ Transformadora:		
• Virus DNA	x	Inmortalización
• Virus RNA	✓	Inmortalización

Tabla 16: Tipos de infección viral relacionadas con la producción viral correspondiente y el efecto que provocan en la célula. <sup>(29)</sup>

1. **INFECCIÓN ABORTIVA:** Como su nombre lo indica, la infección no logra concretarse. <sup>(29)</sup>
2. **INFECCIÓN CITOLÍTICA:** La replicación del virus es muchas veces incompatible con las funciones esenciales y la viabilidad de la célula. Algunos virus evitan la síntesis de macromoléculas celulares o producen enzimas degradativas y proteínas tóxicas. Esto impide las funciones de crecimiento y reparación conduciendo a la muerte celular. <sup>(29)</sup>

Tabla 17: Mecanismos que provocan la lisis celular en una infección citolítica:

<b>Mecanismo</b>	<b>Virus humanos importantes</b>
Inhibición de la síntesis de proteínas celulares.	Virus representativos.
Inhibición y degradación del DNA celular.	Poliovirus, VHS, togavirus, poxvirus.
Alteración de la estructura de la membrana celular:	Herpesvirus.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inserción de glucoproteínas</li> </ul>	Todos los virus con envoltura.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formación de sincitios</li> </ul>	VHS, V VZ, paramixovirus, VIH.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alteración del citoesqueleto.</li> </ul>	Virus desnudos, VHS.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cambios de la permeabilidad</li> </ul>	Togavirus, herpesvirus.
Cuerpos de inclusión:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cuerpos de Negri.</li> </ul>	(Intracitoplasmáticos) Rabia.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ojo de lechuza.</li> </ul>	(Intranucleares) CMV.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tipo A de Cowdry.</li> </ul>	(Intranucleares) VHS, sarampión.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Basófilos intranucleares.</li> </ul>	Adenovirus.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acidófilos intracitoplásmicos.</li> </ul>	Poxvirus.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acidófilos citoplásmicos perinucleares.</li> </ul>	Reovirus.
Toxicidad de componentes del virión.	Fibras del adenovirus.

### 3. INFECCIONES PERSISTENTES

La desaparición de los síntomas y de la enfermedad no siempre está acompañada de la eliminación del virus, sino que se prolonga con la persistencia del material genómico viral de alguna forma. Esto puede traer como consecuencia la recurrencia de la forma aguda de la enfermedad o una enfermedad de progresión lenta que puede parecerse o no a las condiciones originales. <sup>(29)</sup>

El mecanismo preciso por el cual los virus persisten "*in vivo*" habitualmente no es bien comprendido a nivel molecular. <sup>(29)</sup>

Las enfermedades virales persistentes se dividieron tradicionalmente en dos categorías:

- Infecciones productiva (crónicas)

Los virus de la progenie se encuentran presentes y salen de la célula sin causar daño aparente, por exocitosis o gemación a través de la membrana plasmática, pudiendo ser recuperados por métodos biológicos convencionales. Por ejemplo las infecciones virales persistentes con producción continua del virus como en la hepatitis B. <sup>(29)</sup>

- Infecciones latentes

Son infecciones persistentes en las cuales el genoma viral está presente, pero las partículas infecciosas no se producen más que en periodos intermitentes de episodios de reactivación. Por ejemplo el herpesvirus. <sup>(29)</sup>

Es difícil dar una definición de infección viral persistente latente o productiva. Los términos no son absolutos y la persistencia comprende estadios de infección productiva y latente. <sup>(29)</sup>

- Infecciones transformantes

Resulta a menudo de la integración de la totalidad o de parte del genoma viral al genoma celular. <sup>(29)</sup>

La célula transformada adquiere características morfológicas y biológicas nuevas:

- Crecimiento continuado sin senescencia.
- Alteraciones de la morfología y el metabolismo celulares.
- Aumento de la tasa de crecimiento celular y del transporte de azúcares.
- Pérdida de inhibición del crecimiento por contacto con otras células.
- Pérdida de la capacidad de crecimiento en suspensión o en agar semisólido.

Los distintos virus oncogénicos tienen mecanismos diferentes para immortalizar las células:

- Los virus immortalizan las células favoreciendo o proporcionando genes estimuladores del crecimiento.
- Mediante eliminación de mecanismos de subescisión intrínsecos, que normalmente limitan la síntesis del ADN y el crecimiento celular. <sup>(29)</sup>

• Virus de ADN

La immortalización en estos virus ocurre en células semipermissivas, que sólo expresan los genes víricos precoces. La síntesis de ADN vírico y la progresión hasta la fase tardía de síntesis de ARNm y proteínas suelen causar muerte celular, lo que impide la immortalización. <sup>(29)</sup>

• Virus de ARN

Estos virus tienen diversos mecanismos para lograr una immortalización exitosa, pero en general no resulta suficiente para la oncogénesis y la formación de un tumor. Las células immortalizadas experimentan mayor riesgo que las normales de acumular otras mutaciones o reagrupaciones cromosómicas con el transcurso del tiempo, lo que favorece el desarrollo de células tumorales. Es posible que las células immortalizadas se muestren también más susceptibles a cofactores y promotores tumorales (ésteres de forbol y butirato), lo que facilita la formación de tumores. Aproximadamente el 15% de los cánceres humanos pueden ser relacionados con virus oncogénicos, como el VLTH-1, VHB, papilomavirus 16 y 18 y el VEB. El VHS tipo 2 puede actuar como cofactor para el cáncer cervical de las mujeres. <sup>(29)</sup>

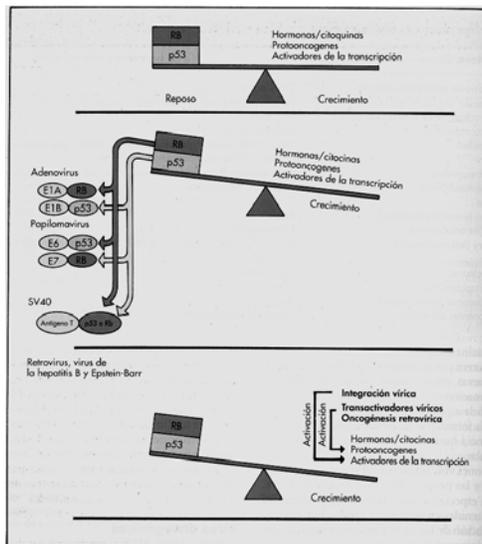


FIGURA 45: Mecanismos de transformación/ inmortalización por los virus. El crecimiento celular está controlado por el equilibrio de activadores externos e internos (aceleradores) y depresores como la proteína p53 y el producto del gen del retinoblastoma (RB) (frenos). Los virus oncogénicos alteran el equilibrio al eliminar frenos o potenciar aceleradores. <sup>(40)</sup>

Cuando un individuo es infectado por un virus se pueden dar a su vez los siguientes tipos de infección:

- **INFECCIÓN AGUDA:**
  - Influenza. <sup>(29)</sup>
- **INFECCIÓN PERSISTENTE:**
  - Crónica productiva: VIH, VHB.
  - Latente con o sin reactivaciones: papiloma, herpes virus. <sup>(29)</sup>
- **INFECCIONES LOCALIZADAS:**
  - Papilomavirus.
  - Influenza.
  - Varicela zoster. <sup>(29)</sup>
- **INFECCIONES GENERALIZADAS:**
  - VIH.
  - Sarampión.
  - VEB → infección mononucleósica. <sup>(29)</sup>
- **INFECCIÓN PRIMARIA**
  - Se considera así a aquella infección en la cual el hospedero toma contacto con el agente viral por primera vez. <sup>(29)</sup>
- **REINFECCIÓN**
  - Se considera así cuando un hospedero toma contacto con una cepa viral diferente a la que contactó la primera vez. <sup>(29)</sup>

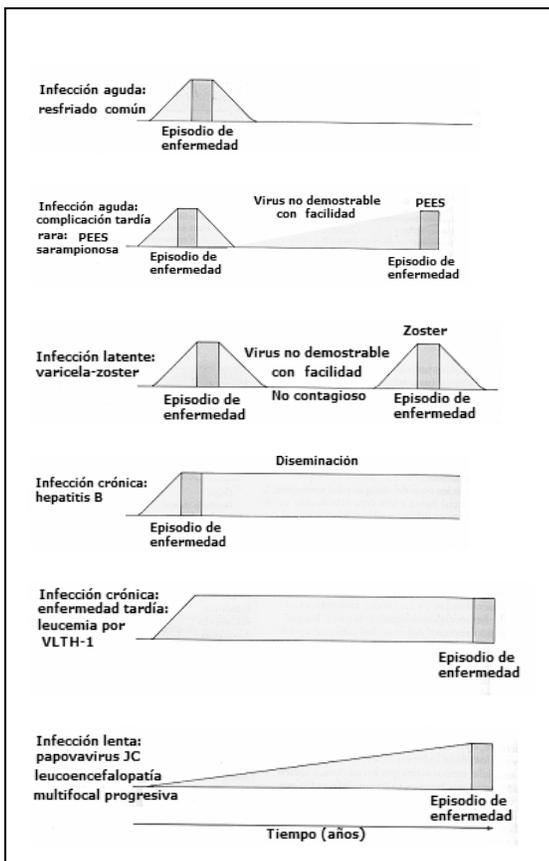


FIGURA 46: El esquema muestra la infección aguda y varios tipos de infección persistente, ilustradas por las enfermedades que se indican en la columna de la izquierda. Los rectángulos verticales en color verde ilustran los episodios de enfermedad. PEES, panencefalitis esclerosante subaguda. <sup>(40)</sup>

## 4.2 RESPUESTA INMUNE ANTE LOS VIRUS

La curación de la infección viral se obtiene por interacciones complejas entre las células endoteliales, macrófagos e interferones, que intervienen muy rápidamente y además por los linfocitos T citotóxicos. <sup>(29)</sup>

La inmunidad (o protección contra una reinfección por el mismo virus) parece estar dada fundamentalmente por las defensas inmunológicas humorales. Los anticuerpos neutralizantes (IgG e IgA) son eficaces contra los viriones extracelulares y se combinan con las proteínas de la superficie de los virus. Ellos impiden la adsorción de los virus a las células. Se los encuentra en el suero sanguíneo y en la superficie de las mucosas (IgA secretora). <sup>(29)</sup>

Los anticuerpos circulantes protegen contra las infecciones generalizadas neutralizando los virus durante su fase virémica (sarampión, paperas, varicela, rubéola, poliomielitis, viruela, fiebre amarilla); por el contrario, son los anticuerpos locales los que protegen al individuo contra las infecciones a nivel de la puerta de entrada (gripe, resfrío, gastroenteritis, poliomielitis). Todos estos anticuerpos juegan un rol capital en la prevención de la infección. La inmunidad contra el mismo tipo antigénico de un virus dura en general algunos años, y son las infecciones inaparentes las responsables de la inmunidad duradera. En ciertos casos, la respuesta inmunológica es en parte responsable de la enfermedad viral. <sup>(29)</sup>

### INMUNOPATOLOGÍA

Desde un punto de vista práctico es conveniente dividir la respuesta inmune en dos tipos:

- Respuesta inespecífica:

En los hospederos no inmunizados, antes de que los componentes específicos de la respuesta inmune puedan ser detectados, existe un periodo de latencia de algunos días posteriores a la infección. Es particularmente durante este periodo que la respuesta inespecífica a la infección se hace aparente y puede limitar la replicación viral. <sup>(29)</sup>

La infección induce una respuesta inflamatoria en una variedad de células, tales como neutrófilos y monocitos, pero son primordialmente los leucocitos polimorfonucleares (LPMN) los que se dirigen al sitio de la infección. La activación de las células Natural Killer (NK) también contribuye a disminuir los títulos virales elevados por intermedio de los interferones alfa y beta. <sup>(29)</sup>

Las células NK son linfocitos grandes granulares con una morfología característica. Se cree que reconocen estructuras en las glicoproteínas de alto peso molecular que aparecen en la superficie de las células infectadas por virus. <sup>(29)</sup>

- Respuesta específica:

Esta respuesta está mediada por una variedad de células presentadoras de antígenos (CPA), y por dos clases de linfocitos: linfocitos B o derivados de la médula ósea y linfocitos T o derivados del timo. La mayoría de las células presentadoras de antígenos procesan el

antígeno de tal forma que pueda ser reconocido por las células T. Estas células presentadoras de antígenos pueden hacerlo a los complejos de histocompatibilidad mayores de clase I y II. <sup>(29)</sup>

- Complejo de histocompatibilidad mayor de clase II (MHC II)

Algunos de los péptidos producidos por la degradación de los antígenos se asocian con antígenos del MHC II. Este complejo es transportado hacia la membrana plasmática, donde es expresado y es específicamente reconocido por una célula T receptora. <sup>(29)</sup>

La célula presentadora de antígenos (CPA) también segrega algunas interleucinas (ILs) que se unen a los receptores en las células T. Luego de esto las células se multiplican y se diferencian, transformándose en T helper (Th) o T supresoras (Ts), cuyo papel es ayudar o suprimir la activación de las células T o B para que se transformen en células efectoras. Es así que la célula Th es una célula T del MHC II y puede luego diferenciarse para transformarse en célula efectora (Td) que media las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado. De estudios realizados en ratones hay evidencia de la existencia de dos tipos de células Th (Th1 y Th2) que segregan patrones diferentes de ILs. <sup>(29)</sup>

- Complejo de histocompatibilidad mayor de clase I (MHC I)

Por el contrario, la partícula viral infecciosa puede reconocer un receptor en la célula presentadora de antígenos, puede penetrar en ella por endocitosis y replicarse produciendo una infección abortiva o productiva. <sup>(29)</sup>

Algunas proteínas virales que se sintetizan dentro de la célula son degradadas a péptidos que se pueden asociar con antígenos de MHC I. Luego de expresarse a nivel de la superficie celular, estos péptidos pueden ser reconocidos por una célula T del MHC I. Esta célula T se transforma en un efector (Tc) que posee actividad citolítica (lisis mediada por células). La célula final de esta vía tiene una vida media corta. <sup>(29)</sup>

La célula B inmunocompetente también puede presentar antígenos. Un epítipo es específicamente reconocido por el receptor IgM de la célula. El complejo así formado penetra a la célula por endocitosis y es degradado dentro de la misma de una forma similar al proceso que se lleva a cabo a nivel de los macrófagos. Aumenta la expresión de los antígenos MHC II en la célula, y el complejo péptido-MHC es transportado a la superficie celular. Al ser reconocido por el receptor de una célula Th se produce liberación de ILs, tales como IL4 e IL6, que activan a las células B. Esto resulta en un proceso de diferenciación por medio del cual se forman células secretoras de IgG, IgA e IgE. En este caso también la célula final diferenciada (la célula plasmática) tiene una vida media corta. <sup>(29)</sup>

La memoria inmunológica comprende la generación de un número aumentado (10 a 1000 veces) de células T o B con una especificidad de receptores similar a la de las células precursoras. Existen marcadores superficiales que contribuyen a diferenciar las células precursoras de las células memoria. <sup>(29)</sup>

La respuesta específica de anticuerpos puede estar presente durante muchos años luego de una única infección viral y en ausencia de reexposiciones al mismo virus. Es sólo en las infecciones virales en las que generalmente se encuentran anticuerpos contra péptidos y carbohidratos. <sup>(29)</sup>

Los niños menores de 2 años responden muy pobremente a los antígenos polisacáridos. Generalmente son los anticuerpos contra secuencias peptídicas los más protectores en las infecciones virales. <sup>(29)</sup>

## RESPUESTA INMUNE ANTE UNA INFECCIÓN VIRAL AGUDA

### ▪ Infección primaria

En muchas infecciones los virus replican y la respuesta inmune primero controla y luego detiene completamente la infección, de tal forma que los virus no persisten en la mayoría de las personas. <sup>(29,40)</sup>

Se han descrito cuatro estadios en esta respuesta inmune:

1: El virus reconoce un receptor celular, penetra en la célula y se replica allí. Las nuevas progenies virales infectan otras células.

2: La respuesta inespecífica limita la extensión de la replicación viral.

3: Aparecen las células T reguladoras y las T efectoras antes de que la respuesta de anticuerpos sea detectada. La respuesta IgM se produce antes que la respuesta IgG, IgA e IgE.

La prevalencia de los diferentes isotipos depende de la vía de infección y del patrón de ILs segregadas por las células Th.

4: Generación de células memoria T y B.

Se piensa que la persistencia de los antígenos virales es la razón por la cual las células secretoras de anticuerpos permanecen en el tiempo. Primero aparece la secreción de IgM y luego la de IgG e IgA. IgM e IgG se encuentran hasta 8 y 12 meses luego de la infección, mientras que IgG se mantiene por más tiempo. Las células Tc memoria alcanzan sus máximos niveles a las 2 semanas y se mantienen elevadas de por vida, por lo menos así se demostró en experiencias con ratones. <sup>(29,40)</sup>

Los niveles máximos de células B memoria se producen más tardíamente y luego disminuyen con el tiempo.

### ▪ Infección secundaria

La presencia de anticuerpos específicos de la primoinfección neutraliza muchas veces los virus de una segunda infección.

La respuesta inespecífica colabora para limitar la replicación de los virus. La respuesta específica, humoral y mediada por células, se produce más rápidamente que en la respuesta primaria. La dimensión de esta respuesta depende de la cantidad de virus no neutralizados. Las células infectadas son destruidas por las células Tc, por la citotoxicidad a anticuerpos mediada por células y por la lisis mediada por anticuerpos más complemento. La infección es en estos casos de corta duración.<sup>(29,40)</sup>

## INMUNIDAD MEDIADA POR CÉLULAS

La inmunidad mediada por células se relaciona con la eliminación de las células infectadas de los órganos donde el virus crece. Esto termina con la producción de nuevos virus, impidiendo la posterior difusión del proceso infeccioso.<sup>(29,40)</sup>

Mientras que las inmunoglobulinas específicas antivirales son muy importantes para neutralizar viriones libres y es por ello que juegan un papel central en la resistencia a la reinfección, experimentos con transferencia de anticuerpos indican que los mecanismos mediados por las inmunoglobulinas son menos efectivos para eliminar al virus de los tejidos sólidos.<sup>(29,40)</sup>

La remoción de las células infectadas generalmente depende de linfocitos específicos para el virus derivados del timo.<sup>(29,40)</sup>

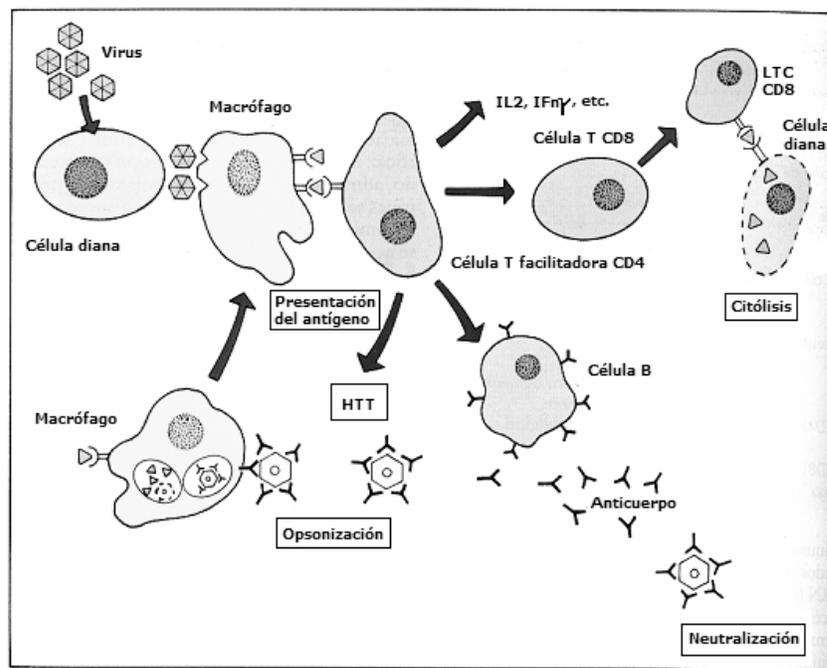


FIGURA 47: Inmunidad antiviral específica de antígeno. La respuesta inmune es iniciada por fagocitosis, proteólisis y presentación del antígeno en células de linaje macrófágico. Se activan células T facilitadoras específicas de antígeno y de hipersensibilidad tipo tardío (HTT), con liberación de linfocinas que activan las células B y T citolíticas.<sup>(40)</sup>

## 4.3 TIPOS DE VACUNAS

### INMUNIZACIÓN

Técnica de medicina preventiva cuyo objetivo consiste en procurar resistencia inmune frente a un organismo infeccioso. <sup>(29)</sup>

Con este fin, se inyecta al individuo una forma del organismo patógeno que no tiene capacidad de producir la enfermedad, pero sí de inducir la formación de anticuerpos. <sup>(29)</sup>

Este proceso se denomina también vacunación debido a que la primera técnica de inmunización consistió en la administración del virus de la vacuna para lograr la inmunidad frente a la viruela llevado a cabo por el médico británico Edward Jenner en 1796. En 1885 el científico francés Louis Pasteur fue el primero en utilizar un virus atenuado, el de la rabia, para lograr la inmunización frente a la infección natural. En 1897 se desarrolló en Inglaterra una vacuna frente a la fiebre tifoidea. <sup>(29)</sup>

El preparado inmunizante se introduce en el organismo a través de la piel (inoculación), salvo algunas excepciones, como la vacuna oral de la polio tipo Sabin. La duración del efecto protector es muy variable, desde seis meses en el caso de la peste hasta diez años para la fiebre amarilla. <sup>(29)</sup>

Para inmunizar a una población hay dos estrategias diferentes de vacunación:

- Vacunación selectiva: sólo a aquellos individuos con mayor probabilidad de padecer la enfermedad (como se hizo en cierto modo, y con muy buenos resultados, en la reciente campaña de erradicación de la viruela). <sup>(29)</sup>
- Vacunación en masa: cuando en una población la probabilidad de que un individuo con determinada enfermedad infecciosa se ponga en contacto con un individuo susceptible (sin inmunidad frente a ese microorganismo) es muy pequeña, la transmisión de la enfermedad tiende a desaparecer. No es pues necesario vacunar a toda la población, pero para muchas enfermedades se deben alcanzar niveles de protección de al menos el 90% de sus miembros. <sup>(29)</sup>

Estas estrategias, u otras formas mixtas, son las más empleadas en los países desarrollados. En el caso de la rubéola, por ejemplo, las autoridades sanitarias supervisan la vacunación de todos los escolares y de las mujeres en edad fértil. <sup>(29)</sup>

## INMUNIZACIÓN ACTIVA

Inducción de la producción de anticuerpos inoculando una forma del organismo infeccioso. Fundamento de las vacunas. <sup>(29)</sup> Puede ser:

- Natural → Infección subclínica.
- Artificial → Vacunación.

## INMUNIZACIÓN INACTIVA

También llamada pasiva consiste en la administración de un suero que ya contiene esos anticuerpos porque se obtiene de una persona que ha padecido la enfermedad previamente. La inmunización pasiva sólo se emplea en raras ocasiones, como en ciertos casos de hepatitis. <sup>(29)</sup>

- Natural → Madre a hijo.
- Artificial → Aplicando globulinas o interferones.

## VACUNA:

Preparado de antígenos procedentes de microorganismos patógenos, cuya finalidad es la creación de anticuerpos que reconozcan y ataquen a la infección y, por lo tanto, produzcan la inmunidad del organismo inoculado. Es decir es una preparación antigénica específica cuya administración provoca en el organismo la inmunización activa contra una enfermedad determinada. <sup>(58)</sup>

El término vacuna procede del latín vacca, y Jenner denominó al proceso descrito vacunación. <sup>(58)</sup>

La vacuna suele consistir en dosis muy pequeñas del propio agente , hay dos formas de aplicarla:

- **INACTIVA:** microorganismos muertos de cepas virulentas por la exposición al calor o a agentes químicos (como la primera vacuna de la polio, o la vacuna de la fiebre tifoidea) ó con un toxoide que es la forma inactivada de la toxina producida por el microorganismo (vacunas del tétanos y la difteria). <sup>(58)</sup>
- **ATENUADA:** microorganismos vivos de cepas debilitadas en el laboratorio de manera que no produzca la enfermedad (como la vacuna de la polio desarrollada por Albert Sabin, o las vacunas del sarampión y la fiebre amarilla). <sup>(58)</sup>

<b>Tabla 18. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAS VACUNAS VIVAS E INACTIVADAS<sup>(58)</sup></b>		
<b>PROPIEDAD</b>	<b>ATENUADAS (VIVAS)</b>	<b>INACTIVADAS</b>
Vía de administración.	Natural (oral o respiratoria en ciertos casos) o inyección.	Inyección.
Dosis de virus; costo.	Bajo.	Alto.
Número de dosis.	Única (puede ser aconsejable un refuerzo después de 10 años en los casos de sarampión, rubéola y fiebre amarilla).	Múltiples.
Necesidad de adyuvante.	No.	Sí (sin embargo no existen adyuvantes satisfactorios para uso humano).
Duración de la inmunidad.	Muchos años.	Generalmente menos.
Respuesta de anticuerpos.	IgG, IgA.	IgG.
Respuesta inmune mediada por células.	Buena.	Pobre.
Labilidad al calor en los trópicos.	Sí (el MgCl <sub>2</sub> y otros estabilizadores, la refrigeración y el almacenamiento en frío ayudan a la conservación).	No.
Interferencia (con otros virus o enfermedades).	Ocasional.	No.
Efectos secundarios.	Síntomas leves ocasionales (especialmente rubéola y sarampión).	Irritación ocasional en el brazo.
Reversión a la virulencia.	Rara.	No.

Cualquiera de las formas origina la enfermedad, por lo que provoca la creación de anticuerpos que permanecen en el organismo y lo protegen en el caso de futuros contagios. (58)

Las técnicas de administración depende del tipo de vacuna y son tres:

- Inoculación, la mas común.
- Ingestión.
- Spray nasal.

Las vacunas son la forma más eficaz de protección frente a los virus y otros organismos relacionados contra los que los antibióticos no son eficaces. (58)

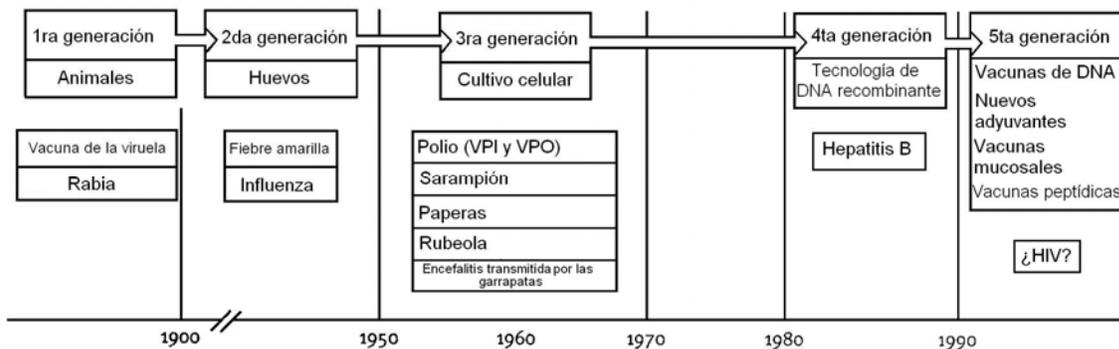


FIGURA 48: Progreso cronológico de los diferentes tipos de vacunas. (12)

En los países occidentales se administran ciertas vacunas de acuerdo a :

VACUNA	FORMA DE APLICACIÓN	EDAD DE APLICACIÓN
DIFTERIA	Aplicación Simultánea	3 meses
TETANOS		5 meses
TOSFERINA		7 meses
POLIOMIELITIS	Aplicación Única	7 meses
PAROTIDITIS	Aplicación Simultánea	15 meses (vacuna triple vírica)
SARAMPIÓN		
RUBÉOLA		
HAEMOPHILUS TIPO B	Cada vez mas común	-

Tabla 19: Calendario oficial de vacunación en México. (58)

## Vacunas tradicionales

VIRUS	TIPO DE VACUNA	VIA DE ADMINISTRACIÓN	ORIGEN
Poliomielitis	Virus vivo atenuado (Sabin)	Oral	CC
	Virus muerto (Salk)	Subcutánea	CC
Sarampión	Virus vivo atenuado	Subcutánea	CC/EP
Paperas	Virus vivo atenuado	Subcutánea	CC/EP
Rubéola	Virus vivo atenuado	Subcutánea	CC/EP

Tabla 20: Vías de administración y origen (generación), de las vacunas tradicionales. CC (Cultivo celular, 3ª generación), EP (embrión de pollo, 2ª generación).<sup>(58)</sup>

## Vacunas ocasionales

VIRUS	TIPO DE VACUNA	VIA DE ADMINISTRACIÓN	ORIGEN
Viruela	Virus vivo vaccinia	Intradérmica	LINFA
Fiebre amarilla	Virus vivo atenuado	Subcutánea	CC/EP
Hepatitis B	Subunidad	Subcutánea	DNAC
Influenza	Virus muerto	Subcutánea	EP
Rabia	Virus muerto	Subcutánea	CC/EP
Adenovirus	Virus vivo atenuado	Oral con capa entérica.	CC
Enc. Japonesa	Virus muerto	Subcutánea	AL
E.E.V.	Virus vivo atenuado	Subcutánea	CC
E.E.O.	Virus muerto	Subcutánea	CP de EP
E.E.	Virus muerto	Subcutánea	CP de EP
Enc. Rusa	Virus muerto	Subcutánea	AL
Varicela Zoster	Virus vivo atenuado	Subcutánea	CC
Hepatitis A	Virus vivo atenuado	Subcutánea	CC

Tabla 21: Vacunas de aplicación ocasional, indicándose su vía de administración, origen y generación. CC (Cultivo Celular, 3ª generación), EP (Embrión de pollo, 2ª generación) y AL (Animales de Laboratorio, 1ª generación).<sup>(58)</sup>

## Vacunas experimentales <sup>(58)</sup>

- CMV.
- Dengue.
- Rotavirus.
- Parainfluenza.
- VHC.
- VIH.
- VPH.

Problemas relacionados con las vacunas <sup>(58)</sup>:

- Las vacunas vivas pueden revertir en ocasiones a formas virulentas.
- La interferencia de otros microorganismos puede prevenir la infección por el virus (la rubéola impide la proliferación del virus polio).
- La vacunación de una persona inmunodeprimida con vacuna viva puede resultar letal.
- Pueden producirse efectos secundarios a la vacunación, como hipersensibilidad o reacciones alérgicas al antígeno, al material no microbiano de la vacuna o a los contaminantes.
- El desarrollo del producto y el seguro de responsabilidad resultan muy caros para los fabricantes de vacunas.
- Los microorganismos con muchos serotipos son difíciles de controlar mediante vacunas.

## 4.4 TERAPIA VIRAL

Los medicamentos antivirales pueden ser clasificados de acuerdo al mecanismo de acción. <sup>(44)</sup>

Este mecanismo de acción es básicamente la etapa de replicación viral que es inhibida por el fármaco. <sup>(44)</sup>

Los antivirales se pueden clasificar de acuerdo al efecto que tienen sobre el virus:

EFECTO EN EL VIRUS		ANTIVIRAL REPRESENTATIVO
IMPIDEN LA ADSORCIÓN.		▪ Interferón
INHIBEN LA PENETRACIÓN.		▪ Interferón      ▪ Amantadina
INHIBEN EL DESNUDAMIENTO.		▪ Amantadina
INHIBEN LA TRANSCRIPCIÓN DEL GENOMA VIRAL.	Inhiben la DNA polimerasa viral.	▪ Aciclovir      ▪ Idoxuridina ▪ Fanciclovir      ▪ Trifluridina ▪ Ganciclovir      ▪ Vidarabina ▪ Valaciclovir      ▪ Foscarnet
	Inhiben la RNA polimerasa viral.	▪ Ribavirina
	Inhiben la transcriptasa reversa (Antirretrovirales).	▪ Zalcitabina      ▪ Zidovudina ▪ Didanosina      ▪ Estavudina
	Inhibición de la traducción RNAm viral.	▪ Interferón
	INHIBICIÓN DEL ENSAMBLAJE Y LIBERACIÓN.	
INHIBICIÓN DE LA MADURACIÓN Y LA LIBERACIÓN (Otros antirretrovirales).		▪ Saquinavir ▪ Ritonavir ▪ Indinavir

Tabla 22: Clasificación de los medicamentos antivirales de acuerdo al efecto que producen en los virus. <sup>(44)</sup>

## ACICLOVIR

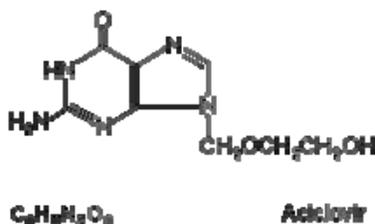


FIGURA 49: Herpes labial.

El aciclovir (ACV) es un análogo sintético del nucleósido purina 9-[(2hidroxietoxi)metil] guanina, en el cual se ha sustituido el azúcar cíclico de la molécula de guanosina natural por una cadena lateral lineal. <sup>(44)</sup>

El aciclovir inhibe la replicación mediante la inhibición de la síntesis de DNA. La selectividad en esta acción proviene de dos interacciones diferentes del fármaco con las proteínas virales:

1. Para inhibir el DNA el aciclovir debe ser primero fosforilado por la timidina cinasa viral ya que la afinidad de aciclovir por esta enzima codificada por el virus del herpes es 200 veces mayor que por la enzima de los mamíferos.
2. Después de la síntesis de aciclovir monofosfato (aciclo-GMP), las enzimas de la célula hospedero sintetizan aciclo-GDP y aciclo-GTP. Esta aciclo-GTP inhibe la DNA polimerasa viral y se incorpora en el DNA viral en formación finalizando su replicación. <sup>(44)</sup>

Se puede crear resistencia, principalmente en los pacientes con SIDA, por alteraciones en la Timidina cinasa o en la DNA polimerasa; en estos casos se requieren de concentraciones mayores o la utilización de Vidarabina y Foscarnet. <sup>(44)</sup>

### FARMACOCINÉTICA

Después de la administración tópica se presenta una mínima absorción percutánea y no se detecta el medicamento en la sangre o en la orina.

Después de la administración oral el aciclovir se absorbe pobremente en el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad del 15 al 30%.

El aciclovir se distribuye ampliamente con altas concentraciones en el riñón, el hígado y los intestinos. Las concentraciones en líquido cefaloraquídeo son solo un tercio de las plasmáticas. Su unión a proteínas es del 9-33%.

El aciclovir sufre un metabolismo mínimo. Las células infectadas lo transforman en su metabolito activo, el trifosfato, aunque una parte del medicamento puede ser metabolizada extracelularmente.

Aproximadamente el 70% del medicamento se elimina en la orina sin cambios. Debido a su pobre biodisponibilidad, después de su administración por vía oral, solo el 14% de la dosis se recupere en la orina (en comparación con el 92% cuando se administra por vía sistémica). En pacientes con función renal normal la vida media del fármaco es de mas o menos 2.5 horas. En pacientes con alteraciones de la función renal, puede llegar a ser de hasta 19

horas. Este fármaco se puede remover del organismo por hemodiálisis (aunque lentamente).<sup>(44)</sup>

### APLICACIONES TERAPÉUTICAS

El uso clínico del aciclovir está limitado al tratamiento de las infecciones por herpes simples, herpes genital y herpes zoster. La administración por vía parenteral es de primera elección en pacientes inmunocomprometidos con lesiones cutáneas y en las mucosas.

El aciclovir por vía oral está limitado al tratamiento del primer episodio y los episodios recurrentes del herpes labial y cutáneo, el tratamiento agudo del herpes zoster y la varicela. Cuando el herpes es recurrente se requieren tratamientos prolongados por 1-2 meses.

Los virus de Epstein-Barr y CMV pueden ser inhibidos, pero solo a concentraciones muy altas del medicamento.<sup>(44)</sup>

Se ha visto que la actividad de Aciclovir es más de 100 veces superior a la Viradabina y 10 veces que la de la Ioxuridina contra el herpes simplex tipo I.

Además se utiliza para el tratamiento de:

- Encefalitis por herpes simple
- Profilaxis de herpes en inmunocomprometidos
- Queratinoconjuntivitis herpética
- Herpes zoster oftálmico
- Profilaxis de CMV en pacientes con trasplante
- Indicaciones del aciclovir en varicela:
  - Pacientes en tratamiento con corticoides inhalados
  - Pacientes sanos mayores de 13 años
  - Pacientes mayores a 1 año con condiciones crónicas cutáneas o pulmonares
  - Neumonía por varicela en adulto sano

### EFECTOS ADVERSOS

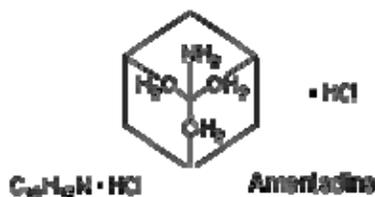
Cuando se aplica por vía tópica puede producir irritación y ardor local cuando se aplica en lesiones genitales. Por vía oral prácticamente no presenta efectos adversos (si acaso náuseas y cefalea ocasionales).

La extensa eliminación renal después de la administración parenteral puede predisponer a los pacientes a cristaluria, aunque en general el medicamento es muy bien tolerado.

Puede producir encefalopatía en el 1% de los pacientes cuando se administra por vía sistémica, aunque generalmente se da en pacientes con función renal comprometida. También puede producir flebitis, irritación local, hematuria e hipotensión.

Con base en el aciclovir se crearon otros fármacos antivirales análogos para tratar las cepas resistentes y mejorar su actividad antiviral. Dentro de este grupo están el Ganciclovir, Fanciclovir, Cidofovir.<sup>(44)</sup>

## AMANTADINA



La amantadina es un agente antiviral sintético que actúa inhibiendo el desnudamiento del virus. Este agente se introdujo inicialmente como un agente profiláctico de influenza A y posteriormente se observó que inducía una mejoría sintomática en los pacientes con enfermedad de Parkinson.<sup>(44)</sup>

Actúa de dos formas sobre la replicación viral:

- Inhibe la pérdida de la cobertura del virus, al evitar la fusión de la envoltura vírica con las membranas celulares después de la captación endosómica.
- A concentraciones bajas, se une y bloquea un canal de la membrana formado por la proteína matriz M2 del virus de la influenza A. Este canal evita la acidificación normal de las vesículas de Golgi y otras vesículas citoplasmáticas.<sup>(44)</sup>

### FARMACOCINÉTICA

Administrada por vía oral posee principalmente una acción profiláctica en los casos de influenza o gripe producida por el virus A o virus asiático (con rápida mejoría de la fiebre y demás síntomas).<sup>(44)</sup>

Se ha demostrado que la amantadina no inactiva o extermina el virus antes de ponerse en contacto con la célula, ni impide su absorción a la superficie celular sino que evita la penetración del virus en la misma, con lo que se bloquea la replicación o duplicación de aquel y la destrucción celular.<sup>(44)</sup>

La amantadina se absorbe bien del tracto gastrointestinal. Las concentraciones pico en plasma son de 0.3 a 0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  después de la administración de una dosis de 200 mg. La mayor parte del fármaco absorbido es excretado sin cambios por la orina: su vida media de eliminación es de aproximadamente 16 horas; este valor aumenta en personas de edad avanzada y en pacientes con baja función renal.<sup>(44)</sup>

La amantadina alcanza concentraciones en la saliva un tanto similares a los plasmáticos y penetra fácilmente en el líquido cefalorraquídeo.<sup>(44)</sup>

## APLICACIONES TERAPÉUTICAS

Actualmente se utiliza para la profilaxis o el tratamiento sintomático de las infecciones respiratorias producidas por el virus de la influenza A, especialmente en pacientes con alto riesgo de sufrir esta enfermedad o en aquellos que sufren una enfermedad muy severa. <sup>(44)</sup>

## EFFECTOS ADVERSOS

- Insomnio.
- Vértigo.
- Trastornos psicológicos.

Este fármaco está contraindicado en daño hepático, insuficiencia renal y hepática y epilepsia.

Existe un fármaco similar a la amantadina llamado Rimantadina que tiene una menor toxicidad en el sistema nervioso central (SNC), pero mayor en el tracto gastrointestinal (TGI). <sup>(44)</sup>

## DIDANOSINA

Es un análogo (purínico) sintético de los nucleósidos que a diferencia de la Zidovudina, su actividad es mayor en las células mononucleares sanguíneas que se encuentran en reposo. <sup>(44)</sup>

## FARMACOCINÉTICA

- a) Al administrarse por vía oral alcanza una biodisponibilidad del 40%.
- b) La comida interfiere con su absorción, por lo que se debe dar con estómago vacío.
- c) La droga es inestable en ácido, tal y como ocurre en el ambiente gástrico, por lo que se debe dar con antiácidos o búferes.
- d) La unión a proteínas séricas es mínima (5%).
- e) Su vida media plasmática es 1 a 1.5 horas.
- f) Su vida media intracelular es de 8 a 24 horas.
- g) Tiene baja concentración en líquido cefalorraquídeo: alcanza el 20% de la concentración sérica.
- h) No está claro el metabolismo de la droga.

- i) Es eliminada por vía renal. Se recomienda ajustar la dosis en compromiso renal severo.

## EFFECTOS ADVERSOS

- a) Los principales efectos adversos son la neuropatía periférica y la pancreatitis; la neuropatía periférica es dosis-dependiente y es reversible si se suspende el tratamiento; el riesgo de presentarla es mayor si hay neuropatía de base y con el uso concomitante de otras drogas neurotóxicas. La pancreatitis tiende a ser grave y es motivo de suspensión de la droga; el riesgo de presentarla es mayor si el paciente es alcohólico, sufre de hipertrigliceridemia o ha presentado episodios previos de pancreatitis.<sup>(44)</sup>
- b) Otros: cefalea, náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal, rash, despigmentación retiniana y falla hepática.<sup>(44)</sup>
- c) Teratogenicidad: no se ha demostrado la aparición de malformaciones congénitas.<sup>(44)</sup>

## INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS

- a) Drogas que necesitan un pH ácido para su absorción, como el Ketoconazol, Itraconazol y Dapsona, deben administrarse por lo menos 2 horas antes de administrarse la Didanosina.<sup>(44)</sup>
- b) Las quinolonas también deben administrarse antes de la dosis de Didanosina porque los cationes encontrados en los buffers pueden alterar su absorción.<sup>(44)</sup>
- c) El uso concomitante de otras drogas neurotóxicas puede aumentar la posibilidad de desarrollar neuropatía periférica. La Zalcitabina y la Estovudina son también neurotóxicas.<sup>(44)</sup>

## DOSIFICACIÓN

- a) La dosis de Didanosina es dependiente del peso del paciente.
- b) La dosis (en tabletas) recomendada para pacientes adultos que pesan mas de 60 Kg es de 200 mg cada 12 horas.
- c) La dosis (en tabletas) recomendada para pacientes adultos que pesan menos de 60 Kg es de 125 mg cada 12 horas.
- d) La dosis recomendada para pacientes pediátricos es de 120 mg/m<sup>2</sup> cada 12 horas.<sup>(44)</sup>

## ESTAVUDINA

Es un análogo sintético de la timidina, similar a la Zidoudina y al igual que ésta, su actividad es mayor en las células en replicación. <sup>(44)</sup>

### FARMACOCINÉTICA

- a) Tiene buena absorción al administrarse por vía oral con una biodisponibilidad del 80%.
- b) La comida no interfiere con su absorción.
- c) La unión a proteínas séricas es mínima.
- d) Su vida media plasmática es 1 a 1.5 horas.
- e) Su vida media permite la dosificación cada 12 horas.
- f) Tiene buena penetración a líquido cefalorraquídeo: alcanza el 40% de la concentración sérica.
- g) No está claro el metabolismo de la droga.
- h) Es eliminada en un 40% por vía renal. Se recomienda ajustar la dosis en compromiso renal severo. <sup>(44)</sup>

### EFFECTOS ADVERSOS

- a) El principal efecto adverso es la neuropatía periférica; en dosis dependiente y es reversible si se suspende el tratamiento o se disminuye la dosis.
- b) Aumento leve de transaminasas hepáticas.
- c) Otros: cefalea, anorexia, náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal, rash, mialgias e insomnio.
- d) Teratogenicidad: no se ha demostrado la aparición de malformaciones congénitas en estudios con animales. <sup>(44)</sup>

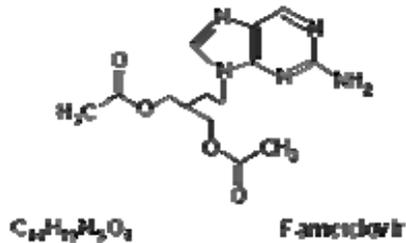
### INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS

- a) El uso combinado de Zidovudina y Estovudina muestra efectos antagónicas por lo que no se recomienda su utilización.
- b) El uso concomitante de otras drogas neurotóxicas puede aumentar la posibilidad de desarrollar neuropatía periférica. La Zalcitabina y la Didanosina son también neurotóxicas. <sup>(44)</sup>

### DOSIFICACIÓN

- a) La dosis de Estavudina es dependiente del peso del paciente.
- b) La dosis recomendada para pacientes adultos que pesan mas de 60 Kg es de 40 mg cada 12 horas.
- c) La dosis recomendada ara pacientes adultos que pesan menos de 60 Kg es de 30 mg cada 12 horas.
- d) La dosis recomendada para pacietes pediátricos que pesan menos de 30 Kg es 2 mg/kg al día. <sup>(44)</sup>

## FAMCICLOVIR



El famciclovir es un profármaco del penciclovir, que es 100 veces menos potente que el aciclovir TP, pero con vida media de 7-20 horas. La administración a largo plazo de este medicamento puede ser tumorigénica y se ha asociado a toxicidad testicular en animales.

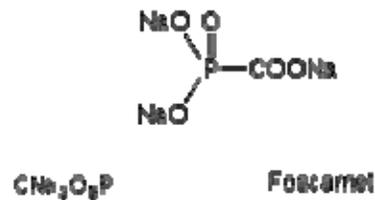
El famciclovir por vía oral se utiliza para el tratamiento del herpes zoster agudo localizado en adultos inmunocompetentes. También se utiliza por vía oral como profilaxis de herpes genital recurrente en pacientes con VIH. Este fármaco puede tener una posible utilidad en hepatitis crónica.

Sus principales efectos secundarios son dolor de cabeza, fatiga, náuseas y vómito.<sup>(44)</sup>



FIGURA 50: Herpes Zoster.

## FOSCARNET

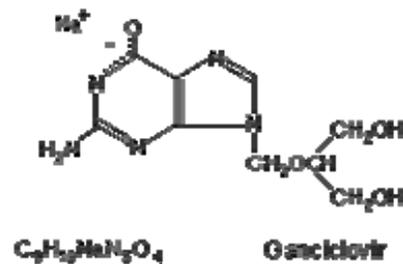


El foscarnet es un análogo orgánico del pirofosfato inorgánico que se utiliza por vía intravenosa.

Este fármaco inhibe los virus herpes, CMV y el VIH, al inhibir la DNA polimerasa sin fosforilación previa y la transcriptasa reversa.

Actualmente el foscarnet se utiliza en retinitis por CMV e infecciones por herpes simple resistente a aciclovir o ganciclovir. <sup>(44)</sup>

## GANCICLOVIR



El ganciclovir tiene una mecánica similar a la del aciclovir y difiere de él estructuralmente solo por la adición de un grupo hidroximetilo.

El ganciclovir inhibe la síntesis del ADN viral. Este fármaco sufre una fosforilación inicial a monofosfato por las quinasas virales y celulares, y luego a difosfato y trifosfato por enzimas celulares.

Las concentraciones intracelulares del trifosfato son superiores a las alcanzadas por aciclovir y declinan con mayor lentitud. Este trifosfato es un inhibidor competitivo de la incorporación de desoxiguanina trifosfato en el ADN e inhibe la DNA polimerasa viral en forma selectiva.

Las cepas de herpes simplex que son resistentes al aciclovir debido a la deficiencia de timidina cinasa también son algo resistentes al ganciclovir, mutaciones en la DNA polimerasa también puede causar resistencia. La enfermedad por CMV resistente al ganciclovir es un problema importante en los pacientes inmunosuprimidos. <sup>(44)</sup>

## FARMACOCINÉTICA

La biodisponibilidad del ganciclovir por vía oral es muy baja y por esta razón inicialmente solo se usaba por vía parenteral (hoy día hay presentaciones para uso oral e implantación intravítrea).

Después de la administración por vía parenteral el fármaco se distribuye ampliamente en los tejidos y fluidos corporales, incluyendo el ojo.

El ganciclovir cruza la barrera hematoencefálica y alcanza concentraciones en LCR del 40% en promedio, de las concentraciones plasmáticas. También cruza la placenta y tiene una unión a proteínas del 1-2%. Tiene una vida media de 3-4 horas.

La mayor parte del ganciclovir se elimina sin cambios por la orina y su vida media se prolonga cerca de 30 horas en la insuficiencia renal grave. <sup>(44)</sup>

## APLICACIONES TERAPÉUTICAS

A causa de su toxicidad el uso del ganciclovir se ha limitado a infecciones por CMV que amenacen la vida o la visión de los pacientes. Por vía oral se utiliza para la profilaxis y el tratamiento de la retinitis por CMV en pacientes inmunocomprometidos (por ejemplo paciente con VIH).

Existe un implante intraocular que libera ganciclovir continuamente durante 8 meses y se usa para la prevención de la retinopatía por CMV.

El ganciclovir es activo in vitro contra todos los herpes virus incluyendo el CMV.

Este fármaco es 100 veces más activo que el aciclovir contra las infecciones por CMV en los cultivos celulares. <sup>(44)</sup>

## EFFECTOS ADVERSOS

El efecto adverso más común es la supresión de la médula ósea. Se produce neutropenia en el 40% de los pacientes tratados y trombocitopenia en el 20%.

Se han descrito efectos en el sistema nervioso central incluyendo cefalea, cambios en la conducta, psicosis, convulsiones y coma.

El ganciclovir es teratógeno y mutágeno en los animales de experimentación. <sup>(44)</sup>

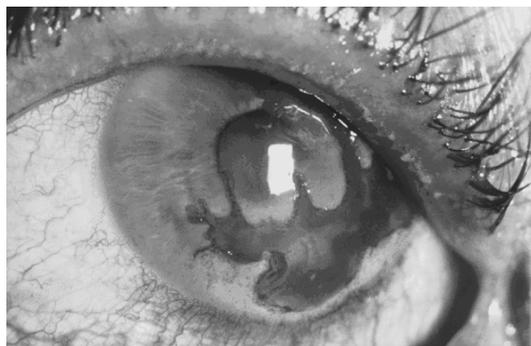


FIGURA 51: Queratoconjuntivitis por herpes.

# IDOXURIDINA

Análogo de pirimidina, sustrato para timidina cinasa incorporándose en el DNA celular y viral, por lo que solo se usa en aplicación tópica. Dentro de sus efectos adversos se encuentran irritación local e inflamación. Se usa en queratitis por herpes. <sup>(44)</sup>

## FARMACOCINETICA

La idoxuridina es químicamente similar a la timidina, precursor del DNA; la célula infectada al utilizar la idoxuridina forma un DNA que no puede infectar nuevas células ni desarrollarse.

La droga se absorbe pobremente después de su instalación al ojo. Después de su administración intravenosa, la idoxuridina se metaboliza rápidamente en el hígado y se excreta por orina; sin embargo, aplicada al ojo, la naturaleza del tejido ocular y la insignificante penetración de la droga, le permiten un efecto antiviral local sin estar sujeta a la degradación rápida que ocurre después de su administración parenteral. <sup>(44)</sup>

## APLICACIONES TERAPEUTICAS

En infecciones por el virus del herpes simplex, no teniendo ninguna acción en otros tipos de infecciones ya sean bacterianas o virales. <sup>(44)</sup>

## CONTRAINDICACIONES

Hipersensibilidad a los componentes de la fórmula. <sup>(44)</sup>

## PRECAUCIONES O RESTRICCIONES DE USO DURANTE EL EMBARAZO Y LA LACTANCIA

La idoxuridina en su uso sistémico es capaz de atravesar la barrera placentaria y ha mostrado efectos teratogénicos en animales de laboratorio. En mujeres embarazadas no se han hecho estudios bien controlados.

Aunque su absorción con el uso tópico es limitada, deberá utilizarse solamente si es absolutamente necesaria.

No se sabe si la droga se excreta en la leche materna, por lo que no deberá utilizarse durante la lactancia. <sup>(44)</sup>

## EFFECTOS ADVERSOS

Ocasionalmente edema o inflamación de la conjuntiva y los párpados con prurito, ardor, opacificación corneal y defectos punteados del epitelio corneal. Con el uso prolongado pueden ocurrir conjuntivitis folicular, cicatrización conjuntival y oclusión de puntos lagrimales.

## INTERFERONES

Los interferones son citocinas (gluproteínas) producidas por células animales y humanas infectadas con virus o estimuladas por sustancias naturales o sintéticas. Se han clonado utilizando tecnología de DNA recombinante. <sup>(44)</sup>

Hay tres tipos:

- Alfa producidos por leucocitos B, Monocitos y Macrófagos.
- Beta producidos por fibroblastos.
- Gamma se producen en fases posteriores de la infección y es sintetizado por las células T activadas (antígenos o mitógenos). <sup>(44)</sup>

Los interferones producen su efecto antiviral uniéndose a receptores de superficie específicos e inhibiendo la penetración a la pérdida de la cubierta viral, la síntesis o la metilación del RNA mensajero, la traducción de las proteínas o el montaje y liberación viral. <sup>(44)</sup>

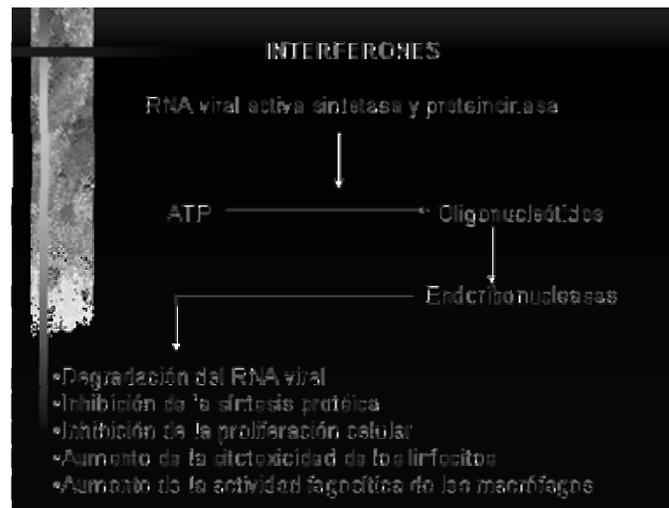


FIGURA 52: Cuadro de la actividad de los interferones.

### FARMACOCINÉTICA <sup>(44)</sup>

- Aplicación por vía intramuscular o subcutánea (Alfa).
- Su actividad persiste por cuatro días.
- Se eliminan por captación celular y catabolismo en riñón e hígado.

### APLICACIONES TERAPÉUTICAS <sup>(44)</sup>

- Condiloma acuminado.
- Hepatitis crónica B y C.
- Sarcoma de Kaposi.

- Esclerosis múltiple.

EFFECTOS ADVERSOS <sup>(44)</sup>

- Síndrome gripal.
- Trombocitopenia, granulocitopenia.
- Neurotoxicidad.
- Cardiotoxicidad.
- Difusión tiroidea.
- Formación de anticuerpos neutralizantes.
- Inhibición del citocromo P-450.

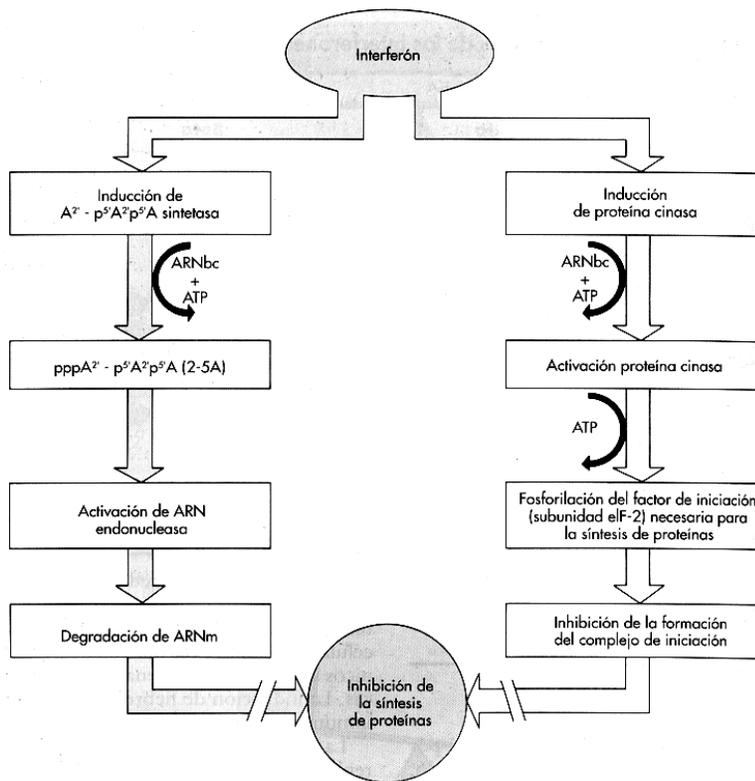


FIGURA 53: Las dos vías principales para la inhibición de proteínas víricas por el interferón. Un mecanismo implica la inducción de una polimerasa inusual (2-5A sintetasa), que es activada por el ARN bicatenario. La enzima activada sintetiza un trinucleótido de adenina inusual con un enlace 2'5' fosfodiéster. El trinucleótido activa una endonucleasa que degrada el ARNm. El otro mecanismo implica la inducción de una proteína cinasa que inactiva el factor de iniciación eIF-2 mediante fosforilación de una de las subunidades para evitar la iniciación de la síntesis de proteínas. <sup>(40)</sup>

# RIBAVIRINA

La ribavirina es un análogo del nucleósido purina que inhibe competitivamente las enzimas huésped con disminución de GTP y DNA e inhibición de RNA polimerasa viral. <sup>(44)</sup>

## APLICACIONES TERAPEUTICAS

Este fármaco tiene un amplio rango de acción incluyendo mixovirus, paramixovirus, arenavirus, bunyavirus, retrovirus, herpesvirus, adeovirus y poxvirus. Funciona como agente antiviral en el tratamiento de infecciones causadas por virus DNA y RNA. Para infecciones del tracto respiratorio inferior causadas por el virus sincicial respiratorio, infecciones causadas por el virus de influenza tipo A y B, herpes simple tipo 1 ó 2, herpes zoster y para el tratamiento de la hepatitis viral aguda A y crónicas B y C. <sup>(44)</sup>

## FARMACOCINETICA

- **Absorción:** La ribavirina se absorbe rápidamente al administrarse vía oral, presentándose el pico en la concentración plasmática durante las primeras 1 a 2 horas después de la administración. Las concentraciones plasmáticas encontradas al administrar diariamente 15 mg/kg divididos en tres dosis promediaron 0.775 µg/ml después de 2.5 horas con una variación de 0.425 a 1.325 µg/ml. <sup>(44)</sup>
- **Distribución:** Estudios en animales y humanos mostraron que la ribavirina y sus metabolitos se acumulan en los eritrocitos, al administrar una dosis única por vía oral de 3 mg/kg; el pico en la concentración de eritrocitos se presentó a los 4 días, sobrepasando en 100 veces las concentraciones plasmáticas detectadas simultáneamente y posteriormente disminuyó con una vida media de alrededor de 40 días (equivalente a la vida media de los eritrocitos). Al administrar una dosis oral del fármaco, la concentración en eritrocitos fue incrementando durante la primera y segunda horas a una velocidad similar a la concentración plasmática; posteriormente, la concentración en eritrocitos siguió incrementándose durante 4 días conforme la concentración plasmática disminuía. Aproximadamente, el 3% de la ribavirina se detecta en los eritrocitos 72 horas después de la administración oral. <sup>(44)</sup>
- **Eliminación:** La ribavirina es metabolizada posiblemente en el hígado a ribavirina desribosilada (la 1,2,4-triazol-3-carboxamida); se ha reportado que la actividad antiviral de este metabolito contra varios virus de ARN y ADN es similar a la actividad de la ribavirina. También se han encontrado metabolitos del ácido 1, 2, 4-triazol-3-carboxílico. Se presume que *in vivo* es necesaria la fosforilación para lograr la actividad antiviral del fármaco. <sup>(44)</sup>

La ribavirina se excreta principalmente en la orina. Adultos sanos con función renal normal excretan por orina aproximadamente 53% de una dosis oral única durante 72 a 80 horas, encontrando que en las primeras 24 horas excretan cerca del 33% de la dosis.

Alrededor de 15% de una dosis única se excreta en heces durante las 72 horas siguientes a la administración. <sup>(44)</sup>

## CONTRAINDICACIONES

La administración de este producto está contraindicada en pacientes con hipersensibilidad conocida al fármaco. <sup>(44)</sup>

## PRECAUCIONES O RESTRICCIONES DE USO DURANTE EL EMBARAZO Y LA LACTANCIA

El fármaco puede causar toxicidad fetal a mujeres embarazadas. No deberá administrarse el fármaco en mujeres embarazadas o con posibilidad de embarazarse, debido a que los riesgos del uso claramente sobrepasan los beneficios. Si se administra inadvertidamente durante el embarazo o la paciente se embaraza durante el tratamiento, la paciente deberá ser advertida del riesgo potencial para el feto.

No se sabe si la ribavirina se distribuye en la leche materna; sin embargo, debido al riesgo de efectos adversos en los lactantes no debe ser usada en mujeres en periodo de lactación.<sup>(44)</sup>

## EFFECTOS ADVERSOS

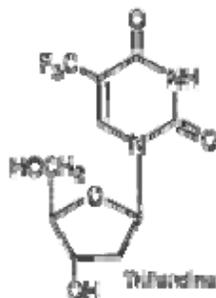
Se ha reportado anemia reversible al administrar dosis de ribavirina mayores a 1.2 g (alrededor de 15-17 mg/kg diariamente) por más de 10 días, por lo que se recomienda monitorear estrechamente a los pacientes cuyo tratamiento requiera una duración mayor a 1 ó 2 semanas. Dentro de sus efectos secundarios también se encuentran la irritación conjuntival y sibilancias, teratogénesis, mutagénesis.

La ribavirina se consigue en aerosol para el tratamiento de virus sincitial respiratorio e influenza. Por vía oral se utiliza para el tratamiento de hepatitis crónica C, asociado a interferón alfa-2b.<sup>(44)</sup>

## CRITERIOS PARA EL USO EN VRS:

- Enfermedad cardíaca congénita.
- Displasia broncopulmonar.
- Fibrosis quística.
- Inmunosuprimidos.
- Prematuros.
- Pacientes con ventilación mecánica.

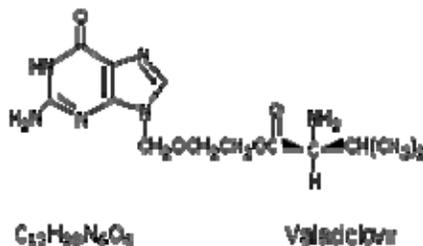
## TRIFLURIDINA



La trifluridina es un nucleósido pirimidínico fluorado en solución oftálmica, que se utiliza principalmente para la queratoconjuntivitis primaria y queratitis epitelial recurrentes por herpes simplex tipo I y II, además del CMV. También se utiliza en infecciones cutáneas por herpes resistente a aciclovir. <sup>(44)</sup>

El mecanismo de acción exacto se desconoce, pero se sabe que el compuesto inhibe las DNA polimerasas y el virus no puede incorporar la timidina dentro de su DNA viral. <sup>(44)</sup>

## VALACICLOVIR



El valanciclovir es el ester l-valina de aciclovir. Este fármaco es una prodrogra y no exhibe ninguna actividad antiviral hasta que se hidroliza en la pared intestinal o en el hígado formando aciclovir.

La ventaja de la estructura química de este medicamento frente al aciclovir es que tiene una absorción en el tracto gastrointestinal aumentada y por ende su biodisponibilidad por esta vía es mejor.

El valanciclovir por vía oral se utiliza para el tratamiento de herpes zoster en adultos inmunocompetentes. También se usa para los episodios iniciales y recurrentes de herpes genital, así como en la profilaxis de CMV en pacientes trasplantados. <sup>(44)</sup>

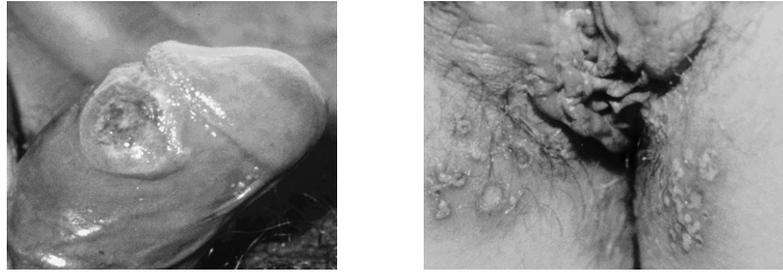
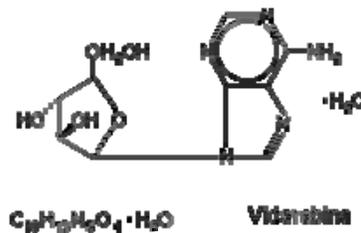


FIGURA 54: Herpes genital.

## VIDARABINA



Este fármaco es un análogo de adenosina que posee actividad contra el herpes simplex I y II, varicela zoster y hepadnavirus (como el VHB).

La viradabina se utiliza en encefalitis por herpes simplex e infecciones graves por herpes zoster. Se considera alternativo al aciclovir en encefalitis herpética, herpes neonatal y herpes zoster en inmunodeprimidos.<sup>(44)</sup>

## ZALCITABINA

Es un análogo (pirimídico) sintético de los nucleósidos y al igual que la Didanosina, su actividad es mayor en las células mononucleares sanguíneas que se encuentran en reposo.<sup>(44)</sup>

### FARMACOCINÉTICA

- a) Tiene buena absorción al administrarse por vía oral con una biodisponibilidad del 80%.
- b) La comida no interfiere con su absorción.
- c) La unión a proteínas séricas es mínima (4%).
- d) Su vida media plasmática es de 1 a 3 horas.

- e) Tiene baja concentración en líquido cefalorraquídeo: alcanza del 9 al 37% de la concentración sérica.
- f) No está claro el metabolismo de la droga.
- g) Es eliminada por vía renal en un 80%. Se recomienda ajustar la dosis en compromiso renal severo.

#### EFFECTOS ADVERSOS

- a) El principal efecto adverso es la neuropatía periférica; la neuropatía periférica es dosis dependiente y es reversible si se suspende el tratamiento; el riesgo de presentarla es mayor si hay neuropatía de base y con el uso concomitante de otras drogas neurotóxicas.<sup>(44)</sup>
- b) La pancreatitis ocurre con menor frecuencia que con la Didanosina.
- c) Ulceras orales severas: ocurren hasta en 3% de los pacientes.
- d) Otros: cefalea, náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal, rash y alteraciones en las pruebas de función hepática.
- e) Teratogenicidad: según los reportes del Antiretroviral Pregnancy Registry, la aparición de anomalías congénitas no aumenta al utilizar la terapia con Zalcitabina como monoterapia o en combinación durante el primer trimestre del embarazo.<sup>(44)</sup>

#### INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS

El uso concomitante de otras drogas neurotóxicas puede aumentar la posibilidad de desarrollar neuropatía periférica. La Didanosina y la Estovudina son también neurotóxicas.<sup>(44)</sup>

#### DOSIFICACIÓN

- a) La dosis recomendada para pacientes adultos es de 0.75 mg cada 8 horas.
- b) La dosis recomendada para pacientes pediátricos es de 0.01 mg/Kg cada 8 horas.

## ZIDOVUDINA

Fue la primera droga aprobada para el tratamiento del VIH, en 1987. Es un análogo de la timidina y su actividad es mayor en las células en replicación.<sup>(44)</sup>

#### FARMACOCINÉTICA

- a) Tiene buena absorción al administrarse por vía oral con una biodisponibilidad del 65%.
- b) No debe administrarse con las comidas.

- c) Tiene baja unión a proteínas séricas 25%.
- d) Su vida media plasmática es 1 a 1.5 horas.
- e) Su vida media intracelular es de 3 a 4 horas.
- f) Su vida media permite la dosificación cada 8 a 12 horas.
- g) Tiene buena penetración a líquido cefalorraquídeo, alcanza el 53% de la concentración sérica.
- h) Es metabolizada en el hígado. Un 14% de la droga no se metaboliza.
- i) Es eliminada por vía renal. Se recomienda ajustar la dosis e compromiso renal severo.<sup>(44)</sup>

## EFFECTOS ADVERSOS

- a) El principal efecto adverso es la supresión de la médula ósea lo cual lleva a anemia y/o neutropenia. Es reversible si se suspende el tratamiento.
- b) Miositis y miopatía asociadas con el uso prolongado de la droga. Es reversible si se suspende el tratamiento.
- c) Otros: cefalea, vómito, malestar general, fatiga, insomnio e hiperpigmentación de piel y uñas.
- d) Teratogenicidad: según los reportes del Antiretroviral Pregnancy Registry, la aparición de anomalías congénitas o en combinación durante el primer trimestre del embarazo.<sup>(44)</sup>

## INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS

- a) La rivabirina inhibe la fosforilación intracelular de la Zidovudina, lo que disminuye su actividad antirretroviral.
- b) El uso concomitante de agentes mielosupresores o citotóxicos, puede potenciar la supresión sobre la médula ósea.<sup>(44)</sup>

## DOSIFICACIÓN

- a) La dosis recomendada de Zidovudina en adultos es de 600 mg/día, en esquema de 200 mg cada 8 horas o 300 mg cada 12 horas.
- b) La dosis recomendada para pacientes pediátricos entre 3 meses y 12 años es de 180 mg/m<sup>2</sup> cada 6 horas.
- c) En pacientes con enfermedad renal terminal se recomienda utilizar 100 mg cada 6 a 8 horas.
- d) Existe la combinación de Zidovudina (300 mg) y Lamivudina (150 mg); se recomienda una tableta diaria.<sup>(44)</sup>

## INHIBIDORES DE LA PROTEASA

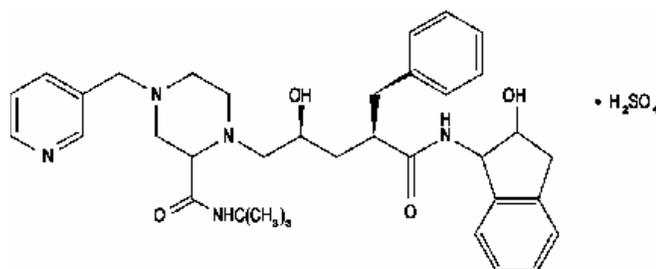
Los inhibidores de la proteasa (IP) actúan inhibiendo la proteasa (producto del gen gag-pol) del VIH-1. La proteasa del VIH-1 es una enzima compleja, que cliva los productos polipeptídicos del gen pol y gag-pol del genoma viral. Este proceso ocurre al final del ciclo de replicación del VIH y es indispensable para que los viriones en formación sean maduros. Al inhibirse esta enzima, se liberan partículas virales estructuralmente desorganizadas y no infecciosas. Los IP tienen acción sobre células aguda y crónicamente infectadas. Son antirretrovirales potentes y muestran beneficios inmunológicos y clínicos en los pacientes VIH positivos. En el momento hay cinco IP aprobados por la Food and Drugs Administration (FDA): Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Amprenavir y Nelfinavir<sup>(44)</sup>.

Los IP son metabolizados por el sistema citocromo P-450 y son inhibidores del mismo. Esto hace que posean una amplia interacción farmacológica con drogas que interactúan con este sistema citocrómico.<sup>(44)</sup>

Con el uso de los IP, ha aparecido reportes de efectos adversos (metabólicos) importantes como la hiperglicemia e incluso la Diabetes Mellitus, aunque no se ha esclarecido su mecanismo.<sup>(44)</sup>

El mecanismo de resistencia viral hacia los IP es complejo y no completamente entendido. Al parecer se da por mutaciones en los genes que codifican para la proteasa. En general, se necesitan múltiples mutaciones para el desarrollo de una alta resistencia viral. Se ha identificado resistencia cruzada entre los diferentes IP, mas no entre los inhibidores de la transcriptasa reversa y los IP.<sup>(44)</sup>

### INDINAVIR



#### APLICACIONES TERAPEUTICAS

Es un inhibidor específico de la proteasa, activo contra el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1). Está indicado para el tratamiento de adultos con infección por el HIV-1. Los estudios clínicos demuestran:

- Disminución del riesgo de progresión a una de las enfermedades definidoras del SIDA o a la muerte.
- Aumento de la supervivencia general.
- Disminución duradera del ARN viral en el suero.

- Aumento duradero de la cuenta de células CD4. <sup>(44)</sup>

## FARMACOCINÉTICA

- a. Se absorbe bien al administrarse por vía oral.
- b. Se absorbe mejor con estómago vacío. Una comida liviana no disminuye su absorción, pero una rica en grasas sí.
- c. Tiene moderada unión a proteínas séricas (60%).
- d. La vida media de eliminación es 1.8 horas.
- e. Es metabolizada en el hígado por la citocromo P-450. Hasta un 20% de la droga es eliminada sin ser metabolizada.
- f. Es eliminada principalmente por vía renal. <sup>(44)</sup>

## EFFECTOS ADVERSOS

- a. Los principales efectos adversos son gastrointestinales: náuseas, vómito, dispepsia, dolor abdominal y diarrea.
- b. El 9% de los pacientes desarrollan nefrolitiasis por lo que deben tomar mínimo 1.5 litros de agua al día.
- c. Otros más raros: Hiperbilirrubinemia, elevación de las transaminasas hepáticas, anemia, leucopenia, trombocitopenia.
- d. Teratogenicidad: No se ha observado en estudios con animales. Hace falta estudios en mujeres embarazadas. <sup>(44)</sup>

## INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS

- a. Las drogas que inducen o inhiben la actividad del citocromo P-450, pueden alterar los niveles plasmáticos del Indinavir.
- b. No se deben utilizar otras drogas que sean metabolizadas por el sistema citocrómico, dentro de las cuales tenemos antihistamínicos, hipnóticos (benzodicepinas), antiarrítmicos, calcio-antagonistas, alcaloides del ergot, Cisaprida y anfetaminas, por el riesgo de intoxicación ya que el Indinavir inhibe el citocromo.
- c. No se debe coadministrar con Rifampicina ya que ésta produce inducción enzimática y por lo tanto disminuye los niveles de Indinavir.
- d. Cuando se administran Nevirapina e Indinavir concomitantemente, se debe ajustar la dosis de Indinavir a 1000 mg cada 8 horas por el efecto sobre la inducción enzimática.

- e. Cuando se administra Efavirenz e Indinavir concomitantemente, se debe ajustar la dosis de Indinavir a 1000 mg cada 8 horas por el efecto sobre la inducción enzimática.
- f. Cuando se administran Ketoconazol e Indinavir concomitantemente, se debe ajustar la dosis de Indinavir a 600 mg cada 8 horas por el efecto sobre la inhibición enzimática.
- g. Cuando se administre Indinavir y Didanosina debe dejarse un espacio de por lo menos 1 hora en la administración, ya que esta última tiene un buffer que disminuye la absorción del Indinavir. <sup>(44)</sup>

## DOSIFICACIÓN

La dosis recomendada de Indinavir en adultos es de 800 mg cada 8 horas. <sup>(44)</sup>

## RITONAVIR

Solo o combinado con análogos de nucleósidos para el tratamiento de pacientes con infección por VIH, cuando el tratamiento proporciona evidencias clínicas, inmunológicas o ambas de progresión de la enfermedad. <sup>(44)</sup>

## FARMACOCINÉTICA

- a. Se absorbe bien al administrarse por vía oral, alcanzando una biodisponibilidad del 75%.
- b. Se absorbe mejor con las comidas.
- c. Tiene alta unión a proteínas séricas (99%).
- d. La vida media plasmática es de 3 a 5 horas.
- e. Es metabolizada en el hígado por la citocromo P-450. Tiene un metabolito con actividad antiviral similar al Ritonavir. Un 5% de la droga es excretada por la orina sin ser metabolizada.
- f. De los IP es el más potente inhibidor del citocromo P-450.
- g. Es eliminada principalmente por heces (80%). <sup>(44)</sup>

## EFFECTOS ADVERSOS

- a. El Ritonavir es el peor tolerado de los IP. Por esto se recomienda la dosificación escalonada de la droga.
- b. Los principales efectos adversos son gastrointestinales: náuseas, vómito, dolor abdominal y diarrea. Se ha reportado alteraciones del gusto hasta en el 15% de los pacientes.

- c. Otros más raros: Elevación de las enzimas hepáticas, triglicéridos, ácido úrico, y creatín-fosfoquinasa.
- d. Teratogenicidad: No se ha observado en estudios con animales. Hace falta estudios en mujeres embarazadas. <sup>(44)</sup>

## INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS

- a. Las drogas que inducen o inhiben la actividad del citocromo P-450, pueden alterar los niveles plasmáticos del Indinavir.
- b. No se deben utilizar otras drogas que sean metabolizadas por el sistema citocrómico, dentro de las cuales tenemos antihistamínicos, hipnóticos (benzodiazepinas), antiarrítmicos, calcio antagonistas, alcaloides del ergot, Cisaprida, Rifampicina, Amiodarona, Propafenona, Quinidina, Bupropión y anfetaminas, por el riesgo de intoxicación ya que el Indinavir inhibe el citocromo.
- c. Como el Ritonavir es el más potente inhibidor del citocromo P-450 de los IP, éste ha sido utilizado para combinar esta droga con otros IP ya que al haber inhibición citocrómica, las concentraciones del otro IP se aumenten y se pueden utilizar dosis más bajas. La combinación más utilizada es la de Ritonavir con Saquinavir. <sup>(44)</sup>

## DOSIFICACIÓN

La dosis recomendada de Ritonavir en adultos es de 600 mg cada 12 horas. <sup>(44)</sup>

## SAQUINAVIR

El Saquinavir fue el primer IP en ser aprobado por la FDA en 1995. Existe en una forma de cápsula de gel blanda (Fortovase) y una dura (Invirase). <sup>(44)</sup>

La proteasa del VIH es la enzima encargada de escindir las proteínas precursoras del virus en las células infectadas, lo cual constituye un paso esencial para la creación de nuevas partículas víricas íntegras e infecciosas. Dichas proteínas precursoras contienen un lugar específico de escisión reconocido únicamente por las proteasas del VIH y otros virus afines. El saquinavir es una sustancia de estructura pseudopeptídica muy similar a la de los puntos de escisión sobre los que actúan estas proteasas víricas. Como resultado de ello, el saquinavir se fija íntimamente a los lugares activos de la proteasa del VIH-1 y el VIH-2, y se comporta *in vitro* como un inhibidor reversible y selectivo, con un grado de afinidad por las proteínas humanas unas 50,000 veces menor. <sup>(44)</sup>

## FARMACOCINÉTICA

- a. El Fortovase tiene pobre absorción por vía oral con una biodisponibilidad del 12%.
- b. El Invirase tiene pobre absorción por vía oral con una biodisponibilidad del 4%.

- c. La comida aumenta su absorción. Por lo tanto se debe dar con la comida o hasta 2 horas después de la misma.
- d. Tiene alta unión a proteínas séricas (98%).
- e. Tiene mínima penetración al líquido cefalorraquídeo.
- f. Es metabolizada en el hígado por la citocromo P-450 a metabolitos inactivos.
- g. Es eliminada principalmente por vía renal. <sup>(44)</sup>

#### EFFECTOS ADVERSOS

- a. Los principales efectos adversos son gastrointestinales: náuseas, vómito, dispepsia, dolor abdominal y diarrea.
- b. Otros más raros: Cefalea, fatiga, elevación de las transaminasas hepáticas, anemia, neutropenia, trombocitopenia, hipocalcemia, hipofosfatemia, hipocalcemia e hipernatremia.
- c. Teratogenicidad: No se ha observado en estudios con animales. Hace falta estudios en mujeres embarazadas. <sup>(44)</sup>

#### INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS

- a. Las drogas que inducen o inhiben la actividad del citocromo P-450, pueden alterar los niveles plasmáticos del Saquinavir.
- b. Al administrar drogas como el Ketoconazol u otros IP se inhibe al citocromo P-450 y se aumentan los niveles de Saquinavir.
- c. No se deben utilizar otras drogas que sean metabolizadas por el sistema citocrómico, dentro de las cuales tenemos antihistamínicos, hipnóticos (benzodiazepinas), antiarrítmicos, calcio-antagonistas, alcaloides del ergot, cisaprida y anfetaminas, por el riesgo de intoxicación ya que el Saquinavir inhibe el citocromo. <sup>(44)</sup>

#### DOSIFICACIÓN

La dosis recomendada de Saquinavir (Fortovase) en adultos es de 1,200 mg cada 8 horas con las comidas. <sup>(44)</sup>

## 4.5 EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL DE LAS INFECCIONES VIRALES

### DEFINICIÓN

La Epidemiología estudia cómo las enfermedades se distribuyen en las poblaciones, y los factores que influyen o determinan esa distribución. Una definición más amplia de la Epidemiología ha sido globalmente aceptada y la describe como:

***El estudio de la distribución y los determinantes de los estados o eventos relacionados con la salud en poblaciones específicas, y la aplicación de este estudio para controlar los problemas que afectan la salud.*** <sup>(37)</sup>

Lo que es notable en esta definición es que incorpora tanto una descripción del contenido de la disciplina como el propósito o aplicación para los cuales los estudios epidemiológicos son llevados a cabo. <sup>(37)</sup>

### OBJETIVOS DE LA EPIDEMIOLOGÍA

1. Identificar la etiología o la causa de una enfermedad y los factores de riesgo, es decir, situaciones que incrementan la posibilidad de una persona de padecer una determinada enfermedad. <sup>(37)</sup>
2. Determinar la extensión de una enfermedad encontrada en la comunidad, es decir, la carga que tiene la misma en la población. Para este propósito se vale del uso y establecimiento de tasas y proporciones, que cuantifican la morbilidad y la mortalidad que produce una enfermedad en las personas en un lugar y tiempo determinados. Esto es crítico para planear servicios e instalaciones de salud, y para entrenar a futuros proveedores del cuidado de la misma. <sup>(37)</sup>
3. Estudiar la historia natural y el pronóstico de la enfermedad. <sup>(37)</sup>
4. Evaluar nuevas medidas preventivas y terapéuticas, y nuevos modos de brindar cuidados de la salud. <sup>(37)</sup>
5. Proveer los fundamentos para desarrollar políticas públicas y decisiones regulatorias para los problemas medioambientales. <sup>(37)</sup>

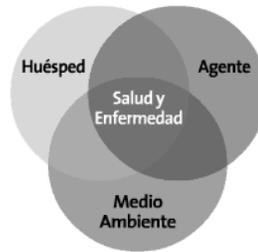


FIGURA 55. La infección de una población es similar a la de un individuo, en el sentido de que el virus debe diseminarse a través de la población y es controlado por la inmunización. Para sobrevivir, los virus tienen que seguir infectando a nuevos hospederos susceptibles, inmunológicamente vírgenes.<sup>(37)</sup>

### MANTENIMIENTO DE UN VIRUS EN LA POBLACIÓN

La persistencia de un virus en una comunidad depende de la disponibilidad de un número crítico de individuos susceptibles, inmunológicamente vírgenes (seronegativos). La eficacia de la vía de transmisión determina el tamaño de la población susceptible necesaria para el mantenimiento del virus. La inmunización, natural u obtenida mediante vacunación, constituye el mejor medio para reducir el número de individuos susceptibles.<sup>(37)</sup>

### TRANSMISIÓN DE LOS VIRUS

La vía de transmisión depende de la fuente del virus y la capacidad de éste para soportar los peligros y barreras del medio ambiente y el cuerpo durante su progresión hasta el tejido diana. La presencia o ausencia de envoltura vírica representa el principal determinante estructural para el modo de transmisión del virus.<sup>(37)</sup>

<b>Virus Desnudo</b>	
<b>Factor</b>	<b>Resistencia</b>
Sequedad	++++
Detergentes	++++
pH Extremo	++++
Temperaturas Extremas	++++
Acidez Estomacal	++++
Detergente Biliar	++++
Desinfección Suave	++++
Procedimientos de Agua Residuales Insuficientes	++++

TABLA 23. Factores que afectan la transmisión de los virus desnudos. Estos virus son transmitidos en general por vía respiratoria o feco-oral, y muchas veces se contagian a través de objetos contaminados (fomites).<sup>(37)</sup>

Virus Envuelto	
Fragilidad	++++
Capacidad Infecciosa	<i>Depende de una envoltura intacta</i>
Humedad	++++
Diseminación	<i>Gotitas respiratorias</i>
	<i>Sangre</i>
	<i>Inyecciones</i>
	<i>Órganos trasplantados</i>
	<i>Moco</i>
	<i>Saliva</i>
	<i>Semen</i>
Lábil a los Ácidos y Detergentes	++++ <i>(Impiden su transmisión feco-oral)</i>

TABLA 24. Factores que afectan la transmisión de los virus envueltos.

Los animales pueden actuar como vectores para la diseminación de enfermedades víricas a otros animales y a los humanos, e incluso a otras localidades. También pueden servir de reservorios donde los virus persisten y se multiplican dentro del medio ambiente. Los artrópodos, como mosquitos, garrapatas y otros, pueden actuar como vectores de togavirus, flavivirus, bunyavirus y reovirus. Tales virus se conocen muchas veces como arbovirus. La mayoría de los arbovirus tienen una gama de hospederos muy amplia, que puede incluir insectos, aves, reptiles y mamíferos, además de los humanos. Los mapaches, zorros, perros y gatos son vectores del virus de la rabia.<sup>(37)</sup>

Entre los demás factores que pueden favorecer la transmisión de los virus se incluyen:

- Capacidad de causar infección asintomática.
- Hacinamiento.
- Ocupación.

- Estilo de vida.
- Asistencia a guarderías.
- Viajes.

Muchos virus son liberados antes de que el paciente presente síntomas, por lo que resulta difícil controlar su transmisión. Las infecciones productivas persistentes representan una fuente continua de virus, que puede conducir a enfermedad en individuos inmunológicamente vírgenes. Los virus con muchos serotipos diferentes y los capaces de cambiar sus determinantes antigénicos encuentran con facilidad poblaciones vírgenes desde el punto de vista inmunológico.<sup>(37)</sup>

## FACTORES GEOGRÁFICOS Y ESTACIONALES

La distribución geográfica de un virus suele estar determinada por la presencia de cofactores, vectores o una población susceptible. Muchos arbovirus se limitan al nicho ecológico de los artrópodos vectores. Los transportes a nivel mundial están eliminando muchas restricciones geográficas para la distribución de los virus.<sup>(37)</sup>

Las diferencias estacionales en la incidencia de las enfermedades víricas también influyen en la diseminación de los virus. Los virus respiratorios son más prevalentes en invierno, debido al hacinamiento y las condiciones de temperatura y humedad que facilitan la transmisión o permiten su supervivencia en el medio ambiente. Los virus entéricos son más frecuentes durante el verano, posiblemente debido a una higiene menos efectiva. Las diferencias estacionales en las enfermedades arbovíricas reflejan el ciclo vital del artrópodo vector o de su reservorio.<sup>(37)</sup>

***Brotos epidémicos*** → De una infección vírica se deben muchas veces a la introducción del virus en una localidad nueva. El brote es iniciado por una fuente común y es frecuente que la identificación de la fuente permita parar el brote.<sup>(37)</sup>

***Epidemias*** → Las epidemias ocurren en áreas geográficas más grandes y generalmente se deben a la introducción de una cepa nueva del virus en una población susceptibles.<sup>(37)</sup>

***Pandemias*** → Son epidemias a nivel mundial y suelen deberse a la introducción de un virus nuevo. Las pandemias de gripe A se producen aproximadamente cada 10 años, causadas por la introducción de cepas nuevas del virus.<sup>(37)</sup>

## CONTROL DE LA DISEMINACIÓN DE LOS VIRUS

La diseminación de un virus se puede controlar mediante:

- Cuarentena.
- Buena higiene.
- Cambio del estilo de vida.

- Eliminación del vector.
- Factores culturales (Educación y campañas masivas de información).
- Inmunización de la población (Campañas de Vacunación).

Hace años la cuarentena era el único medio para limitar las epidemias víricas, y resulta más efectiva para los virus que siempre producen síntomas. El procedimiento se usa en los hospitales para limitar la diseminación nosocomial de virus, sobre todo entre los pacientes de alto riesgo. La higiene correcta de los objetos contaminados y la desinfección del suministro de agua pueden limitar la diseminación de virus entéricos. Los cambios del estilo de vida han influido en la transmisión del virus relacionada con la actividad sexual, por ejemplo, de VIH, VHB y VHS. La eliminación del artrópodo o de su nicho ecológico se ha mostrado eficaz para controlar los arbovirus. <sup>(37)</sup>

Uno de los mejores modos de limitar la diseminación de los virus consiste en inmunizar a la población. La infección natural o la vacunación protegen al individuo y reducen el tamaño de la población susceptible, necesaria para que continúe la diseminación vírica. <sup>(37)</sup>

***Una cadena de transmisión está compuesta por los siguientes eslabones:*** <sup>(37)</sup>

**Primer eslabón: AGENTE** es el elemento potencialmente capaz de producir enfermedad, pudiendo ser de origen bacteriano, viral, parasitario o micótico (entre los de naturaleza infeccioso). <sup>(37)</sup>

**Segundo eslabón: FUENTE DE INFECCION (FI)** es el lugar donde se encuentra el agente causal de enfermedad. Pueden ser animales enfermos, convalecientes, portadores sanos, reservorios, etc. que eliminan el agente causal de la enfermedad y/o la mantienen. Puede ser el agua, como elemento inanimado, capaz de vehiculizar elementos biológicos y no biológicos. <sup>(37)</sup>

**Tercer eslabón: VIA DE TRANSMISION (VT)** es la forma de difusión del agente al hospedero susceptible. <sup>(37)</sup>

**Cuarto eslabón: VIA DE ELIMINACION (VE)** del agente. <sup>(37)</sup>

**Quinto eslabón: VIA DE PENETRACION (VP)** también llamada puerta de entrada, que utiliza el agente para invadir al hospedero. <sup>(37)</sup>

**Sexto eslabón: HOSPEDERO SUSCEPTIBLE (HS)** que es el animal propenso a contraer enfermedad. <sup>(37)</sup>

El conocimiento de esta secuencia de eventos nos permite reconocer no solo la historia natural de la enfermedad sino también cuál es el eslabón más débil de la cadena. De acuerdo a la vía de transmisión, las enfermedades pueden ser clasificadas en enfermedades de transmisión directa o indirecta. Cuando tengamos que actuar para prevenir, controlar o eliminar una enfermedad debemos elaborar un plan sanitario con posibilidades de éxito. <sup>(37)</sup>

## 4.6 GLOSARIO UP IV

<b>A</b>	
ε <b>Antropozoonosis</b>	Enfermedades transmisibles del animal al hombre.
ε <b>Anfixenosis</b>	Enfermedades transmisibles en ambas direcciones.
ε <b>Agente causal</b>	Elemento, sustancia, fuerza animada o inanimada cuya presencia o ausencia sirve de estímulo para desencadenar una enfermedad.
ε <b>Agente etiológico</b>	Agente causal de una enfermedad.
ε <b>Agente patógeno</b>	Equivalente a un agente etiológico.
ε <b>Anademia</b>	Enfermedad contagiosa o no, epidémica o endémica en la que todos los casos tienen un único origen (foco común).
ε <b>Anticuerpo</b>	Proteína producida por los vertebrados tras la exposición a un antígeno.
ε <b>Antigenicidad</b>	Equivalente a inmunogenicidad.
ε <b>Antígeno</b>	Proteína extraña que provoca una respuesta inmune específica.
<b>B</b>	
ε <b>Bacteriemia</b>	Presencia de bacterias en sangre.
ε <b>Brote</b>	Ocurrencia de una enfermedad que afecta a uno o más animales.
<b>C</b>	
ε <b>Caso</b>	Individuo que cumple las condiciones de una situación definida.
ε <b>Ciclozoonosis</b>	Zoonosis que requiere para su supervivencia más de una especie de vertebrados.
ε <b>Comensal</b>	Microorganismo localizado en la superficie de un organismo animal o en su interior y que generalmente no produce enfermedad.
ε <b>Contagiosidad</b>	Característica de una enfermedad o de su agente etiológico consistente en transmitirse fácilmente de forma directa (por contacto entre animales) o indirecta (mediante vehículos del tipo vectores o fómites).
<b>D</b>	
ε <b>Determinante</b>	Factor que cuando se modifica produce una alteración en la salud de una población.
<b>E</b>	
ε <b>Endémica</b>	Enfermedad que se presenta con una frecuencia constante en una población animal siendo además predecible ese nivel de presentación.
ε <b>Endógena</b>	Característica innata de un ser vivo.
ε <b>Enfermedad</b>	Proceso en el que se produce una alteración de las funciones corporales del animal. Puede acompañarse de síntomas y lesiones o no.
ε <b>Epidemia</b>	Aumento repentino e impredecible del número de casos de enfermedad en una población claramente excesivo con respecto a lo que cabría esperar.
ε <b>Epidemiología</b>	Ciencia que estudia la enfermedad en el seno de una población, su frecuencia, evolución y distribución, así como los factores que determinan su aparición. Se aplica en el control de los problemas sanitarios y en la mejora de la productividad animal.
<b>F</b>	
ε <b>Foco</b>	Aparición de casos de enfermedad en un "lugar"
ε <b>Fomite</b>	Vehículo inanimado.
ε <b>Fracción inmunogénica</b>	Elemento de acción de la defensa inmune creada por el hospedador. Indica si actúa frente al agente, frente a toxinas del mismo...

<b>H</b>	
ε <b>Hiperendémica</b>	Enfermedad endémica que afecta a una importante parte de la población.
ε <b>Holoendémica</b>	Enfermedad endémica cuya prevalencia se mantiene constante a través de un país región o área.
ε <b>Hospedero</b>	Ser vivo que alberga y mantiene en condiciones naturales a un agente patógeno.
<b>I</b>	
ε <b>Infección</b>	Entrada y desarrollo o multiplicación de un agente en el organismo animal. Puede producir o no enfermedad.
ε <b>Inmunosupresión</b>	Reducción o anulación de la capacidad de respuesta del sistema inmune.
<b>M</b>	
ε <b>Metazoonosis</b>	Zoonosis que requiere para su supervivencia un hospedador vertebrado y otro invertebrado.
<b>P</b>	
ε <b>Pandemia</b>	Epidemia que afecta a una gran parte de la población y que posee una amplia difusión espacial.
ε <b>Patogenicidad</b>	Capacidad de un agente infeccioso para producir enfermedad o grado con que un agente debilita a su hospedador.
ε <b>Periodo de incubación</b>	Periodo que abarca desde que el animal sufre la infección hasta que aparecen los primeros síntomas.
ε <b>Periodo de latencia</b>	Periodo que abarca desde que se produce la infección en un animal hasta que se alcanza la diseminación de esa infección en todo el organismo del animal. Es más corto que el periodo de incubación y suele ser semejante al periodo de prepatencia.
ε <b>Periodo de prepatencia</b>	Periodo que abarca desde que el animal sufre la infección hasta que pasa a ser infectante, bien por que se ha multiplicado o bien por que ha sufrido un paso más en su desarrollo evolutivo.
ε <b>Portador</b>	Ser vivo que alberga un agente patógeno en su organismo en ausencia de enfermedad clínica y que puede actuar de fuente de infección en un momento dado.
<b>S</b>	
ε <b>Saprozoonosis</b>	Zoonosis que requiere para su supervivencia un medio no vivo, generalmente el suelo o el agua.
ε <b>Serología</b>	Estudio de las reacciones antígeno- anticuerpo.
ε <b>Seropositivo</b>	Ser vivo cuyo nivel o título de anticuerpos sugiere que ha existido una infección en el pasado.
ε <b>Seroprevalencia</b>	Proporción de una población que ha resultado seropositiva a una infección.
<b>T</b>	
ε <b>Transmisión</b>	Todo mecanismo por el que un agente se distribuye en una población animal, pasando de un individuo a otro.
ε <b>Transmisión horizontal</b>	De un individuo de la población a otro contiguo.
ε <b>Transmisión indirecta</b>	Transmisión de un agente causante de enfermedad mediante un ciclo indirecto.
ε <b>Transmisión vertical</b>	De un individuo de la población a su descendencia.
<b>U</b>	
ε <b>Umbral epidemiológico</b>	Incidencia a partir de la cual puede considerarse que un proceso epidémico está en curso.

<b>V</b>	
ε <b>Vacuna</b>	Producto que tiende a inducir de forma artificial una respuesta inmune frente a un agente patógeno infectante.
ε <b>Variabilidad de un agente</b>	Capacidad mutante de un agente ante ciertas condiciones cambiantes del ambiente o del hospedador.
ε <b>Vector</b>	Vehículo animado (generalmente se considera como tales a los artrópodos).
ε <b>Vehículo</b>	Objeto, animado o inanimado que actuando como intermediario facilita la transmisión de una agente entre seres vivos al poner en contacto a ambos.
ε <b>Vigilancia activa</b>	Vigilancia epidemiológica en que la información es recogida de forma dinámica y regular sobre los participantes en el programa de vigilancia.
ε <b>Vigilancia de agregados</b>	Vigilancia epidemiológica en que la información es recogida de forma dinámica y regular sobre los participantes en el programa de vigilancia.
ε <b>Vigilancia de casos</b>	Vigilancia epidemiológica de una enfermedad basada en la recogida de datos en cada caso definido.
ε <b>Vigilancia centinela</b>	Vigilancia de un evento relacionado con la salud en una única muestra de la población (que constituye las unidades centinela) expuesta a a riesgo.
ε <b>Vigilancia epidemiológica</b>	Recogida sistemática de información, organización y análisis de la misma, así como la diseminación de esa información a aquellas entidades o individuos que deben conocerla para desarrollar estrategias de actuación.
ε <b>Vigilancia laboratorial</b>	Vigilancia epidemiológica es en la que el punto de partida es la identificación y aislamiento de un organismo particular en el laboratorio.
ε <b>Vigilancia pasiva</b>	Vigilancia epidemiológica en que la información no se recoge de forma dinámica en los participantes sino que se utilizan datos existentes previamente (historiales, etc.).
ε <b>Vigilancia rutinaria</b>	Recogida sistemática de datos específicos con el fin de seguir una enfermedad o evento relacionado con la salud.
ε <b>Vigilancia serológica (serovigilancia)</b>	Vigilancia de una enfermedad por medio de la medición de anticuerpos específicos frente a la misma en una población o muestra.
ε <b>Viremia</b>	Presencia de agentes vírico en sangre.
ε <b>Virulencia</b>	Potencia de un agente patógeno para producir la enfermedad en un hospedero.
<b>Z</b>	
ε <b>Zooantroponosis:</b>	Enfermedades transmisibles del hombre a los animales.
ε <b>Zoonosis</b>	Infección/enfermedad que en la naturaleza es compartida por el hombre y otros vertebrados de forma natural trasmitiéndose entre ellos. Existen diversos tipos, directa, ciclozoonosis, metazoonosis y saprozoonosis.
ε <b>Zoonosis directa</b>	Zoonosis que requiere para su supervivencia una única especie de hospedador.

## DISCUSIÓN

Este trabajo consta de 4 unidades programáticas, abarcando la historia, los conceptos básicos, la replicación, las diversas técnicas de diagnóstico, patogénesis y epidemiología. Cada uno de estos, se divide en diferentes subtemas que nos van llevando a un mejor entendimiento, es decir, se desglosa cada uno de los conceptos.

El texto comienza con una recopilación de los hechos mas sobresalientes a lo largo del tiempo (Unidad Programática 1), haciendo uso de imágenes. A continuación se enuncian los conceptos básicos de la virología, tales como virus, las partes que lo conforman y su función, los tipos de virus; una clasificación que conjuga todas las que actualmente se utilizan para su estudio, diferentes imágenes y fotografías de virus representativos, y algunos virus y las enfermedades que causan.

En la Unidad Programática 2 se toca el tema de la replicación viral en toda su extensión; se describen todos los procesos y mecanismos que se llevan a cabo para que un virus haga su "*función*", es decir, su ingreso a la célula, su multiplicación y su liberación para infectar a otras y causar la enfermedad, así como los factores que intervienen en estos. Al final de esta unidad se nombran a los virus que afectan a las bacterias, los bacteriófagos, explicando sus mecanismos de infección así como esquemas e imágenes.

Para poder combatir las enfermedades que causan los virus, es de vital importancia hacer un diagnóstico preciso, y para esto es necesario conocer perfectamente las técnicas y sus métodos; los fundamentos y materiales que se utilizan en el laboratorio clínico, desde lo mas sencillo y accesible hasta las técnicas mas avanzadas; todo esto se tocan a detalle en la Unidad Programática 3; se profundiza en cada una de las técnicas divididas en los diferentes tipos según su fundamento (cultivos celular, físicos, químicos, microscopía, inmunológicas, biología molecular, métodos cuantitativos y cualitativos). Al final de esta unidad se enuncia bajo que condiciones debe de funcionar un laboratorio dedicado al diagnóstico viral, así como el control de calidad que se lleva a cabo dentro del mismo.

La secuencia de la información nos lleva a la Unidad Programática 4, en la cual, ya con todo el conocimiento adquirido, se toca la manera como los virus afectan al organismo (hospedero) y sus diferentes etapas, es decir, desde su entrada hasta la salida; enunciando las vías, los periodos de incubación según el tipo de virus, como se distribuyen a través del hospedero afectándolo, además de los diferentes tipos de infecciones. Es muy interesante como el organismo reacciona ante la presencia de agentes extraños, esto se manifiesta a través del sistema inmune, se nombran los diferentes mecanismos que se activan y su proceso haciendo uso de imágenes para un mejor entendimiento.

En base a lo anterior, la forma de contrarrestar los efectos nocivos de los virus, es decir, las vacunas y los medicamentos que se utilizan para combatir las enfermedades

causadas, tienen un papel muy valioso dentro de este compendio, de esta manera se nombran los mas representativos divididos según su mecanismo de acción.

Estas enfermedades han golpeado a la humanidad en las formas mas catastróficas, por lo cual es necesario tener un control sobre las poblaciones, informándola y previniéndola en lo referente a su transmisión, factores que la favorecen, los hospederos mas susceptibles, así como la secuencia que recorre la enfermedad.

Es importante conocer una variedad de conceptos que se utilizan a través de todo el compendio, sobre todo en la ultima Unidad, es por eso que se crearon dos glosarios, uno para la Unidad Programática 1 y otro general al final del todo texto.

La información con respecto a la virología cambia y se actualiza de manera rápida, y en la actualidad la velocidad con que sucede no permite en algunas ocasiones obtenerla de primera mano o entenderla de la mejor manera, es por eso que este tipo de trabajos son de gran utilidad, mas no el único, es un buen principio para adentrarse y continuar una o varias líneas de investigación.

## CONCLUSIONES

Durante muchos años el hombre ha luchado por combatir enfermedades que lo han aquejado logrando tener éxito en muchas ocasiones y en otras tantas en espera de él. Entre tantas enfermedades que causan la muerte, las virales son las que, junto con el cáncer y la diabetes, están acabando con la vida humana en este planeta.

Un arma infalible contra esta situación es la información, la cual no siempre esta al alcance de toda la gente; debido a esto el equipo dedicado a la salud, en el cual estamos incluidos nosotros los QFB's, debe informarse día con día con el afán de entender mejor cada una de las enfermedades. Con el presente trabajo se realizó la recopilación y actualización de la información para comunicar la importancia del pequeño mundo que nos vigila, así como crear conciencia y fomentar el interés en todo lo relacionado con los virus, sobre todo en el diagnóstico y el tratamiento.

El principal objetivo que se pretende alcanzar es inducir a los alumnos de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, como profesionistas del área de la salud, a comprometerse con su función en la sociedad procurando su bienestar y seguridad. Y que mejor manera de hacerlo que con información actual y completa, la cual es difícil de obtener a primera mano, por lo que estamos seguros que este compendio será un buen comienzo para emprender una línea de investigación a través de las diferentes vertientes que ese pequeño mundo nos ofrece.

Además de los anterior, se habrá un panorama mas amplio en lo que se refiere al campo laboral para el QFB, dándole a conocer las diferentes áreas de desarrollo, dando pie a no cerrarse a una sola actividad profesional y al aprendizaje constante, del cual ningún profesionista esta exento.

## GLOSARIO

<b>A</b>	
ε <b>Agent causal</b>	Elemento, sustancia, fuerza animada o inanimada cuya presencia o ausencia sirve de estímulo para desencadenar una enfermedad.
ε <b>Agente etiológico</b>	Agente causal de una enfermedad.
ε <b>Agente patógeno</b>	Equivalente a un agente etiológico.
ε <b>Anademia</b>	Enfermedad contagiosa o no, epidémica o endémica en la que todos los casos tienen un único origen (foco común).
ε <b>Anfixenosis</b>	Enfermedades transmisibles en ambas direcciones.
ε <b>Anticuerpo</b>	Proteína producida por los vertebrados tras la exposición a un antígeno.
ε <b>Antigenicidad</b>	Equivalente a inmunogenicidad.
ε <b>Antígeno</b>	Proteína extraña que provoca una respuesta inmune específica.
ε <b>Antropozoonosis</b>	Enfermedades transmisibles del animal al hombre.
ε <b>ARNhn</b>	Ácido ribonucleico heteronuclear.
ε <b>ASF</b>	Factores de splicing alternativos
ε <b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>B</b>	
ε <b>Bacteriemia</b>	Presencia de bacterias en sangre.
ε <b>Brote</b>	Ocurrencia de una enfermedad que afecta a uno o más animales.
<b>C</b>	
ε <b>Caso</b>	Individuo que cumple las condiciones de una situación definida.
ε <b>CGRP</b>	Producto relacionado al gen de la calcitonina
ε <b>Ciclozoonosis</b>	Zoonosis que requiere para su supervivencia más de una especie de vertebrados.
ε <b>CMV</b>	Citomegalovirus.
ε <b>Comensal</b>	Microorganismo localizado en la superficie de un organismo animal o en su interior y que generalmente no produce enfermedad.
ε <b>Contagiosidad</b>	Característica de una enfermedad o de su agente etiológico consistente en transmitirse fácilmente de forma directa (por contacto entre animales) o indirecta (mediante vehículos del tipo vectores o fómites).
ε <b>CPA</b>	Célula presentadora de antígeno.
<b>D</b>	
ε <b>Determinante</b>	Factor que cuando se modifica produce una alteración en la salud de una población.
ε <b>DMS</b>	Dimetilsulfóxido.
<b>E</b>	
ε <b>Endémica</b>	Enfermedad que se presenta con una frecuencia constante en una población animal siendo además predecible ese nivel de presentación.

ε <b>Endógena</b>	Característica innata de un ser vivo.
ε <b>Enfermedad</b>	Proceso en el que se produce una alteración de las funciones corporales del animal. Puede acompañarse de síntomas y lesiones o no.
ε <b>Epidemia</b>	Aumento repentino e impredecible del número de casos de enfermedad en una población claramente excesivo con respecto a lo que cabría esperar.
ε <b>Epidemiología</b>	Ciencia que estudia la enfermedad en el seno de una población, su frecuencia, evolución y distribución, así como los factores que determinan su aparición. Se aplica en el control de los problemas sanitarios y en la mejora de la productividad animal.
ε <b>ETS</b>	Enfermedades de transmisión sexual.
ε <b>Exantema</b>	
ε <b>Exón</b>	Secuencia de ARNm que codifica un polipéptido
<b>F</b>	
ε <b>FISH</b>	Fluorescence <i>in situ</i> hybridation.
ε <b>Foco</b>	Aparición de casos de enfermedad en un "lugar"
ε <b>Fomite</b>	Vehículo inanimado.
ε <b>Fracción inmunogénica</b>	Elemento de acción de la defensa inmune creada por el hospedador. Indica si actúa frente al agente, frente a toxinas del mismo.
<b>H</b>	
ε <b>Hiperendémica</b>	Enfermedad endémica que afecta a una importante parte de la población.
ε <b>Holoendémica</b>	Enfermedad endémica cuya prevalencia se mantiene constante a través de un país región o área.
ε <b>Hospedero</b>	Ser vivo que alberga y mantiene en condiciones naturales a un agente patógeno.
ε <b>HPLC</b>	<i>High performance liquid chromatography</i> : cromatografía de líquidos de alto rendimiento
ε <b>HRPE</b>	Células del epitelio pigmentario de la retina humana
ε <b>HSMS</b>	Human smooth muscle cells
ε <b>HUVEC</b>	Células endoteliales del cordón umbilical humano
<b>I</b>	
ε <b>ICTV</b>	International committee on taxonomy of viruses
ε <b>IFD</b>	Inmunofluorescencia directa.
ε <b>IL</b>	Interleucina.
ε <b>Infección</b>	Entrada y desarrollo o multiplicación de un agente en el organismo animal. Puede producir o no enfermedad.
ε <b>Inmunosupresión</b>	Reducción o anulación de la capacidad de respuesta del sistema inmune.
ε <b>Intrón</b>	Secuencia de ARNm que no codifica a ningún polipéptido.
<b>K</b>	
ε <b>KSHV</b>	Herpesvirus humano 8.
<b>M</b>	
ε <b>Mab` s</b>	Sobrenadantes de anticuerpos monoclonales.
ε <b>Metazoonosis</b>	Zoonosis que requiere para su supervivencia un hospedador vertebrado y otro invertebrado.

<b>O</b>	
ε <b>OMS</b>	Organización mundial de la salud.
<b>P</b>	
ε <b>Pandemia</b>	Epidemia que afecta a una gran parte de la población y que posee una amplia difusión espacial.
ε <b>Patogenicidad</b>	Capacidad de un agente infeccioso para producir enfermedad o grado con que un agente debilita a su hospedador.
ε <b>PBS</b>	
ε <b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.
ε <b>PEES</b>	Panencefalitis esclerosante aguda
ε <b>Periodo de incubación</b>	Periodo que abarca desde que el animal sufre la infección hasta que aparecen los primeros síntomas.
ε <b>Periodo de latencia</b>	Periodo que abarca desde que se produce la infección en un animal hasta que se alcanza la diseminación de esa infección en todo el organismo del animal. Es más corto que el periodo de incubación y suele ser semejante al periodo de prepatencia.
ε <b>Periodo de prepatencia</b>	Periodo que abarca desde que el animal sufre la infección hasta que pasa a ser infectante, bien por que se ha multiplicado o bien por que ha sufrido un paso más en su desarrollo evolutivo.
ε <b>Portador</b>	Ser vivo que alberga un agente patógeno en su organismo en ausencia de enfermedad clínica y que puede actuar de fuente de infección en un momento dado.
<b>R</b>	
ε <b>RFLP</b>	Restriction fragments length polymorphysm.
ε <b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>S</b>	
ε <b>Saprozoonosis</b>	Zoonosis que requiere para su supervivencia un medio no vivo, generalmente el suelo o el agua.
ε <b>Sarcoma de Kaposi</b>	
ε <b>SARS</b>	Síndrome respiratorio agudo severo
ε <b>Senescencia</b>	
ε <b>Serología</b>	Estudio de las reacciones antígeno- anticuerpo.
ε <b>Seropositivo</b>	Ser vivo cuyo nivel o título de anticuerpos sugiere que ha existido una infección en el pasado.
ε <b>Seroprevalencia</b>	Proporción de una población que ha resultado seropositiva a una infección.
<b>T</b>	
ε <b>Transmisión</b>	Todo mecanismo por el que un agente se distribuye en una población animal, pasando de un individuo a otro.
ε <b>Transcripción</b>	
ε <b>Transfección</b>	
ε <b>Transmisión horizontal</b>	De un individuo de la población a otro contiguo.
ε <b>Transmisión indirecta</b>	Transmisión de un agente causante de enfermedad mediante un ciclo indirecto.
ε <b>Transmisión vertical</b>	De un individuo de la población a su descendencia.

<b>U</b>	
ε <b>UHA</b>	Unidad hemaglutinante
ε <b>Umbral epidemiológico</b>	Incidencia a partir de la cual puede considerarse que un proceso epidémico está en curso.
<b>V</b>	
ε <b>Vacuna</b>	Producto que tiende a inducir de forma artificial una respuesta inmune frente a un agente patógeno infectante.
ε <b>Variabilidad de un agente</b>	Capacidad mutante de un agente ante ciertas condiciones cambiantes del ambiente o del hospedador.
ε <b>VEB</b>	Virus Epstein – Barr
ε <b>Vector</b>	Vehículo animado (generalmente se considera como tales a los artrópodos).
ε <b>Vehículo</b>	Objeto, animado o inanimado que actuando como intermediario facilita la transmisión de una agente entre seres vivos al poner en contacto a ambos.
ε <b>VHB</b>	Virus de la hepatitis B
ε <b>VHC</b>	Virus de la hepatitis C
ε <b>VHE</b>	Virus de la hepatitis E
ε <b>Vigilancia activa</b>	Vigilancia epidemiológica en que la información es recogida de forma dinámica y regular sobre los participantes en el programa de vigilancia.
ε <b>Vigilancia de agregados</b>	Vigilancia epidemiológica en que la información es recogida de forma dinámica y regular sobre los participantes en el programa de vigilancia.
ε <b>Vigilancia de casos</b>	Vigilancia epidemiológica de una enfermedad basada en la recogida de datos en cada caso definido.
ε <b>Vigilancia centinela</b>	Vigilancia de un evento relacionado con la salud en una única muestra de la población (que constituye las unidades centinela) expuesta a a riesgo.
ε <b>Vigilancia epidemiológica</b>	Recogida sistemática de información, organización y análisis de la misma, así como la diseminación de esa información a aquellas entidades o individuos que deben conocerla para desarrollar estrategias de actuación.
ε <b>Vigilancia laboratorial</b>	Vigilancia epidemiológica es en la que el punto de partida es la identificación y aislamiento de un organismo particular en el laboratorio.
ε <b>Vigilancia pasiva</b>	Vigilancia epidemiológica en que la información no se recoge de forma dinámica en los participantes sino que se utilizan datos existentes previamente (historiales, etc.).
ε <b>Vigilancia rutinaria</b>	Recogida sistemática de datos específicos con el fin de seguir una enfermedad o evento relacionado con la salud.
ε <b>Vigilancia serológica (serovigilancia)</b>	Vigilancia de una enfermedad por medio de la medición de anticuerpos específicos frente a la misma en una población o muestra.
ε <b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana.
ε <b>Viremia</b>	Presencia de agentes vírico en sangre.
ε <b>Virulencia</b>	Potencia de un agente patógeno para producir la enfermedad en un hospedero.
ε <b>VLHT</b>	Virus de la leucemia humana de las células T
ε <b>VPH</b>	Virus del papiloma humano
ε <b>VRS</b>	Virus respiratorio sincinal

<b>Z</b>	
ε <b>Zooantroponosis:</b>	Enfermedades transmisibles del hombre a los animales.
ε <b>Zoonosis</b>	Infección/enfermedad que en la naturaleza es compartida por el hombre y otros vertebrados de forma natural trasmitiéndose entre ellos. Existen diversos tipos, directa, ciclozoonosis, metazoonosis y saprozoonosis.
ε <b>Zoonosis directa</b>	Zoonosis que requiere para su supervivencia una única especie de hospedador.

<b>APENDICE DE FIGURAS</b>		
<b>Pagina</b>	<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>
30	1	Estructuras de un virus con cápside desnuda (arriba, izquierda) y de otro con envoltura, dotados de una nucleocápside icosaédrica (izquierda) o de una ribonucleocápside helicoidal (derecha). La ribonucleocápside helicoidal está formada por proteínas víricas asociadas con un genoma RNA. <sup>(40)</sup>
31	2	Ensamblaje de la cápside icosaédrica de un picornavirus. Las proteínas individuales se asocian en subunidades que se asocian en protómeros, capsómeros y una procápside vacía. La inclusión del genoma RNA (+) desencadena su conversión en la cápside final. <sup>(40)</sup>
42	3	Clasificación de los virus <sup>(35)</sup>
44	4	Replicación general de un virus icosahédrico desnudo.
45	5	Curva de crecimiento en un solo ciclo de un virus liberado mediante lisis celular. Los diferentes estadios estan definidos por la presencia o ausencia de componentes víricos visibles (periodo de eclipse), virus infecciosos en el medio (periodo latente) o síntesis de macromoléculas ( fase precoz/ tardía). <sup>(40)</sup>
45	6	Curva de crecimiento y tamaño del estallido de virus representativos. <sup>(40)</sup>
47	7	Esquema del trímero de la glucoproteína hemaglutinina del virus influenza A, un ejemplo de proteína espicular. La región para unión al receptor celular está descubierta en la superficie de la proteína espicular. En condiciones de leve acidosis, la HA cambia de conformación para exponer una secuencia hidrofóbica en la "región de fusión".
47	8	Esquema del mecanismo de reconocimiento entre la nucleoporina Rip 1p y un Dominio Activador asociado a un cofactor celular.
48	9	Fase de entrada de un virus icosahédrico envuelto.
48	10	Esquema que muestra la Fase de entrada del Rabdovirus. <sup>(40)</sup>
49	11	Introducción por viropexis de una partícula viral a una célula.
50	12	La imagen de la izquierda muestra 4 partículas virales, de las cuales una es la que está ingresando a la célula. Lo normal es el ingreso de una sola partícula. La de derecha muestra la partícula viral que ha ingresado a la célula y se encuentra en el hoyo cubierto. La membrana de la célula se ha reparado, hecho normal en la biología celular. Una vez en el citoplasma, el virus generalmente ingresa a los endosomas, a los cuales se les unen los lisosomas, que producen la liberación del ácido nucleico del virus. <sup>(23)</sup>

50	13	Esquema de la penetración a una célula y desnudamiento del virus de influenza. Nótese que para que sea liberado el DNA viral es necesaria una acidificación del medio.
51	14	Esquema de la penetración a una célula y desnudamiento del Rabdovirus.
51	15	El virón del Rabdovirus debe contener una polimerasa y producir 5 ARNm individuales y una plantilla ARN (+) de longitud completa.
53	16	Esquema de una célula infectada por un virus que ha introducido su ADN viral.
53	17	Replicación del Rabdovirus. ④ Se traducen las proteínas a partir de los ARNm, incluyendo una glucoproteína (GP) que experimenta glucosilación en el retículo endoplásmico (RE), es procesada en el aparato de Golgi y pasa a la membrana celular. ⑤ El genoma se replica a partir de la plantilla ARN (+), y las proteínas N, L y NS se asocian con el genoma para formar la nucleocápside. <sup>(40)</sup>
54	18	Endosoma con partículas virales en su interior. Las más oscuras (electrodensas) son virus que ingresaron al endosoma y están intactos. Las más claras son partículas virales que han empezado a desmembrarse. <sup>(23)</sup>
56	19	Receptores celulares de entrada y salida de virus.
56	20	Las dos vías principales para la inhibición de la síntesis de proteínas víricas por el interferón. Un mecanismo implica la inducción de una polimerasa inusual (2-5A sintetasa), que es activada por el ARN bicatenario. La enzima activada sintetiza un trinucleótido de adenina inusual con un enlace 2' 5' fosfodiéster. El trinucleótido activa una endonucleasa que degrada el ARNm. El otro mecanismo implica la inducción de una proteína cinasa que inactiva el factor de iniciación eIF-2 mediante fosforilación de una de las subunidades para evitar la iniciación de la síntesis de proteínas. <sup>(40)</sup>
58	21	En esta imagen se puede ver una partícula viral liberándose (brotando) a través de la membrana plasmática. Debajo de ella, un grupo numeroso de ensamblajes del ácido nucleico y los capsómeros (nucleocápside) esperando su turno para brotar y así constituir la progenie viral. <sup>(23)</sup>
59	22	La imagen de la izquierda muestra dos partículas virales en la etapa de liberación. La imagen de la derecha muestra una partícula viral brotando y arrastrando con ella, parte de la membrana plasmática. <sup>(23)</sup>
59	23	La imagen (a) muestra una partícula viral en la etapa de liberación. La imagen (b) muestra una partícula viral una vez liberada en el medio extracelular. <sup>(23)</sup>
60	24	Esquema de los ciclos lítico y lisogénico de un bacteriófago.

60	25	Esquema de un bacteriófago visto en diferentes ángulos de 3D.
69	26	Medios para cultivo primario
69	27	Fibroblastos humanos
70	28	Esquema que presenta el desarrollo de un cultivo celular desde cultivo primario, cepa celular hasta convertirse en línea celular, mostrando los factores que influyen para los procesos de diferenciación, desdiferenciación y neoplasia. <sup>(40)</sup>
74	29	Evolución de una línea celular hipotética. Comportamiento a lo largo de las semanas. Figura de Freshney, 1987, p.8.
74	30	Embrión de pollo.
75	31	Rata wistar.
90	32	Análisis de neutralización, hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación. En el análisis mostrado se incuban suero diluido 1:10 con el virus, esto se añade después a cultivos celulares o hematíes. En ausencia de anticuerpos, el virus infecta la monocapa (indicado por ECP) y produce hemaglutinación (formación de una suspensión de hematíes similares a un gel). En presencia de anticuerpos se bloquea la infección (neutralización) y se inhibe la hemaglutinación (IH), permitiendo que los hematíes formen un grumo. El título de anticuerpos de la muestra es 100. <sup>(40)</sup>
91	33	Enzimoinmunoanálisis para cuantificación de anticuerpos o antígenos. Detección de anticuerpos: 1→ El antígeno vírico obtenido de células infectadas, viriones, o ingeniería genética, se fija a una superficie. 2→ Se añade suero del paciente y se deja que se una al antígeno. Se elimina el anticuerpo unido. 3→ Se añade anticuerpo antihumano conjugado con enzima, y se lava el anticuerpo unido. 4→ Se añade sustrato. 5→ Es convertido en cromóforo, precipitado o fluorescencia. Captura o detección del antígeno: 1→ El anticuerpo antivírico se fija a una superficie. 2→ Se añade la muestra que contiene el antígeno, y se lava el antígeno no unido. 3→ Se añade un segundo anticuerpo (antivírico) para detectar el antígeno capturado. 4→ Se añade antianticuerpo conjugado con enzima, se lava y después, 5→ Se añade sustrato, que es, 6→ Convertido en cromóforo, precipitado o fluorescencia. <sup>(40)</sup>
96	34	Análisis Western Blot de antígenos y anticuerpos contra el VIH. Los antígenos proteínicos de VIH se separan mediante electroforesis y se depositan en tiras de papel de nitrocelulosa (manchas). La tira se incuba con anticuerpo del paciente, se lava para eliminar el anticuerpo no unido y después se hace reaccionar con anticuerpo antihumano conjugado con enzima y sustrato cromóforo. El suero de un individuo infectado por el VIH se fijará e identificará las proteínas antigénicas mayores del VIH. Entre los cuatro sueros mostrados, sólo el suero 7 reconoce todos los antígenos y es definitivamente positivo.

98	35	Esquema de las técnicas de análisis virológico.
100	36	Esquema de la Reacción en cadena de la polimerasa.
101	37	Esquema de la técnica Southern Blot.
101	38	Hibridación de los ácidos nucleicos.
102	39	Análisis de células infectadas por virus mediante sonda de DNA. Las células infectadas se pueden localizar en secreciones tisulares preparadas histológicamente, utilizando sondas de DNA tan pequeñas como nueve nucleótidos o plásmidos bacterianos que contengan el gen vírico. Se añade a la muestra una sonda de DNA marcada. En este caso la sonda de DNA está marcada con timidina modificada con biotina pero también se puede usar la radioactividad. La muestra se calienta para desnaturalizar el DNA, y se enfría para permitir la hibridación de la sonda con la secuencia complementaria. Se añade avidina marcada con enzima para que se una a la biotina en la sonda. La adición del sustrato apropiado coloreará los núcleos de las células infectadas por el virus. <sup>(40)</sup>
103	40	Northern Blot; Muestra el ARNm de la b-actina en diferentes tejidos.
114	41	Vías de entrada de los virus humanos mas importantes.
117	42	Esquema general de la diseminación viral en el humano.
118	43	Órganos blanco de los virus mas significativos.
120	44	A- Fases de la infección vírica: el virus es liberado desde un individuo, adquirido por otro, se multiplica e inicia una infección primaria en el sitio de contagio. Dependiendo del virus, puede diseminarse a otros sitios corporales hasta alcanzar por último el tejido diana característico de la enfermedad. El ciclo se continúa con la liberación de nuevos virus. El grosor de la flecha indica amplificación del inóculo original mediante multiplicación. Las cajas indican un foco o causa de síntomas. B- Curso cronológico de la infección vírica: el curso de los síntomas y la respuesta inmune guardan relación con la fase de la infección y con que el virus produzca síntomas en el lugar primario o solo tras diseminación a otro foco (foco secundario). <sup>(40)</sup>
124	45	Mecanismos de transformación/ inmortalización por los virus. El crecimiento celular está controlado por el equilibrio de activadores externos e internos (aceleradores) y depresores como la proteína p53 y el producto del gen del retinoblastoma (RB) (frenos). Los virus oncogénicos alteran el equilibrio al eliminar frenos o potenciar aceleradores. <sup>(40)</sup>
125	46	El esquema muestra la infección aguda y varios tipos de infección persistente, ilustradas por las enfermedades que se indican en la columna de la izquierda. Los rectángulos verticales en color verde ilustran los episodios de enfermedad. PEES, panencefalitis esclerosante subaguda. <sup>(40)</sup>

129	47	Inmunidad antivírica específica de antígeno. La respuesta inmune es iniciada por fagocitosis, proteólisis y presentación del antígeno en células de linaje macrófago. Se activan células T facilitadoras específicas de antígeno y de hipersensibilidad tipo tardío (HTT), con liberación de linfocinas que activan las células B y T citolíticas. <sup>(40)</sup>
133	48	Progreso cronológico de los diferentes tipos de vacunas. <sup>(12)</sup>
139	49	Herpes labial.
143	50	Herpes Zoster.
145	51	Queratoconjuntivitis por herpes.
147	52	Cuadro de la actividad de los interferones.
148	53	Las dos vías principales para la inhibición de proteínas víricas por el interferón. Un mecanismo implica la inducción de una polimerasa inusual (2-5A sintetasa), que es activada por el ARN bicatenario. La enzima activada sintetiza un trinucleótido de adenina inusual con un enlace 2'5' fosfodiéster. El trinucleótido activa una endonucleasa que degrada el ARNm. El otro mecanismo implica la inducción de una proteína cinasa que inactiva el factor de iniciación eIF-2 mediante fosforilación de una de las subunidades para evitar la iniciación de la síntesis de proteínas. <sup>(40)</sup>
152	54	Herpes genital.
161	55	La infección de una población es similar a la de un individuo, en el sentido de que el virus debe diseminarse a través de la población y es controlado por la inmunización. Para sobrevivir, los virus tienen que seguir infectando a nuevos hospederos susceptibles, inmunológicamente vírgenes.

<b>APENDICE DE TABLAS</b>		
<b>Página</b>	<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>
11	1	Historia de los virus.
28	2	Características comparadas entre los virus y otros microorganismos.
29	3	Factores ambientales que afectan a los virus. <sup>(10)</sup>
30	4	Organización de los virus.
31	5	Partes que constituyen a los virus relacionadas con su función y composición química.
32	6	Métodos para el estudio de los virus.
35	7	Clasificación de los virus. En ésta clasificación solo incluiremos a virus que afectan a los animales y con importancia médica.
44	8	Fases de la replicación viral por etapas tanto fisiológicas como patológicas.
62	9	Situaciones clínicas mas comunes y los diversos casos en los que se puede sospechar de las mismas. <sup>(49)</sup>
66	10	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y BIOFÍSICA DE LOS VIRUS. Existen muchas pruebas de caracterización y clasificación bioquímica y física de los virus. En la tabla siguiente se muestran las características de los virus para esta clasificación. <sup>(49)</sup>
67	11	Ventajas y desventajas del cultivo celular.
71	12	Líneas celulares de mayor uso en el estudio de virus humanos.
73	13	Microfotografías Electrónicas de las cepas y líneas celulares mencionadas.
83	14	Lista de los virus mas representativos y los eritrocitos que proporcionan una aglutinación.
115	15	Tiempo de incubación media de algunas infecciones virales.
121	16	Tipos de infección viral relacionadas con la producción viral correspondiente y el efecto que provocan en la célula. <sup>(29)</sup>
122	17	Mecanismos que provocan la lisis celular en una infección citolítica.
132	18	Ventajas y desventajas de las vacunas antivirales. <sup>(58)</sup>
133	19	Calendario oficial de vacunación en México. <sup>(58)</sup>
134	20	Vías de administración y origen (generación), de las vacunas tradicionales. CC (Cultivo celular, 3ª generación), EP (embrión de pollo, 2ª generación). <sup>(58)</sup>
134	21	Vacunas de aplicación ocasional, indicándose su vía de administración, origen y generación. CC (Cultivo Celular, 3ª generación), EP (Embrión de pollo, 2ª generación) y AL (Animales de Laboratorio, 1ª generación). <sup>(58)</sup>
136	22	Clasificación de los medicamentos antivirales de acuerdo al efecto que producen en los virus. <sup>(44)</sup>
161	23	Factores que afectan la transmisión de los virus desnudos. Estos virus son transmitidos en general por vía respiratoria o feco-oral, y muchas veces se contagian a través de objetos contaminados (fomites). <sup>(37)</sup>
162	24	Factores que afectan la transmisión de los virus envueltos.

## REFERENCIAS

1. American Type Culture Collection. Catalogue of cell lines and Hybridomas. Maryland; 1992-1994.
2. BARQUERO J, SALGADO A. Terapia génica: la nueva frontera. Ancoa SA 1994.
3. Bernard Davis, Renato Dulbecco, Harold Ginsberg. MICROBIOLOGIA DE DAVIS. Volumen VIROLOGIA. Harper and Row. San Pablo, Brasil.
4. Bernard Fields, David Knipe. VIROLOGY. Volúmenes 1 y 2. Raven Press. New York.
5. [cbw.sipri.se/cbw/001030100.html](http://cbw.sipri.se/cbw/001030100.html)
6. Celia Coto y Ramón A. de Torres. NATURALEZA Y ESTRUCTURA DE LOS VIRUS ANIMALES. Serie Virología. Edigem S.A. Argentina.
7. Clausen J: Laboratory Techniques in Biochemistry and molecular biology. 3a ed. Elsevier, New York. 1988: 464 pp.
8. COFFEY DS. DNA technology. Postgraduate Course. AUA meeting. San Francisco. May 15. 1994.
9. CORDON CARLO C. Técnicas del laboratorio de la Biología Molecular. Comunicación personal.
10. DÍAZ, G.; "Compendio de la Unidad 1 de Virología Médica"; Estado de México, México; 2002.
11. Enciclopedia Encarta Omikron/Foto Researches. Inc
12. Encyclopedia of Virology, edited by Robert G. Webster and Allan Granoff, Academic Press, 1994.
13. European Group on tumour markers: Consensus Recommendations. Anticancer Res 1999; 19:2785-820.
14. GELEHRTER TH D. COLLINS FS. Principles of medical genetics. William - Wilkins 69-95, 1990.
15. George SL. Statistical considerations and modeling of clinical utility of tumor markers. Hemat Oncol Clin NA 1994;8:457-70.
16. Hansen ER. Serum biochemical markers in monitoring of malignancies. Clin Lab Sci 1988; 1:26-8.
17. Hayes DF. Preface. Tumor markers in adult solid malignancies. Hematol Oncol Clin NA 1994;8:ix-x.
18. <http://edicion-micro.usal.es/web/educativo/micro2/#anchor163990>
19. <http://edicion-micro.usal.es/web/educativo/micro2/#anchor164787>
20. <http://edicion-micro.usal.es/web/educativo/micro2/#anchor165213>
21. [http://images.google.com.mx/imgres?imgurl=www.dexin.com.uy/imagenes/bibby/corning\\_1.jpg&imgrefurl=http://www.dexin.com.uy/insumos/bibby/cultivo\\_celular.htm&h=292&w=250&sz=20&tbnid=IFWAWku5y4QJ:&tbnh=110&tbnw=95&start=4&prev=/images%3Fq%3Dcultivo%2Bcelular%26hl%3Des%26lr%3D%26ie%3DUTF-8%26sa%3DN](http://images.google.com.mx/imgres?imgurl=www.dexin.com.uy/imagenes/bibby/corning_1.jpg&imgrefurl=http://www.dexin.com.uy/insumos/bibby/cultivo_celular.htm&h=292&w=250&sz=20&tbnid=IFWAWku5y4QJ:&tbnh=110&tbnw=95&start=4&prev=/images%3Fq%3Dcultivo%2Bcelular%26hl%3Des%26lr%3D%26ie%3DUTF-8%26sa%3DN)
22. [http://images.google.com.mx/imgres?imgurl=www.health.ufl.edu/dental/6351/media/s\\_g\\_c15\\_30\\_web.jpg&imgrefurl=http://www.health.ufl.edu/dental/6351/chapter15.html&h=733&w=550&sz=45&tbnid=pTiuv9VxYGAJ:&tbnh=138&tbnw=104&start=62&prev=/images%3Fq%3Dmyxoma%2B%26start%3D60%26hl%3Des%26lr%3D%26ie%3DUTF-8%26sa%3DN](http://images.google.com.mx/imgres?imgurl=www.health.ufl.edu/dental/6351/media/s_g_c15_30_web.jpg&imgrefurl=http://www.health.ufl.edu/dental/6351/chapter15.html&h=733&w=550&sz=45&tbnid=pTiuv9VxYGAJ:&tbnh=138&tbnw=104&start=62&prev=/images%3Fq%3Dmyxoma%2B%26start%3D60%26hl%3Des%26lr%3D%26ie%3DUTF-8%26sa%3DN)

23. <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/question.htm>
24. [http://osms.otago.ac.nz/bur\\_AIDS.htm](http://osms.otago.ac.nz/bur_AIDS.htm)
25. [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/Salud/Cruz\\_M\\_C/parte\\_experimental.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/Salud/Cruz_M_C/parte_experimental.htm)
26. <http://tidepool.st.usm.edupix/mycoplasma>
27. <http://www.biologia-en-internet.com/default.asp?Id=27&Fd=2>
28. [http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol56\\_1\\_04/mtr06104.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol56_1_04/mtr06104.htm)
29. <http://www.drscope.com/pac/infecto-1/a1>
30. <http://www.epidemic.org/cgi-bin/hepcglossary.cgi?query=TobaccoMosaic&caller=theFacts/viruses/theOriginsOfViruses.html>
31. <http://www.google.com.mx/search?hl=es&q=que+es+la+inmunofluorescencia&meta=cr%3DcountryMX>
32. <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/cultivos.htm>
33. <http://www.laboratorioramos.com.mx/temas%20marcadoresTumorales%201.htm>
34. <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap3.htm>
35. <http://www2.cbm.uam.es/jalopez/CLASSES2002/CLASES0203>
36. [informatica.isste.gob.mx/website/comunicados](http://informatica.isste.gob.mx/website/comunicados)
37. LANDEGREN U, KAISER R, CASKEY T, HOOD L. DNA Diagnostic-Molecular Techniques and Automation. *Science* 242: 229-237, 1988.
38. Lindblom A, Liljegren A. Tumor markers in malignancies. *Br Med J* 2000; 320:424-7.
39. MAXAM A, GILBERT W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 560-564, 1977.
40. MURRAY, KOBAYASHI, PFALLER, ROSENTHAL; "Microbiología Médica"; Hartcourt Brace ed. 2a.; Madrid, España; 1997.
41. [omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/071/htm/enlafron.htm](http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/071/htm/enlafron.htm)
42. OSTE C. Polymerase Chain Reaction. *BioTechniques* 6: 162 - 167, 1988.
43. Pamies RJ, Craeford DR. Tumor markers. An update. *Med Clin NA* 1996;80:185-99
44. PLM, Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (DEF), Edición 47, México, 2001, Versión Electrónica.
45. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en México. Secretaría de Salud. México, 1999.
46. Robert G. Webster, Alan Granoff. *ENCYCLOPEDIA OF VIROLOGY*. Volúmenes 1, 2 y 3. Academic Press.
47. Rose N, Conway de Macario E, Folds D: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 5ta ed. ASM Press. 1997.
48. Roulston JE, Leonard RCF: *Serological Tumour Markers. An Introduction*. 1a ed. Churchill Livingstone. USA. 1993:175 pp.
49. Rovozzo, G. C., Burke, C. N., *A Manual of Basic Virological Techniques*, Prentice Hall, 1973, New Jersey, EUA.
50. S.E. Luria, J.E. Darnell, D. Baltimore and A. Campbell. *GENERAL VIROLOGY*. John Wiley-Sons. New York.
51. SANGER F, NICKLEN S, COULSEN A. DNA sequencing with chain -termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74. 5463-5467, 1977.
52. [sic.sapo.pt/article24089visual4.html](http://sic.sapo.pt/article24089visual4.html)

53. SOUTHERN EM. Delection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J MolBiol 98: 503-517, 1975.
54. Swan F, Velasques S, Tucker S, Redman J, et al: A new serologic staging system for large-cell lymphomas based on initial Beta-2 microglobulin and lactate dehydrogenase levels. J Clin Oncol 1989; 7:1518-27.
55. THOMPSON MW, MCINNES RR, WILLARD HF. Tools of human molecular genetics. En "Genetics in Medicine".Quinta edición. WB Saunthers, Philadelphia. Capítulo 5, pp 97-114, 1991.
56. Virología Médica; G. Carballal, El Ateneo, edición 1992.
57. Virologie Médicale; A. Mammette, 14ª edición, 1992.
58. Virology, 2nd Edition, edited by B.N. Fields, D.M. Knipe et al., Raven Press Ltd. New York, 1990.
59. [vurs.gov.si/bse.htm](http://vurs.gov.si/bse.htm)
60. W. Joklik, H. Willett, B. Amos, C. Wilfert. ZINSSER MICROBIOLOGIA. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
61. [www.3unileon.es/ins/insaiem/EQUIPAMIENTO.htm](http://www.3unileon.es/ins/insaiem/EQUIPAMIENTO.htm)
62. [www.artehistoria.com/historia/personajes/4062.htm](http://www.artehistoria.com/historia/personajes/4062.htm)
63. [www.aula-elmundo.es/.../05/14/aula989595132.html](http://www.aula-elmundo.es/.../05/14/aula989595132.html)
64. [www.biografix.de/.../italian/html/2/h\\_2c2.htm](http://www.biografix.de/.../italian/html/2/h_2c2.htm)
65. [www.byc.com.au/.../Releases/auction\\_mar\\_2003.htm](http://www.byc.com.au/.../Releases/auction_mar_2003.htm)
66. [www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/fuller/EMBL\\_Virus.Structure.html#VES](http://www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/fuller/EMBL_Virus.Structure.html#VES)
67. [www.geocities.com/CollegePark/Library/5484/intro.html](http://www.geocities.com/CollegePark/Library/5484/intro.html)
68. [www.idd0073h.eresmas.net/museo/pat008.htm](http://www.idd0073h.eresmas.net/museo/pat008.htm)
69. [www.ii.ua.pt/uimc/divulga/caracteriza2a.html](http://www.ii.ua.pt/uimc/divulga/caracteriza2a.html)
70. [www.inmunize.org/images/slides/slide25b.jpg](http://www.inmunize.org/images/slides/slide25b.jpg)
71. [www.lajornada.unam.mx/.../001009/cien-cara.html](http://www.lajornada.unam.mx/.../001009/cien-cara.html)
72. [www.med.sc.edu:85/mhunt/bunya.gif&imgrefurl](http://www.med.sc.edu:85/mhunt/bunya.gif&imgrefurl)
73. [www.med.sc.edu:85/mhunt/flu3jpg](http://www.med.sc.edu:85/mhunt/flu3jpg)
74. [www.med.sc.edu:85/mhunt/RNA-ho.htm](http://www.med.sc.edu:85/mhunt/RNA-ho.htm)
75. [www.medcity.com/image/flucolo1.gif&imgrefurl](http://www.medcity.com/image/flucolo1.gif&imgrefurl)
76. [www.muyinteresante.es/.../ciencia04.html](http://www.muyinteresante.es/.../ciencia04.html)
77. [www.ncbi.nlm.gov/ICTV/intro\\_to\\_universal.html](http://www.ncbi.nlm.gov/ICTV/intro_to_universal.html)
78. [www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/WebIntKey/Imeges/em\\_morwa.gif](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/WebIntKey/Imeges/em_morwa.gif)
79. [www.paho.org/.../DPI/100/100feature13\\_photos.htm](http://www.paho.org/.../DPI/100/100feature13_photos.htm)
80. [www.portaldehistoria.com/.../laviruela.asp](http://www.portaldehistoria.com/.../laviruela.asp)
81. [www.portaldehistoria.com/...epidemias/polio.asp](http://www.portaldehistoria.com/...epidemias/polio.asp)
82. [www.sfaf.org/.../virologia.html](http://www.sfaf.org/.../virologia.html)
83. [www.thebody.com/ bp/mar01/forum.html](http://www.thebody.com/ bp/mar01/forum.html)
84. [www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/emimages.html](http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/emimages.html)
85. [www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/emimages.html](http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/emimages.html)
86. [www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html](http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html)
87. [www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html](http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html)
88. [www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/papillo.html](http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/papillo.html)
89. [www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/papillo.html](http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/papillo.html)
90. [www.vir.gla.ac.uk/staff/bhellad/Echo12\\_2388\\_30k.jpg](http://www.vir.gla.ac.uk/staff/bhellad/Echo12_2388_30k.jpg)

91. [www.vir.gla.ac.uk/staff/bhellad/Paramyxo\\_405\\_35.jpg](http://www.vir.gla.ac.uk/staff/bhellad/Paramyxo_405_35.jpg)
92. [www.virology.net/Big\\_Virology/Special/Rabies1/Rabies.htm](http://www.virology.net/Big_Virology/Special/Rabies1/Rabies.htm)
93. [www.virology.net/Big\\_Virology/special/Nermut/Vaccinia.GIF](http://www.virology.net/Big_Virology/special/Nermut/Vaccinia.GIF)
94. [www.virology.net/Big\\_Virology/Special/Nermut/Vaccinia.Gif](http://www.virology.net/Big_Virology/Special/Nermut/Vaccinia.Gif)
95. [www.wadsworh.org/databank/b19virus.htm](http://www.wadsworh.org/databank/b19virus.htm)
96. [www.wadsworth.org/databank/b19virus.htm](http://www.wadsworth.org/databank/b19virus.htm)
97. [www1.cba.unige.it/virologia/Herpes2000.htm](http://www1.cba.unige.it/virologia/Herpes2000.htm)
98. [www2.cbm.uam.es/jalopez/CLASES2002/CLASES0203/Fig123T27.htm](http://www2.cbm.uam.es/jalopez/CLASES2002/CLASES0203/Fig123T27.htm)
99. [www2.cbm.uam.es/jalopez/CLASES2002/CLASES0203/Fig123T56.htm](http://www2.cbm.uam.es/jalopez/CLASES2002/CLASES0203/Fig123T56.htm)
100. [www-micro.mdb.le.ac.uk/3035/Coronaviruses.html](http://www-micro.mdb.le.ac.uk/3035/Coronaviruses.html)
101. Zambrano AF, Díaz SV: El Radioinmunoanálisis y su Control de Calidad. Impretei, México, D.F. 1996: 85 pp.
102. Freshney, 1987, pag. 8.