

## REPLICACION Y CUANTIFICACION VIRALES

Por : El Profesor

JORGE E. OSSA L.      DVM-MS

### Replicación.

Antes de entrar a discutir los diferentes pasos que se suceden en el proceso de la infección de una célula por un agente viral, es necesario advertir que los mecanismos utilizados por los diferentes virus son muy variados; por lo tanto lo que alcancemos a decir en esta oportunidad no será más que unas generalidades del tema.

Si bien la palabra replicación se refiere especialmente al proceso de multiplicación del genoma viral, vamos a repasar bajo este título toda la serie de eventos que deben sucederse para que la infección de una célula ocurra en una forma exitosa.

El primer gran problema que el virus debe resolver es el de el mecanismo de transmisión de un huésped al siguiente. Para asegurar su sobrevivencia cada uno de los virus se ha ingeniado un mecanismo: contacto directo, vía oral, utilizando vectores, ect. Una vez que este primer problema ha sido resuelto, el virus debe adherirse a la célula para que posteriormente ocurra la penetración del virus; aquí no termina el problema para el virus sin embargo, pues a continuación este debe ser desnudado para que se libere el material genético, el cual debe ser replicado y nuevamente ensamblado en su cápside, para que luego pueda ocurrir la liberación del virus, y en este proceso de la liberación los virus con envoltura deben adquirir esta estructura, y luego si tendremos un nuevo virión infeccioso, listo para iniciar otro ciclo de infección, bien en la célula vecina o en otro huésped.

En cuanto a los mecanismos de transmisión, son tan variados, tan interesantes y de tanta trascendencia para el entendimiento de las enfermedades infecciosas en general, que cualquier comentario adicional resultaría muy pobre ante la magnitud del tema. Me propongo entonces, a continuación entrar a desglosar los mecanismos o pasos anteriormente mencionados y hacer algunos comentarios al respecto.

Adhesión. Para que ocurra una correcta adhesión de un virus a una célula deben existir en la membrana celular unos sitios específicos llamados receptores virales. El contacto físico entre la célula y la partícula viral es el momento inicial de la adhesión, la cual es esencialmente un proceso electrostático y por lo tanto, puede ser afectado por la concentración iónica y el pH del medio.

Si bien la adhesión es un paso indispensable para que ocurra la replicación, también pueden ocurrir las llamadas infecciones abortivas, que son aquellas en las cuales, no obstante que la adhesión se lleva a cabo en una forma normal y completa, el proceso de replicación es inhibido posteriormente por cualesquiera otras circunstancias.

La naturaleza química de los receptores virales varía para los diferentes virus; así por ejemplo, para los Picornavirus se ha demostrado que los receptores son de origen lipoproteico, mientras que para los Mixovirus, son Mucoproteínas. La presencia de los receptores virales específicos depende de la especie de la célula, y aún de la clase de tejido de donde la célula provenga, dentro de la misma especie. El estado fisiológico de la célula también es muy importante: cuando se trató de infectar células primarias de riñón y de testículo de mono con poliovirus, estas células carecieron de los receptores específicos; pero después de cultivar las células in vitro por algunos días, las células desarrollaron esos receptores, y la infección ocurrió en forma exitosa. Se ha demostrado también, que si los receptores son destruidos por medio de tratamiento con enzimas, las células así tratadas se hacen completamente resistentes al virus correspondiente.

Penetración. Este paso se inicia inmediatamente después de la adhesión, y se caracteriza porque una vez que esto ha ocurrido, no es posible recuperar el virus sin destruir la célula, lo cual sí es posible en cualquier momento de la adhesión.

Con la ayuda del microscopio electrónico se ha podido demostrar que en el caso de los virus con envoltura, la penetración ocurre mediante la fusión de la envoltura del virus con la membrana celular, mientras que en el caso de los virus desnudos, el virión completo penetra en forma intacta a través de la membrana.

La penetración también puede ocurrir mediante un proceso de fagocitosis, para virus con o sin envoltura.

La penetración, al contrario de la adhesión es un proceso dependiente de la temperatura, de tal suerte que se puede lograr una sincronización, in vitro, de la replicación viral si la adhesión - ocurre en el frío, y luego se pasa a 37°C donde el proceso de penetración ocurriría simultáneamente para todas las partículas adheridas.

Desnudamiento. Este paso tiene lugar en las vacuolas fagocíticas que se forman al penetrar el virus en la célula, con la ayuda de enzimas lisosomales. Este proceso representa, obviamente, un gran peligro para el virus ya que una vez liberado el material genético de su cápside protector puede ser atacado por las enzimas existentes en el citoplasma celular. Sobre esta etapa se tiene realmente poca información y los mecanismos básicos por medio de los cuales el virus es capaz de sobrevivir en este momento de la infección, siguen siendo un enigma para la mayoría de los virus.

La proporción de viriones que terminan exitosamente una infección, es relativamente baja y varias razones podrían explicarlo: Fallas en la adhesión, desprendimiento del virus después de una correcta adhesión, fallas en el desnudamiento, y la destrucción del material genético después del desnudamiento, podrían ser las más importantes.

Después del desnudamiento se continúa una fase llamada de ECLIPSE, que se caracteriza porque durante esta fase es imposible recuperar el virus, aún destruyendo la célula, si es posible, desde luego, recuperar DNA o RNA infecciosos en algunos casos.

Replicación. La replicación del genoma viral puede tener lugar en el citoplasma celular, como es el caso de la mayoría, pero no todos los virus que contienen RNA, o en el núcleo, como es el caso de todos los virus que contienen DNA, excepto los Poxvirus.

Los patrones de replicación de los virus son muy variables , y para tener una idea completa de este proceso se hace necesario entrar a considerar cada grupo de virus por separado ; no obstante como lo anterior se sale de los objetivos de esta discusión , voy a intentar mencionar sólo algunos aspectos sobresalientes .

En cuanto a los virus que se replican en el núcleo , todo el proceso de multiplicación ocurre en este sitio excepto la síntesis de proteína , para lo cual la información correspondiente sale del núcleo en forma de RNA mensajero y va a los ribosomas donde se forman las proteínas que regresan al núcleo de nuevo , para el ensamblaje del virión.

Todos los virus que confinen RNA , a excepción de los Mixovirus , se replican en el citoplasma y allí mismo tienen lugar la síntesis de las proteínas necesarias para el ensamblaje del virión.

Maduración y liberación. La variabilidad de los virus también se hace patente en este proceso de maduración y liberación. En términos generales la maduración consiste en la formación de los cápsides a partir de las proteínas sintetizadas mediante la información del ácido nucleico viral , y esta formación de cápsides puede llevarse a cabo independientemente , de la asociación con el ácido nucleico, o simultáneamente con la inclusión del genoma , quedando conformado el nucleocápside.

Un fenómeno interesante y que está relacionado con la maduración de los virus, es el que ocurre cuando una célula es infectada simultáneamente con dos virus relacionados como Polio tipo 1 y Polio tipo 2: como las proteínas de cada uno de los virus se está produciendo al mismo tiempo, puede ocurrir que proteínas de uno sean incorporadas en el cápside del otro, o puede ocurrir también , que el genoma de un tipo sea incorporado al cápside del otro ; aún con algunos virus no tan relacionados como los del anterior ejemplo , se ha comprobado que puede ocurrir una mezcla fenotípica. Lo anterior es muy importante si lo consideramos conjuntamente con la capacidad que los ácidos nucleicos tienen para sufrir recombinaciones , mutaciones , etc. que en un momento dado explicaría la aparición de enfermedades virales atípicas , e inclusive la aparición de nuevas enfermedades , pues estamos tratando con agentes que tienen un material genético maleable y sensible a las presiones del medio ambiente.

La envoltura, es adquirida por los virus al pasar por las membranas celulares; bien del núcleo como es el caso de los Herpesvirus, bien de membranas intracitoplasmáticas como en el caso de algunos Togavirus, o bien de la membrana celular como ocurre con los Mixo y Paramixovirus. El último paso en la infección viral lo constituye la liberación de las nuevas partículas virales; esto puede ocurrir mediante lisis de la célula o por gemación a partir de la membrana celular , nuevamente el virus se encuentra expuesto al ataque enzimático e inmunológico , por lo tanto este paso constituye otro gran peligro para la sobrevivencia del virus. Los Herpesvirus , por su parte, maduran por gemación a partir de la membrana nuclear , y viajan a las células vecinas a través de microtúbulos , para evitar así la posible acción desintegrante de las enzimas existentes en el citoplasma de la célula , y para evitar también, la neutralización por parte de anticuerpos específicos existentes en los líquidos extracelulares.

## Cuantificación de los Virus.

Se entiende por titulación de una suspensión viral, al proceso por medio del cual podemos cuantificar la actividad biológica de un determinado virus. Toda ciencia requiere de una fase cuantitativa, generalmente posterior a la fase inicial o descriptiva; los virólogos entonces, se vieron también en la necesidad de inventar sus propios parámetros para medir la actividad biológica de los virus. Estos parámetros, como todas las medidas existentes, fueron tomados en forma arbitraria, pero tienen aceptación universal y son la base sobre la cual gira la investigación en esta ciencia.

A diferencia de las bacterias, que pueden cuantificarse en forma directa mediante el recuento de colonias sobre medios artificiales, o mediante el recuento de las células mismas al microscopio de luz, los virus por su pequeñísimo tamaño, y por su carácter de parásitos intracelulares obligatorios, sólo permiten su cuantificación en forma indirecta, a través de los efectos que producen - bien sea en su huésped natural, en animales de laboratorio o en cultivos de celulares.

Por los años de 1900, cuando la Virología apenas empezaba a vislumbrarse, los Virus eran estudiados en sus huéspedes naturales; es común leer acerca de los estudios sobre Fiebre Amarilla, para los cuales se utilizaron voluntarios humanos. Posteriormente se encontró que los huevos embrionados son un excelente medio de cultivo para algunos virus; seguidamente, empezaron a caracterizarse los diferentes animales de laboratorio, entre los cuales se destacan los ratones; hamsters, conejos y muchos otros. Como se recordará, no todos los virus son capaces de producir efectos nocivos en todas las especies de animales y por esta razón fué necesario, y aún hoy sigue siendo necesario buscar huéspedes o sistemas indicadores que se adapten a las condiciones de laboratorio, para poder estudiar los diferentes virus.

En la década de 1930 fué descubierto el microscopio electrónico, con el cual pudimos por primera vez observar directamente a los virus. Para efectos de cuantificación viral el microscopio no fué de mucho valor, sin embargo, pues además de que este aparato no está al alcance de la mayoría de los laboratorios, debido a su alto costo, tampoco es capaz de decirnos si la partícula viral que estamos viendo, es infecciosa o no; y esta información es importante porque no todos los viriones ensamblados y liberados de una célula infectada son normales; puede darse el caso de que haya cápsides sin genoma, y aún que el genoma sea defectuoso; en el cual caso no serán infecciosos; se ha calculado aproximadamente que sólo 1 de cada 15 ó 30 partículas del virus de Influenza son infecciosas; que sólo 1 de cada 10 partículas del virus de la peste aviar es infeccioso y en el caso del papiloma del conejo, sólo 1 de 100.000 partículas es infecciosa).

La cuantificación viral tiene su mayor importancia práctica en los laboratorios de investigación, donde es necesario saber con qué y con cuánto se está trabajando a fin de que los resultados - sean reproducibles y comparables con los resultados obtenidos por otros investigadores; en los laboratorios de diagnóstico de enfermedades virales puesto que las pruebas serológicas requieren también cantidades determinadas de virus y, además, en los laboratorios dedicados a la producción de vacunas es también necesario calcular exactamente la cantidad de antígenos necesario para obtener la respuesta deseada.

Entre los animales de laboratorio, quizá el más comúnmente utilizado es el ratón, por varias razones: En primer lugar, el tamaño de este huésped es perfectamente adaptable al espacio escaso del laboratorio; en segundo lugar, la prolificidad y el corto período de gestación permiten tener animales en abundancia como el laboratorio lo requiere; lo más importante de los ratones como animales de laboratorio es su amplio rango de susceptibilidad a los agentes virales y la posibilidad de uniformar esa susceptibilidad a los agentes virales y la posibilidad de uniformar esa susceptibilidad mediante un proceso de -

entrecruzamiento. Todo lo anterior hace de este animal un excelente huésped indicador al alcance de la mayoría de los laboratorios.

Para hacer la titulación se procede de la siguiente forma :

1. Se selecciona el huésped indicador
2. Se hacen diluciones decimales de la muestra de virus ( de 10 en 10 ).
3. Se inocula cada dilución en un grupo de animales
4. El título está dado por la dilución + alta que infecta ( causa síntomas ) o mata al 50% de los animales inoculados. En el primer caso , ( infecta ) se habla de la dosis infecciosa 50 (DI 50) ; en el segundo caso (mata), se habla de la dosis letal 50 ( DL 50 ).  
Así , cuando se dice que un virus tiene un título de  $10^6$  en ratones , lactentes , significa que una dilución 1 en 1.000.000 , del mencionado virus , es capaz de matar el 50% de los ratones que se inoculen con esa dilución.

Algunos virus como la Influenza y el Newcastle , tienen propiedades hemaglutinantes , es decir que son capaces de aglutinar glóbulos rojos de algunas especies , principalmente de aves; esta propiedad puede también ser utilizada para hacer la cuantificación viral y en este caso el título está dado por la dilución mayor del virus que es capaz de aglutinar los glóbulos rojos.

Mucho más se podría decir acerca de este tópico , pero ello implicaría entrar en detalles que no son oportunos , cuando el propósito de la charla es sólo el de hacer una introducción en el tema.

#### BIBLIOGRAFIA:

- Davis , Bernard D. et. al . Microbiology . 2 ed. Harper and Row. New York. 1973.  
Fenner , Frank. The Biology of Animal Viruses . 2 ed. Academic Press. 1968.  
Merchant , I. A , Packer , R. A. Veterinary Bacteriology an Virology. 7 ed. The Iowa State University Press. Ames . 1967.