

Avances y nuevos horizontes en el control de enfermedades virales del hombre*

Por

Maurice R. Hilleman**

(Recibido para su publicación el 16 de noviembre de 1970)

La práctica de la medicina necesariamente pone énfasis en la curación de las enfermedades, ya sea por medio de tratamientos específicos o de medidas colaterales no específicas. Sin embargo, las enfermedades producidas por virus se encuentran en situación marginal, ya que los beneficios que se puedan derivar de tales tratamientos son muy limitados. Por ello, en la actualidad, todas las medidas para su control son preventivas y no curativas.

Existen tres métodos para el control específico de las enfermedades virales (Cuadro 1): el inmunológico (vacunas), el químico (drogas), y el aumento de la resistencia del huésped (interferón). El control inmunológico ha sido sumamente efectivo, ya que proporciona una protección de duración relativamente larga, pero tiene la desventaja de ser de un espectro viral muy reducido. La resistencia del huésped ejemplificada en el mecanismo del interferón, promete una actividad antiviral de espectro amplio, pero tiene la desventaja de ser de efecto corto. Los métodos químicos hasta ahora han dado resultados pobres en el control de las enfermedades virales y sufren la desventaja de ser de espectro reducido y de requerir una administración continua para mantener su efecto protector.

Es mi propósito revisar estos métodos brevemente, con énfasis especial en los avances contemporáneos y proyecciones futuras. Usaré datos ilustrativos obtenidos en nuestros estudios, cuando sean pertinentes.

* Conferencia presentada en el XXXVIII Congreso Médico Nacional, noviembre 25-29, 1969, San José, Costa Rica.

** Director del Instituto Merck de Investigación Biológica, West Point, Pennsylvania. Profesor de Investigación Viroológica, Universidad de Pennsylvania, Philadelphia, Pa., U.S.A.

CUADRO 1

Tipos de control específico de infecciones virales

Tipo	Eficacia	Características	
		Espectro de protección contra diferentes virus	Duración del efecto protector
Immunológico (Vacunas)	Alta	Muy pequeño	Larga, de por vida
Resistencia del huésped (Interferón e inductores)	Moderada a alta	Muy amplio	Corta
Quimioterapia	Baja a moderada	Pequeño	Muy corta

VACUNAS

Creo que no se puede negar el hecho de que las vacunas han sido sumamente efectivas en el control de las enfermedades virales (Cuadro 2). Al principio de este siglo ya existían vacunas eficaces contra los virus de la viruela y la rabia. La introducción del uso del ratón y del huevo embrionado de gallina para la propagación de los virus facilitó, en la primera mitad del siglo, el desarrollo de vacunas contra la fiebre amarilla, contra la influenza, y una de eficacia limitada contra la encefalitis japonesa de tipo B (que constituyó un serio problema durante la Segunda Guerra Mundial). Al revivir Enders y sus asociados las técnicas de cultivo de tejidos durante la década de 1940, abrieron el camino para el desarrollo de vacunas contra la poliomielitis, tanto de virus muerto como de vivo, así como las de virus muerto contra los adenovirus.

Las técnicas de cultivo de tejido celular hicieron posible el desarrollo de vacunas contra tres enfermedades sistemáticas de la niñez: el sarampión, las paperas y la rubéola.

SARAMPIÓN: Los esfuerzos de control del sarampión tuvieron sus comienzos en 1954 al reportar ENDERS y sus colaboradores la propagación del virus en cultivos celulares (11). Esto condujo al desarrollo de una vacuna licenciada por primera vez para uso general en 1963, reduciéndose desde entonces el sarampión en los Estados Unidos a una incidencia baja y de trivial importancia. Con su uso se han derivado también grandes beneficios en países tropicales en desarrollo, donde la mortalidad por sarampión es alta.

CUADRO 2

Vacunas contra infecciones virales de importancia en el hombre

Vacuna	Fecha aproximada de su descubrimiento
Viruela (viva)	1798
Rabia (muerta)	1885
Fiebre amarilla (viva)	1937
Influenza A y B (muerta)	1943
Encefalitis japonesa B (muerta)	1943
Poliomielitis (muerta)	1953
(viva)	1959
Adenovirus (muerta)	1956
Sarampión (viva)	1963 (licencia)
Parotiditis (viva)	1968 (licencia)
Rubéola (viva)	1969 (licencia)
Complejo respiratorio (Sincíticos respiratorios, parainfluenza 1, 2, 3, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , influenza A y B)	Futuro
Varicela	

Todas las vacunas contra el sarampión causan alguna reacción clínica adversa, especialmente fiebre, y se considera importante reducir estas reacciones al mínimo sin reducir sus propiedades inmunizantes. Para ello se han desarrollado varias vacunas, más atenuadas, principalmente aquellas derivadas de la cepa original Edmonston de Enders (7, 23). En nuestro laboratorio logramos producir una cepa viva más atenuada que llamamos línea Moraten ("more attenuated Enders"). El Cuadro 3 muestra los resultados de la comparación clínica cuidadosa de nuestra vacuna Moraten con la original de Enders y la modificada de Schwarz. La fiebre fue mucho menos frecuente en los grupos que recibieron las vacunas Moraten y Schwarz y hubo significativamente menos elevación de temperatura en los niños que recibieron la vacuna Moraten que en aquellos que recibieron la vacuna original de Enders.

Estos hallazgos fueron confirmados en estudios llevados a cabo por SWARTZ *et al.* (41) bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud. El Cuadro 4 muestra los resultados de estudios de duración de anticuerpos producidos por las tres vacunas. Con las tres vacunas los niveles de anticuerpos se mantuvieron elevados por espacio de más de dos años, lo que está de acuerdo con el patrón de la infección de sarampión adquirida naturalmente. Sin embargo, la persistencia de nivel fue mayor con la vacuna Enders y menor con la Schwarz. A fines de 1968 la vacuna Moraten estaba disponible para uso del público.

CUADRO 3

Porcentaje de niños con fiebre entre el quinto y el duodécimo día después de la vacunación

Vacuna	Porcentaje con temperatura oral máxima (°C)			Total
	38-39.9	39-39.9	40-41.9	38° ó >
Enders	27.8	16.9	1.2	45.9
Moraten	10.3	3.0	1.1	14.4
Schwarz	14.5	6.1	0.8	21.4
Controles*	2.7	1.7	0	4.4

* Personas seropositivas a sarampión antes de la vacunación.

CUADRO 4

Persistencia de anticuerpos contra sarampión dos años después de la administración de diversas vacunas

Vacuna	N° de niños	N° de positivos a los dos años*	Promedio geométrico del título de anticuerpos		
			1 mes	2 años	% declinación
Enders	52	51/52 (98%)	96.4	61.8	36
Moraten	50	49/50 (98%)	47.9	25.4	47
Schwarz	47	45/47 (96%)	50.4	24.6	51

* 100% de los vacunados respondieron serológicamente.

PAROTIDITIS: Aunque generalmente se considera a las paperas como una enfermedad leve de la niñez, puede tener consecuencias serias, especialmente cuando afecta el sistema nervioso. En los Estados Unidos causa un promedio de 46 muertes anuales (2) y un 1% de todos los casos de sordera se atribuye a esta enfermedad (39). La orquitis, la diabetes y las anomalías cardíacas congénitas pueden ser también importantes secuelas.

Los estudios con la cepa Jeryl Lynn, aislada en nuestros laboratorios, condujeron al desarrollo de una vacuna viva contra paperas (21) que obtuvo licencia para el uso general en enero de 1968. La vacuna no produce ninguna reacción clínica e induce la formación de anticuerpos neutralizantes en aproximadamente 98% de los receptores susceptibles. La principal preocupación con respecto a la vacuna contra las paperas ha sido la de la duración de la inmunidad conferida. Hemos observado la actividad protectora cuatro años después de la vacunación y el Cuadro 5 muestra que el nivel de protección fue de 75% en relación a la infección natural de paperas. Desde entonces, y

a través del cuarto año, la inmunidad se ha mantenido en un 100%. Se han mantenido los anticuerpos neutralizantes de parotiditis sin declinación apreciable durante estos cuatro años de estudio, tanto en poblaciones abiertas, como en instituciones, en las que se ha notado la ausencia de paperas durante ese período.

CUADRO 5

Nivel y duración del efecto protector de la vacuna viva contra parotiditis, cepa Jeryl Lynn

Intervalo entre vacunación y prueba	Personas en riesgo				Eficacia protectora
	Vacunadas		No vacunadas		
	Casos Total	Tasa	Casos Total	Tasa	
0-18 meses	5/174	2.9%	133/224	59.4%	95.1%
19-32 meses	0/50	0	67/87	—	100%
			ó >*		
33-44 meses	0/42	0	60/71	—	100%
			ó >*		

* El número real de susceptibles en riesgo no es conocido, pero excede los números indicados.

RUBÉOLA: Aparte de complicaciones ocasionales como neuritis, encefalitis, artritis y trombocitopenia, la rubéola es una enfermedad leve de la niñez. El peligro real consiste en que de 10 a 15% de las mujeres en Estados Unidos y porcentajes mayores en otros países (6), llegan a la madurez sin haber contraído la enfermedad, con la consiguiente alta incidencia de muerte fetal y defectos congénitos al adquirir la infección durante el primer trimestre del embarazo.

Desde 1962 (22, 24), al encontrar que el virus crecía muy bien en cultivos celulares de embrión de pato y que se atenuaba muy rápidamente para uso en el hombre, concentramos nuestros esfuerzos en desarrollar una vacuna contra la rubéola. Llevamos a cabo pruebas de nuestra cepa Benoit en niños, en varios niveles de pasaje, y la vacuna que llamamos de nivel B demostró ser adecuadamente inmunogénica, sin producir reacciones clínicas adversas y sin causar diseminación del virus a contactos susceptibles, proporcionando a la vez altos niveles de inmunidad. También modificamos el virus de Meyer-Parkman (34), atenuado en tejido de riñón de mono, por medio de pasajes en serie en cultivos de embrión de pato, demostrando que era comparable a la vacuna Benoit. Característicamente, la rubéola ocurre en ciclos de aproximadamente siete años y se espera que la próxima epidemia en E.E. U.U. sea en 1970-71. Por esta razón el desarrollo de vacunas fue esencial y decidimos proceder con el virus HPV-77 (Meyer-Parkman) en lugar de nuestra cepa Benoit, para poder usar todos los datos obtenidos por el Dr. Meyer, por nosotros y por otros investigadores. De este modo

se podría poner a la disponibilidad del público una vacuna en un menor tiempo. Se concedió licencia para uso general a la primera vacuna de este tipo (Ate-nuvax) en junio de 1969.

Existen dos posibilidades para el control de la rubéola en mujeres. Una de ellas es vacunar a la mujer adulta, pero se sabe que el virus de la vacuna puede afectar al feto y probablemente tenga efecto teratológico. Por tanto tendría que suministrarse la vacuna a mujeres no embarazadas, teniendo la seguridad de que no llegarán a concebir durante los tres meses siguientes. La ejecución de esta tarea supone un trabajo formidable, ya que 85 a 90% de las mujeres han adquirido inmunidad y no existe un método sencillo ni económico para saber quién es inmune y quién susceptible.

Por esta razón los planes actuales (36) hacen imperativa una inmunización masiva de la población susceptible para eliminar las fuentes de contagio en la mujer embarazada. Con este fin, se está procediendo en los Estados Unidos a vacunar a todos los escolares desde el kindergarten hasta la prepubertad. Este programa comprende aproximadamente 30 millones de niños; tiene buen pronóstico, ya que sería necesario vacunar al azar únicamente a 1/7 de la población susceptible para prevenir una epidemia mayor. En la actualidad nuestros laboratorios producen 2,000,000 de vacunas por mes, lo suficiente para suplir la demanda.

Aunque la vacuna de cepa HPV-77 no causa reacción en niños preadolescentes, produce artritis o artralgia leve y transitoria en aproximadamente el 40% de las mujeres adultas (45). Se ha encontrado que estos síntomas se relacionan con la edad, como sucede en la infección natural (Cuadro 6). Existe una incidencia relativamente baja de involucramiento articular a partir de la edad de 11 años, que aumenta progresivamente hasta los 41 años. Antes de los 21 años la reacción clínica es extremadamente leve y no afecta las actividades normales. Consecuentemente, se puede suministrar la vacuna sin temor en estas edades. En mujeres mayores, la artritis puede ser un impedimento por unos pocos días. En la actualidad estamos tratando de producir una vacuna aun más atenuada para mujeres adultas, aunque su uso en estos casos será limitado. Los resultados preliminares demuestran que los síntomas de artritis y artralgia pueden reducirse notablemente sin menoscabo de la actividad inmunizante.

VACUNAS COMBINADAS: La proliferación de nuevas vacunas virales, y las que se anticipan en un futuro cercano, hacen imperativo desarrollar métodos que simplifiquen su administración, reduzcan los costos y el número de visitas del paciente al médico. Los estudios recientes de nuestro grupo (5, 40) revelan que es factible administrar vacunas combinadas contra sarampión, paperas y rubéola en una dosis única (Cuadro 7). Los estudios en Costa Rica se llevaron a cabo en colaboración con el Centro Internacional de Investigación y Adiestramiento Médico de la Universidad del Estado de Louisiana (LSU-ICMRT) en San José. En este Cuadro se ve que no hubo inhibición significativa en la respuesta de anticuerpos a ninguno de los tres virus cuando se administró la vacuna combinada de sarampión, paperas, y rubéola en una sola dosis, ni cuando la

CUADRO 6

Reacciones clínicas en mujeres vacunadas contra la rubéola (HPV-77 en embrión de pato, 5º pasaje), por edad

Edad (años)	Nº vacunadas	Nº con reacciones clínicas				Artritis-Artralgia
		Artritis	Artralgia	Exantema	Nódulos	
1-4	136	0	0	0	1	0 %
5-10	121	0	0	0	3	0 %
11-14	151	0	7	4	6	5 %
15-16	63	3	2	1	3	8 %
17-18	51	2	6	1	6	16 %
19-20	50	0	5	1	5	10 %
21-24	18	3	2	0	1	28 %
25-29	18	6	1	4	3	39 %
30-41	11	5	2	4	2	64 %

combinación fue de sarampión-paperas o rubéola-paperas. Además, la reacción clínica no fue mayor que cuando se administró únicamente vacuna contra el sarampión. Se han obtenido resultados igualmente excelentes en nuestros estudios con la vacuna combinada contra el sarampión y viruela administrada con pistola "jet" en E. U. A. (46, 47), Africa (26) y Centro América (44).

POLIOMIELITIS: Creo que es justo decir que la introducción de la vacuna contra la poliomiélitis nos ha llevado a una reducción tan drástica de la enfermedad, que generalmente su presencia en ciertas áreas se debe a falta de su aplicación. Aun existen, sin embargo, problemas con esta vacuna. El primero se relaciona con el potencial paratogénico del virus vivo de la vacuna misma, predominantemente del tipo 3, y su aparente incapacidad de inducir inmunidad duradera en algunos casos.

El virus de polio tipo 3 es claramente más lábil, genéticamente, que los otros tipos y puede convertirse en virulento, hasta cierto grado, durante su pasaje en el hombre. Aunque no está definitivamente probado, se sospecha que la vacuna León tipo 3 fue la causante de algunos casos de poliomiélitis en Checoslovaquia, Hungría y Polonia después de vacunar poblaciones en las que la enfermedad no estaba presente. En Dinamarca hubo 6 casos entre 2,7 millones de personas a quienes se les había dado vacuna tipo 3. En Hungría hubo 20 casos sospechosos durante 1961-1965. En los Estados Unidos ya no se suministra la vacuna León tipo 3 a adultos.

Este problema nos ha llevado a buscar una cepa más segura y atenuada para la vacuna tipo 3. Una cepa llamada USOL-D ha sido extensamente estudiada en muchos países bajo los auspicios de la OMS. A pesar de los hallazgos promisorios en pruebas realizadas en animales y en humanos, existe la duda sobre si algunos casos de poliomiélitis, en individuos que estuvieron en contacto con personas vacunadas, fueron causados por esta vacuna, v.gr. un caso en Rusia y 4 en Rumania.

CUADRO 7

Producción de anticuerpos por niños inicialmente seronegativos al recibir vacunas combinadas en dosis única

Combinación	Estudio	Producción de anticuerpos contra:					
		Sarampión		Parotiditis		Rubéola	
		Respuesta	P.G.T.*	Respuesta	P.G.T.*	Respuesta	P.G.T.*
Sarampión (Moraten) Parotiditis (J. Lynn) Rubéola (HPV-77 pato)	EUA	30/30 (100%)	38	29/30 (97%)	6	30/30 (100%)	31
Sarampión (Moraten) Parotiditis (J. Lynn) Rubéola (HPV-77 pato)	Costa Rica	28/30 (93%)	56	27/30 (90%)	19	29/30 (97%)	27
Parotiditis Rubéola	EUA	—	—	30/31 (97%)	7	31/31 (100%)	46
Parotiditis Rubéola	Costa Rica	—	—	103/103 (100%)	8	100/103 (97%)	45
Sarampión Rubéola	EUA	37/38 (97%)	69	37/38 (97%)	7	—	—

*P.G.T. = Promedio geométrico del título.

El segundo problema de la vacuna contra la polio se relaciona con su comportamiento en algunos ambientes. Se está notando un ascenso de polio-mielitis en ciertas áreas tropicales y subtropicales del mundo como en Africa, Sudamérica, el Cercano Oriente y partes de Asia. A veces el problema se relaciona con un mejoramiento del estado sanitario de la población y otras, con falta de vacunación. Más importante, sin embargo, es la falta de respuesta inmune a la vacuna, v.gr. la vacuna no "prende". Esto fue notado por Montefiore en Nigeria donde solamente el 30% de las personas que tomaron vacuna viva respondieron con producción de anticuerpos. Pocas "pegas" fueron también vistas en Singapore, Africa del Sur y Brasil, pero no en otros países. Esto parece indicar que la falta de reacción en esos casos se debe a infección concurrente del tracto intestinal con otros enterovirus que causan interferencia y consecuentemente falta de propagación del virus de la vacuna. También puede haberse debido a desnutrición. La conclusión más lógica parece ser que en la actualidad no todos los problemas de la vacuna contra la poliomiélitis han sido solucionados.

INFLUENZA Y ADYUVANTE 65: Las enfermedades respiratorias causadas por virus de influenza A y B fueron las primeras en ceder a las vacunas. Cuando está adecuadamente constituida, la vacuna corriente acuosa contra la influenza puede reducir la incidencia en un 75 a 90%. Los cambios menores en la estructura antigénica de los virus prevalentes, que ocurren en intervalos de dos a tres años, tienden a reducir su eficacia. Los cambios que se operan en el virus cada diez años, aproximadamente, tales como en el brote reciente de Hong Kong, hacen que las vacunas viejas sean virtualmente inútiles hasta que se las revalide con cepas nuevas.

La protección contra un virus de influenza en particular depende esencialmente de la cantidad correspondiente de anticuerpos existentes en las secreciones respiratorias. Hay dos modos de obtener una máxima respuesta de anticuerpos. Una de ellas es vacunar directamente en el tracto respiratorio, causando así que las células locales productoras de anticuerpos los secreten directamente en el tracto respiratorio, en especial la inmunoglobulina A; este efecto es de corta duración. El otro método es usar un adyuvante inmunológico que estimule la producción de niveles extremadamente altos de anticuerpos circulantes, algunos de los cuales llegarían a las secreciones respiratorias. Hemos escogido la segunda solución por necesitarse en este caso mucho menos antígeno; además se producen niveles muy altos de anticuerpos circulantes que persisten por muchos años. Desarrollamos un adyuvante fácilmente metabolizable (18), que llamamos adyuvante 65, preparando la vacuna acuosa en una emulsión estable de aceite de maní y hemos probado este material extensamente en seres humanos.

La figura 1 muestra que la vacuna acuosa de virus muertos emulsificada con adyuvante 65, generalmente aumenta la respuesta de anticuerpos de 4 a 16 veces, aun cuando la dosis de antígeno fuera reducida cuatro o más veces. Estos aumentos en los anticuerpos pueden persistir por largos períodos, por lo menos

seis años (50) después de administrar virus de influenza A₁ (Fig. 2) y B (Fig. 3).

Es importante notar que la incorporación de vacuna contra influenza en el adyuvante produce un aumento considerable de respuestas y anticuerpos contra diversos serotipos (51). En el ejemplo que se muestra en la Figura 4, la incorporación de vacuna 1962-A2 en adyuvante produjo un nivel alto de anticuerpos contra las formas 1957 y 1964, haciendo que estos cambios antigénicos fueran sin importancia desde el punto de vista inmunológico.

Un ejemplo patente del aumento en la respuesta antigénica se mostró recientemente en el virus de influenza de Hong Kong (54), en el que hubo un cambio mayor (ciclo de 10 años) en la composición antigénica, con la consiguiente diseminación del virus en todo el mundo. El Cuadro 8 muestra que únicamente 1.5% de las personas que recibieron la vacuna acuosa contra influenza, conteniendo vacuna pre-Hong Kong, desarrollaron anticuerpos contra el virus Hong Kong 1968. En contraste, el 55% de las personas que recibieron la misma vacuna con adyuvante 65 respondió favorablemente. Los estímulos de anticuerpos fueron de 1:10 a 1:160. De este modo, se le pudo haber dado una protección sustancial a una proporción significativa de personas, de haberse usado el adyuvante 65 con la vacuna antigua en 1968.

CUADRO 8

Distribución de títulos de anticuerpos contra el virus de influenza Hong Kong dos meses después de la administración de la primera de dos dosis de vacuna acuosa o vacuna con adyuvante 65 en personas inicialmente seronegativas

Título de anticuerpos	Número de personas observadas post inmunización con:	
	Vacuna acuosa (600 CCA)	Vacuna con adyuvante 65 (600 CCA)
< 10	70	30
10	0	5
20	1	17
40	0	9
80	0	4
160	0	2
Nº seroconversiones	<u>1</u> 71	<u>37</u> 67
% seroconvertores	1.4%	55.2%

Otro hecho que aumenta la respuesta de anticuerpos a la vacuna contra influenza con adyuvante 65 fue demostrado recientemente (53), empleando polinucleótidos adicionales que pueden ser también inductores de interferón y que aumentan las respuestas de anticuerpos cuando se administran con el antígeno. En el ejemplo que se muestra en la Figura 5, el adyuvante 65 solo causó

un aumento sustancial de respuesta de anticuerpos a la vacuna contra la influenza en monos. Este efecto se aumentó de 4 a 8 veces cuando a la emulsión se le incorporó un complejo de ácido poliriboinosínico-poliribocitidílico (poli (I:C)). En este caso, la actividad del I:C fue separada y diferente a su capacidad de inducir interferón.

Hasta la fecha se ha administrado vacuna contra influenza en adyuvante 65 a más de 16 mil personas, sin efectos clínicos adversos. En una reciente reevaluación de 504 personas (50) que habían recibido una a tres dosis de vacuna contra influenza con adyuvante 65 en los últimos cinco años, solamente 3 o sea 0.6% mostraron nódulos persistentes muy pequeños, apenas palpables, en el sitio de la inyección.

COMPLEJO RESPIRATORIO: El complejo de enfermedades respiratorias causadas por virus es sumamente diverso y difícil de controlar por medio de vacunas. Consecuentemente, el camino a seguir en la vacuna es el de seleccionar únicamente los pocos agentes que, desde el punto de vista clínico-epidemiológico, se haya comprobado que son susceptibles de ser controlados por las vacunas. Aparte de la influenza, debe estudiarse la vacunación contra los virus sincíticos respiratorios y los de parainfluenza, debido a su importancia en las enfermedades respiratorias en niños. Aunque el *Mycoplasma pneumoniae* es una bacteria, se le ha puesto atención por sus altas tasas de ataque de neumonía atípica en niños y adultos. Estudios extensos en nuestros laboratorios han permitido la preparación de una vacuna purificada de virus muertos contra los sincíticos respiratorios y los de la parainfluenza, de una potencia, medida en animales y niños, igual a la de la vacuna contra influenza (19, 25, 43, 48, 49). La vacuna muerta de *M. pneumoniae* ha sido sustancialmente efectiva en proteger adultos en poblaciones militares y niños contra enfermedades respiratorias (35, 48). Igual que con la influenza, es esencial el producir un máximo nivel de anticuerpos contra estos agentes en las secreciones respiratorias. La administración nasal y el uso del adyuvante inmunológico 65 se están explorando como alternativas al uso de la vacuna acuosa parentérica.

Los rinovirus, que causan el catarro común en adultos y niños, comprenden tal multiplicidad de serotipos que sería inútil pensar en una vacuna práctica. Lo mismo es cierto con respecto a los virus ECHO y Coxsackie, para los cuales sería necesario emplear otras vías. Consideramos que estos son buenos candidatos para un control con interferón de alto espectro.

OTROS VIRUS: Ya es posible propagar los virus de varicela en cultivos de células y se han iniciado las pruebas clínicas exploratorias en busca del nivel apropiado de atenuación para vacunas. La hepatitis viral y la mononucleosis infecciosa (16), que comunmente se cree son causadas por virus, son fuertes candidatos para la investigación de vacunas, pero tales acontecimientos tendrán que esperar al aislamiento y propagación definitivos de los virus en el laboratorio. Hemos seguido los avances recientes de DEINHARDT *et al.* (10) en la transmisión de hepatitis en monos calitrícidos (marmosets) y hemos podido repetir los hallazgos de su extensa labor. La asociación recientemente demostrada de hepa-

titis sérica con un probable virus (3), llamado antígeno Australia, ha aportado una nueva dimensión en la búsqueda del agente etiológico, que sin duda contribuirá a un progreso considerable en un futuro cercano.

QUIMIOTERAPIA

Los éxitos notables alcanzados en la terapéutica antibacteriana después del comienzo de la Segunda Guerra Mundial estimularon la búsqueda de sustancias de valor comparable para la prevención y el tratamiento de las enfermedades virales. Es ya bien conocido que en las infecciones por virus existen acontecimientos en las células que son específicos para el virus y que proveen bases sobre las cuales se podría dirigir la acción de drogas antivirales. Estas incluyen el contacto del virus con la célula, la penetración en la célula, desnudación del ácido nucléico viral, síntesis de ácidos nucléicos virales y de proteínas (estructurales y enzimáticas), y el ensamblaje y liberación de las partículas virales. Desafortunadamente hasta ahora el éxito quemoterapéutico ha sido modesto en relación al esfuerzo. En la actualidad existen tres sustancias o clases de sustancias químicas que puedan considerarse de algún valor clínico. Estas son N-metilisatin-B-tiosemicarbazona (2) en la profilaxis de la viruela, las adamantanaminas (52) en la prevención de la influenza, y los inhibidores metabólicos (incluyendo iodo-deoxiuridina, citosina-arabinósido y trifluorotiuridina) en el tratamiento de la infección de la córnea por virus herpes simplex (28). Las vacunas y el interferón están limitados a la prevención de las enfermedades virales. En la actualidad la quimioterapia constituye la única esperanza, aparte de la prevención, para curar la infección viral de la célula individual. Este hecho por sí solo justifica un esfuerzo continuo y concentrado en la quimioterapia viral.

INTERFERON

La actividad antiviral de amplio espectro del sistema de interferón (17) justifica un esfuerzo concentrado que conduzca a su aplicación útil en el hombre y los animales domésticos. Las dos vías para llevar a cabo esto serían: (a) la administración de interferón exógeno preformado y (b) estimular la producción de interferón endógeno. La información contemporánea indica que la utilización clínica práctica del interferón exógeno sería poco prometedora, debido a varias limitaciones, como la falta de una fuente adecuada, problemas de inocuidad y su alto costo. La vía más prometedora parece ser la de hacer que el cuerpo produzca y distribuya su propio interferón endógeno después de la administración de un inductor no infeccioso y práctico, que fuera inocuo y no antigénico.

Muchas clases de sustancias, incluyendo bacterias, parásitos, virus o polisacáridos, agentes mitogénicos y endotoxinas estimulan la formación de interferón, pero ninguno de ellos promete ser de uso rutinario debido a su toxicidad, antigenicidad, o infecciosidad. Los estudios en nuestros laboratorios se dirigieron hacia la búsqueda del estímulo natural para la inducción de interferón por los

virus, con la esperanza de encontrar un compuesto inductor práctico y adecuado. En estos estudios se encontró que el ácido ribonucleico (ARN) de doble banda, pero no así el de banda sencilla, es altamente activo como inductor de interferón (13, 14, 15, 17, 20, 29, 30, 37, 38, 42).

El esquema siguiente muestra nuestro concepto de la síntesis y acción del interferón.

*Hipótesis del trabajo de la inducción de interferón
y de su interferencia en la síntesis viral*

FASE 1

1. Adosamiento del virus a la célula, penetración y denudación —→
Liberación de ARN de banda simple.
2. El ARN viral se reproduce, formando ARN de doble banda —→
Reacción de alerta.

La transcripción produce interferón.

3. El ADN del huésped transcribe el mensaje que recibe del mARN—→

FASE 2

El interferón liberado llega a nuevas células y por un mecanismo no conocido interfiere con la formación de nuevo ácido nucleico viral, probablemente a nivel de los ribosomas.

El ARN de doble banda se forma durante la reproducción de los virus de tipo ácido ribonucleico. Este ácido nucleico no es normal para la célula y hemos adelantado la teoría de que la presencia de una forma doble repetitiva de ácido ribonucleico en la célula produce una "reacción de alerta", la cual induce a sintetizar interferón. El interferón producido de esta manera invade células nuevas, haciendo que éstas a su vez elaboren otra proteína nueva que inhibe la síntesis de más ácido nucleico viral sin afectar el proceso sintético normal del huésped. Los virus ADN, tales como la vaccinia, producen también ARN de doble banda durante su reproducción, lo que induce la producción de interferón (8). Otros virus ADN posiblemente pueden estimular la formación de interferón por medio de un complejo ADN:ARN formado en el proceso de duplicación.

Se ha encontrado (Cuadro 9) que varias formas de ARN, de origen natural o sintético, inyectadas intravenosamente en conejos, son eficaces inductoras de interferón. Estas incluyen el poli I:C (complejo ácido poliriboinosínico:poliribocitidílico $rI:rC$; $rI_n:rC_n$); el poli A:U (complejo ácido poliriboadenílico:poliribouridílico, $rA:rU$, $rA_n:rU_n$); ANR de viriones de reovirus 3 y el probable micovirus de *Penicillium funiculosum*; la forma reproductiva de colífago MS2 y MU9; ARN del virus del arroz enano y de virus de poliedrosis; auto-acoplamiento alternativo de ribocopolímero poli IC; y ADN:ARN híbrido de bacteriófago. F. A esto se le puede agregar ahora (8, 12) ARN de doble banda de 1 mengovirus, influenza y vaccinia. Los ARN de banda sencilla, de origen natural

o sintético, no fueron activos. Se ha reportado que la "actividad" sumamente baja (1, 4) de poli I y poli C suministrados solos, se debe a la contaminación con un componente de doble banda (15) o al encadenamiento doble por auto-acoplamiento de poli I o poli C promovido por un pH bajo o iones de magnesio (9).

CUADRO 9

Inducción de interferón en conejos por el ARN de doble banda

A c i d o n u c l é i c o		Dosis intravenosa por conejo (μ g)	Títulos individuales de interferón en suero de conejo	
Procedencia o tipo	Naturaleza química			
Poli I:C (rI:rC; rI _n :rC _n) sintético	ARN — doble banda	2	>640, >640	
Poli A:U (rA:rU; rA _n :rU _n) sintético	" " "	25	20, 40	
<i>Penicillium funiculosum</i> (virus ?)	" " "	8	>640, 80	
Reovirus 3, virión	" " "	8	>640, 640	
MS2 colífago (reproductivo)	" " "	8	160, 40	
MU9 colífago mutante (reproductivo)	" " "	2	40	
Virus del arroz enano, virión	" " "	20	>640	
Polihedrosis citoplásmica, virión	" " "	22	160	
Ribocopolímero alternante auto-acoplado	" " "	10	320, >640	
ADN-ARN F-1, fago híbrido	" " ADN-ARN	5	40	
Timo de ternera	ADN — doble banda	200	0	
Poli I sintético	ARN — banda simple	25	0	
Poli C sintético	" " "	20	0	
Colífago MS2, virión	" " "	8	0, 0	
<i>E. coli</i>	" " "	100	0, 0	
Virus de Newcastle, virión	" " "	10	0	
Virus Influenza, virión	" " "	10	0	
Virus del mosaico del tabaco, virión	" " "	40	0	
Ribosoma de levadura	" " "	1000	0	
Levadura soluble	" " "	200	0	
Núcleo de levadura	" " "	100	0	
Ribosoma de hígado de ratón	" " "	200	0	
Hígado bovino soluble	" " "	200	0	

Los mismos ARN de doble banda que resultaron activos en inducir interferón en conejos (Cuadro 10) también produjeron resistencia al virus de la estomatitis vesicular, cuando se agregaron a los cultivos celulares de riñón de conejo en cantidades de microgramos.

CUADRO 10

Inducción de resistencia al virus de la estomatitis vesicular por ARN de doble banda en cultivos de células de riñón de conejo

Procedencia o tipo de ARN de doble banda	Mínimo de ARN requerido para protección (μg)
Poli I:C (rI:rC; rI ⁿ rC ⁿ)	0.002
<i>P. funiculosus</i> (viral ?)	0.30
Reovirus 3, virión	0.04
MS2 colífago (reproductivo)	0.04
MU9 colífago mutante (reproductivo)	0.125 — 1.0
Virus del arroz enano, virión	0.015
Polihedrosis citoplásmica, virión	0.04
Poli I:C sintético (Ribocopolímero alternante auto-acoplado; rIc)	0.003
Fago híbrido de ADN-ARN	0.60

El inductor fue añadido 18 a 24 horas antes del 10 TCID₅₀ del virus de estomatitis vesicular.

De igual modo (Cuadro 11), estos ARN de doble cadena administrados intranasalmente evitaron la muerte en ratones a los que se les había administrado virus PVM por la misma vía.

CUADRO 11

Actividad profiláctica de ARN de doble banda contra infecciones por virus PVM en ratones

Procedencia o tipo del ARN de doble banda*	Dosis intranasal (μg)	Sobrevivencia de ratones (14 días)		
		Nº sobrevivientes Nº examinados	% de sobrevivientes	Exceso de sobrevivencia comparado con los controles %
Poli I:C	4	192/211	91	90
<i>P. funiculosus</i>	20	18/20	90	89
Reovirus 3, virión	16	16/16	100	75
MS2 colífago (reproductivo)	9	9/12	75	65
MU9 colífago mutante (reproductivo)	15	11/15	73	65
Virus del arroz enano, virión	3	13/17	76	89
Poli I:C sintético (ribocopolímero alternante auto-acoplado; rIc)	3	15/15	100	95
Polihedrosis citoplásmica, virión	3	15/15	100	83

* Administrado intranasalmente 3 horas antes del virus, también intranasal.

Aunque pudimos escoger entre muchos ARN de doble banda, decidimos concentrar nuestra atención en el poli I:C. El Cuadro 12 muestra un resumen interpretativo breve de las extensas pruebas preclínicas llevadas a cabo en sistemas de ratón y pollo para medir la actividad profiláctica del poli I:C contra varios virus ARN y ADN. En las pruebas, el inductor fue suministrado siempre antes del virus y se usó una combinación de varias vías de administración. Los mejores resultados fueron obtenidos contra los virus PVM, Columbia SK, vaccinia, y parainfluenza 1 (Sendai). La actividad contra los virus de rabia, sarcoma de Rous e influenza 1 fue débil. No hubo actividad contra los virus de influenza A, A2, fiebre amarilla o el agente Marek (un virus Herpes que causa linfomatosis neural en aves). A esto se le puede agregar un efecto benigno menor contra la neoplasia causada por el adenovirus 12 ó virus de leucemia Friend, pero no a la producida por el virus SV (31, 32, 33).

40

CUADRO 12

Resumen interpretativo de la eficacia de poli I:C contra infecciones en ratones o pollitos

Virus	Vía de administración		Grado de actividad, estimado
	Virus	Polinucleótido	
PVM	Intranasal	Intranasal	Excelente
Columbia SK	Intranasal	Intranasal	Muy bueno
Columbia SK	Intranasal	Intraperitoneal	Muy bueno
Columbia SK	Subcutánea	Intraperitoneal	Muy bueno
Vaccinia	Intravenosa	Intraperitoneal	Muy bueno
Vaccinia	Intravenosa	Subcutánea	Muy bueno
Parainfluenza 1 (Sendai)	Intranasal	Intranasal	Bueno
Parainfluenza 1 (Sendai)	Intranasal	Intranasal	Bueno
Rabia	Intraplantar	Intraperitoneal	Débil
Rabia	Intracerebral	Intraperitoneal	Débil
Sarcoma de Rous	Intraperitoneal	Intraperitoneal	Débil
Influenza B	Intranasal	Intranasal	Débil
Influenza A y A2	Intranasal	Intranasal	Ninguno
Fiebre Amarilla	Intracerebral	Intraperitoneal	Ninguno
Agente de Marek	Intraperitoneal	Intraperitoneal	Ninguno
Agente de Marek	Contacto	Intraperitoneal	Ninguno

Los hallazgos en rinovirus probados con poli I:C en cultivos celulares humanos que aparecen en el Cuadro 13 son muy halagadores. Estos datos, considerados juntos con el alto nivel de actividad demostrado por el poli I:C administrado por vía nasal (Cuadro 12), dan base para creer que el poli I:C sería efectivo contra el catarro común por rinovirus si se le aplicara adecuadamente en humanos.

CUADRO 13

Cantidad mínima de poli I:C requerida para inducir resistencia contra varios virus en cultivos primarios de células de riñón humano y de conejo

Virus	Poli I:C ($\mu\text{g/ml}$)	
	Riñón embrional humano	Riñón de conejo
Rinovirus 1 (JH)	5.6	—
" 11 (68)	0.8	—
" 20 (225)	3.0	—
" 42 (457)	0.8	—
" 47 (425)	0.8	—
Estomatitis vesicular	0.04	0.001
Vaccinia	—	0.001
Herpes simplex	—	0.100

La duración limitada del efecto protector del poli I:C parece indicar que se necesitará una administración repetida. El Cuadro 14 demuestra que el efecto protector de poli I:C en el modelo de virus PVM y ratón, que es un sistema completamente nasal, persiste por seis días, con un declive a bajo nivel al séptimo. Fue de especial interés que el poli I:C tuvo efecto terapéutico como también profiláctico en este sistema, como por ejemplo, cuando se comenzó a usar la droga mucho después de estar establecida la infección viral. En el ejemplo que se muestra se obtuvo protección casi total contra la muerte cuando se administró poli I:C aun dos días después del virus, y se salvó la mitad de los ratones cuando se inició el tratamiento con la droga al tercer día.

EVALUACIÓN DE INOCUIDAD: Ya se ha preparado poli I:C de calidad bien definida para pruebas en humanos. La evaluación de inocuidad se ha llevado a cabo en los sistemas celulares para buscar inducción de alteraciones a nivel celular¹ y también en el animal intacto². El poli I:C, igual que otros inductores ARN de doble banda, no es una sustancia químicamente definida en el sentido ordinario de la palabra. Puede variar grandemente en el tamaño de su banda, y en su estructura secundaria, dependiendo, en parte por lo menos, de su ambiente iónico. Por lo tanto ha sido necesario seleccionar materiales altamente purificados para la prueba, en los que las propiedades químicas y físicas caigan dentro de límites bien definidos y den resultados reproducibles.

¹ Estos datos inéditos fueron desarrollados en nuestros laboratorios por los doctores A. A. Tydell, A. K. Field, C. L. Baugh, M. M. Nemes, M. R. Hilleman y el señor G. P. Lampson.

² Estas investigaciones fueron llevadas a cabo por los doctores R. E. Zwickey, H. M. Peck, W. R. Brown, M. Hite, A. H. Mosher y E. Piperno.

CUADRO 14

Relación del tiempo con el efecto profiláctico de poli I:C contra infecciones de PVM en ratones

Tiempo de administración de poli I:C	Sobrevivencia				Exceso de sobrevivencia (%)
	Ratones tratados con poli I:C		Ratones control placebo		
	Nº sobreviv. Total	Sobrev. %	Nº sobreviv. Total	Sobrev. %	
<i>Antes del virus PVM (profilaxis)</i>					
3 horas	17/17	100	1/32	3.1	96.9
4 días	11/14	71.4	4/32	12.5	58.9
5 días	15/15	100	1/28	3.6	96.4
6 días	14/16	87.5	0/30	0	87.5
7 días	4/17	23.5	1/34	2.9	20.6
8 días	4/17	23.5	0/34	0	23.5
<i>Después del virus PVM (terapéutico)</i>					
1 día	17/17	100	1/24	4.2	95.8
2 días	15/15	100	1/25	4	96.0
3 días	7/17	41.2	0/24	0	41.2
4 días	0/15	0	0/27	0	0

El poli I:C se llevó a través de pasajes continuos con cepas de células diploides humanas en cultivo y no causó ninguna alteración significativa en la tasa de crecimiento, eficiencia de plating, o en su morfología y no produjo atrasos en la ocurrencia natural de senectud de los cultivos. No se alteró el cariotipo de las células, ni hubo transformación neoplásica. Se encontró que la sustancia no era carcinogénica cuando se probó en cobayos recién nacidos, ni indujo crecimiento de tumores HEp-2 en los hamsters. Tampoco causó sensibilización anafiláctica, ni sensibilizó, ni provocó reacciones de tipo Schwartzman en conejos. El complejo poli I:C fue pirogénico en conejos y causó leucopenia, no así los homopolímeros individuales,

Se llevaron a cabo evaluaciones muy extensas de inocuidad de poli I:C en ratones, ratas, perros, monos y cobayos, en dosis y frecuencias variadas y por diferentes vías de administración. Las observaciones abarcaron síntomas físicos, hematológicos, químico-sanguíneos, macropatológicos e histopatológicos. Se notaron efectos tóxicos que no habían sido aparentes en animales empleados en las

pruebas de actividad antiviral. El perro parece ser el más susceptible a las varias especies de efectos tóxicos en la administración repetida de poli I:C. Las manifestaciones tóxicas más significativas tuvieron una base vascular, hepática o hemática. Los síntomas físicos, entre ellos vómito, diarrea (a veces con sangre evidente u oculta), temblores y convulsiones, fueron comunes, especialmente con dosis altas y frecuentes. La patología incluyó cambios necróticos en varios órganos, incluyendo el hígado, la médula ósea, los huesos y el páncreas. Las pruebas de funcionamiento hepático fueron positivas. La fosfatasa alcalina se mostró aumentada y generalmente se notó leucopenia. Algunos animales fueron mucho menos susceptibles que el perro, especialmente el mono, que no mostró más que una elevación en la fosfatasa alcalina dos días después de la primera de tres dosis semanales de 1.0 mg/kg de poli I:C intravenosa. La vía de administración de la droga fue muy importante y las alteraciones bioquímicas fueron casi nulas cuando se usó la vía respiratoria.

A pesar de esta toxicidad, los primeros resultados sugieren que existe una relación favorable entre toxicidad y actividad, especialmente cuando se suministra la droga por vía respiratoria. Debido a ésto, se han iniciado pruebas clínicas cautelosas. Al mismo tiempo, se continúa con manipulaciones moleculares para llegar a mejorar la relación entre la toxicidad y la actividad.

RESUMEN

De los tres métodos existentes para el control específico de las enfermedades virales, las vacunas han proporcionado las mayores ventajas y continúan prometiendo los mejores beneficios para el futuro. Ciertamente, para que su uso sea eficaz, la vacunación debe usarse en aquellas enfermedades en las que el complejo de serotipos de agentes es suficientemente pequeño para permitir una inmunización efectiva. Las vacunas vivas, o las muertas cuando se usan con un adyuvante apropiado, prometen ser altamente efectivas y proporcionar inmunidad duradera.

La mayor ventaja del mecanismo del interferón es su efecto antiviral de amplio espectro y debe considerarse la posibilidad de usarlo contra aquellas enfermedades virales en las que la diversidad de serotipos dificultan el control inmunológico, como en los casos del catarro común causado por los rinovirus y en las infecciones sistemáticas y entéricas causadas por los virus ECHO y Coxsackie. El uso actual de ARN de doble cadena, poli I:C, ofrece la primera esperanza para una aplicación práctica del mecanismo del interferón en la medicina clínica.

En la actualidad el método químico ofrece pocas esperanzas, pero merece dedicarle un esfuerzo concentrado y continuo, ya que constituye la única posibilidad de curación de la célula ya infectada.

SUMMARY

Of the three approaches to specific viral disease control, vaccines have given the greatest reward and continue to promise major benefits for the future.

Surely, the vaccine approach should be used where the complexity of serotypes of agents is sufficiently small to render immunization feasible. Live vaccines or killed vaccines, especially when used with a suitable adjuvant, give promise for highly effective and lasting immunity.

The greatest promise for the interferon mechanism is its broad-spectrum antiviral effect and should be mainly considered for those virus diseases in which the diversity of serotypes defies immunologic control, as in the common cold caused by the rhinoviruses and the systemic and enteric infections caused by the ECHO and Coxsackie viruses. The current application of double-stranded RNA, poly I:C, offers the first hope for a practical application of the interferon mechanism in clinical medicine.

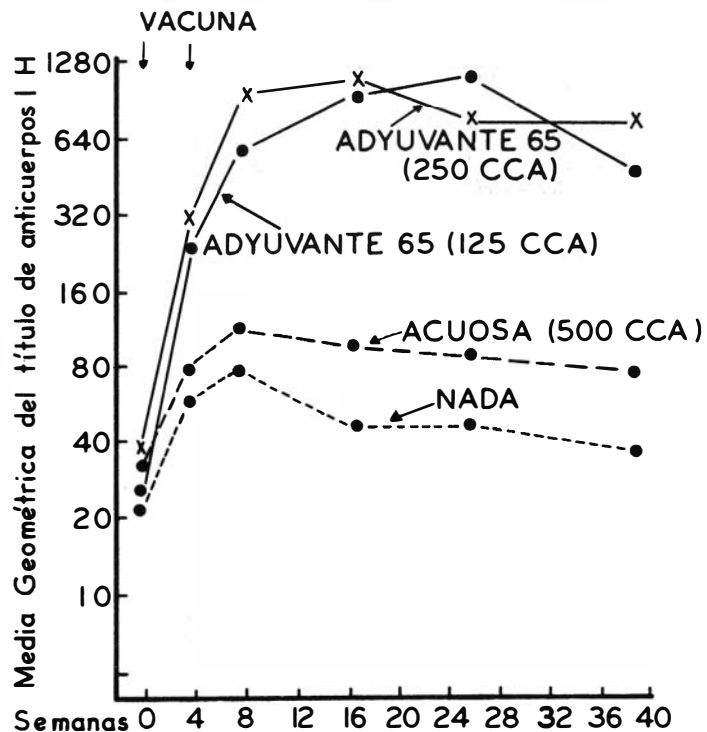
The chemical approach has given little reward to the present but deserves continued concerted effort since here alone, is the approach for cure of the already infected cell.

REFERENCIAS

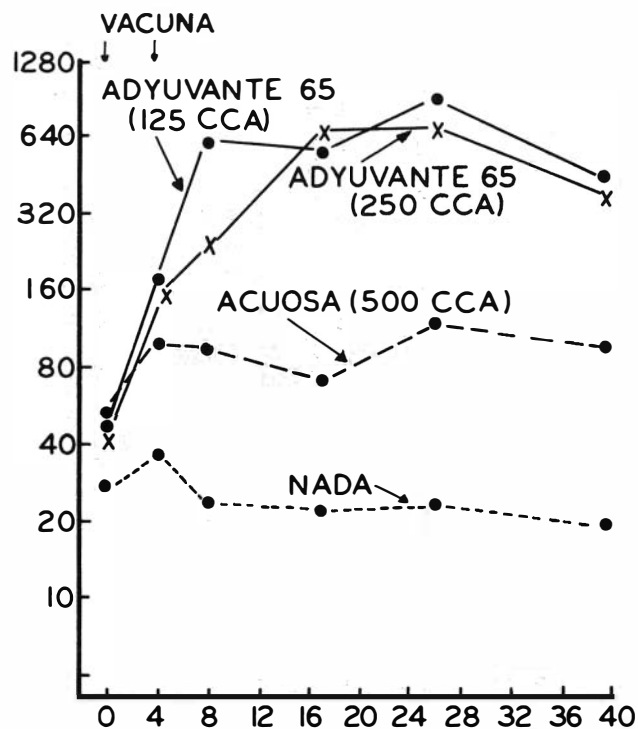
1. BARON, S., N. N. BOGOMOLOVA, H. B. LEVY, A. BILLIAU & C. E. BUCKLER
1968. Induction of interferon by synthetic "single-stranded" RNAs. Comunicación personal reportada en *Interferon Scientific Memorandum* N° 55.
2. BAUER, D. J., L. ST. VINCENT, C. H. KEMPE & A. W. DOWNIE
1963. Prophylactic treatment of smallpox contacts with N-Methylisatin B-thiosemicarbazone (Compound 33T57, Marboran). *Lancet*, 2: 494-496.
3. BLUMBERG, B. S., A. I. SUTNICK & W. T. LONDON
1969. Australia antigen and hepatitis. *J. Amer. Med. Ass.*, 207: 1895-1896.
4. BUCKLER, C. E., A. BILLIAU, F. DIANZANI, C. UHLENDORF & S. BARON
1969. Induction of the interferon mechanism by single-stranded RNA: potentiation by polybasic substances. *Fed. Proc.*, 28: 503.
5. BUYNAK, E. B., R. E. WEIBEL, J. E. WHITMAN, JR., J. STOKES, JR. & M. R. HILLEMANN
1969. Combined live measles, mumps and rubella virus vaccines. *J. Amer. Med. Ass.*, 207: 2259-2262.
6. COCKBURN, W. C.
1969. World aspects of the epidemiology of rubella. *Amer. J. Dis. Child.*, 118: 112-122.

Fig. 1. Respuesta de anticuerpos a virus de influenza A2 y B después de la administración de vacuna de influenza acuosa tetravalente, vacuna de influenza con adyuvante 65 y controles sin aditivos.

CEPA A2/JAPON/305/57

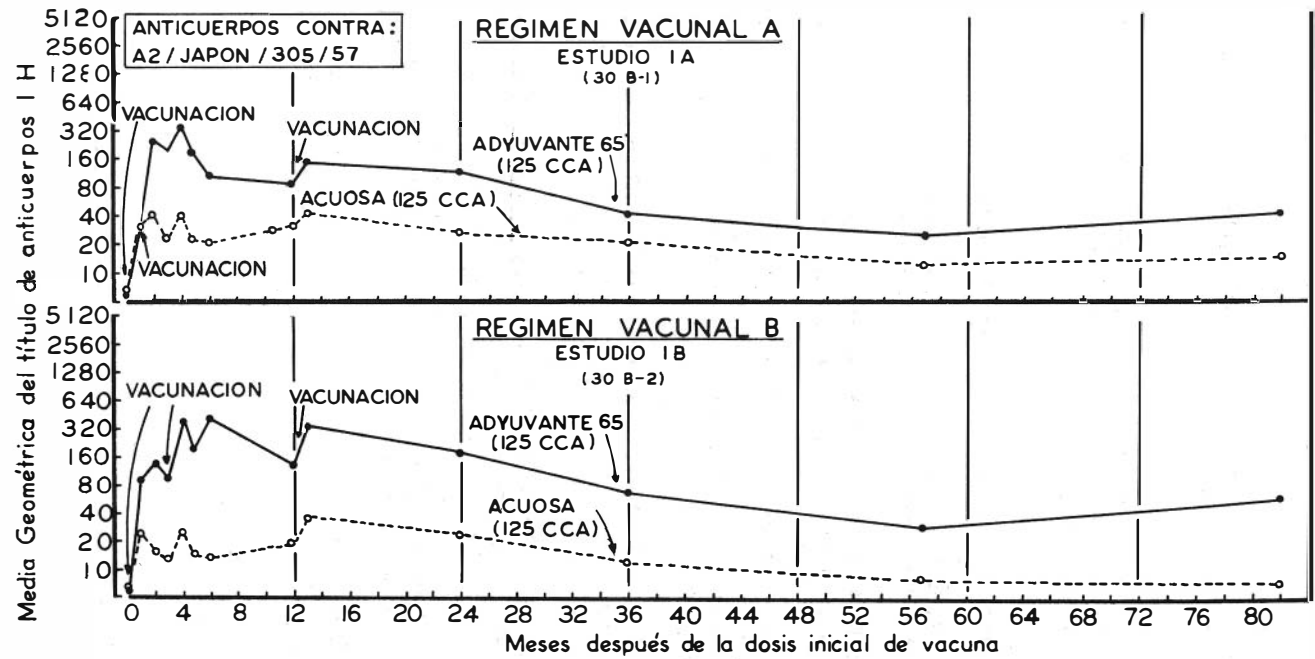


CEPA B/GT. LAKES/1739/54



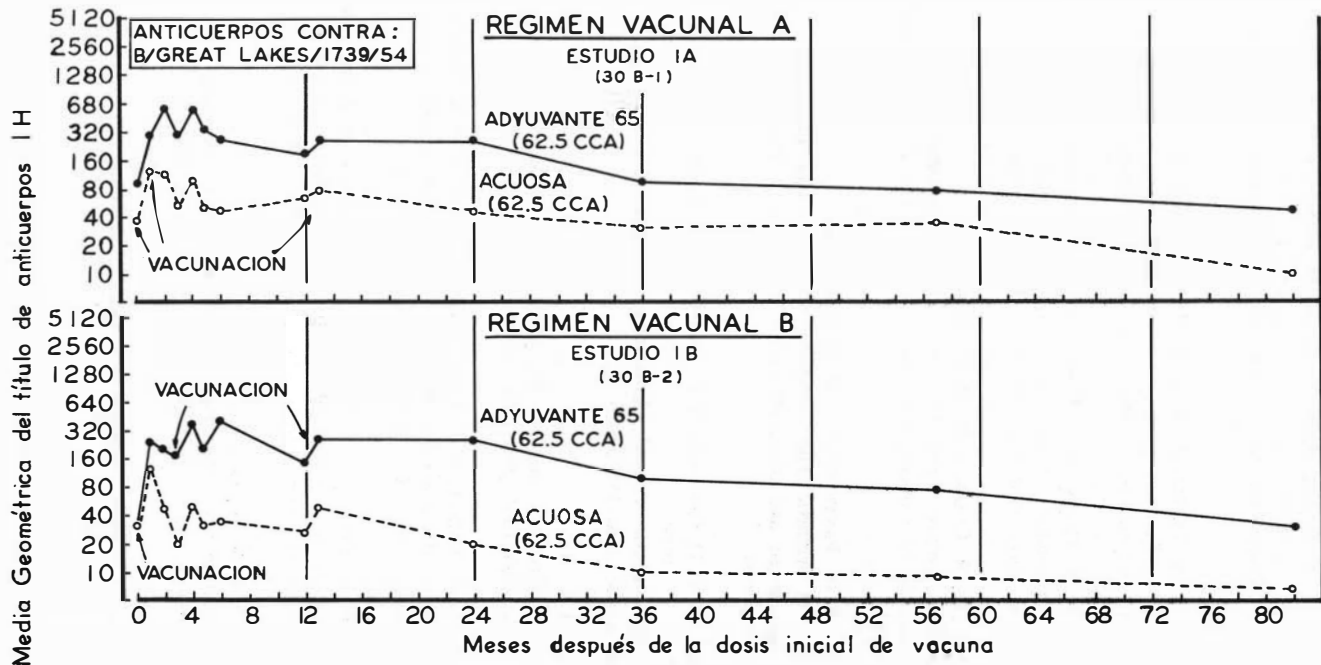
7. COCKBURN, W. C., J. PECENKA & T. SUNDARESAN
1966. WHO-supported comparative studies of attenuated live measles virus vaccines. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 34: 223-231.
8. COLBY, C., & P. H. DUESBERG
1969. Double-stranded RNA in vaccinia virus infected cells. *Nature (Lond.)* 222: 940-944.
9. DE CLERCQ E., & T. C. MERIGAN
1969. Requirement of a stable secondary structure for the antiviral activity of polynucleotides. *Nature (Lond.)*, 222: 1148-1152.
10. DEINHARDT, F., A. W. HOMES, R. B. CAPPS & H. POPPER
1967. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passages, and descriptions of liver lesions. *J. Exp. Med.*, 125: 673-688.
11. ENDERS, J. F., S. L. KATZ, M. V. MILANOVIC & A. HOLLOWAY
1960. Studies on an attenuated measles-virus vaccine. I. Development and preparation of the vaccine: technics for assay of effects of vaccination. *New Engl. J. Med.*, 263: 153-184.
12. FALCOFF, R., & E. T. FALCOFF
1969. Induction de la synthèse d'interferon par des RNA bicaténaires. I. Application à l'étude du cycle de multiplication du virus mengo. *Biochim. Biophys. Acta.* 182: 501-510.
13. FIELD, A. K., G. P. LAMPSON, A. A. TYTELL, M. M. NEMES, & M. R. HILLEMAN
1967. Inducers of interferon and host resistance. IV. Double-stranded replicative form RNA (MS2-RF-RNA) from *E. coli* infected with MS2 coliphage. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 58: 2102-2108.
14. FIELD, A. K., A. A. TYTELL, G. P. LAMPSON & M. R. HILLEMAN
1967. Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 58: 1004-1010.
15. FIELD, A. K., A. A. TYTELL, G. P. LAMPSON & M. R. HILLEMAN
1968. Inducers of interferon and host resistance. V. *In vitro* studies. *Proc. Nat. Acad. Sci., (Wash.)*, 61: 340-346.
16. HENLE, G., W. HENLE & V. DIEHL
1968. Relation of Burkitt's tumor associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc. Nat. Acad. Sci., (Wash.)*, 59: 94-101.

Fig. 2. Observación prolongada de anticuerpos IH contra vacuna de virus de influenza A2/Japón/305/57 en humanos en fórmula acuosa o con adyuvante 65.



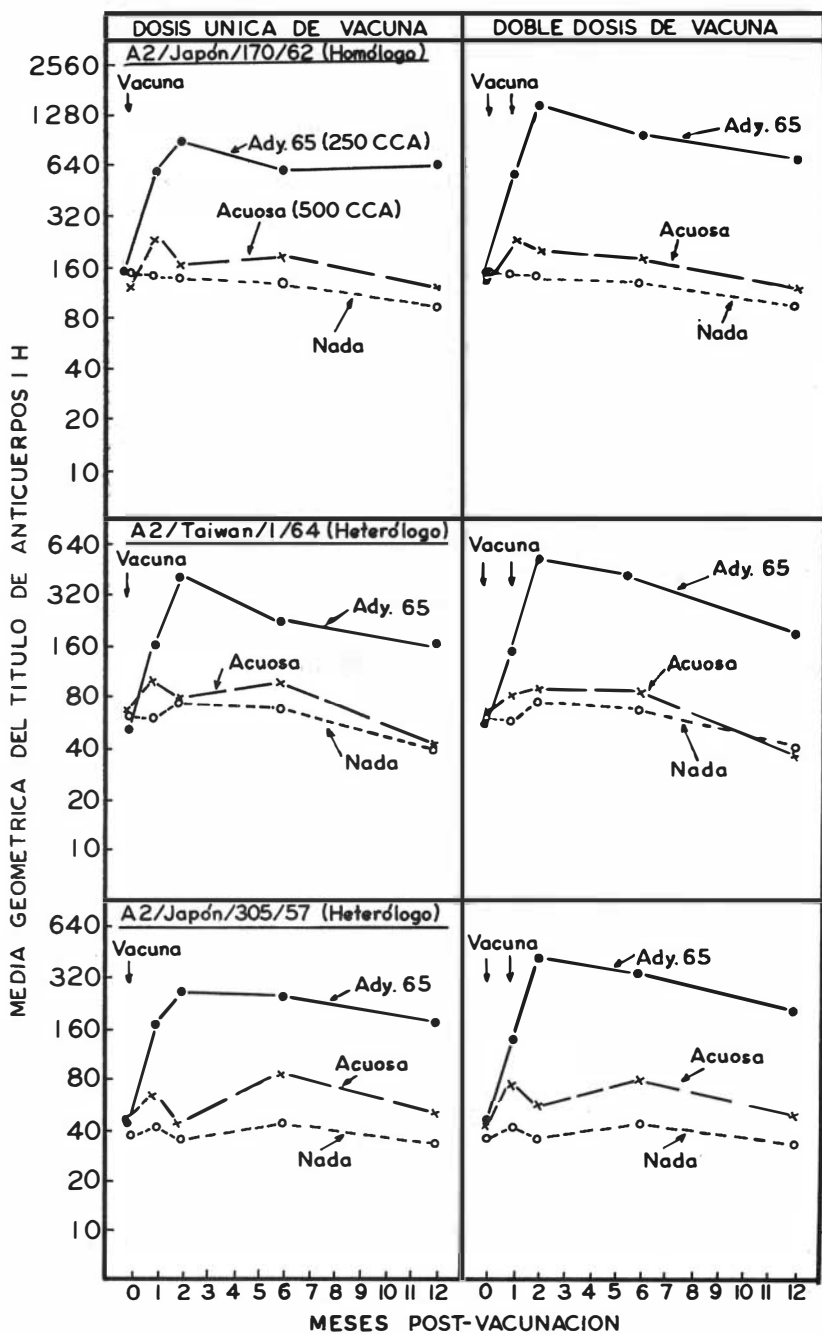
17. HILLEMANN, M. R.
1963. Interferon in prospect and perspective. *J. Cell. Com. Physiol.*, 62: 337-353.
18. HILLEMANN, M. R.
1966. Critical appraisal of emulsified oil adjuvants applied to viral vaccines. *Progr. Med. Virol.*, 8: 131-182.
19. HILLEMANN, M. R.
1967. Cause and immunologic control of viral respiratory illnesses. p. 119-138. *In: Infektionskrankheiten. IVth International Congress for Infectious Diseases*, F. K. Schttauer-Verlag, Stuttgart.
20. HILLEMANN, M. R.
1968. Interferon and utilization. *J. Cell. Physiol.* 71: 43-60.
21. HILLEMANN, M. R., E. B. BUYNACK, R. E. WEIBEL, & J. STOKES, JR.
1968. Live, attenuated mumps virus vaccine. *New Eng. J. Med.*, 278: 227-232.
22. HILLEMANN, M. R., E. B. BUYNACK, R. E. WEIBEL, & J. STOKES, JR.
1968. Live, attenuated rubella virus vaccine. *New Eng. J. Med.*, 279: 300-303.
23. HILLEMANN, M. R., E. B. BUYNACK, R. E. WEIBEL, J. STOKES, JR., J. E. WHITMAN, JR. & M. B. LEAGUS
1968. Development and evaluation of the Moraten measles virus vaccine. *J. Amer. Med. Ass.*, 206: 587-590.
24. HILLEMANN, M. R., E. B. BUYNACK, J. E. WHITMAN, JR., R. E. WEIBEL & J. STOKES, JR.
1969. Live attenuated rubella virus vaccines. Experiences with duck embryo cell preparations. *Amer. J. Dis. Child.*, 118: 166-171.
25. HILLEMANN, M. R., R. E. WEIBEL, A. F. WOODHOUR, J. STOKES, JR., C. C. MASCOLI, M. B. LEAGUS, A. A. TYTELL & P. P. VELLA
1967. Development and field evaluation of combined polyvalent respiratory virus vaccines, p. 141-154: *In: First International Conference on Vaccines Against Viral and Rickettsial Diseases of Man*, Pan American Health Organization Scientific Publication N° 147, Washington, D. C.
26. KALABUS, F., H. SANSARRICQ, P. LAMBIN, J. PROULX, & M. R. HILLEMANN,
1967. Standardization and mass application of combined live measles-smallpox vaccine in Upper Volta. *Amer. J. Epid.*, 86: 93-111.
27. KARCHMER, A. W.
1969. Comunicación personal.

Fig. 3. Observación prolongada de anticuerpos IH contra vacuna de virus de influenza B/Gt. Lakes/1739/54 en humanos en fórmula acuosa o con adyuvante 65.



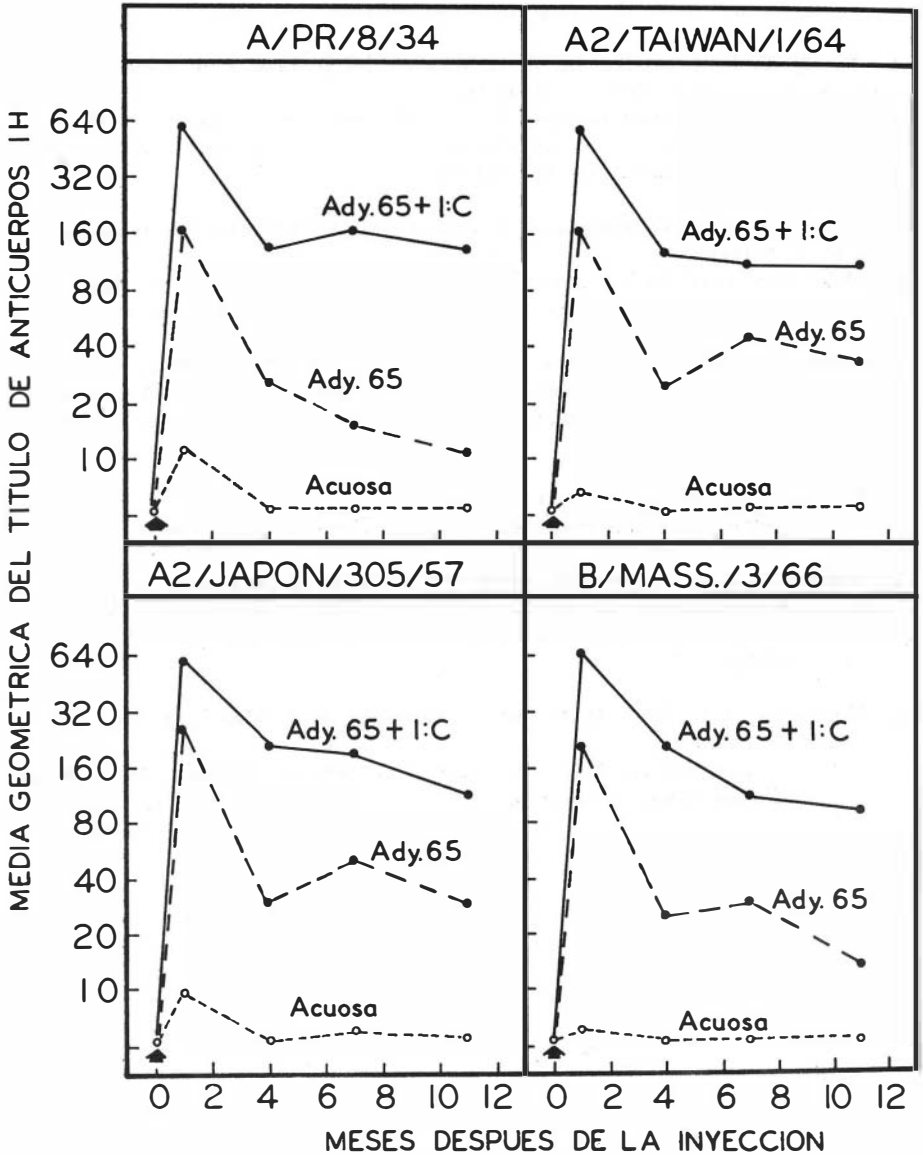
28. KAUFMAN, H. E.
1965. Problems in virus chemotherapy. *Progr. Med. Virol.* 7: 116-159.
29. LAMPSON, G. P., A. A. TYTELL, A. K. FIELD, M. M. NEMES, & M. R. HILLEMANN
1967. Inducers of interferon and host resistance. I. double stranded RNA from extracts of *Penicillium funiculosum*. *Proc. Nat. Acad. Sci., (Wash.)*, 58: 782-789.
30. LAMPSON, G. P., A. A. TYTELL, A. K. FIELD, M. M. NEMES, & M. R. HILLEMANN
1969. Influence of polyamines on induction of interferon and resistance to viruses by synthetic polynucleotides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, en prensa.
31. LARSON, V. M., W. R. CLARK, G. E. DAGLE, & M. R. HILLEMANN
1969. Influence of synthetic double-stranded ribonucleic acid, Poly I:C, on Friend leukemia in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, en prensa.
32. LARSON, V. M., W. R. CLARK, & M. R. HILLEMANN
1969. Influence of synthetic (poly I:C) and viral double-stranded ribonucleic acids on adenovirus 12 oncogenesis in hamsters. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 131: 1002-1011.
33. LARSON, V. M., P. N. PANTELEAKIS & M. R. HILLEMANN
1969. Influence of synthetic double-stranded ribonucleic acid (Poly I:C) on SV₄₀ viral oncogenesis and transplant tumor in hamsters. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, en prensa.
34. MEYER, H. M., JR., P. D. PARKMAN, T. E. HOBBS, H. E. LARSON, W. J. DAVIS, J. P. SIMSARIAN & H. E. HOPPS
1969. Attenuated rubella viruses. Laboratory and clinical characteristics. *Amer. J. Dis. Child.*, 118: 155-165.
35. MOGABGAB, W. J.
1968. Protective effects of inactive *Mycoplasma pneumoniae* vaccine in military Personnel, 1964-1966. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 97: 359-365.
36. NEMES, M. M., A. A. TYTELL, G. P. LAMPSON, A. K. FIELD, & M. R. HILLEMANN
1969. Inducers of interferon and host resistance. VI. Antiviral efficacy of poly I:C in animal models. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, en prensa.
37. NEMES, M. M., A. A. TYTELL, G. P. LAMPSON, A. K. FIELD, & M. R. HILLEMANN
1969. Inducers of interferon and host resistance VII. Antiviral efficacy of double-stranded RNA of natural origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, en prensa.
38. PUBLIC HEALTH SERVICE ADVISORY COMMITTEE
1969. Recommendation of the Public Health Service Advisory Committee on immunization practices. *Amer. J. Dis. Child.*, 118: 397-399.

Fig. 4. Ampliación de la respuesta de anticuerpos a variantes antigénicas de influenza A2 usando vacuna bivalente A y B en adyuvante 65 y controles sin aditivo.



39. SHAMBAUGH, G. E., E. W. HAGENS, J. W. HOLDERMAN & R. W. WATKINS
1928. Physical causes of deafness: report of committee, Division of Medical Sciences, National Research Council. II. Statistical studies of the children in the public schools for the deaf. *Arch. Otolaryng.*, 7: 424-513.
40. STOKES, J., JR., R. E. WEIBEL, V. M. VILLAREJOS, J. A. ARGUEDAS, E. B. BUYNAC & M. R. HILLEMANN
1969. Trivalent combined measles-mumps-rubella vaccine. Findings in clinical-laboratory studies. *J. Amer. Med. Ass.*, en prensa.
41. SWARTZ, T., W. KLINBERG, M. NISHMI, N. GOLDBLUM, C. GERICHER, Y. YOFE, & W. C. COCKBURN
1968. A comparative study of four live measles vaccines in Israel. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 39: 285-293.
42. TYTELL, A. A., G. P. LAMPSON, A. K. FIELD, & M. R. HILLEMANN
1967. Inducers of interferon and host resistance. III. Double-stranded RNA from reovirus type 3 virions (reo 3-RNA). *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 58: 1719-1722.
43. VELLA, P. P., R. E. WEIBEL, A. F. WOODHOUR, C. C. MASCOLI, M. B. LEAGUS, O. L. OTTENSohn, J. STOKES, JR. & M. R. HILLEMANN
1969. Respiratory virus vaccine among preschool children in families, 1967-1968. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 99: 526-541.
44. VILLAREJOS, V. M., A. RODRÍGUEZ-ARAGONÉS, N. GUNERA, J. A. ARGUEDAS, E. B. BUYNAC & M. R. HILLEMANN
1969. Field evaluation of combined more attenuated live measles (Moraten)-smallpox vaccine in Honduras and Costa Rica. *Amer. J. Epid.*, en prensa.
45. WEIBEL, R. E., J. STOKES, JR., E. B. BUYNAC & M. R. HILLEMANN
1969. Live rubella vaccines in adults and children. HPV-77 and Merck-Benoit strains. *Amer. J. Dis. Child.*, 118: 226-229.
46. WEIBEL, R. E., J. STOKES, JR., E. B. BUYNAC, M. R. HILLEMANN & P. W. GRUNMEIER
1966. Clinical-laboratory experiences with combined dried live measles-smallpox vaccine. *Pediatrics*, 37: 913-920.
47. WEIBEL, R. E., J. STOKES, JR., E. B. BUYNAC, M. B. LEAGUS & M. R. HILLEMANN
1969. Clinical laboratory experience with a more attenuated Enders' measles virus vaccine (Moraten) combined with smallpox vaccine. *Pediatrics*, 43: 567-575.

Fig. 5. Respuesta de anticuerpos en monos Grivet inyectados con vacuna tetravalente de influenza en fórmula acuosa, con adyuvante 65 y con adyuvante 65 + polinucleótido.



48. WEIBEL, R. E., J. STOKES, JR., M. B. LEAGUS, C. C. MASCOLI & M. R. HILLEMANN
1966. Respiratory virus vaccines. V. Field evaluation for efficacy of heptavalent vaccine. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 94: 362-379.
49. WEIBEL, R. E., J. STOKES, JR., C. C. MASCOLI, M. B. LEAGUS, A. F. WOODHOUR, A. A. TYTELL, P. P. VELLA & M. R. HILLEMANN
1967. Respiratory virus vaccines. VII. Field evaluation of respiratory syncytial, parainfluenza 1, 2, 3, and *Mycoplasma pneumoniae* vaccines, 1965 to 1966. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 96: 724-739.
50. WEIBEL, R. E., A. F. WOODHOUR, J. STOKES, JR., A. FRIEDMAN, W. J. MCALLEER & M. R. HILLEMANN
1969. New metabolizable immunologic adjuvant for human use. X. Long-term serologic and clinical follow-up *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, en prensa.
51. WEIBEL, R. E., A. F. WOODHOUR, J. STOKES, JR., D. P. METZGAR & M. R. HILLEMANN
1967. New metabolizable immunologic adjuvant for human use. Evaluation of highly purified influenza-virus vaccine in adjuvant 65. *New Engl. J. Med.*, 276: 78-84.
52. WENDEL, H. A., M. T. SNYDER & S. PELL
1966. Trial of amantadine in epidemic influenza. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 7: 38-43.
53. WOODHOUR, A. F., A. FRIEDMAN, A. A. TYTELL & M. R. HILLEMANN
1969. Hyperpotentiation by synthetic double-stranded RNA of antibody responses to influenza virus vaccine in adjuvant 65. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 131: 809-817.
54. WOODHOUR, A. F., W. J. MCALLEER, A. FRIEDMAN, R. E. WEIBEL, J. STOKES, JR. & M. R. HILLEMANN
1969. Antibody response in man to Hong Kong influenza following 1967 formula influenza vaccine in adjuvant 65. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 131: 501-506.