

EL VIRUS RABICO: MORFOLOGÍA, MORFOGÉNESIS y CRECIMIENTO EN CULTIVOS CELULARES

E. HERNÁNDEZ BAUMGARTEN, M.V.Z., M.S., Ph.D.

*Escuela Nacional de Estudios Profesionales Cuautitlán
Universidad Nacional Autónoma de México*

1. Introducción

11: Morfología y morfogénesis	
1. MorfoIogía del virus rábico	2
2. Monogénesis del virus .rábico	2
	1
111. Crecimiento del virus rábico en cultivos celulares	5
	22
1.El ciclo del virus rábico	
23	
2. Efecto de la multiplicidad de infección sobre el periodo de Latencia.	31
3. Efecto de los cultivos primarios y líneas celulares sobre el crecimiento del virus	32
Referencias	
34	

1. Introducción

El virus de la rabia ha sido Clasificado recientemente dentro del nuevo género de los *Lyssavirus*. Este género junto con el de los *Vesiculovirus* y otros virus todavía no asignados a ningún género y para los cuajes no se aprobó nombre, constituyen la familia *Rhabdoviridae* (1).

El género *Lyssavirus* contiene el virus de la' rabia y a otros de reciente descubrimiento que están serológicamente relacionados con él. Estos Son el virus lagos Bat, el virus Mokola, el virus Obodhiang y el virus Kotonkan. Una de las bases para separar al antiguo género de los *Rhabdovirus* en los actuales géneros *Vesiculovirus* y *Lyssavirus*, fue el' que los .V *esiculovirus* se multiplican tanto en verte-

brados como en artrópodos, estando en este género los virus de la Estomatitis Vesicular, Cocal, Flanders-Hart Park, etcétera; en tanto que los *Lyssavirus* se multiplican en vertebrados solamente. La naturaleza tentativa de algunas asignaciones a determinados géneros se evidencia en el hecho de que los virus Obodhiang y Kotonkan se colocan en los *Lyssavirus* por su relación antigénica con el virus de la rabia; sin embargo, se multiplican en artrópodos (2). La relación antigénica de los dos virus mencionados con el virus de la rabia es bastante lejana en el mejor de los casos, pero considero que el criterio inmunológico no es suficiente motivo para la asignación del virus a uno u otro género. Una línea independiente de investigación parece sugerir que la relación del virus de la rabia y el de la Estomatitis Vesicular es más estrecha de lo que se había pensado hasta ahora (3). Aparentemente la ARN transcriptasa del virus de Estomatitis Vesicular inactivado con luz ultravioleta, es utilizado por el virus de la rabia acortando su periodo de latencia (3). En caso de ser así, la parte del ARN viral del virus de la rabia en la que se inicia la replicación del ácido nucleico sería lo suficientemente parecida a la sección de inicio de replicación del virus de la Estomatitis Vesicular como para activar a la enzima. Este efecto parecería indicar que de manera semejante a lo estudiado con otros virus de la familia *Rhabdoviridae* (4), los complejos de iniciación de transcripción del ARN son semejantes, ya que la ARN transcriptasa dependiente de ARN que forma parte del virión de la Estomatitis Vesicular, es lo suficientemente específica para replicar ARN viral y no los múltiples ARN presentes en el citoplasma de la célula infectada (3,4).

Independientemente del género a que sea finalmente asignado el virus de la rabia; el hecho es que ésta, continúa siendo una enfermedad importante en el mundo; tanto desde el punto de vista de las pérdidas que ocasiona en algunos países. de Ibero América (5) como desde el punto de vista de la salud pública (6) en casi todo el mundo.

II. Morfología y morfogénesis

1. *Morfología del virus rábico*

El virus rábico es cilíndrico con un extremo redondeado Y el otro extremo aplanado. Su forma, como la de otros virus pertenecientes a la misma familia, ha sido comparada a la de una bala.

Los estudios con tinción negativa han revelado una superficie cubierta de proyecciones superficiales (peplomeros) de 6 a 8 nanómetros (nm)1 de largo, y con el extremo libre redondeado, dándole a los

peplómeros la apariencia de una perilla. Los peplómeros están espaciados entre sí 4 o 5 nm de distancia. Aun cuando la disposición de estas proyecciones puede aparecer irregular, en ocasiones se observa claramente una disposición en forma de panal con los peplómeros estrechamente ordenados en hileras, lo que parece indicar una organización regular de las capas subyacentes (7).

Cuando el virus es tratado con detergentes iónicos, se desdobra en una cinta ondulada de ribonucleoproteína de 4.2 μm de longitud total con 2×6.5 nm de ancho y alto y una periodicidad de 7.5 nm. La ribonucleoproteína no es infecciosa. En el virión intacto esta cinta se enrolla para formar de 15 a 20 espiras en el cuerpo del virión y cuatro espiras decrecientes en el extremo redondeado (8).

El virión completo tiene de 75 a 80 nm de diámetro, incluyendo a los peplómeros, y de 170 a 180 μm de largo. Ocasionalmente el colorante penetra los virus por su extremo planar permitiendo observar una estructura interna, que también puede presentar estriaciones. El virus rábico, de manera semejante al de la Estomatitis Vesicular puede ocurrir en forma completa; forma de bala o partículas B y en forma acortada de 125 y 150 μm de largo, que son las formas truncadas (partículas T); sin embargo, su longitud no varía de 125 a 150 μm en forma continua, sino que las partículas son de una u otra longitud (8, 19), al menos en la cepa PM examinada por Sokol y colaboradores a este respecto (10).

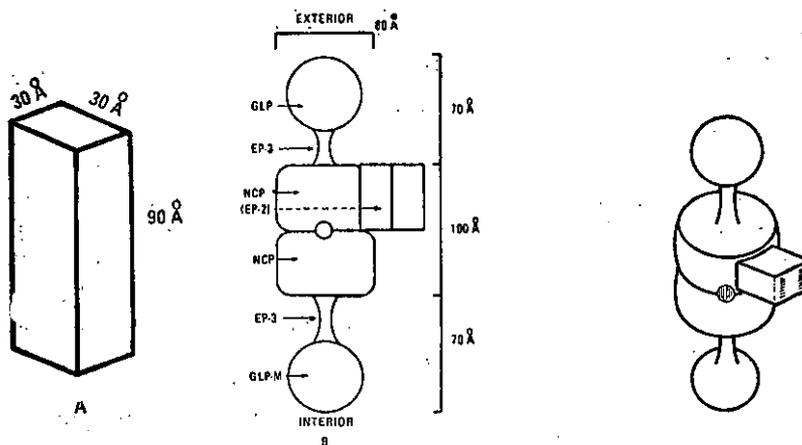
El virus rábico está constituido por cuatro proteínas mayores y una proteína menor. La proteína de peso molecular más alto del virión es una glicoproteína (GLP) de 80000 daltons de peso molecular y en cantidad aproximada de 1783 unidades por virión (10). Sigue en tamaño una proteína de nucleocápside (NCP) de 62000 daltons en cantidad de 1713 por virión (10). Sigue una nucleoproteína menor (NCP-M) de 55000 daltons de peso molecular en cantidad de 76 unidades por virión (10). La segunda proteína de envoltura (EP-2), (la primera es la glicoproteína ya mencionada) con 40000 daltons de peso molecular, se encuentra en cantidad de 789 unidades por virión (10). Y por último la tercera proteína de envoltura (EP-3) con un peso molecular de 25000 daltons y en cantidad de 1661 unidades por virión (10). Cabe aclarar que los términos proteína mayor y proteína menor no se refieren en virología al tamaño de las proteínas, sino al porcentaje de las proteínas virales que constituyen. También por convención internacional se numera a las proteínas de los virus con el N° 1 a la de más alto peso molecular y de ahí en adelante hasta la de menor peso molecular. Si se les da nombre según su función o la supuesta posición que ocupan en el virión, tendrán

que anotarse de todas formas de la de mayor peso molecular a la de menor peso molecular, como se ha anotado arriba. Las siglas empleadas para designar a las diferentes proteínas del virus rábico, son las propuestas por Sokol (10).

Es interesante notar que tres de las proteínas virales se encuentran en proporciones equimolares en el virión: GIP, NCP y EP-3 \pm 1700 unidades por virión; en tanto que la otra proteína mayor EP-2 se encuentra en proporción aproximada de una por cada dos unidades de las otras tres proteínas (850 unidades por virión). El significado de estas proporciones no es todavía muy claro.

Una posibilidad que ha sido sugerida (8, 11) para explicar las proporciones en que se encuentran los diversos componentes de virus rábico y otros virus de la familia Rhabdoviridae es que estos componentes se encuentran combinados de tal manera que dos GIP, dos NCP y dos EP-3 junto con un EP-2 constituyen una unidad. Este conglomerado multiprotéico formaría las subunidades que unidas por el ácido nucléico del virus forman una cadena visible al microscopio

FIGURA



MODELOS DE LAS SUBUNIDADES DEL VIRUS RÁBICO

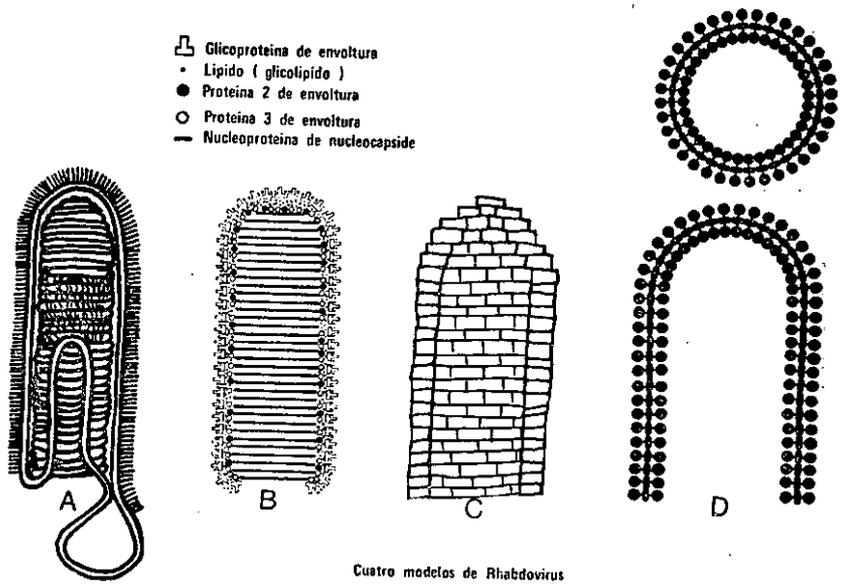
A.-NAKAI Y HOWATSON (SI B.-HERNANDEZ(11) MODIFICADO C.-DIBUJO EN PERSPECTIVA

electrónico como una cinta ondulada cuando se rompe el virión (8). Nakai y Howatson proponen por simplicidad una subunidad constituida por bloques rectangulares (8), en tanto que Hernández (11) sugiere una subunidad constituida por las proteínas antes mencionadas en la disposición que se ilustra en la figura 1.

EL VIRUS RÁBICO:- MORFOLOGÍA

Los modelos que estos dos autores proponen, junto con otros dos modelos actualmente en la literatura, se ilustran en la figura 2. El modelo de Murphy, pretende explicar solamente la apariencia microscópica del virus rábico sin tomar en consideración las proporciones 2 : 2 : 2 : 1 en que se encuentran las proteínas mayores del virión. El modelo de Sokol (10), por otra parte sólo intenta explicar los hallazgos fisicoquímicos y químicos obtenidos por él y sus colaboradores al estudiar el virus de la rabia y no pretende establecer la localización de las diversas proteínas en estructuras definidas del virión (E. Her-

FIGURA 2



Al Murphy(12), Bl Sokol (10), Cl Nakaiy H Watson(8' D)
 Hernánu(11)

nández B., observaciones no publicadas). El modelo de Nakai y Howatson, curiosamente antecede al estudio de las proteínas constitutivas del virus rábico realizado por Sokol y colaboradores (10) Y supone la existencia de subunidades morfológicas unidas por el ácido nucleico a la manera de un hilo uniendo las perlas de un collar. Este modelo, de manera puramente accidental prepara el terreno para la explicación de la proporción de proteínas virales en el virión. Desde este

punto de vista, el modelo de Hernández (11) puede considerarse como un refinamiento más moderno del que propusieron Nakai y Howatson (8). El conglomerado de siete proteínas que se ilustra en la figura 1B sería el equivalente propuesto para el prisma rectangular (figura 1A) empleado por Nakai y Howatson para elaborar su modelo de Rhabdovirus (figura 2C). El nuevo modelo, sin embargo ofrece numerosas ventajas para explicar la morfogénesis del virión rábico y otros virus de la misma familia en un proceso que requeriría de un mínimo de pasos adicionales en el ensamble, como se verá más adelante *vide infra* II-2).

El modelo de subunidad anotado en la figura 1B está formado por dos glicoproteínas ligeramente diferentes, siendo la exterior la glicoproteína clásica, en tanto que la interior es una glicoproteína modificada (GIP-M) que tiene una fuerte afinidad por otras glicoproteínas similares. Cada glicoproteína se encuentra adherida por medio de residuos de aminoácidos hidrofóbicos a la proteína de envoltura EP-3 que le sirve de tallo para desprenderse de la superficie viral y entre las dos forman el peplomero o proyección superficial del virión. Es necesario postular la unión hidrofóbica entre GIP Y EP-3 dado el comportamiento del virión rábico en presencia de detergentes no iónicos como el nonident P-40 (NP-40).

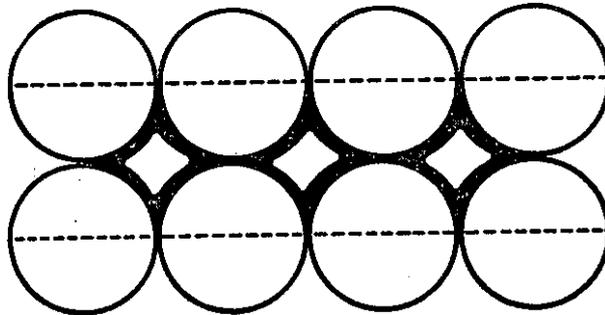
El NP-40 libera todos los fosfolípidos virales y a la glicoproteína viral. Esto podría significar: a) Que los fosfolípidos son los que mantienen fijo al virión a la glicoproteína, o b) Que el detergente no iónico ataca a la unión hidrofóbica de las dos proteínas y por lo tanto tiene dos efectos diferentes sobre el virión. La primera hipótesis supondría que la GIP es la única que forma los peplomeros, pero no explica ni la proporción de proteínas ni el arreglo regular de los peplomeros en la superficie del virión. La proteína de envoltura EP-3 a su vez se une por fuerzas iónicas (sin ligaduras covalentes) a la proteína de nucleocápside NGP. La proteína de nucleocápside por su parte, se une con la base de otra proteína de nucleocápside y entre las dos forman un canal rico en aminoácidos básicos para fijar al ARN. Sokol ha encontrado que la NCP es rica en lisina y arginina, que son aminoácidos básicos (10), la proteína de envoltura EP-2 actuaría como lazo adicional de unión entre las proteínas para estabilizar el virión (figura 3).

Todas las fuerzas que mantendrían el heptámero unido serían de naturaleza iónica, con excepción de la unión entre GIP y EP-3 que sería de tipo hidrofóbico como ya se ha anotado antes. La superficie de las proteínas de nucleocápside NCP y de las proteínas de envoltura EP-2 necesitarían ser hidrofóbicas a fin de sumergirse entré

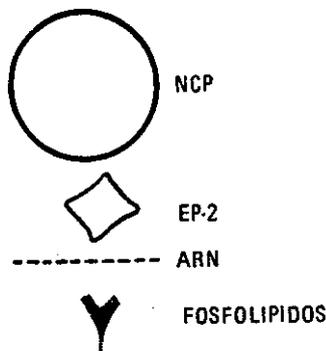
los extremos hidrofóbicos de los fosfolípidos virales, que son derivados de la membrana celular.

Existen una serie de irregularidades en las medidas de las estructuras virales, tal y como se han anotado antes. Por ejemplo, tanto Murphy (12) como Sokol (10) concuerdan en que la nucleocápside del virus' rábico tiene una longitud total extendida de 4 200 nm. (4.2 um.), con una periodicidad de 7.5 nm. Esto haría posible acomoda-

Figura 3

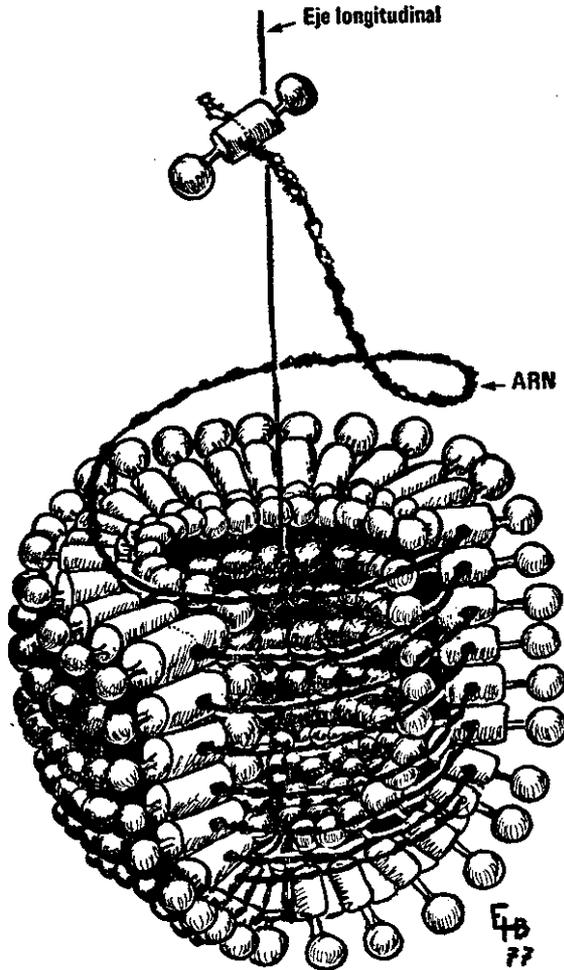


VISTA DE NUCLEOPROTEINAS A LAS QUE SE LES HA REMOVIDO LOS PEPLDMEROS



dar en una nucleocápside de esta longitud un máximo de 560 unidades estructurales. Este valor sin embargo, se encuentra muy alejado del número de proteínas de cada tipo contenidas en un virión y no es un múltiplo de ninguna de ellas. Por otra parte Murphy (12) indica que el cuerpo del virión está formado por 30 o 35 vueltas según medidas obtenidas en su laboratorio y que la nucleocápside forma una

FIGURA 3 B



Vista tridimensional de un Rhebdoviru. en f01mación con un cuadrante seccionado para mostrar la posición del ARN en 01 viru. y le estructura inteliior

espiral de 50 nm de diámetro y que el extremo redondeado del virión está formado por cuatro o cinco espirales de tamaño decreciente. Con estas medidas, una nucleocápside de 4200 nm. alcanza para 25 vueltas; lo cual arroja un valor ligeramente inferior al observado por Murphy *et al* (12). Hernández (11) por su parte, ha determinado que el virión rábico tiene un diámetro de 100 *um* incluyendo peplómeros y 85 *um* sin contar los peplómeros. Las proyecciones superficiales tendrían una longitud de 7 *nm* y el anillo interior, que Murphy considera que constituye la nucleocápside y Hernández considera que está formado por glicoproteínas modificadas, equidistante de la zona lipoproteica intermedia. Esto deja un hueco llamado agujero axial de 56 *um* de diámetro y que recorre toda la longitud del virus. La totalidad del agujero axial está lleno de fluido derivado del citoplasma celular y el hecho de que no sea penetrado por el ácido fosfotúngstico estaría explicado por el hecho de que la abertura inferior o planar del virus se hallaría, parcial o totalmente, ocluida por remanentes de la membrana celular desprendidos en el momento de la liberación viral. Hernández, en estudios de material de cortes ultra finos ha determinado que el número de subunidades presentes por cada vuelta de virus y que se hacen evidentes en la sección transversal de los viriones, es de 36 (E. Hernández B., 1972, observaciones no publicadas). Si por otra parte se toma la figura mínima de Murphy (12) de 30 espiras para el cuerpo del virión, y cuatro espiras decrecientes para formar el extremo redondeado con 35, 24, 12 y 7 subunidades, respectivamente, el total de subunidades que constituirían a un virión completo (de 165 nm de largo) sería de 1158. Este modelo requeriría de 2316 moléculas de glicoproteínas GIP, e igual número de EP-3 NCP así como 1158 moléculas de EP-2. Estas figuras están en franco desacuerdo con el número de moléculas de cada proteína encontrados por Sokol (10). Otros autores, han encontrado un menor número de vueltas por virión y esta figura se acerca más al número permisible según la longitud de la nucleocápside (11); la figura 7 muestra una partícula viral casi completa y todavía adherida a la membrana celular. Este virión contiene 15 espiras si sólo se cuentan las bandas oscuras. Lo que pudo suceder es que Murphy (12) hubiera contado tanto bandas oscuras como claras. Con 15 a 20 espiras de la nucleocápside, el modelo requeriría de 720 subunidades, lo que está de acuerdo con las determinaciones de Sokol (10).

El modelo propuesto por Hernández (11) y modificado recientemente (E. Hernández B., 1977 datos no publicados) incorpora algunas características sorprendentes. Obviamente no hay ninguna razón para suponer que el interior del virión contenga peplómeros proyectados



FIG. 4. Célula BHK-21, trece horas después de la infección con virus V-319. La totalidad de los espacios del retículo endoplásmico granular se hallan distendidos por antígeno rábico. Este paso en el ciclo de infección va seguido rápidamente de la formación de matrices virales. 15000X.

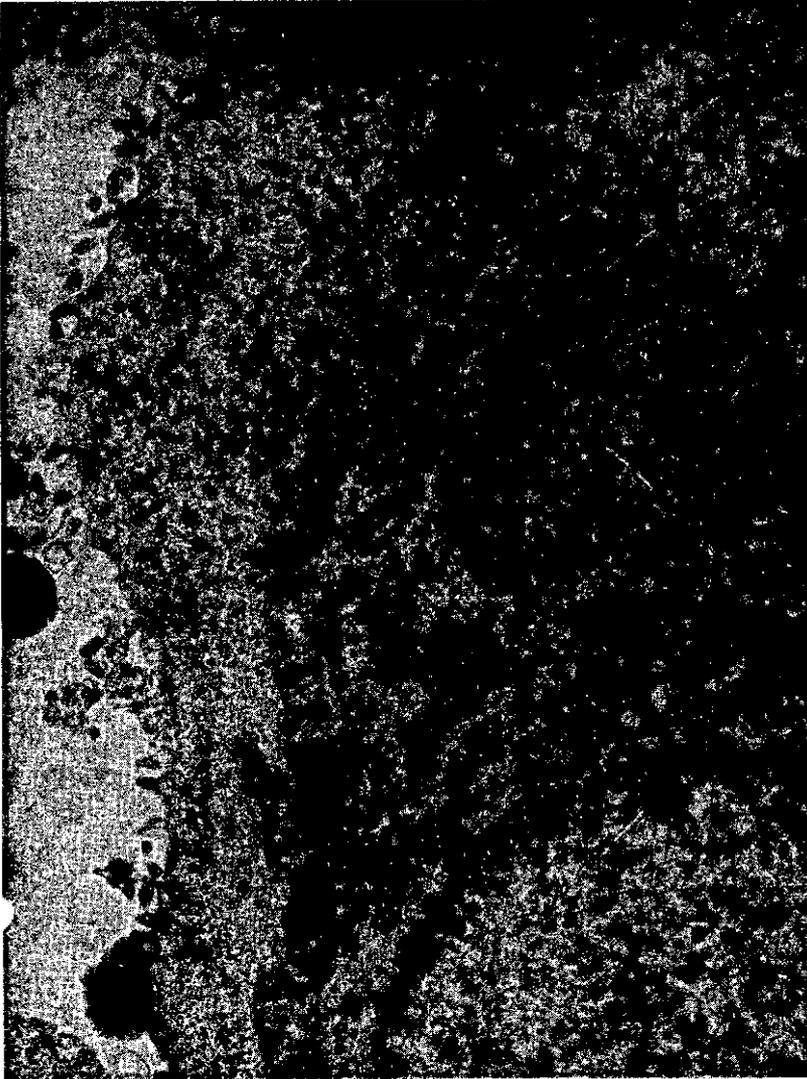


FIG. 5. Célula 135 infectada con virus V-319, 16 horas después de la infección. El citoplasma celular contiene una matriz viral bien formada, a la' que continuamente contribuye el retículo endoplásmico. Varias partículas virales maduran en la membrana citoplásmica. 15000X.

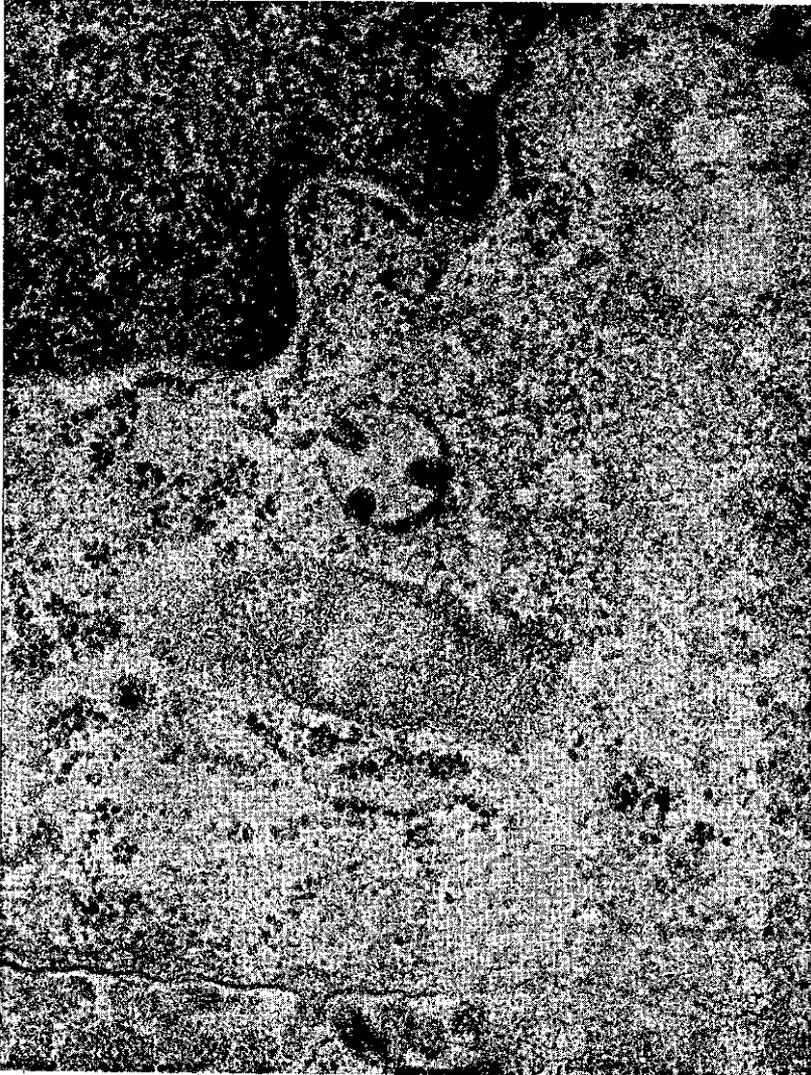


FIG. 6. Célula 13S infectada con virus cepa ERA. Una vacuola; contiene tres partículas virales madurando hacia el interior y muestra una parte de la membrana engrosada en lo que probablemente se convertirá en una cuarta partícula viral. 20 horas después de la infección. 5250QX.

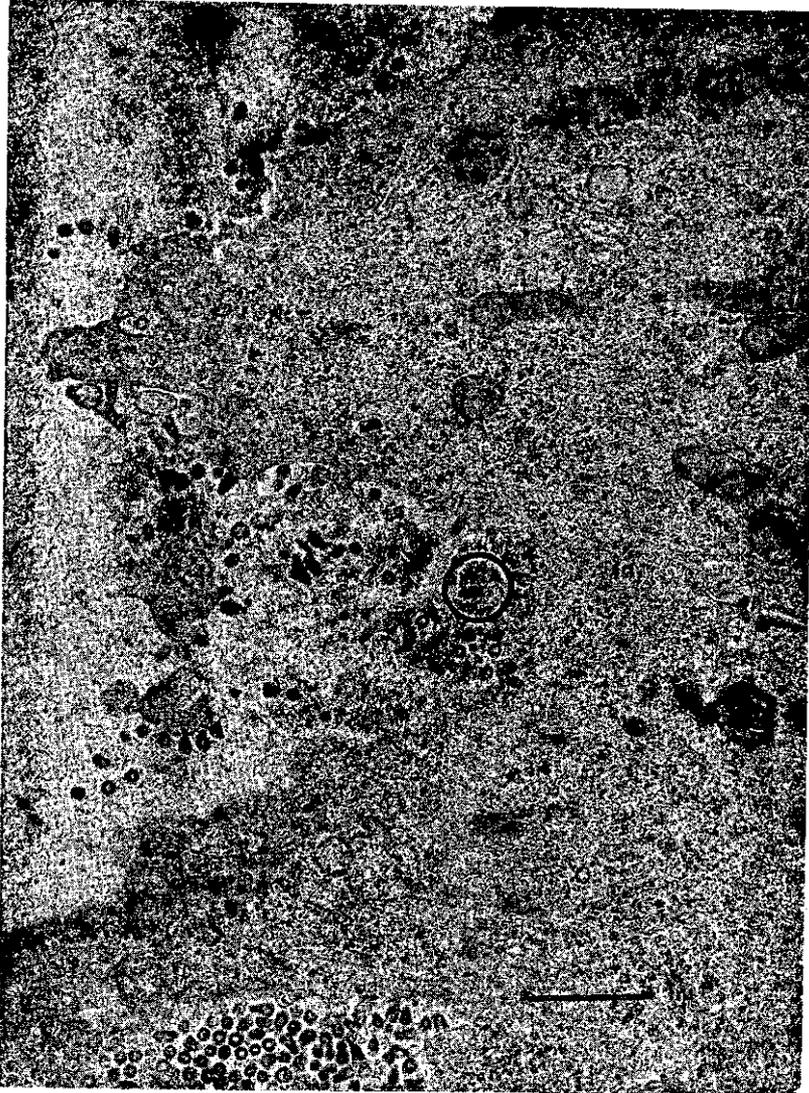


FIG. 7. Parte de dos células 13S infectadas con cepa ERA. Punto medio de lá infección, 48 horas después de iniciado. El virión incluido en el círculo ha sido cortado longitudinalmente y es una partícula viral completa (B). 22 500X.

hacia el agujero axial La evidencia que apoya esta hipótesis proviene de diferentes líneas de investigación. Por una parte, Sokol (15) estudiando la composición química del virión rábico llegó a la sorprendente conclusión de que el virión desintegrado contenía el doble de actividad antigénica que el virión completo. Las glicoproteínas purificadas carecían de actividad hemoaglutinante pero ejercían una fuerte actividad inhibidora de la hemoaglutinación (HI); esta actividad también es ejercida por viriones parcialmente destruidos, pero cuando se empleaba glicoproteínas purificadas, consistentemente se observaba un aumento de actividad HI. Esta observación podría explicarse de varias maneras, una de las cuales sería precisamente que la ruptura de los viriones provocaría la liberación de sitios antigénicos y unidades HI previamente ocultos. Schneider por otra parte desagregando viriones rábicos con saponina (16) encontró un aumento de cuatro veces la actividad hemoaglutinante. Esta observación parecería indicar que siguiendo la técnica apropiada de ruptura de los viriones es posible obtener las subunidades completas de tal forma que retengan dos valencias y por lo tanto sigan causando hemoaglutinación y no HI como las glicoproteínas aisladas de Sokol (15), Una observación bastante constante es el diámetro de los viriones, así como la regularidad de su forma (11, 12). Las mayores variaciones, de hecho, las únicas variaciones de forma, se encuentran en la longitud de los viriones (9, 19) .

Otros virus animales de simetría helicoidal tienen variaciones en diámetro de 100 a 200 μm ; lo cual implica un 100% de variabilidad, definitivamente más de lo que podría explicarse con errores de medición en virus de este tamaño. La regularidad de forma de los virus de la familia Rhabdoviridae se automatiza con un modelo de virus como el propuesto por Hernández (11). Se ha indicado anteriormente que la glicoproteína situada hacia el interior del virión (hacia el agujero axial) sería una glicoproteína modificada con gran afinidad por otras glicoproteínas similares. De esta manera, el extremo redondeado estaría condicionado por la unión de las glicoproteínas internas entre cada espira y de las espiras entre sí. Es decir, habría una estructura semejante a un casquete hemisférico formado por GIP-M unidas tridimensionalmente (ver figura 3B). El cuerpo del virus tendría siempre el mismo diámetro por que es el obligado por la unión de las esferas de glicoproteínas modificadas sin dejar resquicios entre sí. Si el ARN es la cadena que une las subunidades entre sí, es lógico suponer que cada cadena de ácido nucleico aceptara tantas subunidades como larga sea, lo cual, a su vez tendrá un efecto sobre la longitud final del virión que madure en la membrana celular, pero

no sobre otras medidas, dado que las subunidades empleadas son las mismas en ambos casos. ¿Qué tan cercano a la estructura real del virus rábico es el modelo propuesto? La única forma de saberlo es esperar y observar como resiste la prueba del tiempo y de una nueva evidencia morfológica que pueda ser descubierta en el futuro. El modelo actual incluye la información disponible sobre el virus y predice con razonable exactitud el comportamiento del virus ante los diferentes agentes que lo desmembran y la forma en que se comportan ante la deshidratación, congelación, etcétera.

El ácido nucleico purificado de los Rhabdovirus no es infeccioso. En los Vesiculovirus, el virus de la Estomatitis Vesicular en sus dos serotipos contiene una enzima que se encarga de la replicación del ARN, la ARN replicasa (4, 17). La única acción enzimática evidenciada hasta ahora en el virus rábico es una actividad de kinasa de proteínas. O bien la ARN replicasa está ausente, o los métodos empleados en la reacción para evidenciar esta actividad no han sido capaces de detectarla (10)

2. Morfogénesis del virus rábico

La morfogénesis del virus rábico está estrechamente ligada al ciclo de infección del mismo. La división que aquí se hace es un tanto artificial, sin embargo sirve al propósito de delimitar este aspecto del ciclo de infección con lo cual se trata de evitar el complicar aún más la descripción del ciclo,

El virus de la rabia puede conducir a una infección tolerada y ocasionalmente a una infección citopática (14), sin embargo un efecto constante que evidencia la multiplicación viral en las células infectadas es la formación de corpúsculos intracitoplásmicos de inclusión. En el sistema nervioso central (SNC) reciben el nombre de corpúsculos de Negri y los métodos de tinción han sido descritos en detalle en otros trabajos (5, 19) Y no es el propósito de este capítulo el entrar repetitivamente en esos detalles nuevamente. La técnica de anticuerpos fluorescentes (19) evidencia corpúsculos o masas antigénicas intracitoplásmicas que en el caso del sistema nervioso central son indistinguibles de los corpúsculos de Negri. En cortes finos examinados en el microscopio electrónico de transmisión, las masas antigénicas forman inclusiones intracitoplásmicas que no están delimitadas por una membrana. Estas masas finamente granulares, en realidad están compuestas de largas fibras de nucleocápsides orientadas al azar (véase figuras 5 y 9). Estas masas intracitoplásmicas reciben el nombre de matrices virales, dado que contienen estructuras precursoras de virio-

nes. Durante mucho tiempo, la relación entre la matriz vital y la viriogénesis permaneció obscura. ¿ En qué forma contribuían estas masas intracitoplásmicas a la maduración de nuevos viriones. Los cortes ultrafinos revelaban ocasionalmente estructuras tubulares en asociación con las matrices virales, y para aumentar la confusión, la mejor idea que se tenía del virus rábico es que se trataba de un "probable mixovirus", es decir un virus esférico (12). Más tarde se observó que además de estas estructuras, las células infectadas en cultivo, mostraban una gran abundancia de microfibrillas (véase figuras 9 y 10); estas estructuras fibrilares sí se observan penetrando en la base de los viriones en formación. Otro aspecto que ha sido observado, es que la modificación de la membrana celular no ocurre libremente - sino en estrecha asociación con el inicio del extremo redondeado del virión y la extrusión de peplómeros (20). Es decir, según las observaciones de Iwasaki *et al.*, (20), el proceso de espiralización de la nucleocápside y el proceso de gemación viral son concomitantes. El virus no modifica primero la membrana celular y después inicia su gemación sino que ambos procesos se observan estrechamente sincronizados, al grado que la modificación de la membrana celular, termina en la base del virus naciente (ver figura 6). La gemación viral no ocurre con preferencia en ninguna membrana celular sino que utiliza indiferentemente todas las membranas de la célula, empezando con la membrana plasmática, vacuolas, continuado con membranas del retículo endoplásmico granular y agranular, llegando incluso al extremo de usar la capa externa de la membrana nuclear. La maduración de Viriones en las matrices virales sin asociación con membranas ha sido reportada (12) y ha sido explicada como una síntesis *de novo* de membranas para el propósito de la gemación viral intracitoplásmica. Aparentemente el proceso de enrollar la nucleocápside ocurre simultáneamente con la gemación viral en 10 que resulta un complejo juego coreográfico: a) La extrusión de peplómeros sólo ocurre en la parte de la membrana que está dando lugar a la gemación de un virus; b) La gemación del virus está ligada estrechamente por una parte a la presencia de peplómeros y por otra a la de la nucleocápside; e) La espiralización o arrollamiento de la nucleocápside está sincronizada con el proceso de gemación. El único proceso celular de sincronización y complejidad comparables es la mitosis y la hace una célula completa, no un virus.

Los peplómeros virales son casi en su totalidad glicoproteínas que adquieren su componente de carbohidratos por medio de transferasas celulares. Éste proceso, a su vez, parece actuar como el pasaporte para que las proteínas pasen la doble barrera de fosfolípidos de la membrana



Fig. 8. Parte de una célula 135 infectada con virus Mazatán. La mayor parte del citoplasma de esta porción de la célula ha sido substituido por matriz viral. En los bordes de la matriz viral empieza la maduración intracitoplásmica del virus. Infección tardía 100 horas después de iniciada. 22 500X.



FIG. 9. Células 135 infectadas con virus V-319, 120 horas después de la infección. El estado de la célula de la parte media corresponde a la infección tardía. Los viriones todavía están madurando en la membrana celular, en tanto que el citoplasma se halla ocupado por gran cantidad de partículas virales asociadas al retículo endoplásmico, matrices virales múltiples y fibrillas (¿nudeocápsides?) en arreglo casi paralelo. 30 OOOX.

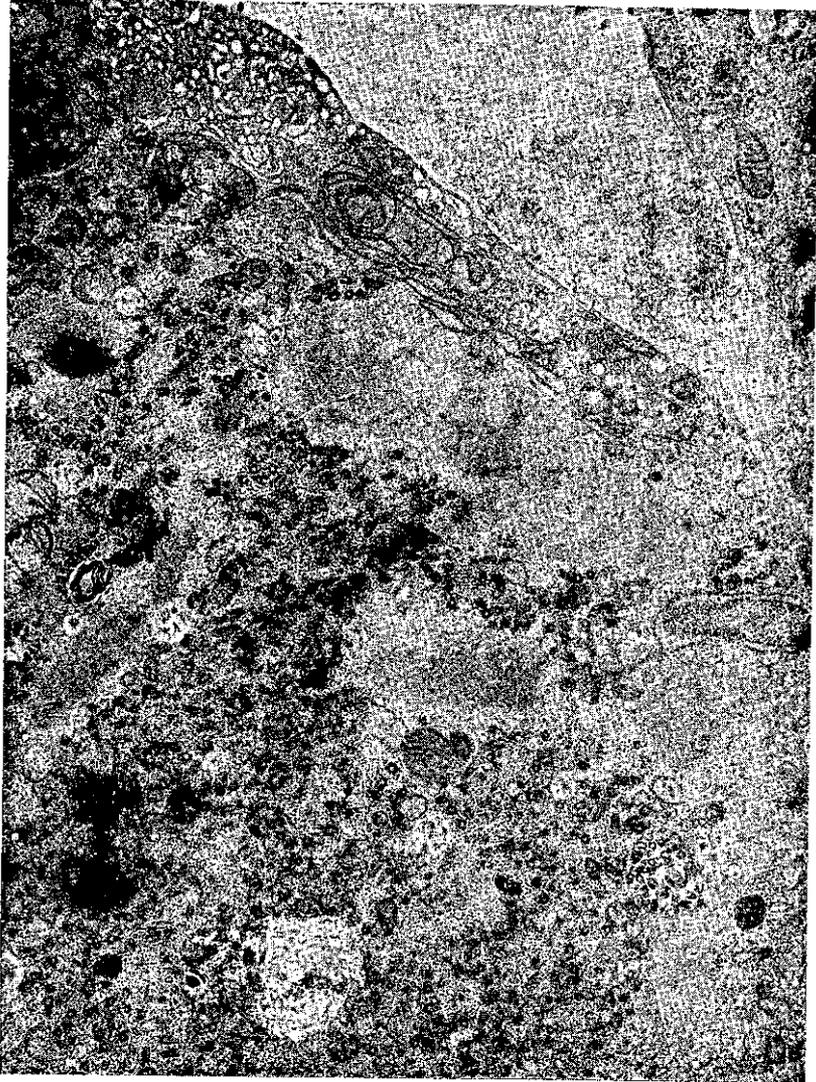


FIG. 10. Células BHK-21 infectadas con virus ERA. 148 horas después de la infección. El estado de la célula corresponde a la degeneración celular temprana. No se encuentran partículas virales madurando en la membrana plasmática, en tanto que las partículas virales se acumulan en el citoplasma celular en medio de una enorme matriz viral. Se observan numerosas formas mieloides, mitocondrias hinchadas y vacuolas en la célula como pruebas de degeneración celular temprana. 22 S00X.

celular. Si las matrices virales contuvieran el virión desensamblado pero constituido por tantas subunidades como pudiera unir el ARN viral, según su longitud y si las esferas terminales sólo estuvieran esperando la acción de las transferasas celulares y adquirir así su "pasaporte" para trasponer la membrana celular, en el momento en que adquirieran su fracción glucídica estarían en posición de iniciar el ensamble viral en la membrana más próxima, hacia la cual se dirigiría. Una vez en contacto con una membrana; sólo uno de los peplomeros podría sobresalir, ya que el otro quedaría forzado hacia el interior de la célula por la arquitectura de la subunidad viral. Una vez que la primera subunidad hubiera penetrado la membrana celular, una de las enzimas tardías del virus, una enzima ensambladora (*vide infra*, III-1), se encargaría de modificar la glicoproteína situada en el interior de la célula con lo cual provocaría la afixación de esta GIP-M por otras similitudamente modificadas, a medida que la orientación sobre la membrana y subsecuente modificación hubiera tenido lugar. El proceso de estructuración de las subunidades virales y su unión con el ARN viral de progenie (*vide infra*, III -1) serían procesos de autoensamble provocados por la estructura misma de los componentes, de tal forma que la nucleocápside se estructuraría tan pronto como todos los componentes estuvieran disponibles en la concentración adecuada para ello. El proceso de gemación sería un proceso que progresaría mediante la energía generada por la enzima ensambladora y que se inicia con la penetración de la primera subunidad viral en la membrana celular y termina con la penetración y modificación de la última de ellas. Las 76 moléculas de NCP-M encontradas por Sokol (10) constituirían la señal de terminación de ensamble a fin de iniciar la liberación viral por pellizcamiento, con lo cual el virión maduro se separaría de la célula (11) (E. Hernández B., 1977, observaciones no publicadas). Así se resolvería de una manera lo más sencilla posible (con el empleo de una sola enzima, la ensambladora) el complejo problema de la triple sincronización mencionado antes. El proceso de morfogénesis viral bien pudiera ser más complejo, pero dado el paso molecular del ARN viral de 4.6×10^6 daltons (1a), la capacidad de codificación de un ácido nucleico es limitada y una buena parte ya ha sido empleada en la síntesis de proteínas precursoras de tal forma que ya no queda posibilidades de mucha información adicional. Tomando algunos parámetros sencillos es posible calcular el porcentaje del ácido nucleico que no ha sido empleado en la síntesis de moléculas precursoras. Cada aminoácido es codificado por tres nucleótidos, cuya secuencia y tipo determina el tipo de aminoácido de que se trate (21). Tomando en cuenta que el peso molecu-

lar del ARN del virus rábico es de 4.6×10^6 y no es infeccioso, (10) y por otra parte tomando un valor promedio de peso molecular por nucleótido de 335, para codificar un aminoácido se requieren aproximadamente 1000 daltons de ácido nucleico. La máxima capacidad de codificación del ARN del virus rábico sería de 4 600 aminoácidos. Tomando un peso molecular promedio de 110.7 daltons por aminoácido, el máximo peso molecular de proteína que puede codificar el ARN viral de rabia es de 509 220 daltons. De esta capacidad, una buena parte ya ha sido utilizada para codificar las proteínas precursoras que forman parte del virión (*vide supra*, Ir-1), de la siguiente manera: GIP, 80000 daltons; NCP, 62000 daltons, NCP1M 55000 daltons; EP-2, 40 000 daltons, y EP-3, 25 000 daltons, lo que arroja un total de 262 000 daltons empleados en la síntesis de las proteínas precursoras. Restan por explicar 247 220 daltons, que bastarían para codificar 10 proteínas con peso molecular de 24 000 daltons cada una. Se ha indicado antes (*vide supra*, Ir-1) que el virión contiene Kinasa de proteínas y pudieran contener una ARN transcriptasa dependiente de ARN inactiva y que pudiera activarse intracelularmente. Las enzimas, en general han probado ser de más alto peso molecular que las proteínas estructurales, y de éstas las polimerasas de ácidos nucleicos son bastante pesadas, del orden de 80000 daltons o más (22). Si suponemos a la kinasa con un peso molecular de 60000 daltons y 80 000 a la ARN replicasa restarían apenas 100 000 daltons para

. codificar las proteínas virales que se hicieran cargo de la cuidadosa sincronización requerida para el ensamble viral, siempre y cuando no se presente el fenómeno de genes incluidos dentro de otros genes, como ocurre en el bacteriófago IN estudiado por Fides (13). Definitivamente la capacidad remanente de especificación de proteínas virales no es suficiente para explicar la sincronización observada, al menos por los mecanismos de sincronización conocidos y que involucran el transporte y extrusión de proteínas de peplomero a la membrana celular, el transporte y espiralización de la nucleocápside, el cambio de propiedades de la membrana para causar la gemación viral y por último el desprendimiento del virión maduro por pellizcamiento. Todos estos pasos involucran acciones intracelulares bastante complejas, que están por encima de la capacidad de un virus de este tamaño, a menos que se expliquen de manera que no graben la capacidad de codificación del virus.

111. Crecimiento del virus rábico en cultivos celulares

El éxito del cultivo del virus rábico en cultivos celulares fue un tanto tardío y no fue sino hasta que Kissling (23) logró su crecimiento en cultivos celulares no nerviosos y más tarde una primera vacuna obtenida con estos métodos (24), que realmente fue posible iniciar el estudio de morfología. Después de numerosos estudios infructuosos, Davies *et al.*, en 1963 (25), describen al virus rábico como un virus alargado "que se proyecta como dedos de las células infectadas" (25). Con anterioridad se habían descrito una serie de morfologías esféricas (26), etcétera, que hoy día resulta claro que contenían casi exclusivamente viriones en diversas fases de degeneración. También los primeros intentos de cultivar al virus rábico en cultivos de Órganos y células tumorales de tejido nervioso habían obtenido un éxito nulo o muy moderado (27, 28, 29, 30). Entre otras, las dificultades que encontraron estos autores derivaron de la dificultad de mantener células nerviosas en cultivo. Kissling por otra parte (23) se apartó por completo de estos cánones y obtuvo el crecimiento de virus rábico en tejido no nervioso, utilizando cultivos primarios de riñón de hámster (*Cricetus auratus*). A partir de este trabajo, que ha probado ser la piedra angular de la que parten todos los trabajos detallados sobre la biología molecular del virus rábico, es que el progreso significativo se inició con un ímpetu que sigue hasta nuestros días. En la actualidad se han utilizado una gran variedad de sistemas primarios para el cultivo del virus rábico, así como también gran variedad de líneas celulares, incluyendo líneas celulares de peces, víboras, tortugas, etcétera (14).

En la mayoría de los sistemas celulares, la adherencia y penetración del virus rábico puede aumentarse por la adición de poliiones, como son la dietilaminoetil dextran (DEAE dextrán) y el sulfato de protamina (31). Todos los virus rábicos que han sido mantenidos por medio de pases intracerebrales en animales de laboratorio (virus fijos) así como los virus de calle, requieren de un proceso de adaptación a cultivos celulares. Al principio sólo unas cuantas células se infectan como puede evidenciarse por acumulos de material inmunofluorescente, visible en su citoplasma. A medida que se efectúan un mayor número de pases, el número de células que acumulan en su citoplasma material teñible por anticuerpos fluorescentes aumenta, así como también el tamaño y cantidad de los corpúsculos de inclusión (14, 32, 33). Esta característica del virus rábico ha sido empleada con éxito para la titulación de anticuerpos así como para pruebas de viabilidad del virus rábico adaptado a cultivos celulares (32).

La forma de efectuar pases sucesivos del virus rábico para obtener su adaptación a una línea celular puede hacerse pasando seriadamente células infectadas, ya que es posible mantener y pasar líneas celulares infectadas con virus rábico (5, 33). También es posible hacer los pases sucesivos del virus rábico utilizando virus extracelular que se encuentra en el medio de cultivo. A veces la cantidad de virus rábico liberado en el medio de cultivo es tan escaso que no alcanza para infectar células en el pase sucesivo ni siquiera después de varios pases ciegos. Una tercera posibilidad de efectuar los pases de virus rábico durante la fase de adaptación consiste en mezclar células infectadas con células no infectadas y dejarlas multiplicarse juntas. Al término de la fase de formación del monoestrato, casi todas las células se encontrarán infectadas (14).

Dadas las características de crecimiento y adaptación del virus rábico a cultivos celulares, es probable que múltiples factores afecten su crecimiento (*vide infra*, III-2 y 3).

1. El ciclo del virus rábico

Como resultado de un estudio comparativo de la morfogénesis de diferentes cepas de virus rábico en cultivos celulares, Hernández (11) estudió intensivamente en cortes ultra finos con microscopía electrónica, el comportamiento de varias cepas de virus rábico, usando especialmente células BHK-21 Y 13S CI" ambas de origen de riñón de hámster (34). Si bien no se observaron grandes diferencias en la morfogénesis de las diferentes cepas de virus rábico estudiadas, el ciclo de infección del virus rábico en cultivos celulares fue estudiado con un grado de detalle que lo hace accesible de interpretación.

El ciclo de multiplicación de los virus ARN en general está constituido por once pasos diferentes que fluyen uno en el otro sin detenerse y en ocasiones se mezclan entre sí.

a) El primer paso del ciclo de todo virus, es la adsorción o adherencia, es decir la unión del virus con una célula susceptible. Esta adsorción puede ser con o sin mediación de sitios receptores.

b) El segundo paso es la penetración, que también tiene variaciones según la familia de virus de que se trate. Puede ser penetración por captación celular en vesículas pinocitóticas, como en el caso de los *Poxviridae* (familia de virus ADN), por penetración a través de la membrana celular como en algunos *Picornaviridae* o bien por viriopenesis, es decir la unión de la envoltura viral a la célula y el subsecuente vaciado de la nucleocápside al citoplasma celular como en los *Herpetoviridae* (familia de virus ADN).

e) Una vez dentro de la célula, ocurre la denudación, es decir la liberación de un ácido nucleico funcional. En algunos virus los procesos de penetración y de denudación ocurren simultáneamente.

d) Una vez liberado el ácido nucleico en el citoplasma pueden ocurrir varias cosas según el tipo de ácido nucleico contenido en el virus. Existen varias terminologías para denominar *los* ácidos nucleicos, según Baltimore (35), dependiendo de si el ARN viral es al mismo tiempo el ARN mensajero, es decir que puede ser traducido directamente en proteína o bien si requiere de una síntesis de ARN antes de ser traducible en proteína. Siguiendo convenciones internacionales, se llamará cadena positiva a la contenida en el virión y negativa o Complementaria a la que se sintetiza en la célula infectada. Si el ARN viral es al mismo tiempo mensajero se le denominará "mensaje", que será opuesto al ARN "antimensaje" que no tiene sentido para la célula. Si el ARN positivo es mensaje, el siguiente paso que sigue a la denudación, es la formación de polirribosomas e inicio de la síntesis de proteínas tempranas. Si el ARN positivo es antimensaje, lo primero que ocurre después de la denudación es la síntesis de un ARN complementario que sea mensaje antes de proceder a la síntesis de proteínas. En este caso el virus casi siempre lleva su propia enzima, la ARN replicasa, como parte integral del virión ya que el ácido nucleico deberá replicarse en ausencia de síntesis de proteína. Una vez que el ARN complementario o mensaje ha sido producido se inicia la síntesis de proteínas tempranas. Por último en el caso de la familia *Retroviridae*, a continuación de la denudación ocurre la síntesis de un ADN complementario al ARN viral, para esto, el virión lleva la llamada transcriptasa reversa o inversa, que da el nombre a la familia y que se encarga del paso de ARN a ADN (36).

e) El siguiente paso es la síntesis de proteínas tempranas que por definición son aquellas que se sintetizan directamente en el ARN progenitor o bien en el ARN complementario del progenitor. Estas proteínas tempranas sintetizadas como es natural en pequeña cantidad sirven para establecer la infección viral en la célula. Algunos virus producen potentes inhibidores de macromoléculas celulares en esta fase (inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas celulares) así como las polimerasas necesarias para el siguiente paso.

f) A continuación se inicia la síntesis de ARN de progenie por medio de la formación de un intermediario de replicación que está formado por una molécula de ARN que es recorrido simultáneamente por varias moléculas de polimerasa y, sobre una sola molécula de ácido nucleico (positiva o negativa) se sintetizan simultáneamente varias moléculas complementarias en varios grados de maduración.

Una vez que se han acumulado suficientes ARN virales se inicia el siguiente paso.

g) Por definición las proteínas tardías son aquellas que se sintetizan en el ARN de progenie y en este caso ocurre una síntesis masiva de proteínas. Estas son generalmente proteínas precursoras, es decir que van a formar parte del virión, de ahí que se requieran en gran cantidad. La mayoría de las cápsides virales están formadas de unidades repetitivas independientemente de la familia de virus de que trate. Una vez que se han sintetizado suficientes proteínas precursoras, ocurre una especialización en la función de los ácidos nucleicos al iniciarse el siguiente paso.

h) Ensamble de nucleocápsides. Este es esencialmente el proceso de agregado de las cápsides junto con el ácido nucleico. En este caso también el proceso es diferentes según el virus de que se trate.

i) La maduración viral consiste en una gemación a través de la membrana celular en el caso de los virus envueltos y en la simple concreción de las nucleocápsides en el caso de los virus desnudos.

j) La citolisis ocurre casi exclusivamente en los virus que maduran en el citoplasma, como el único medio de liberarse; y en el caso de virus envueltos, de maduración en la membrana plasmática, generalmente la citolisis no ocurre o por lo menos es muy lenta dando lugar a la máxima liberación de viriones maduros, que es el último paso del ciclo de virus.

k) Liberación viral, como se explicó antes.

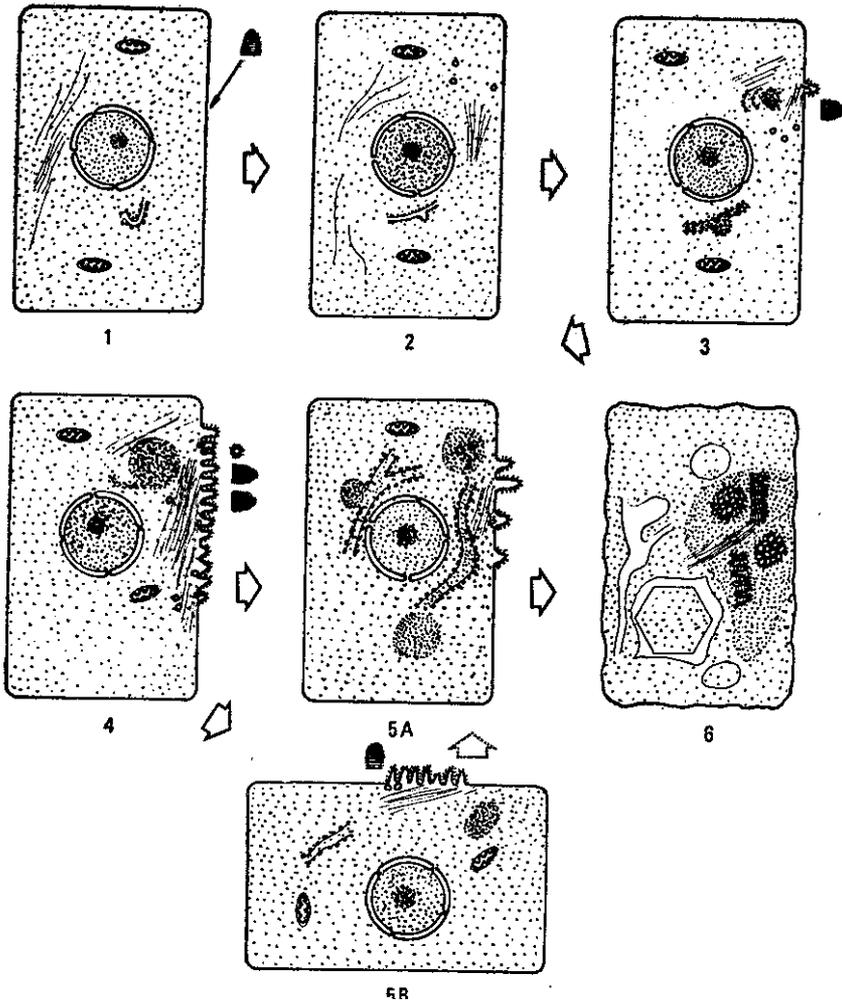
El llamado periodo de latencia de los virus, abarca desde el paso *a* (adsorción) hasta el *k* (liberación viral), en tanto que el llamado periodo o fase de eclipse, es un término puramente microscópico y abarca el periodo en que el virus es invisible hasta que los viriones de la progenie empiezan a ser reconocibles (desde el paso *e* hasta el paso *h* según se ha descrito).

El periodo de Latencia del virus rábico dura un promedio de 16 horas desde el momento en que se adhiere a la célula susceptible hasta que los primeros viriones son liberados al medio ambiente y son detectables (31).

Independientemente del sistema celular, de la cepa de virus y de la multiplicidad empleados, la infección celular progresa en forma asincrónica. Nunca se logra infectar en forma sincronizada a la totalidad de las células a pesar de que se empleen altas mutiplicidades para infectar a los monoestratos (14). Esto se ha tomado como evidencia indirecta de que sólo cierta parte del ciclo celular es susceptible al virus rábico y que por lo tanto sólo las células que están

FIGURA 11

CICLO DE INFECCIÓN DEL VIRUS RÁBICO
(representación esquemática)



INFECCIÓN

2.LATENCIA 1-16hs 3.-

1NFECCION TEMPRANA 16-24

4.- PUNTO MEDIO DE LA INFECCION. EN ESTE PUNTO SE PRODUCE LA MAYOR CANTIDAD DE

VIRUS 24-72 hs 5 A.-INFECCION TARDIA 72 ·120 hs

5 B.-LA CHULA PUEDE CONTINUAR LA PRODUCCION DE

VIRUS 6.- OEGENERACION CHULAR TEMPRANA

en esa fase son infectadas, en tanto que las otras células se muestran refractarias. Una vez establecido el virus en el cultivo, la infección subsecuente de las células, ocurriría tan pronto como fueran llegando al punto del ciclo celular que es susceptible y así llegaría a infectarse todo el monoestrato (14). Otra posibilidad que ha surgido, deriva de la determinación del número de partículas físicas que constituyen una unidad formadora de placa. Esta, es una indicación del número de partículas defectuosas que constituyen un determinado cosechado de virus. La discrepancia observada entre autores, con respecto a una característica del virus rábico, deriva de la falta de homogeneidad de una cosecha a otra (*vide infra*, III-2, 3). Hernández (11) determinó que el número de partículas físicas que constituyen una unidad formadora de placas es de 10 000. Esto no necesariamente significa que hay una partícula vírica completa por cada 10 000 partículas defectuosas. Más bien significa que esa es la eficiencia de detección con que se cuenta en los diferentes sistemas de ensayo del virus rábico. Si suponemos que la prueba de placas detecta una partícula completa por cada diez presentes (lo que constituye un margen más que generoso), entonces la proporción de partículas completas a partículas defectuosas sería de 1: 1000. Aun así, la cantidad de partículas incompletas es muy elevado. Esto condicionaría a un marcado fenómeno de Von Magnus (38). algunos autores lo han observado (11) en tanto que otros consideran que el virus rábico es insensible a él (37). Las partículas incompletas mezcladas con partículas completas condiciona tres tipos de interacción con las células, con tres resultados diferentes: a) Infección de una célula susceptible por una partícula completa solamente. Este tipo de interacción conduce a una infección productiva en la que se producirá la consabida proporción de 1000 partículas T por cada partícula B, b) Infección de una célula susceptible por una partícula completa y una partícula incompleta. Este tipo de interacción conduce al acumulo de material teñible por inmunofluorescencia en el citoplasma pero no a una -infección productiva, y e) Infección de una célula susceptible solamente por una partícula incompleta. Este tipo de interacción no produce cambios en las células pero produce una pérdida temporal de la susceptibilidad. Las tres posibilidades arriba anotadas hacen caso omiso del ciclo celular como factor de susceptibilidad y consideran a la célula susceptible todo el tiempo. Por otra parte, también hace caso omiso de la infección de la misma célula por vanas partículas virales de un mismo tipo; esto último por considerarlo irrelevante en cuanto al resultado de la interacción. La susceptibilidad celular, desde luego, juega un papel que pudiera ser importante (no se ha investigado este aspecto) pero en este caso

solamente produciría confusión. Dado el alto número de partículas virales incompletas por cada partícula completa (mil a uno, según se ha indicado), la posibilidad de una interacción del primer tipo y que conduce a infección productiva es prácticamente nula en altas multiplicidades de infección desde 1 UFP / célula como se han empleado (14), en tanto que a medida que se emplean menores multiplicidades 0.1 UFP/célula o inferiores, las probabilidades aumentan. Si el criterio de evaluación referente al porcentaje de células infectadas es la inmunofluorescencia, la prueba detectará el primer y segundo eventos, *a* y *b*. Si el criterio es producción de virus infectante, la prueba es una medida indirecta del primer evento, *a*, solamente. Es obvio que en ningún caso se logrará el 100% de infección. En altas multiplicidades, por que hay demasiadas partículas incompletas y a bajas multiplicidades, por la sencilla razón de que no hay suficientes partículas completas para ello. La explicación es razonable dado que se ajusta a las observaciones actuales en tanto que predice que aún cuando se empleen células sincronizadas, nunca se logrará una primera infección involucrando al 100% de las células. El tercer tipo de interacción, *e*, implica una resistencia temporal por parte de la célula, debido a que la célula infectada se haya ocupada sintetizando ARN más corto que el viral y que es el que contienen las partículas T. Eventualmente toda esta actividad metabólica inútil, cesa dentro del citoplasma celular y la célula destruye estas estructuras anómalas y recupera su susceptibilidad, justo a tiempo para ser infectada por la segunda generación de virus.

Según evidencia de microscopía de fluorescencia, la adherencia y penetración del virus a la célula susceptible ocurre bastante rápido después de ponerse en contacto (37). Existe una diferencia importante entre cepas. La adsorción tarda de dos a tres horas en virus no adaptados a cultivos celulares, pero tarda unos pocos segundos en virus adaptados (37). Después de la penetración ocurre la desnudación. Esta fase del ciclo del virus rábico no ha sido examinada en detalle. En el caso del virus de la Estomatitis Vesicular (VEV), el ARN purificado no es infeccioso. Baltimore concluyó de estas observaciones, que el ácido nucleico del VEV es "antimensaje" y que requiere de una ARN replicasa (ARN ~polimerasa dependiente del ARN) para la replicación del ácido nucleico (39) que cuando se buscó la enzima, se encontró efectivamente formando parte de virión (40).

El virus de la rabia, también contiene ARN no infeccioso, pero en él no se ha encontrado una ARN replicasa similar (10). Mondragón y Hernández (3) conjeturaron que la replicasa de VEV inactivado con luz ultravioleta podría ser utilizado intracelularmente por el virus rábico

para acortar el periodo de infección. En el sistema de trabajo empleado por estos autores (3) el periodo de latencia del virus rábico fue de 22 horas y del VEV inactivado, fue de 20.5 horas. El efecto observado en un trabajo preliminar como éste, puede explicarse de muchas formas, pero el hecho de que haya habido efecto reproducible es interesante de por sí. El problema no resuelto en el caso del virus rábico, es como ocurre la primera síntesis de proteínas. Con el "antimensaje" viral esta síntesis es imposible; y así, 1) O bien el virus tiene por 10 menos una parte de su genoma como "mensaje" para codificar su ARN replicasa; o 2) Tiene una ARN replicasa que sólo se activa intracitoplásmicamente y los infructuosos esfuerzos que se han hecho para revelar su presencia han sido inadecuados o, por último 3) El virus de alguna forma logra extraer una ARN replicasa del nucleoplasma, llevarla hasta el citoplasma y ahí hace interactuar su ARN con ella.

Independientemente del procedimiento de replicación del ácido nucleico que el virus rábico siga y en la actualidad no se cuenta con evidencia que apunte hacia ninguna de las posibilidades-, el hecho es que ocurre. Una vez que se encuentra el ARN complementario, mensaje, en el citoplasma, se inicia la síntesis de proteínas tempranas. Generalmente las proteínas tempranas de los virus incluyen inhibidores de macromoléculas celulares y polimerasas de ácidos nucleicos. En el caso del virus rábico no ocurre la inhibición de síntesis de proteínas. Quizá la única proteína temprana que produce el virus es la ARN replicasa que necesita para empezar a acuñar unas copias tanto del ARN vira! como del complementario. Tan pronto como se encuentran suficientes mensajes disponibles, se inicia la síntesis de proteínas tardías que son principalmente proteínas precursoras y la enzima ensambladora de que se ha hablado antes. Cabe preguntarse cómo es que los ribosomas celulares logran distinguir ARNm vira! si no ha desaparecido el ARNm celular. Le bastaría al virus producir suficientes copias de ARNm viral para impedir casi por completo la síntesis de proteínas celulares. En realidad, así ocurre. En presencia de la infección, la célula continúa sintetizando proteínas celulares al punto de que es capaz de dividirse aun estando infectada, dando lugar a infecciones crónicas y a cultivos "portadores" del virus (14). La síntesis de proteínas precursoras acumuladas en el interior del retículo endoplásmico granular es el primer cambio visible en las células infectadas (figura 4), esto ocurre entre las ocho y catorce horas después de la infección. A las 16 horas después de la infección, aparecen en el citoplasma las llamadas matrices virales que son los corpúsculos de inclusión detectables por inmunofluorescencia. Como ya se ha

indicado antes (*vide supra*, 11-2) estas matrices virales consisten de nucleocápsides ya ensambladas, o sea que ya ha ocurrido el proceso de formación de las mismas. Simultáneamente a la aparición de las primeras matrices virales empieza a ocurrir la gemación viral en la membrana plasmática de la célula. Los viriones se observan primero en cantidades discretas y más tarde en cantidades verdaderamente extraordinarias (figura 7), esto ocurre entre las 16 y las 24 horas. Si bien éste es el fin del periodo de latencia, no es el fin del ciclo de infección, ya que después de esto ocurren numerosos cambios morfológicos en las células infectadas que ayudarían a explicar observaciones disímboles de otros autores (14, 41). El punto medio de la infección, que va de las 24 a las 72 horas, es cuando la célula infectada produce la mayor cantidad de virus rábico. Este virus está representado en su mayoría por virus defectuosos (11) encontrándose rara vez entre ellos a una partícula de longitud adecuada para constituir una partícula B. (figura 7, en círculo). Después de las 72 horas, la célula puede seguir el camino de dividirse, con lo cual diluye con citoplasma nuevo y en dos células, todos los componentes virales que contiene. Con esto se establece el cultivo crónicamente infectado en el que las células continúan dividiéndose y produciendo virus esporádica o continuamente (11, 14). En caso de que la célula no se divida, por falta de medios nutritivos en el cultivo, etcétera (las células infectadas continúan alimentándose como 10 evidencia las vacuolas pinocitóticas que aún entre los virus, se forman), ocurre el último paso, que es la degeneración celular. La degeneración celular va precedida de una serie de cambios. El sitio de ensamble cambia de la membrana plasmática a estructuras membranosas intracitoplásmicas como son el retículo endoplásmico (figura 9) en vacuolas (figura 6) y por último en sitios libres de membranas, como los bordes de las matrices virales (figura 8). Todos estos sitios anómalos de multiplicación viral producen virus de características poco estudiadas. No se sabe si es virus viable o no. Sokol considera que los virus intracelulares contienen una mayor capacidad hemoaglutinante (10). Probablemente sean virus incompletos, como lo evidencia el alto porcentaje de formas anómalas; formas de L, y formas tubulares con ambos extremos abiertos (12) así como virus más gruesos de lo normal (figuras 8, 9 Y 10). Finalmente el virus deja de madurar en la membrana citoplásmica, la maduración en este sitio cesa, y se transforma en un ciclo de maduración intracitoplásmica exclusivamente (figura 10). Aparentemente este cambio del sitio de maduración viral es asimismo una señal para la destrucción celular. De esta manera, la citólisis sería un proceso muy tardío del ciclo de infección

viral que ocurre después de las 120 horas de infectada la célula. La figura 11 es una representación esquemática del ciclo de infección como se ha descrito, y las micrografías electrónicas (figuras 4 a la 10) son la ilustración gráfica de las observaciones efectuadas.

2. Efecto de la multiplicidad de infección sobre el periodo de latencia

Se ha mencionado que el periodo de latencia de un virus es el lapso que transcurre desde el momento en que el virus infecta a las células y desaparece del medio de cultivo, hasta el momento en que aparece la progenie (*vide supra*, III-1). Se ha mencionado también que el periodo de latencia del virus rábico es de 16 horas. Esto contrasta con el periodo de latencia del virus de la Estomatitis Vesicular, que es de sólo seis horas, o sea diez horas más corto que el del virus rábico.

El periodo de latencia del virus rábico puede ser marcadamente influenciado por la multiplicidad 'de infección, así como por la cepa de virus de que se trate, el grado de adaptación a cultivos celulares y desde luego al tipo de células empleadas en su cultivo y adaptación. Kaplan (31) utilizando la cepa HEP adaptada" células NiI-2 encuentra un periodo de latencia de 16 horas a altas multiplicidades de infección .. Sin embargo, este mismo autor reporta estudios de microscopia electrónica en los que observa virus madurando en grandes cantidades en la membrana de células infectadas seis horas después de la infección (42)'; el sistema célula-virus empleado no es detallado por los autores. Móndebragón y Hernández (3) por otra parte, empleando un sistema de virus V-319 y células 13S clona 3 (derivada de BHK-21) encuentran un periodo de latencia de 22 horas a bajos niveles de multiplicidad; del orden de 0.1 UFP/célula. Si bien es posible causar una variación en el periodo de latencia del virus rábico según la multiplicidad de infección, el impacto de este tipo de procedimientos sobre el virus de progenie producido bajo diferentes condiciones no es muy claro todavía. Es necesario tomar muy en cuenta la multiplicidad de infección que han empleado dos autores diferentes antes de proceder a comparar sus resultados. La diferencia de observaciones muy bien pudiera explicarse con base en este parámetro solamente. Por ejemplo. Hummeler *et al.*, (41) encontraron que el virus HEP en cultivos celulares madura principalmente en el citoplasma y rara vez en la membrana celular, en tanto que Hernández B. (11) encuentra exactamente lo opuesto, o sea que el virus madura principalmente en la membrana plasmática y ocasionalmente en el Citoplasma. Independientemente de algunos errores de técnica que

ya se han señalado antes (5) los dos autores se encuentran en polos opuestos en cuanto a la multiplicidad de infección y por si fuera poco, el tiempo de observación es diferente; Hummeler *et al.*, observan sus células a los cinco días, en tanto que Hernández concluye que el máximo tiempo que dura una célula adherida al monoextracto después de la infección es de 120 horas. ¿ Es sorprendente que Hummeler *et al.*, encuentren formas aberrantes de virus como forma principal de maduración viral?; dadas las circunstancias ciertamente no.

Existen varias explicaciones posibles para que una alta multiplicidad de infección cause una reducción en el periodo de latencia. Una alta multiplicidad de infección aumenta la probabilidad de que una sola célula sea infectada simultáneamente por varias partículas completas. Si éste es el caso, las proteínas tempranas que sean traducidas en los genomas progenitores, se encontrarán en mayor concentración, la iniciación simultánea de la síntesis de ARN en el citoplasma podrá producir en menor tiempo la concentración mínima de este producto viral para iniciar la síntesis de proteínas tardías, lo cual a su vez haría que las proteínas precursoras lleguen a la concentración mínima de auto ensamble y formación de nucleocápsides en las matrices virales. Si bien el resultado de esta situación causaría una reducción en el periodo de latencia, también podrá tener una reducción en el tiempo de sobrevivencia de la célula infectada y el resultado final puede ser una menor producción total de virus viable (Hernández, 1977, observaciones no publicadas) ..

3. *Efecto de los cultivos primarios y líneas celulares sobre el crecimiento del virus*

Aparentemente el virus de la rabia es un virus defectivo. Esto es evidenciado en la actualidad tanto por la longitud de su periodo de latencia como, de acuerdo con la información disponible, por la ausencia (de una ARN reolicasa. Se han señalado ya (*vide supra*, 111-1) las posibles formas en que se podría iniciar el ciclo de infección en la célula. La posibilidad de que el virus rábico "active" o utilice una ARN replicasa celular extrayéndola del nucleoplasma, halla una confirmación indirecta en la observación de que los títulos de virus rábico tienden a ser mayores cuando las células se infectan en suspensión, se siembran en recipientes y se les deja crecer hasta formar un monoestrato confluyente.

Esto parecería indicar que la mitosis celular, al desorganizar temporalmente la estructura nuclear vaciaría el nucleoplasma en el citoplasma y hasta temporalmente disponible la ARN replicasa para

ser empleada por el virus. ¿Cómo es entonces que el virus de la rabia se multiplica en las neuronas si es bien sabido que las neuronas son células especializadas que no se dividen? Esto nos debe servir quizá como advertencia de que no todas las observaciones de cultivos celulares con el virus de la rabia pueden extrapolarse directamente y sin cambio a lo que ocurre en un animal.

Los cultivos celulares tienen varios tipos de influencia sobre el cultivo de virus rábico. En primer término, el tipo de células *per se* tiene una influencia sobre la producción de virus rábico. En general puede decirse que el cultivo de células primarias produce poco virus. Todos los cultivos celulares que han sido estudiados son susceptibles, cuando son células de mamífero (14). El virus rábico ha llegado inclusive a adaptarse a células de serpiente, tortuga y otros animales poikilotermos (14). Las líneas celulares de origen de hámster (*Cricetus aureus*) y modificadas por el virus del polyoma y que por ello han adquirido por así decirlo, la inmortalidad (23,43), las células BHK-21, 13s, Nil-2, etcétera son consistentemente mejores productoras de virus rábico (14). Los cultivos de células primarias, aun en el mejor de los casos producen el 10% del virus de las líneas celulares de hámster. Es conocido el hecho de que las líneas celulares de hámster, contienen estructuras semejantes a virus partículas radiales, en forma normal. No se sabe el papel que estas "partículas radiales" (44) juegan en la función celular, pero bien pudieran ser virus asociados o auxiliares del virus rábico, de la misma manera que el virus de la coriomeningitis linfocitaria del ratón actúa como auxiliar *in vivo* (44).

El pH del medio de cultivo tiene influencia sobre el título final del virus. Los pH alcalinos de 7.6 a 8.0 a inicio de la infección parecen tener un efecto importante en el título final del virus (14). Independientemente del tipo de *Buffer* o tampón del medio de cultivo, el valor de pH es más importante que el tipo de sales involucrado. La suplementación proteica del medio es importante en el título final de virus. En este caso sí hay una influencia definitiva del tipo de proteína involucrado. Es más efectivo, por ejemplo, el hidrolizado de lactoalbúmina que el suero en la alta producción viral (14). La temperatura también tiene influencia en la producción de virus. La producción de virus mejora considerablemente a 32° C., con respecto a la obtenida en el mismo sistema y tiempo a 37° C.

Finalmente, la multiplicidad de infección tiene influencia sobre las células con valores superiores a 10 UFP /célula, en que empieza la producción de interferón. El interferón en el medio de cultivo tiene un efecto muy marcado sobre la producción final de virus (14) (Hernández, observaciones no publicadas).

Con las consideraciones arriba anotadas, en las que se han separado claramente las hipótesis e interpretaciones del autor de los hechos concretos, se espera ayudar a los investigadores que estudian el comportamiento del virus rábico en cultivos celulares y su morfología,

REFERENCIAS

1. Fenner, F. The Classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meeting of the international comitee on toxonomy of viruses in Madrid. September. 1975. *Virology* 71 :371-378, 1976.
2. Shope, R. Rabies virus antigenic relationships. In *The Natural History Of rabies*. G. M. Baer. Ed. Academic Press Inc. Vol. 1: 141-152, 1975.
3. Hernández Baumgarten, E. M., Y Mondragón Vázquez, I. Efecto del virus de la estomatitis vesicular, inactivado con luz ultravioleta, sobre el crecimiento del virus de la rabia en cultivos celulares. *Téc. Peco Méx.* (en prensa)
4. Chang S. H., Obijeski, J. F., and Bishop, Do H. L. RNA transcriptio , by virion polimerases of five rhabdoviruses: *L. Virol.* n 13:652-661, 1974.
5. Hernández Baumgarten, E. Mo La rabia paresiante bovina: definición del problema y metodología de control en *Ciencia Veterinaria*. Editado por R. Moreno Chan. UNAM. México. Vol. 1: 104-131, 1976.
6. Steele, J. H. History 'Of Rabies. In *The Natural Histor'Y01 rabies*. G. M. Baer. Ed. Academic Press Inco Vol. 1: 1-28, 1975.
7. Hummeler, K., Koprowgki, H.; and Wiktor, T. J. Structure ánd develop~ ment of rabies virus in tissue culture. *L. Virol.* 1: 152-170, 1967.
8. Nakai, T., and Howatson, A. F. The fine structure of vesicular stomatitis virus. *Virology*. 35:268-281, 1968.
9. Hackett, A. J., Schaffer, F. L., and Machin, S. A. The separation of in~ fectious and autointerfering particles in VSV virus preparations. *Virology*. 31: 114-119, 1967.
10. SokoI, F., ChemicalI Composition and Srtueture of rabies virus. In *The ~ Natural History of Rabies*. G. M. Baer Ed. Academic Press Inc. Vol. 1: 79-102, 1975.
11. Hernandez Baumgarten, E. Mo Comparative Electron microscope studies of the virus-cell interactions associated with several tissue culture adapted strains of rabies virus. *Dissertation submitted in partial satisfaction to the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Comparative Pathology*. University of California. Davis. Sept. 29, 1972.
12. Murphy, F. A. Morphology and Morphogenesis. In *The Natural History Of rabies*. G. M. Baer Ed. Academic Press Inc. Vol. 1 :33-62, 19750
13. Fides, J. C. The nucleotide sequenee of a viral DNA. *Scientific American*. 237:8:54-67, 1977.
- H. Wiktor, T. J., and Clark, H. F. Growth of rabies virus in cell culture. In *The Natural History of Rabies*, Go M. Baer Ed. Academic Press Inc. Vol. 1: 155-180, 1975,

15. Sokol, F. Composición química del virus rábico. *Memorias del 10° Congreso Internacional de Microbiología*. México, D. F., pp. 551-562, 1971.
16. Schneider, L. Concentration and purification of rabies virus. In *The Natural History Of Rabies*. G. M. Baer Ed. Academic Press Inc. Vol. 1: 125-140, 1975.
17. Baltimore, D., Huang, A. S., and Stampfer, M. Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus. 11. An RNA polymerase in the virion. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 66:572-576, 1970.
18. Negri, A., Beitrag zum studium der aetiologie der Tollwut. *Zentralblatt für Hygiene und Infektious Krankheit.* 43:507-521, 1903.
19. Raplan, M., and Koprowski, H. Eds. *Laboratory' Techniques in Rabies* World Health Organization. Monograph Series No. 23, Third ed. 1973.
20. Iwasaki, Y., Wiktor, T. J., and Koprowski, H. Study on the budding process of rabies virus by electron microscopy. *Laboratory Investigations.* 28: 142-161, 1973.
21. Nishimura, S., Jones, D., Ohtsuka, E., Haytsu, H., Jacob, T., and Khorana, H. The influence of synthetic nucleotide triplets on the incorporation of aminoacids in E. Coli ribosomes. *J. of Molecular biology.* 13:283-301, 1965.
22. Du Praw, E. J. *Gell and molecular Biology*. Academic Press Inc. 1st. 00.1968.
23. Kissling, R. E. Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 98:223-225, 1958.
24. Kissling, R. E., and Reese, D. R. Antirrabies vaccine of tissue culture origin. *J. Immunol.* 91: 362-368, 1963.
25. Davies, M. C., Engbbert, M. E., Sharpless, G. R., and Cabasso, U. J. The electron microscouy of rabies virus in cultures of chicken embryo tissues. *Virology.* 21 :642-651, 1963.
26. Almeida, J. D., Howatson, A. F., Pinteric, L., and Fenji, P. Electron Microscope observations on rabies virus by negative staining. *Virology.* 18: 147-151, 1962.
27. Noguchi, H. Maintenance of rabies virus in embryonic nerve cells. *J. Exp. ~ Med.* 18:314-318, 1913.
28. Levaditi, C. et Schoen, R. Virus rabique et cellules neoplissiques. *Comptes Rendous Academie Scientifique.* París. 202:702-704, 1936.
29. Kanazawa, K. Growth of rabies virus in neoplastic nerve cells. *lap. l. Exp. Med.* 14:519-522, 1936.
30. Parker, R. C., and Hollender, A. J. Propagation of rabies virus in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 60:94-99, 1945.
31. Kaplan, M. H., Wiktor, T. J., Maes, R., Campbell, J. B., and Koprowski. H. Effect of Poly ions on the infectivity of rabies virus in tissue culture: construction of single cycle growth curve. *J. Virol.* 1: 145-151, 1967.
32. Hernández Baumgarten, E. M., y Bijlenga, G. La prueba de micrófocos fluorescentes: una nueva técnica *in vitro* para titulaciones y seroneutralización del virus rábico. *Téc. Pec. Méx.* No. 24, 41-46.
33. Bijlenga, G., and Hernandez Baumgarten, E. M. Adaptation attenuation and plaque purification of a rabies isolate (V-319) from a vampire bat (*Desmodus rotundus*). *British Veterinary Journal* (in the Press). 1977.

34. MacPherson, and Stoker, M. Polyoma transformation of hamster cell clones and investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology*. 16: 147-151, 1952.
35. Baltimore, D. *The classification of nucleic acids according to their intracellular role*. Guest Lecturer to the Regional Conference of the Society of Microbiology of Northern California. San Francisco Air Force Auditorium. 1972.
36. Temin, H. M., and Mizutami, S. RNA dependent DNA Polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*. 226: 1211-1213, 1970.
37. Wiktor, T. J. Growth of rabies virus to a high titre in cell culture systems. *Symposium on Serology and Immunological Standardization*. 1966.
38. Von' Magnus, P. Incomplete forms of Influenza virus. In *Advances in virus research*. Academic Press Inc. Vol. V:59-79, 1958.
39. Baltimore, D., Huang, A.S., and Stampfer, M. Ribonucleic acid synthesis of VSV. I. Lack of infectivity of purified viral RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 66:565-571, 1970.
40. Baltimore, D., Huang, A. S. and Stampfer, M. Ribonucleic Acid Synthesis of VSV. II. An RNA polymerase in the virion. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 66:572-576, 1970.
41. Hummeler, K., Koprowski, H. and Wiktor, T. J. Structure and development of rabies virus in tissue culture. *J. Virol.* 1: 152-170.
42. Expert Committee on rabies, *6th report World Health Organization*. Switzerland, 1973.
43. Diamond, L. Two Spontaneously transformed cell lines derived from the same hamster embryo culture. *International Journal of Cancer*. 2: 1431-52, 1967.
44. Shipman, C., Vander Weide, G. O., and Max, B. I. Relative abundance of radial (R) particles in various cell lines derived from hamsters. *Virology*. 38:707-712, 1969.