

## Tesis de Posgrado

# Acción de inhibidores virales sobre infecciones herpéticas in vivo e in vitro

Puricelli, Lydia Inés

1979

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Puricelli, Lydia Inés. (1979). Acción de inhibidores virales sobre infecciones herpéticas in vivo e in vitro. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1586\\_Puricelli.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1586_Puricelli.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Puricelli, Lydia Inés. "Acción de inhibidores virales sobre infecciones herpéticas in vivo e in vitro". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1979.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1586\\_Puricelli.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1586_Puricelli.pdf)

1586  
42

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires

ACCIÓN DE INHIBIDORES VIRALES SOBRE INFECCIONES  
HERPÉTICAS IN VIVO E IN VITRO.

Lydia Inés Puricelli

Tesis presentada para optar por el título de  
Doctor en Ciencias Biológicas.

- 1979 -

1586<sup>u</sup>  
42

Director de Tesis:

Dra. Eugenia S. de Lustig.

Consejero de Estudios:

Dra. Celia Coto de Ravaschino.

A mis padres quienes  
me alentaron y  
apoyaron en todo  
momento.

Agradezco especialmente la paciencia,  
dedicación y afecto de mi tutora,  
Dra. Eugenia S. de Lustig.

Agradezco la colaboración y apoyo de los  
Dres. Nuria C. de de la Peña, Alberto Diaz,  
Elisa Bal de Kier Joffé, C. Coto de Ravaschino  
y a todo el personal del Servicio de Cultivo  
de Tejidos del Instituto de Oncología "Angel  
H. Roffo, al Sr. Isidoro Tolcachir y en espe-  
cial a la Srta. Lidia Castelluccio.



INDICE-2-

112. . . . . Otras actividades del IF:
113. . . . . . . . . . Papel del IF en la regulación del sistema inmune.
114. . . . . . . . . . Acción del IF como inhibidor del crecimiento celular.
116. . . . . . . . . . Diferencia entre la actividad antiviral y la inhibitoria del crecimiento.
118. . . . . . . . . . Uso terapéutico del IF:
121. . . . . . . . . . Tratamiento de lesiones herpéticas con IF.
123. . . . . . . . . . Bibliografía.
132. . Parte III: Inmunoglobulina A Secretoria (IgA-S)
133. . . . . . . . . . Introducción.
136. . . . . . . . . . Características generales de la IgA.
138. . . . . . . . . . Estructura de la IgA-S.
142. . . . . . . . . . Propiedades físico-químicas de la IgA-S.
145. . . . . . . . . . Biosíntesis de la IgA-S.
149. . . . . . . . . . Fuente de estimulación antigénica.
151. . . . . . . . . . Acción biológica de la IgA-S
154. . . . . . . . . . . . . . IgA-S y Virus Herpes.
155. . . . . . . . . . . . . . Bibliografía.
156. . Parte IV: Ensayo Experimental.
157. . . . . . . . . . A: Interferón Humano: Preparación y Titulación.
161. . . . . . . . . . B: Sensibilidad de HSV a la acción antiviral del IF humano de leucocitos.
168. . . . . . . . . . C: Preparación de la IgA-S.
170. . . . . . . . . . D: Capacidad anti-HSV de la IgA-S.
172. . . . . . . . . . E: Estudio Morfológico de Células RK-13 infectadas con HSV
181. . . . . . . . . . F: Efecto antimitótico del Interferón humano de leucocitos.

INDICE - 3 -

189. . . . . Bibliografía.

193. . Parte V: Ensayo Clínico.

194. . . . . Tratamiento de lesiones a Herpes  
simplex faciales y genitales.

209 . . . . . Bibliografía.-



## INTRODUCCION

Las enfermedades virales representan un desafío ya que a excepción de las vacunas que son preventivas y específicas no hay terapias eficaces de amplio efecto.

El tratamiento y también la prevención de las infecciones a Herpes simplex son dificultosas por la poca información acerca de la evolución natural de la enfermedad y de los procesos inmunológicos que participan en la misma.

Las infecciones herpéticas ampliamente difundidas tanto en el hombre como en los animales son causantes de enfermedades recurrentes y por permanecer en estado de latencia los virus herpes son firmes candidatos a ser oncogénicos.

Los datos epidemiológicos y morfológicos han asociado al HSV tipo 2 como causante etiológico del cancer de cuello de útero en el hombre. El HSV-tipo 1 se ha asociado a algunos tipos de cancer de cabeza y cuello. Esto indica la necesidad de combatir estos virus desde el momento de su aparición.

El Interferón es un inhibidor viral tanto de virus ARN como ADN. En los últimos años se ha comenzado a utilizarlo con éxito con fines terapéuticos en infecciones virales agudas y crónicas debido a su universalidad y a su escasa toxicidad. Esta posibilidad surgió luego del mejoramiento de las técnicas de producción masiva y de purificación de interferón.

La Inmunoglobulina A Secretoria tiene actividad anticuerpo contra muchos microorganismos a los que el hombre está expuesto y tiene un importante papel protectoro contra ciertas infecciones bacterianas y virales.

Los datos obtenidos in vitro indican que la replicación de los virus Herpes es inhibida por el interferón y que la IgA-S tiene actividad neutralizante respecto de HSV.

En este trabajo se propone un tratamiento tópico de interferón humano adicionado de IgA-S en lesiones mucocutáneas herpéticas. Los resultados obtenidos ofrecen una terapia no tóxica que añade a las propiedades antivirales intracelulares del Interferon, las propiedades anti-inflamatorias, bactericidas y virustáticas de la IgA-S.

Parte I

VIRUS HERPES SIMPLEX

ESTRUCTURA, REPLICACION IN VIVO  
E IN VITRO.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO,  
PREVENCION Y TERAPIA.

## INTRODUCCION

La enfermedad herpética fue descrita entre los años 120-200 D.C. por Galeno, como un estado inflamatorio de la epidermis que se manifiesta por la presencia de pequeñas vesículas agrupadas. El nombre "herpes" proviene del griego y significa arrastrarse.

En 1873 Vidal estableció el carácter infeccioso de la enfermedad herpética, confirmado luego con una experiencia de autoinoculación realizada por un médico de Berlín, el Dr. Schnabel.

Austruc en 1736 describe las infecciones herpéticas genitales y en 1896 Unna la considera una enfermedad venérea por haberla encontrado con mayor asiduidad entre las prostitutas.

En 1912 Grüter aisló el agente infeccioso de una córnea de conejo con queratitis herpética. Posteriormente en 1919, Löwenstein repite los trabajos de Grüter y logra, además, aislar virus de lesiones de piel.

Recien en 1921 Lipschutz reconoce la existencia de dos tipos de virus Herpes simplex, que aunque relacionados difieren en sus propiedades biológicas y antigénicas. Se distinguió el virus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) responsable de la mayoría de las lesiones orales y el Herpes simplex tipo 2 (HSV-2) causante de la gran parte de las lesiones genitales. Las características sobresalientes de los virus Herpes son su capacidad de producir lesiones en la presencia de anticuerpos (Ac) específicos y su forma de transmisión.

Después de un período donde los Herpes fueron

considerados de escaso valor en la investigación, el interés resurgió a partir de la década del 60. Algunas razones que explican el incremento en el estudio de las infecciones herpéticas y del agente causal son:

- el aumento de las infecciones por HSV y, sobre todo, por HSV-2 como consecuencia de su transmisión venérea.
- el hecho que pacientes asintomáticos liberan virus.
- el incremento de HSV neonatal , adquirido a partir de lesiones maternas antes o en el momento del parto.
- el reconocimiento que el HSV ocurre como consecuencia de un estado inmunodeprimido.
- la posible relación entre virus Herpes y algunos tipos de tumores en varias especies, incluso el hombre.

De estos datos surge la importancia de la búsqueda de tratamientos locales efectivos como terapéuticos antiherpéticos.

Características generales de los Virus Herpes

Los virus Herpes han sido encontrados en huéspedes tan diversos como hongos, peces, anfibios, mamíferos, animales inferiores y hombre. Estos virus que comparten características antigénicas, morfológicas y biológicas están reunidos bajo la Familia Herpetoviridae.

Los géneros más estudiados están indicados en la Tabla 1.

Tabla 1.- Miembros más importantes de la Familia Herpetoviridae.

Género	Huésped natural
Varicella Zoster	Hombre
Herpes simplex tipo 1 (HSV-1)	Hombre
Herpes simplex tipo 2 (HSV-2)	Hombre
Epstein-Barr	Hombre
Citomegalovirus	Hombre, ratón, cobayo, etc.
Seudorrabia	Vaca, cerdo
Enfermedad de Marek	Pollo
Lucké	Rana
Rinotraqueitis infecciosa bovina	Vaca
Virus B	Mono

Los virus Herpes causan una amplia variedad de enfermedades infecciosas localizadas o generalizadas. Atacan con preferencia los tejidos del

ectodermo y generalmente hay aparición de vesículas superficiales, observándose inclusiones nucleares y células gigantes en la lesión. En general el virus es fácilmente aislable. Muchas lesiones están asociadas a una latencia prolongada y a veces con episodios recurrentes.

Los virus Herpes son virus ADN que replican en el núcleo celular. Poseen una cápside icosaédrica y una envoltura externa que adquieren al brotar a través de la membrana nuclear.

La tabla 2 resume las principales características de esta familia.

Tabla 2.- Características de los Herpesvirus

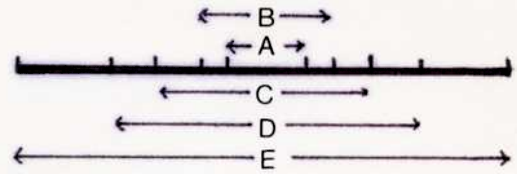
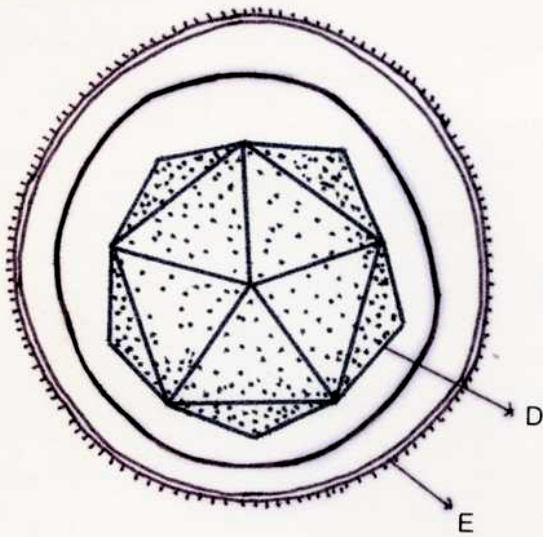
Tamaño	150-200 um
Simetría de la cápside	Icosaédrica
Número de capsómeros	162
Envoltura lipídica	Posee
Sensibilidad al eter o cloroformo	Si
Acido Nucleico	Doble cadena
Sitio de biosíntesis de ADN	Núcleo
Sitio de ensamblaje de la partícula viral	Núcleo
-----	

Los virus Herpes simplex tienen como huesped natural al hombre. Por diferencias en sus propiedades antigénicas, estructurales, su forma de transmitirse y su patogenia se distinguen el HSV-1 responsable de las infecciones orales y el HSV-2 causante de la mayoría de las infecciones genitales.

### Estructura y composición de los HSV

Los HSV son virus relativamente grandes y complejos. Estos virus cuyo genoma es ácido desoxirribonucleico (ADN) tienen un diámetro de aproximadamente de 150 a 170 nm (Figura 1, 2 y 3).

Los HSV poseen una envoltura derivada de la membrana nuclear alterada de la célula huésped donde se replicó y una membrana interna menos definida. Ambas rodean a una cápside externa de simetría icosaédrica formada por 162 subunidades o capsómeros.



- A: Nucleoide (25 nm)
- B: Cápside interna (45 nm)
- C: Cápside media (75 nm)
- D: Cápside icosaédrica (100 nm)
- E: Envoltura (150-170 nm)

Figura 1: Morfología de los Virus Herpes simplex.



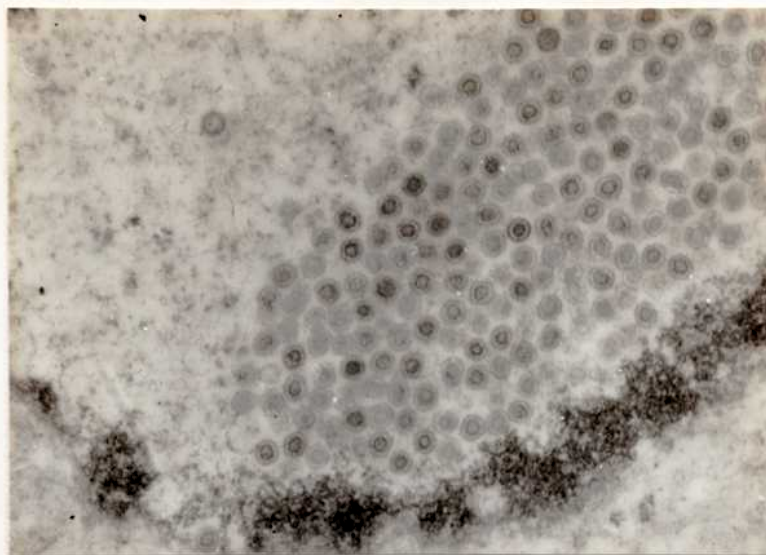


Figura 2: Cultivo de nervio de conejo infectado con HSV-1, donde se observan nucleocápsides inmaduras (20.000 X).

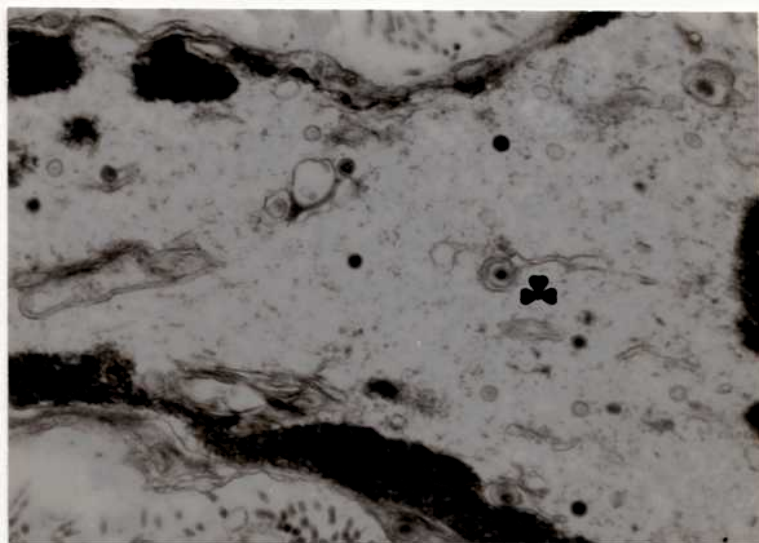


Figura 3: Fibroblasto de un ganglio de conejo infectado con HSV-1. Se observan algunas partículas desnudas y una partícula completa (♣) que adquirió su envoltura al brotar por las membranas celulares, quien por el corte histológico apa

Los HSV poseen otras dos cápsides no muy bien definidas, llamadas media (de 75 nm de diámetro) e interna (de 45 nm) que encierran una nucleoproteína (NP) o "core" de 25 nm de diámetro (1).

#### Composición química:

Los principales componentes de la partícula viral son ADN, proteínas, glicoproteínas, poliaminas y lípidos.

Se habla de proteínas estructurales como aquellas que forman parte del virus y no estructurales las que codificadas por el ADN viral no integran su arquitectura.

Las partículas víricas purificadas contienen 3% de ácido nucleico (AN), 75 % de proteína y 22% de lípidos (2).

#### Genoma viral:

El genoma de HSV está formado por ADN doble cadena, con un peso molecular (PM) de  $97 \times 10^6$  daltons (d) para HSV-1 y  $99 \times 10^6$  d para HSV-2 (3) y con una concentración de Citosina + Guanidina (C+G) de 66 y 68 % respectivamente (3) (4).

Una propiedad importante de los ADN de los HSV, estudiado especialmente con HSV-1, es que sólo un 10 a 30% de las cadenas permanece intacto al desnaturalizarlas en medio alcalino (5). Estos cortes aparentemente no son al azar sino en puntos específicos y en una sola cadena (6), por lo tanto el AN de HSV-1 consistiría en una cadena intacta y otra fragmentada.

Otros autores hablan de la presencia de Acido Ribonucleico (ARN) en el genoma viral, quien sería

el factor responsable de la segmentación (7). El ADN herpético no estaría relacionado con proteínas tipo histonas, como los ADN celulares (8). El ADN de HSV-1 consiste en dos componentes unidos covalentemente, llamados L y S, cada uno formado por secuencias únicas ( $U_L$  y  $U_S$ ) separadas por secuencias repetidas (9). Los componentes L y S comprenden el 82 y el 18% del ADN. Las zonas invertidas que flanquean al componente L se llaman  $ab$  y  $b'a'$  y corresponden al 6% del ADN total, mientras que las zonas invertidas que bordean a S son  $a'c'$  y  $ca$  siendo el 4.5% del ADN total (3). Por lo tanto la secuencia de las regiones identificadas es (10) :



Sheldrick y Berthelot (9) sugieren que los componentes L y S pueden encontrarse invertidos dando 4 poblaciones moleculares. Por lo tanto el ADN viral extraído de viriones de distintos clones contienen 4 tipos de moléculas que difieren en la orientación de los componentes L y S. Estudios sobre HSV-2 indican que posee una estructura semejante (11).

Los ADN de HSV-1 y HSV-2 están estrechamente relacionados y muestran un 47 % de homología por hibridación de AN (12). Esto concuerda con las observaciones que la mayoría de los antígenos codificados

por ambos géneros son comunes.

#### Proteínas estructurales:

El análisis de polipéptidos que constituyen las partículas de HSV-1 purificados, revelan la presencia de al menos 33 clases de proteínas mayores de 25000d (13). Se cree que el mayor polipéptido de la partícula de HSV-1 tiene un PM de 155.000, estimándose que cada partícula viral contiene entre 690 a 1000 copias (14).

No se encontró actividad ARN ni ADN polimerasa en las partículas pero se detectaron enzimas asociadas a membranas como proteínas kinasas (15).

Se sabe que varios polipéptidos son glicosilados. Aunque no se conoce exactamente el número se encontraron 14 bandas de polipéptidos marcados con glucosamina y fucosa (10).

#### Lípidos y poliaminas:

La composición lipídica de los virus Herpes no está bien conocida. Los estudios con microscopía electrónica (ME) revelan que los virus HSV-1 adquieren su envoltura a nivel de la membrana nuclear de la célula infectada y por lo tanto la composición lipídica refleja el contenido de lípidos de la lamela interna del núcleo celular.

En las partículas purificadas se encuentran cantidades significativas de espermina y espermidina (16). Estas poliaminas tienen distintas localizaciones, la espermina se encuentra en la NC, quizá asociada con el ADN, mientras que la espermidina es un componente de la envoltura.

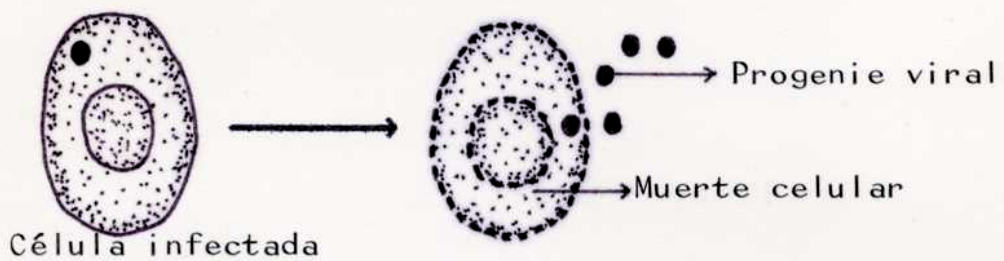
La cantidad de poliaminas asociada con la cápside es suficiente para neutralizar el 50% de los fosfatos del ADN (1).

### Tipos de infecciones de los Virus Herpes

La interacción Virus-Célula a nivel celular y a nivel organismo infectado se resume en la figura 4.

Un tipo de infección resulta de la interacción entre partícula viral (normal y/o defectiva) y célula (permissiva o no) donde son igualmente importantes la cepa de virus como el tipo celular.

#### Infección PRODUCTIVA



#### Infección NO PRODUCTIVA

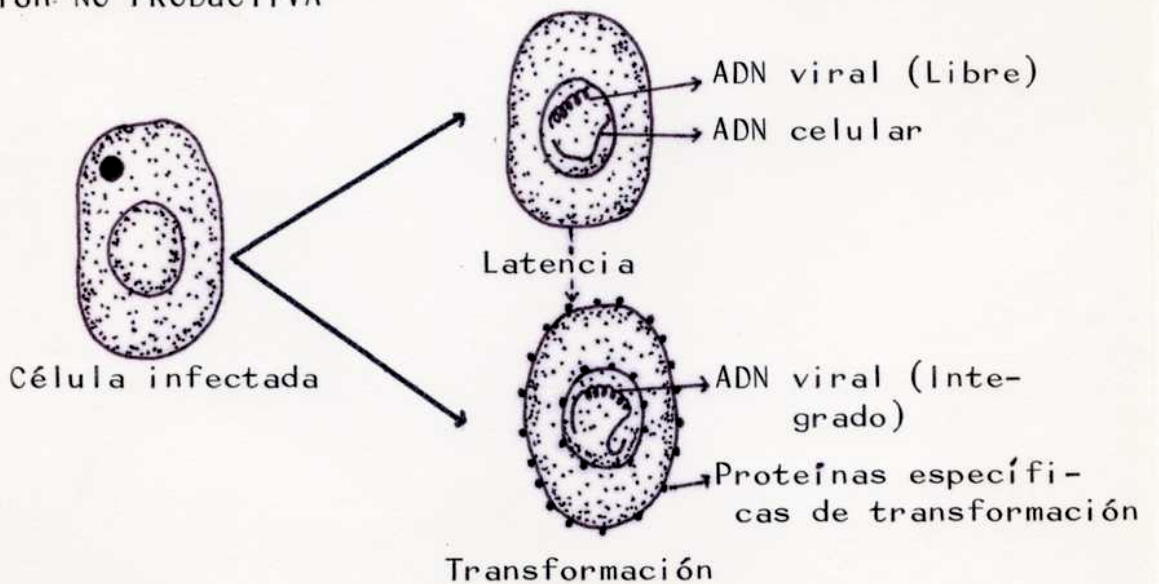


Figura 4: Tipos de infección herpética.

Bajo ciertas condiciones, los virus Herpes cumplen un ciclo lítico o productivo acompañado por la síntesis de un gran número de partículas infecciosas o defectivas. Dado que las partículas carecen de lo necesario para la replicación, deben utilizar enzimas y precursores suministrados por la célula huésped. Como consecuencia de este proceso la célula atacada muere. Este tipo de replicación se da in vivo en las lesiones patológicas donde hay lisis celular de los tejidos infectados.

Bajo otras condiciones los virus Herpes dan una infección no productiva o abortiva que implica la perpetuación del genoma viral y la sobrevivencia de la célula huésped. El virus puede entrar en latencia un estado en el cual no se producen partículas ni se detectan antígenos virales. El virus por determinadas causas (pe. condiciones de stress) puede reactivarse y dar una infección productiva. Este proceso se observa en modelos experimentales animales y en infecciones naturales humanas.

El ciclo abortivo es un prerrequisito para una tercera interacción: la transformación celular. En este caso el genoma viral se integra al DNA celular e induce la formación de nuevos antígenos.

La transformación puede o no ser oncogénica. Se habla de una transformación oncogénica in vitro, cuando las células adquieren un potencial maligno, definido principalmente como la capacidad de producir tumores en animales.

Todos tipos de replicación mencionados están involucrados en distintas enfermedades animales y humanas, siendo posible que una combinación de estas coexistan simultáneamente.



A - INFECCION PRODUCTIVA

A - 1 - Infección de HSV a nivel celular

Gran parte de la información acerca de la replicación de HSV a nivel celular proviene de trabajos hechos sobre cultivos de tejido. Los virus herpes replican mejor "in vitro" en células de conejo, pollo y humanas a la temperatura óptima de 35°C.

Las etapas de una infección lítica (Fig. 5) son:

- adsorción y penetración viral
- replicación
- ensamblado y liberación de los nuevos viriones.

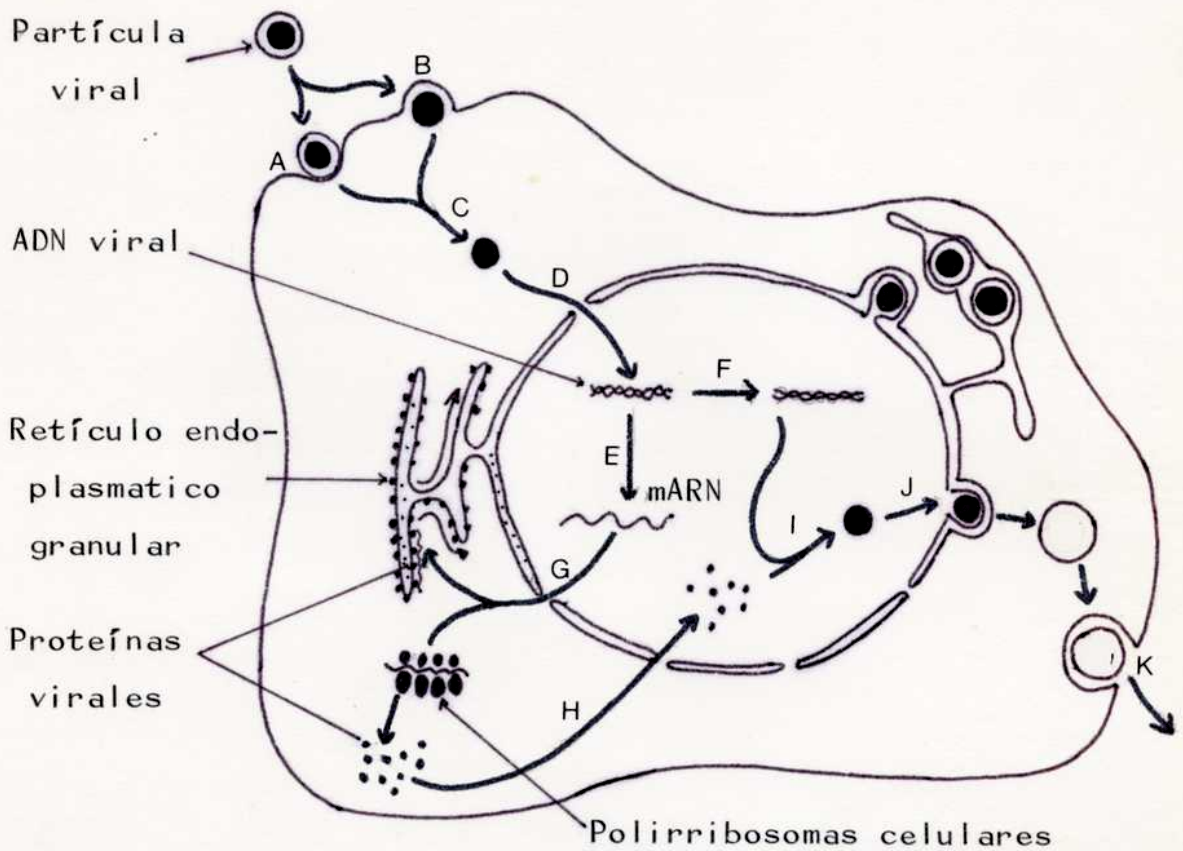


Figura 5: Multiplicación del virus Herpes simplex en una célula perniciosa.



### Adsorción y penetración viral:

Aún no se ha dilucidado el mecanismo por el cual el virus se pone en contacto con la célula (adsorción) y como penetra a la célula donde se replicará. Se han propuesto varias formas de penetración, como la fusión de la envoltura viral con la membrana citoplasmática (Fig. 5A) (17) o un mecanismo semejante a la pinocitosis (Fig. 5B) (18). Datos recientes sobre HSV-1 indican que una glicoproteína designada VP 7 juega un papel importante en la penetración de HSV a la célula huésped. Se cree que la función de VP 7 es promover la fusión entre la envoltura del virión y la membrana plasmática de la célula huésped. Este proceso sería esencial para la infectividad (19), lo que apoyaría el primer mecanismo de penetración indicado.

Se requiere virus completo, con su envoltura, para infectar la célula. Las cápsides extraídas del núcleo celular o bien obtenidas por destrucción de la envoltura con detergentes no son infecciosas (20). Sin embargo en una experiencia se logró extraer ADN de la partícula herpética y obtener una infección productiva (15).

Stoker observó transmisión viral célula a célula sin virus libre infeccioso en el medio del cultivo (21).

### Transcripción y traducción del ADN de HSV:

El ADN de HSV debe llegar al núcleo celular donde dirigirá la replicación viral. Luego de la penetración se liberan las capas más externas de la partícula, se desorganizan las cápsides y la NC entra al núcleo celular (Fig. 5C y 5D).

Las etapas a considerar en el proceso de replicación son: a- la transcripción del ADN viral en ARN mensajero (mARN) quienes en el citoplasma celular dirigirán la síntesis de proteínas (Fig. 5 E); b- la traducción del ADN que implica su replicación semi-conservativa (Fig. 5 F).

Las moléculas transcriptas virales de las células infectadas se dividen en tres clases: 1) ARN temprano inmediato, que se transcribe sin síntesis proteica viral concomitante, 2) ARN temprano, el cual se sintetiza previo a la síntesis del ADN viral; 3) ARN tardío formado por aquellas moléculas de ARN que no se transcriben a menos que exista síntesis de ADN y proteínas herpéticas previa. La duración de estos eventos depende del estado fisiológico celular, la permisividad de la célula al virus y la multiplicidad de infección a la célula.

Las enzimas responsables de la síntesis de ADN y mARN son una ADN polimerasa-ADN dependiente y una ARN polimerasa-ADN dependiente. Se sabe que la primera es inducida luego de la infección con HSV y por lo tanto codificada por el virus (22). Esta enzima es inmunológicamente diferente de aquellas de la célula huésped, se sintetiza alrededor de las 3 horas post-infección (23) y su síntesis precede la replicación del ADN viral (24).

Se sabe que los mARN tempranos inmediatos son transcritos por una ARN polimerasa-ADN dependiente II celular (15). No hay experiencias claras que demuestren si esta misma enzima modificada o no, u otra inducida por el genoma viral transcriben los restantes mARN. En un trabajo reciente Costanzo y col. sugieren la participación de una polimerasa celular (25).

Se sabe que sólo algunos mARN son poliadenilados, un hecho que podría representar una expresión restrictiva del genoma de HSV (24).

Los mARN formados deben pasar al citoplasma (Fig 5 G) donde sobre los polirribosomas celulares o sobre el retículo endoplásmico granular guiarán la síntesis de las proteínas estructurales y funcionales.

Solo el 50% del ADN viral se expresa durante la infección productiva. Si esta información se traduce en proteínas se calcula que el ADN codificaría para 65 proteínas entre estructurales y no estructurales (20). Se han identificado en células infectadas por HSV-1 48 polipéptidos codificados por el virus, que oscilan entre 2.000 y 20.000 de PM (26). Se encontraron otros péptidos adicionales menores de 20.000. Se encontró un número semejante para HSV-2 (26).

A causa del sitio de maduración y de la naturaleza del virión es muy difícil una purificación satisfactoria de los péptidos codificados por HSV. Se postula la posibilidad que algunos polipéptidos virales sean producto de degradación, agregación y glicosidación (1).

La mayoría de las proteínas vuelven al núcleo (Fig.5 H). Algunas quedan en el citoplasma y se unen a las membranas celulares modificándolas antigénicamente.

La replicación viral semiconservativa ocurre concomitantemente a los procesos explicados antes.

Los mecanismos de control para los procesos ordenados por HSV en cuanto a replicación y transcripción a nivel molecular no se conocen. Se cree que la mayoría de estos mecanismos de control están gobernados por alteraciones de actividades enzimáticas específicas (23).

### Ensamblado y liberación

.....

El ensamblado se realiza en el núcleo celular donde se encuentran las proteínas estructurales y las copias de ADN (Fig. 5 I). Las nuevas cápsides adquieren su envoltura cuando brotan a través de la membrana interna nuclear (Fig.6). Las partículas se acumulan en el espacio entre la lamela interna y externa de la membrana nuclear y en el retículo endoplasmático (Fig 5 J) (27).

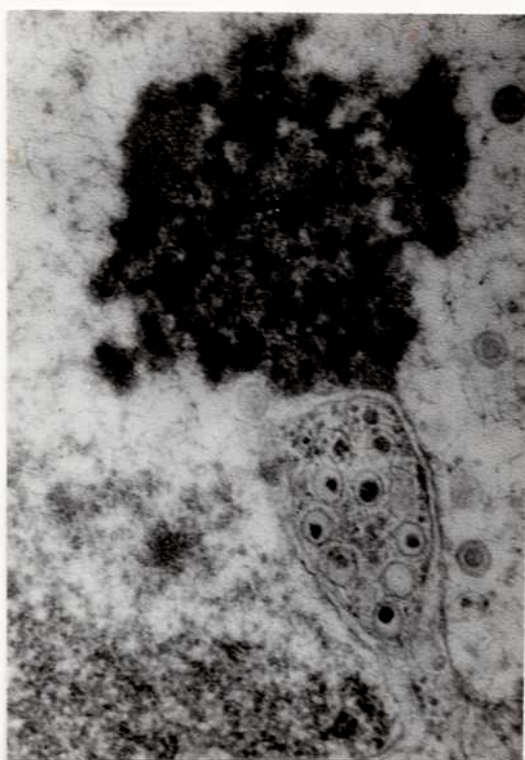


Figura 6: Brotación de partículas de HSV a través de la membrana nuclear de una célula de

Los estudios bioquímicos indican que el virus brota a través de regiones de la membrana nuclear que contienen proteínas y glicoproteínas codificadas por el virus (28).

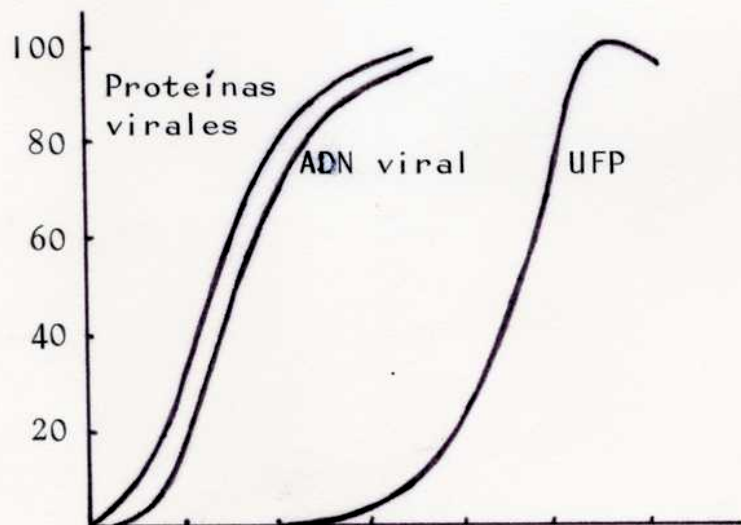
En los últimos momentos de la infección, sobre todo cuando la membrana nuclear se ha roto, las partículas pueden adquirir su envoltura por brotación a través de la membrana plasmática (27).

Los virus envueltos viajan dentro de vacuolas desde el espacio perinuclear hasta la superficie celular donde se liberan al medio extracelular por fagocitosis reversa (Fig 5 K) (29).

#### Ciclo de replicación de HSV:

La figura 7 resume los datos obtenidos de células de carcinoma de laringe (Hep-2) infectadas con HSV-1 (1). Se observa una fase eclipse de 8 horas post-infección, donde no se puede detectar partículas infecciosas en el sobrenadante. El pico máximo de producción viral se produce a las 15 horas.

% del total



Trabajando con HSV-1 replicando en células de riñón de conejo (RK) se encontró la secuencia de eventos expresada en la tabla 3 (30).

Tabla 3.- Síntesis de macromoléculas virales en células de riñón de conejo infectados con HSV-1 "in vitro".

Horas post-infección	Macromolécula sintetizada
2	ARN temprano inmediato
3	ARN temprano
3.5	ADN
4.5	ARN tardío
6	Partículas infecciosas

La secuencia de sucesos en el ciclo multiplicativo es propia de cada sistema virus-célula.

Por cada partícula infecciosa sintetizada se forman entre 10 y 1000 partículas no infecciosas o defectivas (20) cuyo ADN tiene una densidad mayor respecto al de las partículas completas (15). No se sabe el papel que cumplen en el ciclo replicativo (20). Estas partículas defectivas son más frecuentes en pasajes de virus a alta multiplicidad de infección (31).

### Efecto de la infección viral sobre la célula huésped;

La interacción entre HSV y la célula huésped se caracteriza por la producción de un daño letal debido al efecto de los productos del genoma viral sobre la célula y/o su mecanismo regulatorio.

En las células infectadas las proteínas tempranas co-dificadas por el virus bloquean la síntesis proteica y el ARN celular lo cual es incompatible con la sobrevivencia de la célula. Además un gran número de macromoléculas virales se acumulan durante el ciclo infeccioso y algunas de ellas especialmente las de la cápside parecen ser tóxicas.

Las proteínas o partículas virales se congregan en estructuras cristalinas o inclusiones que distorsionan la célula. Algunos autores indican que los cuerpos de inclusión eosinófilos de las células infectadas no tienen partículas virales ni Ag específicos sino que constituyen una escara nuclear. Durante la brotación, al pasar las partículas del núcleo al citoplasma, pasaría también el Ag soluble y esto haría que el primitivo cuerpo de inclusión intranuclear se convirtiera en una masa eosinófila (2).

En las células infectadas se observa frecuentemente agregación y desplazamiento del AN celular hacia la membrana nuclear (marginación de la cromatina).

Las células infectadas forman acúmulos o se fusionan en policariocitos. Este mecanismo no está bien entendido pero se cree que la fusión requiere la modificación de las glicoproteínas de la membrana plasmática por enzimas lisosomales liberadas sobre la superficie celular. Esto es seguido por fusión celular y reorganización de la membrana.

Quizá exista una digestión autolítica celular al destruirse los lisosomas. Lo cierto es que la célula muere a causa de daños individuales o acumulados. El daño causado por el virus en las células permisivas se conoce como efecto citopático (ECP) (1).

#### A-2.- Infección de HSV a nivel de organismo

In vivo el virus Herpes simplex replica en conejo, cobayo, ratón, mono y otras especies como tortuga. Hablaremos especialmente de las infecciones humanas. El herpes en la mayoría de los casos es una enfermedad benigna, caracterizada clínicamente por la aparición de vesículas en piel y/o mucosas.

De acuerdo al tipo de infección pueden clasificarse en:

Infecciones primarias: las personas sin previo contacto con HSV al exponerse al virus por primera vez, se infectan y cursan una infección primaria. Muchas primoinfecciones son subclínicas (80-85) y a veces en virtud de su localización (pe: cuello de útero) son inaparentes.

Infecciones recurrentes: personas con registro clínico o evidencias serológicas de haber tenido una infección primaria pueden tener recurrencias localizadas en la misma zona o cercana del cuerpo (cara, cornea, genitales, etc). Son lesiones vesiculares activadas por varios factores de stress como sol, fiebre, viento, tratamientos hormonales, etc. Las infecciones primarias con sintomatología clínica son generalmente más severas que las recurrentes, manifestándose con fiebre, lesiones extensas, adenopatías locales y dolor (32) y dando a veces



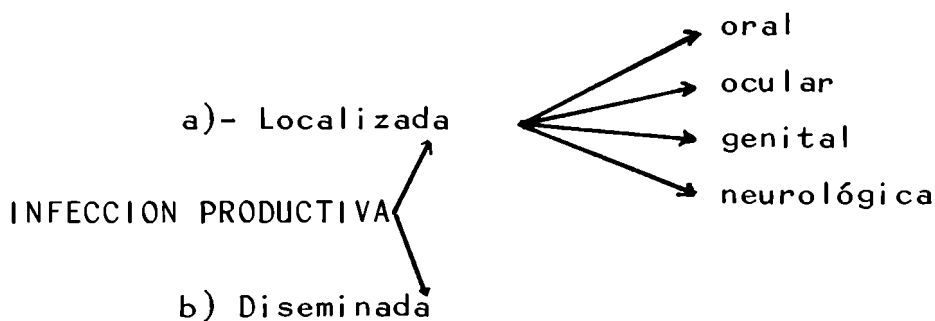
enfermedades sistémicas generalizadas, las que siguen un curso grave hasta mortal. En el caso del HSV recidivante, quizá la presencia de Ac humorales hace que permanezca limitado a un área del cuerpo. Los estudios serológicos revelan que la frecuencia de infecciones a HSV aumenta luego de los 6 meses o sea con posterioridad a la desaparición de los Ac maternos. El nivel de Ac anti HSV-1 aumenta luego de los 5 años, mientras que el de HSV-2 se eleva luego de los 14 años (20).

El período de incubación, ya sea para HSV-1 o HSV-2 varía entre 2 y 20 días con un promedio de 5 días.

Respecto de las infecciones primarias los Ac neutralizantes se desarrollan entre la primera y cuarta semana, detectándose primero en la fracción IgM del suero y posteriormente en la IgG e IgA (20).

La tabla 4 resume las distintas localizaciones de las lesiones herpéticas en el hombre.

Tabla 4.- Clasificación de las lesiones herpéticas de acuerdo a su localización.



a)- Infecciones localizadas:

La localización de la mayoría de las lesiones en un

área superficial de la piel o mucosa debe atribuirse a la incapacidad del virus de extenderse a través del tejido conectivo, la diferente susceptibilidad tisular, su diseminación preferencial a través de la sangre o sistema nervioso y la respuesta inmune (20).

**Infección oral:** El HSV-1 es responsable de la mayoría de las infecciones de la zona perioral, aunque se han relatado casos provocados por HSV-2 y generalmente asociados con los hábitos sexuales (33). La primoinfección con HSV-1 ocurre durante los primeros años de vida. El 80 a 90% de la población adulta tiene Ac contra HSV-1 (34).

La localización más frecuente es la unión mucocutánea de la zona perioral. El comienzo de la enfermedad es repentino, aunque generalmente hay una fase prodrómica de 3 a 5 días, que precede la erupción vesicular, caracterizada por prurito y/o ardor. Las vesículas de paredes delgadas, reunidas a menudo en un grupo son tensas y llenas de un fluido seroso. Posteriormente las vesículas forman costra, curando sin dejar cicatrices. En los casos leves no hay tumefacción de ganglios linfáticos regionales ni fiebre. La infección dura de 8 a 10 días (35).

Las infecciones recurrentes ocurren generalmente en el mismo área y sobre todo en el límite entre la piel y la mucosa de la zona oral que es el sitio más involucrado en el cáncer de labio (34).

La gingivoestomatitis herpética representa la manifestación más frecuente de la primoinfección clínica con HSV. Luego de un período prodrómico pronunciado aparecen vesículas en boca, lengua, mejillas, gingivas

y a veces paladar duro y labios que se ulceran rápidamente. El proceso patológico rara vez pasa a la faringe. Hay fiebre y adenopatías regionales. Luego de una o dos semanas las lesiones curan pero las adenopatías pueden persistir por un tiempo mayor. Es muy raro que se observen recidivas (35).

Infección ocular: Las lesiones oculares, causadas generalmente por HSV-1 incluyen conjuntivitis, queratitis, cataratas, iridociclitis y panuveitis (36). Han sido relatadas infecciones agudas por HSV-2 (37). La enfermedad puede cursar como conjuntivitis con edema palpebral, secreción seroso purulenta, vesículas y úlceras en la córnea y párpados, acompañados por tumefacciones ganglionares de la zona periauricular. Los focos de la córnea pueden ser aislados (queratitis punctata) o ramificados (queratitis dendrítica) o de otros tipos (queratitis geográfica, ameboide, etc). Las formas clínicas de la queratitis herpética varía desde una lesión superficial hasta profunda. Estas últimas son de peor pronóstico, con disminución de la agudeza visual.

Estudios sobre conejos demostraron que HSV-1 causa queratitis superficial con curación más rápida de la córnea. Por otro lado, en estos casos la conjuntivitis e iritis fue leve o moderadamente severa y de corta duración. Las lesiones por HSV-2 producen la lesión en forma más lenta, pero esta es más grave con compromiso estromal, opacificación e hiperplasia corneal y de larga evolución (38). Los datos sugieren que la capa epitelial y estromal actúa como barrera contra HSV-1 pero no en el caso de HSV-2. No se conoce si en el hombre el herpes tipo genital produce queratitis más severa que el herpes

tipo 1 al igual que en el conejo. Sin embargo se ha relatado su responsabilidad en lesiones oculares graves como en el caso de herpes neonatal diseminado (39).

**Infecciones genitales:** Las infecciones genitales son producidas especialmente por HSV-2 aunque alrededor de 10% son debidas a HSV-1 (40). El HSV-2 se transmite en forma venérea (34). La alta frecuencia de HSV-1 está relacionada probablemente con prácticas sexuales orogenitales (41).

Nahmias y col. (42) observaron que los Ac contra HSV-2 no se encuentran en niños menores de 14 años, excepto en recién nacidos infectados de sus madres. De acuerdo a las técnicas de laboratorio empleadas y al grupo estudiado el nivel de Ac varía desde el 13% (Israel) hasta el 100% (Colombia) de la población (5). Sin embargo muestras de distintas áreas geográficas testadas en un solo laboratorio dieron una variación menor con un máximo de 72% en Uganda y sólo un 35% en Colombia (43).

La tasa de Ac herpéticos genitales se asocia al nivel socioeconómico bajo, a la actividad sexual temprana y a la promiscuidad. En distintos estudios se diagnosticó seropositividad a HSV-2 en el 54% de las prostitutas y el 3% de las monjas (44).

La incidencia de herpes activo es difícil de diagnosticar ya que la infección es asintomática en muchos casos y por la variabilidad de las técnicas de laboratorio utilizadas.

La incidencia de herpes genital asintomático varía entre el 2 y 8 % en las mujeres y alrededor del 5% en los hombres (45, 46). De un grupo de mujeres con

infecciones herpéticas diagnosticadas por técnicas de laboratorio, se encontró que el 46.8 % cursa en forma subclínica (47).

Se encontró que el 7.8 % de las mujeres y el 0.6 % de los hombres tienen HSV clínico, siendo la causa más común de las lesiones vesículo-ulcerativas y la segunda enfermedad venérea luego de la gonorrea (45).

La incidencia de infecciones a HSV-2 aumenta durante el embarazo (47).

En los casos de infecciones sintomáticas la infección primaria es más severa que la recurrente. La primoinfección está asociada generalmente con fiebre, disuria y adenopatías inguinales (48) y persiste por 3 a 6 semanas (44). En las recurrentes la sintomatología es menos severa.

En la mujer los brotes herpéticos ocurren en el cervix y en los genitales externos. Las lesiones cervicales clínicas van desde una cervicitis inespecífica o inflamación hasta múltiples úlceras superficiales pequeñas o bien ocasionalmente una úlcera necrótica grande (44).

Las lesiones vulvovaginales raramente se observan en estado de vesícula ya que se ulceran fácilmente, mientras que en nalga y perineo son típicamente vesiculares. Estas lesiones locales van acompañadas frecuentemente de intenso dolor y si involucran la uretra pueden causar retención de orina aguda (44).

Las lesiones vulvares son más frecuentes que las vaginales o cervicales (49). El HSV se inactiva a pH menor de 7 y el medio de la vagina sana tiene pH 4.5, lo cual no es propio para su replicación(49).

En el hombre el HSV genital se manifiesta por grupos de vesículas sobre el glande del pene y a veces en el cuerpo del pene. Las vesículas se vuelven pus tulares y secan o bien se rompen dejando úlceras pro fundas (44). También se ha aislado virus de uretra, próstata y líquido seminal (50).

Infección neurológica: Las manifestaciones neurológicas asociadas con HSV incluyen encefalitis, meningitis, radiculitis y mielitis (33) con pronóstico generalmente desfavorable.

El HSV-1 causa frecuentemente encefalitis y el HSV-2 meningitis (51).

El HSV puede extenderse al SNC vía hematógena, olfatoria o bien por otra ruta neural (52). Se ha sugerido que ambos serotipos herpéticos tienen distintas vías de transmisión. Craig y col. hablan de una ruta neurogénica para la encefalitis y una diseminación hematógena para HSV-2 (53).

La encefalitis por HSV involucra la corteza cerebral y en mucho menor grado la materia blanca y las estructuras basilares. Las inclusiones eosinófilas características se ven comunmente en la oligodendroglia y menos a menudo en neuronas y astrocitos. No siempre se observan inclusiones y a veces pueden confundirse con las de otros virus, como varicela o citomegalovirus(54). Craig y Lahmias describieron disfunciones de la cuerda espinal asociadas con infección a HSV-2.

HSV es responsable del 1% de todos los casos de meningitis aséptica (54).

El nervio facial es el más involucrado en las parálisis humanas y en el 90% de los casos la etiología no está bien establecida. Se postuló al HSV como

agente causal de la parálisis facial idiopática o Bell Palsy (55).

Además se ha relacionado el virus con disturbios mentales y de comportamiento (54).

Otras localizaciones: Se ha relatado brotes en manos y dedos, producidos generalmente por contagio de lesiones genitales herpéticas (56).

b)- Infecciones diseminadas:

En los recién nacidos y en huéspedes comprometidos el HSV puede causar localizaciones severas con diseminación, lo cual es generalmente fatal. Los huéspedes comprometidos incluyen pacientes con terapias inmunosupresoras (como las usadas en trasplantes renales), pacientes con ciertos cánceres (P.e: Enfermedad de Hodgkin) y aquellos con síndrome de Wiskott-Aldrich o con Ac linfocitotóxicos circulantes (20).

Esta enfermedad severa ocurre también en pacientes con quemaduras graves, niños mal nutridos o aquellos con sarampión o pertussis agregada (33).

La variable común responsable de una diseminación severa es probablemente un defecto en el sistema inmune mediado por células (20).

Generalmente el herpes diseminado o eczema herpeticum es una complicación de las primoinfecciones de la piel. Luego de 5 a 7 días de incubación aparecen vesículas con fiebre elevada y graves manifestaciones generales. A partir de la zona primaria de la piel puede haber una difusión por vía hemática, linfática o neural, pudiendo comprometer SNC y otros órganos como hígado, pulmón o suprarrenal. Esta infección diseminada dura

entre 8 y 14 días, aunque en los casos más graves duran varias semanas (35).

Ha sido asociado el HSV-2 a Eritema multiforme, que causa lesiones en piel y mucosas en forma primaria, pero que generalmente se extiende a gran parte del cuerpo (57).

Las infecciones generalizadas son graves con una alta tasa de mortalidad (57, 54).

Herpes neonatal: El recién nacido adquiere HSV de una infección materna en el momento del nacimiento, por una vía ascendente si las membranas se han roto por varias horas o durante el pasaje a través del canal vaginal. El tercer modo de transmisión, aunque menos frecuente es, quizá, la ruta transplacentaria (54).

Hay un riesgo alto de aborto espontáneo cuando la infección materna ocurre durante las primeras semanas de embarazo y riesgo de nacimiento prematuro si la infección sucede luego de las 20 semanas. Si el brote aparece luego de las 32 semanas de gestación y el niño nace luego de 4 horas de rotas las membranas, hay un riesgo de 60% de herpes neonatal (58). En el caso de las infecciones primarias, donde generalmente la sintomatología es más severa y el virus tiende a persistir por más tiempo, el riesgo para el bebé es mayor, especialmente si ocurren en las últimas semanas de embarazo (40, 58).

Aproximadamente el 75% de las infecciones neonatales se deben a HSV-2 y sólo un 25% a HSV-1. No se encontraron diferencias en cuanto al tipo de lesión o severidad cuando la infección es causada por uno



u otro serotipo viral. Por otro lado se ha calculado que aproximadamente el 10% de las infecciones neonatales por HSV-1 provienen de contactos con portadores de herpes bucal en los días subsiguientes al nacimiento. (40).

Al igual que una serie de agentes que infectan al feto y/o recién nacido el HSV puede causar una amplia gama de manifestaciones como: malformaciones congénitas del SNC, cataratas congénitas, corioretinitis, retardo sicomotor, microcefalia, calcificaciones intracraneales, microoftalmia.

Se han clasificado las infecciones neonatales herpéticas de la siguiente forma (54):

- a) Infecciones diseminadas con o sin participación del sistema nervioso central.
- b) Infecciones localizadas del SNC, ojos, piel o boca, sin participación visceral.
- c) Infecciones asintomáticas: niños que se han infectado con HSV sin manifestación clínico-patológica de infección.

La tasa de mortalidad en el grupo a) es del 96% y en el b) del 22%. Sin embargo hay secuelas severas neurológicas u oculares en el 50% de los casos que sobreviven de los grupos b) y c).

Se desconoce si el virus puede pasar vía transplacentaria. La mayor tasa de abortos o partos prematuros en embarazadas infectadas con HSV, así como las evidencias que relacionan al herpes con malformaciones congénitas hablan en favor de un pasaje vía placenta. Además esto está apoyado por la recuperación de virus de placenta o cordón umbilical, la detección de virus por inmunofluorescencia en la placenta y la infección transplacentaria en animales experimentales (54). El potencial teratogénico de HSV se evidencia por

malformaciones producidas en embriones de pollo inoculados con HSV tempranamente en su desarrollo (54). Sin embargo aun no hay suficientes evidencias virológicas que aseguran una infección viral previa al nacimiento.

Aparentemente los Ac transplacentarios no protegen totalmente al bebé ya que se han encontrado infecciones herpéticas severas en niños cuyas madres eran recurrentes y con altos títulos de Ac (58).

### B - Infección no Productiva

No se conocen bien los mecanismos bioquímicos que llevan a una infección no productiva. Se sabe que la replicación se para luego de la penetración del virus.

Como consecuencia de este tipo de infección la célula sobrevive y el genoma viral se perpetua.

La infección abortiva puede o no llevar a una transformación celular la cual puede o no ser oncogénica.

Se tratará de dos tipos de infección no productiva:

- 1 - Latencia
- 2 - Transformación celular

#### B-1.- Latencia.

Latencia se define como el estado en el cual un virus se encuentra presente dentro de un organismo pero sin producir infección.

Se sabe que una infección herpética en piel, córnea, o membranas mucosas es seguida por una infección latente en el correspondiente ganglio sensorial. Se ha elaborado la siguiente hipótesis para explicar la patogénesis de la enfermedad herpética recurrente

en el hombre (59): la infección primaria con replicación del virus en las células epiteliales sería seguida por la invasión de las terminaciones nerviosas superficiales y el virus podría trasladarse a lo largo de los troncos nerviosos hacia el ganglio sensorial correspondiente donde se establecería la infección latente. En el momento de la reactivación el virus emigraría centrífugamente desde el ganglio por los nervios hacia el epitelio donde se produciría nuevamente la lesión. Los datos experimentales confirmaban en gran parte esta hipótesis.

Los trabajos experimentales indican que el virus viaja a lo largo del tronco nervioso. Algunos autores sostienen que el traslado es intraaxonal (60) considerando que el flujo axónico es bidireccional y que la velocidad de avance de la infección es semejante a la del flujo reverso. Además se bloqueó la progresión de HSV hacia el sistema nervioso central con inhibidores de flujo axoplásmico (61).

Otros autores opinan que el virus viaja por el nervio replicando en las células de Schwann, basándose especialmente en datos morfológicos-ultraestructurales (62). No puede descartarse la posibilidad que el virus combine ambas rutas para su traslado.

Luego de inocular HSV a ratones en la almohadilla de la pata se observó una infección del nervio ciático, ganglios espinales, médula espinal y cerebro, donde fue posible aislar virus o detectar Ag herpéticos. Luego de los 12 días se establece latencia y sólo puede recuperarse HSV de ganglios sensoriales cultivados "in vitro" o explantados sobre células sensibles al virus (co-cultivo) (63).

Posteriormente se demostró latencia en ganglio trigémino y en cerebro de ratones inoculados en la cornea

(64); en ganglios sensoriales de animales inoculados vía cervico-vaginal (65), en médula adrenal (66) y en ganglios simpáticos del sistema autónomo (67). Baringer y col han demostrado HSV-1 latente en el 44 % de los ganglios trigéminos de cadáveres no seleccionados, así como HSV-2 en los ganglios sacro-espinales, pero en menor frecuencia (68).

Recientemente Walz y col demostraron que tanto HSV-1 como HSV-2 pueden persistir en el tejido vagino-uterino por largos períodos en ratones inoculados vaginalmente. Igualmente que en el ganglio sensorial, luego de una fase aguda en donde el virus se detecta o por homogeneización de los tejidos o por inmunofluorescencia sigue una fase latente donde sólo el método de explantación permite detectar virus. Se cree que la zona de tejido uterino donde puede recuperarse virus está confinada a la de los ganglios paracervicales (69).

El hallazgo que HSV persiste dentro del útero de ratones infectados genitalmente sería de importancia en la patogénesis de las infecciones humanas.

Se cree que la neurona es la célula donde se produce la latencia. Esta es única en el hecho que no se reproduce en el adulto y posee una prolongada vida media. Un virus temporariamente inactivado podría sobrevivir en el tejido nervioso con poco riesgo de perderse durante la mitosis o muerte celular (70). Así es posible recuperar virus de ganglios pero no de nervios en animales infectados latentemente. Se demostró que las neuronas son las primeras células del ganglio donde se puede visualizar los productos virales luego de unos días de cultivo o trasplante (59). Por estudios de hibridación in situ se detectó genoma de HSV en el núcleo de las neuronas (59).

Estudios morfológicos de tejidos neuronales infectados in vitro han revelado que las distintas células del sistema nervioso pueden ser infectadas y replicar HSV (71).

Vahlne y Lycke han demostrado que HSV replica en forma restrictiva en una línea de neuroblastoma murino, que mantiene muchas de las características de las neuronas diferenciadas (72). Esta restricción depende aparentemente de los pocos receptores para HSV disponibles en la membrana plasmática de las células de neuroblastoma (71). Estos mismos autores demostraron una mayor adsorción de HSV a células gliales tipo astrocitos respecto de pericarión neuronal. Por otro lado HSV se pega bien a sinaptosomas. Si esto se debe a la presencia de receptores específicos sobre los sinaptosomas o sólo reflejan una actividad endocítica de los sinaptosomas no puede saberse.

Una baja tasa de producción viral en las neuronas y una falta de receptores sobre el pericarión podría contribuir al mantenimiento de la infección herpética en los ganglios sin una progresión notoria (71).

Otras experiencias se contradicen con los datos anteriores. Trabajando con mutantes herpéticas termosensibles se logró establecer infecciones latentes. Cuando los ganglios se explantan a temperatura restrictiva, el virus se reactiva y la infección progresa hasta el bloqueo de la mutante. Se ha trabajado con mutantes donde el bloqueo ocurre tardíamente en la infección y donde se sintetiza ADN viral y se forman Ag tardíos, pero no se forman viriones completos. Los datos sugieren que las células satélites que rodean las neuronas son las primeras donde HSV se reactiva y por lo tanto donde ocurriría la latencia (73).

Roizman (74) postuló dos posibles mecanismos de latencia. La hipótesis del estado dinámico propone una multiplicación viral lenta resultando en una infección subclínica crónica. La otra alternativa habla de un estado estático en donde el ciclo lítico es interrumpido en forma reversible y ciertas células son capaces de albergar HSV en forma no replicativa.

Apoyan la teoría dinámica el hecho que haya podido aislarse virus de saliva, heces, secreciones oculares, glándulas lacrimales, etc, de animales experimentales y hombre durante períodos de quiescencia (75). Por otro lado se sabe que durante infecciones productivas se generan partículas virales defectivas que pueden interferir con el ciclo replicativo. Esta interferencia puede resultar en la terminación de una infección aguda y en el establecimiento de una infección crónica (75).

La teoría más aceptada es la del estado estático. El hecho que nunca se pudo aislar virus de tejidos infectados latentemente por ensayos directos ni por inmunofluorescencia, siendo necesario el cultivo para recuperar HSV, apoyan este concepto.

O'Neil y col (76) lograron mantener un sistema "Estado estático" in vitro. Ellos pararon la infección de HSV-2 de células embrionarias humanas de pulmón con citosina arabinosa (Ara-C), un inhibidor de la síntesis de ADN viral. Durante el período de quiescencia el virus se encuentra en una forma no infecciosa pero luego de varios días de quitar el Ara-C las partículas herpéticas reaparecen.

Stevens y Cooks (59) proponen que la infección latente es modulada in vitro por IgG antiviral. Quizá haya una interacción entre la IgG y los Ag de membrana inducidos por el virus en la superficie de las

neuronas, que a través de efectores moleculares intracelulares reprimen completamente la expresión del genoma viral. Probablemente la IgG no actúe so la sino conjuntamente con otros factores. Para coniliar estos datos con el hecho que las recurrencias transcurren con alto título de Ac neutralizantes estos autores proponen que las provocaciones que desencadenarían la recurrencia superarían la capacidad represora del anticuerpo.

Avala el hecho que la IgG module la latencia, los resultados obtenidos por Walz y col (67) quienes demostraron que la inmunización de ratones con HSV previo a la infección viral vía vaginal no sólo modifica el curso de la enfermedad aguda sino también el desarrollo de la latencia. La presencia de IgG específica demora la recuperación de HSV de ganglios infectados latentemente ( 77, 78).

Análogos de la timidina (p. e. iododeoxiuridina) estimula la replicación de virus del grupo Herpes en células latentemente infectadas (79). Varani y col indicaron que el tratamiento con análogos posteriormente al establecimiento de una infección latente no permite recuperar partículas de HSV, pero sí el tratamiento previo (80). Los mecanismos que participan en estos procesos aun no se han comprendido. Se ha logrado reactivar infecciones latentes en animales raspando o aplicando xileno o radiaciones ultravioletas sobre la zona donde el animal recurre espontáneamente (81). Esto apoyaría la teoría que el virus a pesar de hacer latencia en el tejido nervioso, se encontraría frecuentemente en piel, pero sólo causa lesión clínica cuando las condiciones favorecen la multiplicación.

Varios factores se han asociado a la reaparición de la infección. Uno de ellos es la fiebre (82). Se sabe que *in vitro* el HSV replica pobremente a altas temperaturas (75). Pero por otro lado se sabe que las cepas que pueden replicar a temperaturas mayores son más virulentas y podrían iniciar una nueva infección con mayor facilidad (75).

También niveles bajos de IgG y desórdenes inmunosupresivos permiten al virus establecer focos de infección. Glasgow reportó la aparición de infección herpética cuando hay un daño en el mecanismo inmune, sobre todo a nivel de inmunidad mediada por células (83).

Otros factores desencadenantes son infecciones estreptocócicas, excesiva exposición al sol, viento, frío, luz ultravioleta, traumas, shock anafiláctico, stress emocional (75).

Los datos anteriores apoyarían la hipótesis planteada inicialmente, indicando que el virus persiste en alguna forma no replicativa en el sistema nervioso. Esta interacción podría ser modulada por el sistema inmune celular y humoral que, actuando sinérgicamente suprimirían la replicación de HSV.

## B-2 - Transformación

Los estudios de transformación "*in vitro*" han apoyado el concepto que los tumores inducidos por virus surgen como resultado de una transformación celular por la acción viral. Estos estudios demuestran la capacidad oncogénica potencial de un virus.

Algunos miembros de los virus Herpes son capaces de transformar células de cultivo y son sospechosos de



ser oncogénicos (p.e.: Epstein-Barr, Citomegalovirus, HSV-1, HSV-2)(84).

Infectando cultivos celulares con HSV en condiciones restrictivas se ha logrado transformar células de ratón, hamster, rata y humanas (85, 86, 87, 88).

Se habla de transformación cuando las funciones virales se expresan, sin producción de partículas.

Han sido utilizados varios métodos para obtener transformación in vitro. Uno de ellos es la inactivación parcial del virus por radiaciones ultravioletas (UV)(86, 89). Se trabaja con dosis UV que reducen la infectividad viral, pero que no destrozan completamente su genoma. La actividad transformante es más resistente a la radiación que la función viral responsable de la muerte de la célula huésped. También se ha logrado inactivar HSV por métodos fotodinámicos, como el tratamiento de los viriones con colorantes heterocíclicos ( como el rojo neutro) y exposición posterior a la luz visible (90) o por métodos químicos (91).

Otra técnica para obtener transformación celular es trabajar con células que luego de infectadas se llevan a temperaturas no permisivas para la replicación viral (p.e: 42°C). Luego de varios días se seleccionan espontáneamente células infectadas en forma abortiva y que son capaces de crecer a dicha temperatura. Luego de algunas semanas y no detectándose virus en el sobrenadante se baja progresivamente la temperatura hasta 37°C (88).

También se ha logrado transformación usando mutantes termosensibles (92).

Los criterios usados frecuentemente para comprobar la transformación celular son:

-Por cambios no específicos en la morfología celular respecto de los controles (p.e.: cambios de forma,

apilamiento celular, pérdida de la inhibición por contacto, etc) o por diferencias en la tasa de proliferación (86).

- Por la detección de productos virales, como Ag herpes específicos (93).

Un marcador viral encontrado en la célula transformada es la enzima timidina quinasa (TK). Esta célula adquiere una nueva actividad TK, que tiene la misma movilidad electroforética que la enzima inducida por el virus durante la infección lítica (94). Las células controles carecen de esta actividad.

-Por la detección de secuencias de ácido nucleico específico (95). En un trabajo con 5 líneas de hamster transformadas por HSV-2 se detectó entre 8 a 22% de genoma viral con 1 a 3 copias por célula (96).

Se relató que células transformadas por HSV-2 contienen secuencias de mRNA viral (97) y se determinó que son capaces de transcribir cerca del 10% del ARN específico de HSV producido en un ciclo lítico (34).

-Por formación de colonias en agar blando o por crecimiento cuando las células se siembran en baja concentración (98).

-Algunos clones transformados tienen actividad plasminolítica, medida por la capacidad de lisar monocapas de fibrina (98, 99).

-Por persistencia de las células a lo largo de sucesivos pasajes o subcultivos respecto de las células no transformadas (90).

La transformación puede estar acompañada por una conversión oncogénica. En este caso el criterio más válido es la capacidad de la célula transformada de producir tumores cuando se la inyecta a animales (generalmente se trabaja con hamster recién nacido) (85, 100). Así ciertas células transformadas por HSV inducen fibrosarcomas y adenocarcinomas posteriormente

a la inyección de células viables en huéspedes compatibles (101). Los animales portadores de tumores, desarrollan generalmente Ac neutralizantes contra HSV (100, 101).

La capacidad de los virus HSV irradiados de producir transformación in vitro depende de la cepa utilizada. Así se reportó que células de Hamster fueron susceptibles de ser transformadas por 2/12 cepas de HSV-1 y 7/15 de HSV-2 (100). Aún no se ha asociado ninguna propiedad particular de las cepas virales que lleve a la transformación.

Se encontró recientemente que el HSV-2 estimula la síntesis de ADN celular durante la incubación a 42°C o cuando la temperatura baja de 42 a 37° . La capacidad de estimular la síntesis de ADN es una propiedad compartida por otros virus oncogénicos (90).

En la transformación celular por virus, se sabe que el genoma viral se integra al ADN celular, pero se desconocen los factores que gobiernan la porción del genoma integrado y su grado de expresión.

Kimura y col demostraron que células transformadas por HSV soportan la multiplicación de dos mutantes herpéticas termosensibles, quizá debido a una complementación de sus defectos con funciones virales expresadas en las células transformadas (102).

Se estudió la transformación de células de embrión de hamster por ADN de HSV o sus fragmentos. Los cultivos expuestos a concentraciones altas de ADN viral desarrollaron ECP característico. En cambio si las células se exponen a concentraciones bajas de genoma viral se obtienen clones transformados (98).

Actualmente se están estudiando cuales fragmentos del ADN viral son capaces de producir transformación (103).

Las pruebas anteriores indican que el HSV intacto o defectivo es un candidato oncogénico viral en procesos neoplásicos humanos y de animales.

## Asociación de los Virus Herpes con Cánceres Humanos

Se han asociado algunos virus como causantes etiológicos de tumores en el hombre. En la familia Herpetoviridae el Virus Epstein Barr se asocia al Linfoma de Burkitt, al carcinoma nasofaríngeo y a la Enfermedad de Hodgkin (104), el Citomegalovirus al carcinoma de Próstata (105) y el virus Herpes tipo 1 y tipo 2 al carcinoma de labio y cuello de útero respectivamente (34).

El HSV-1 ha sido asociado con el cáncer de labio demostrándose el desarrollo de un carcinoma labial en el sitio de una lesión herpética recurrente (34) y el aislamiento de HSV-1 de un tumor labial (106). Otros autores lo relacionaron con el cáncer de laringe (107). Aún faltan estudios que demuestren una implicancia del HSV-1 en estas neoplasias.

### HSV-II y Cáncer de Cuello de Utero

Varios factores, coitales, maritales y de preñez juegan un papel importante en la etiología del cáncer escamoso de cervix (CaCx), sugiriendo que esta neoplasia es de origen infeccioso y se transmite por vía venérea. El HSV-II, responsable de la mayoría de las lesiones genitales, ha sido asociado al CaCx basándose en numerosos estudios virológicos y seroepidemiológicos.

Siendo el HSV-II un virus que se transmite en forma venérea (108) y que los resultados *in vivo* e *in vitro* indican que son capaces de transformar células, ha enfatizado su posible papel carcinogénico.

Estudios epidemiológicos revelan que la edad promedio de la primera relación sexual es más temprana en

mujeres con CaCx que entre las controles. Estas pacientes suelen tener más parejas sexuales y un índice más elevado de promiscuidad (109). Otros autores han negado que la promiscuidad per se esté relacionada con el cáncer de cuello de útero (43). Se ha observado que las mujeres con infecciones herpéticas tienen mayor probabilidad de desarrollar anaplasia cervical (110). El nivel de anticuerpos es significativamente más alto en las pacientes con CaCx, que en controles de semejante nivel socioeconómico, edad y raza (111).

La edad promedio de las poblaciones infectadas con HSV-II precede en al menos 6 años el promedio de edad a la aparición del tumor, indicando que si este virus es el agente etiológico debe actuar en forma persistente (110) o latente. Basándose en estudios in vitro, la persistencia del virus en las células infectadas depende de la detención temprana de la multiplicación viral, antes que el virus exprese aquellas funciones responsables de la inhibición de la síntesis macromolecular de la célula huésped. Por lo tanto, el virus permanecería en forma persistente, y expresaría aquella parte del genoma que lleva a la síntesis de proteínas virales, asociadas directa o indirectamente con la transformación. Podría pensarse que determinados factores afecten selectivamente la evolución de estas células "transformadas" lo que explicaría la formación del tumor. Tales factores podrían ser fisiológicos, ambientales o inmunológicos (34).

La búsqueda de Ag herpéticos estructurales fue infructuosa en biopsias de células neoplásicas de cuello de útero (112). Tampoco se observaron partículas virales ni signos de infección productiva (34). Sin

embargo se han detectado Ag en células exfoliadas tumorales. Así Pacsa y col reportaron que el 41% de las mujeres con desordenes cervicales, 61% con displasias y 94% con carcinomas invasivos poseían Ag de HSV-II respecto de un 9% en mujeres con epitelio cervical normal (113).

Los datos anteriores indicarían que el genoma o parte del mismo persiste en las células tumorales y se desreprime por algún factor, como por ejemplo la exposición de las células tumorales a condiciones de stress como las secreciones vaginales de pH alcalino o condiciones de mala nutrición.

Se ha aislado HSV-II infeccioso de un cultivo de carcinoma cervical in situ, sometido a alto pH(114).

Además Frenkel y col usando técnicas de cinética de reasociación DNA-DNA encontraron 1 a 3.5 copias por célula de trozos de DNA viral, en una biopsia de carcinoma cervical invasivo. Estos trozos representan el 40% del genoma herpético (115). Por lo tanto el 60% de la molécula de DNA se pierde. Esto podría explicar porque no se encuentra en los tejidos tumorales virus completo. La porción de DNA presente podría unirse al DNA celular y llevar a la célula a una transformación oncogénica. La parte faltante sería necesaria para producir partículas infecciosas (116).

Se ha purificado un Ag tumoral AG-4, codificado por HSV-II. Este Ag fue preparado sobre células Hep-2 infectadas con dicho virus bajo condiciones no líti- cas. Este Ag es codificado por el virus, forma parte de su estructura pero no de su superficie, ya que el uso de sueros específicos no bloquea la capacidad infecciosa del virus.

Se estudió la prevalencia de Ac AG-4 en pacientes con

carcinoma invasivo respecto de la población control (12%) (117). El 43% de las mujeres con atipia cervical, el 65% de las portadoras de un carcinoma in situ y el 85% con CaCx invasivo poseían Ac contra este Ag. Por lo tanto el AG-4 refleja el progreso de la lesión neoplásica. Además no se encontró Ac en pacientes tratadas exitosamente y sin evidencia de neoplasia recurrente. Los datos anteriores indican una asociación entre este producto viral (AG-4) y el desarrollo del tumor.

Los trabajos con Ag internos de la partícula viral o Ag no estructurales (como el NVA) (118) abren nuevas perspectivas ya que eliminan los errores del estudio de los Ag neutralizantes (como las reacciones cruzadas entre los dos géneros de Herpes Simplex).

Otros datos experimentales in vivo e in vitro sustentan el papel de los HSV-II en CaCx. Se realizó un estudio sobre monos cebus infectados intravaginalmente con este virus. Varios animales que recibieron virus y mostraron evidencias de infección, desarrollaron displasia cervical en distinto grado (104). La displasia es considerada como una condición premaligna potencial.

Los trabajos de Centifanto y col (119) indican que el hombre es reservorio y portador sano de HSV-II. Estos autores aislaron virus del 15% de los hombres asintomáticos estudiados, sin historia previa de enfermedad herpética. El hombre estaría infectado crónicamente. Este estado se caracteriza por una replicación viral continua (aunque en niveles bajos) en las células del tracto genitourinario.

Poblaciones donde la práctica de la circuncisión está difundida (judía, árabe) tiene una menor incidencia de cáncer cervical (34). Esto sumado a que el HSV-II



ha sido aislado de smegma, indica que una poca higiene genital masculina podría ser un factor en la carcinogénesis cervical (120).

Un estudio realizado en Puerto Rico demuestra que las esposas de 1064 hombres con diagnóstico de cáncer de Pene, tienen una mayor incidencia de CaCx (121).

Kessler estudió el riesgo de desarrollar CaCx entre las mujeres de hombres cuyas primeras esposas desarrollaron anaplasia cervical (122). Se encontró en este grupo mayor número de mujeres con esta patología, respecto de controles con características semejantes.

Los datos anteriores enfatizan que el hombre puede transmitir via venérea un factor de riesgo de cáncer genital en las mujeres.

No se puede descartar que los virus herpes actúen como cocarcinógeno de otro(s) factor(s) siendo tan alto el porcentaje de la población normal con Ac contra HSV-II y sólo un número escaso que desarrolla CaCx.

### Diagnóstico de Laboratorio

Las técnicas de laboratorio se utilizan para confirmar el diagnóstico clínico. Algunas infecciones herpéticas son fácilmente diagnosticables, aunque el laboratorio da la certeza. Otras infecciones a HSV, como conjuntivitis, uretritis, cistitis prostática, infecciones neurológicas (encefalitis, meningitis, o mielitis) y aquellas lesiones locales o diseminadas con localizaciones inusuales, sólo se diagnostican con la ayuda del laboratorio.

En las lesiones a HSV los criterios de diagnóstico utilizados son:

- a) virológico: consiste en el aislamiento e identificación de la partícula viral.
- b) citológico: se basan en la demostración de la acción viral específica a nivel celular.
- c) serológico: es la detección de Ac anti-HSV en el suero de los pacientes.

#### Criterio virológico:

Las muestras se obtienen de hisopados faríngeos, oculares o genitales, de líquido vesicular, cefalorraquídeo o sangre (123,124). Como los HSV soportan mal el pH bajo y la desecación, el material obtenido debe sumergirse en un medio conservador, al cual se le agregan antibióticos para prevenir infecciones bacterianas.

El éxito del aislamiento depende del momento en que se toma la muestra respecto de la evolución de la enfermedad, del método de colección y preservación del virus.

El aislamiento se realiza inoculando la muestra sobre células en cultivo de tejidos o huevos embrionados, siendo el primer método más utilizado. Una vez inoculada la muestra al cultivo celular se observa periódicamente hasta la aparición del ECP característico de HSV. Este se desarrolla en general dentro de las 48-72 horas (123), lo cual permite un diagnóstico relativamente rápido. La velocidad en la aparición del ECP es una función del inóculo. Esta a su vez se relaciona con el momento en el cual fue tomada la muestra, ya que la producción de virus es mayor dentro de las 48 horas de desarrollo de la lesión herpética y disminuye luego rápidamente.

Estudios realizados sobre la evolución de los títulos virales en las lesiones labiales a HSV revelan que estos son más altos durante las primeras horas, cuando la lesión está en estado vesicular. Luego el título decae a medida que la lesión pasa a úlcera o costra. No se aísla virus luego de las 120 horas de iniciado el episodio clínico. A pesar que el título viral es mayor en las vesículas, en un alto porcentaje de pacientes puede aislarse HSV de úlceras o costra. En algunos pacientes el pasaje de una lesión de vesícula a úlcera o costra no está asociada necesariamente con una caída aguda en la cantidad de virus (124).

Una vez aislado el agente viral debe identificarse. Para ello generalmente se enfrenta el virus con Ac específicos (suero inmune) buscando neutralizar su efecto. En el caso de un aislamiento viral en cultivo de tejido la técnica de identificación más sencilla y precisa es la búsqueda en las células infectadas de Ag específicos por medio de la técnica de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa (123).

El diagnóstico viral puede ser confirmado por el estudio del líquido vesicular al microscopio electrónico en búsqueda de partículas herpéticas.

#### Criterio citológico

Estas técnicas consisten en demostrar los efectos virales específicos en las células infectadas.

En extendidos celulares obtenidos de la base de las vesículas o úlceras se observan frecuentemente células multinucleadas, marginación de cromatina, inclusiones eosinófilas intracelulares u otras alteraciones características de una infección herpética. Estas alteraciones pueden observarse también en extendidos Papanicolaou, especialmente útil en el caso de la mujer embarazada. Otras técnicas como la inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa (125, 126) permiten demostrar Ag específicos en las células de la lesión.

Con el exámen citopatológico es difícil distinguir entre una lesión en piel producida por HSV o por Varicella-Zoster, o entre una infección urinaria causada por HSV o por Citomegalovirus (20). En este sentido las técnicas virológicas son más sensibles. Sin embargo las técnicas citológicas están muy difundidas, pues es factible realizarlas en cualquier hospital y en forma rápida.

El diagnóstico histológico puede realizarse de biopsias o autopsias luego de una adecuada fijación. Esto es particularmente útil en el caso de herpes neonatal (127).

### Criterio serológico

Han sido utilizados varios métodos para detectar infecciones a HSV como: cinética de neutralización, microneutralización, liberación de  $\text{Cr}^{51}$ , inhibición de la hemoaglutinación pasiva, fijación de complemento, radioinmunoensayo en fase sólida (123, 128, 129). Estas técnicas son relativamente útiles en la detección de infecciones primarias. En este caso deben tomarse dos muestras de suero, una en la fase inicial de la enfermedad y otra a los 20 días aproximadamente. Debe observarse un aumento de 4 veces o más en el nivel de Ac, respecto a la primera muestra con título nulo o muy bajo.

Los métodos serológicos no parecen ser útiles en el caso de infecciones recurrentes. El estudio de niveles de Ac en estos pacientes no reveló diferencias estadísticas entre los títulos obtenidos en la fase aguda y la fase convalesciente (124).

En el caso de muestras tomadas al azar, p.e. para determinar el nivel de Ac anti-herpético en una población con episodios herpéticos quizá muy alejados, los resultados serológicos son difíciles de evaluar especialmente porque HSV-1 y HSV-2 comparten Ag y hay reactividad cruzada. Otro inconveniente surge del hecho que muchos laboratorios utilizan prototipos de cepas herpéticas aisladas en otros países que son antigénicamente diferentes de las cepas locales causando pérdida de especificidad.

La técnica de enzimas unida a un inmuno-absorbente (Elisa) reemplaza a las técnicas convencionales de titulación de Ac. Esta técnica es más sensible que la de fijación de complemento y además es simple y rápida (130).

### Tipificación de las cepas de HSV

Los dos géneros de HSV difieren en su composición antigénica y en sus propiedades bioquímicas, biológicas y físicas (131). En base a esto se han desarrollado varios métodos para identificarlos.

Se ha hablado sobre todo en la literatura más vieja, que la formación de placas sobre membrana corioalantoidea de embrión de pollo, permite separar los dos géneros (132). Sin embargo la variedad en tamaño de placas no sólo entre las cepas que pertenecen a uno u otro tipo, sino a las variantes dentro de un mismo género invalidan este test morfológico como procedimiento de tipificación.

Cohen y col (133) observaron que la timidina, aunque es un precursor de la síntesis de ADN, inhibe la multiplicación de HSV-2, pero no la de HSV-1, si se agrega en altas concentraciones al medio de cultivo. Sin embargo se han obtenido cepas con grado intermedio de sensibilidad, lo que hace al método poco útil para la tipificación.

Los métodos actualmente más utilizados para la identificación de HSV-1 y HSV-2 son:

- El estudio del ECP en cultivos sensibles: en algunas líneas celulares los dos géneros de HSV se comportan en una forma diferencial. Así en cultivos de embrión de pollo, HSV-1 da una destrucción difusa, mientras que HSV-2 lo destruye en forma focal, quizá porque se transmite preferencialmente célula a célula (134).

- El estudio morfológico de las alteraciones en las células infectadas también ha sido utilizado como criterio de identificación. En el núcleo de células infectadas por HSV-2 se observan por microscopía

electrónica microtúbulos, que no se detectan en células infectadas con HSV-1 (135).

- HSV-1 es más estable y se inactiva poco a 37°C respecto de HSV-2. La inestabilidad a la temperatura puede medirse como reducción de infectividad y así distinguir entre las cepas faciales y genitales (136).

- Se sabe que la densidad ( $\rho$ ) del ADN difiere en ambos géneros. La  $\rho$  del ADN de HSV-1 es 1.725 g/cm<sup>3</sup> mientras que la de HSV-2 es 1.727 g/cm<sup>3</sup> (137)

- En las células infectadas con Herpes se induce actividad timidina kinasa (TK). Esta enzima es una deoxipirimidina kinasa, que difiere de las enzimas del huésped. A su vez las enzimas inducidas por los dos géneros difieren en su especificidad inmunológica, sus propiedades alostéricas y la sensibilidad a la temperatura (138). Estas propiedades han sido utilizadas para la tipificación, especialmente el hecho que la TK inducidas en células infectadas con HSV-1 es más resistente al calor.

- Se han demostrado focos necróticos sobre la superficie del hígado, cuando se inocula HSV a ratones intraperitonealmente. HSV-2 produce necrosis focales mientras que HSV-1 produce daños generalizados.

Este test es útil para hacer una prueba screening pero la identificación debe confirmarse con otros métodos (139).

-Otro método de tipificación es serológico p.e. la neutralización que consiste en enfrentar el virus desconocido con suero anti HSV-1 y anti HSV-2 y testar cual de ellos bloquea la infectividad viral(136).

-Actualmente se está difundiendo un test de liberación de Cr<sup>51</sup> que consiste en infectar con el virus desconocido células que se marcan posteriormente con

este isotopo. Estos se colocan en presencia de complemento y suero inmune anti HSV-1 y HSV-2. La actividad citolítica del Ac se manifestará en el caso que haya un reconocimiento entre los Ag en la superficie de las células marcadas y el Ac correspondiente. En este caso se liberará  $Cr^{51}$ .

Plummer y col (136) indicaron que los test de medición de la  $r^+$  del ADN y la estabilidad de TK son buenos en la discriminación de los géneros; pero que la prueba de termo-labilidad de la infectividad da resultados muy pobres.

Vahne y col (131) recomiendan la inoculación intraperitoneal en ratón para un screening test. Esta tipificación preliminar puede ser confirmada serológicamente. En el caso que no se obtenga un resultado claro se recurre al estudio de la estabilidad a temperatura de la TK inducida por el virus.

La disponibilidad de técnicas de laboratorio simplificadas coincide con la necesidad para el diagnóstico rápido y seguro de las infecciones virales comunes, especialmente aquellas debidas por HSV. Esta necesidad ha surgido como resultado del incremento de las infecciones herpéticas y la posible utilización de drogas antivirales efectivas.

#### Diagnóstico y Prevención de HSV neonatal

La principal vía de contagio de HSV del recién nacido es el tracto materno infectado al tiempo del nacimiento. Visintine y col (40) en un trabajo reciente detallaron las medidas a tomar en el caso de embarazadas con infección herpética genital.

Es necesario controlar a la embarazada periódicamente en busca de virus y/o células infectadas. Los



métodos virológicos son más sensibles en detectar infecciones, sin embargo los extendidos Papanicolaou de cervix y vagina, en búsqueda de alteraciones producidas por HSV, pueden realizarse en cualquier hospital y rápidamente.

Esos autores mencionados recomiendan controlar periódicamente a: 1- mujeres con HSV genital detectado en cualquier momento del embarazo; 2- embarazadas con historia previa de HSV genital recurrente; 3- mujeres cuyas parejas tienen herpes genital.

En caso de detectar infección en el momento del nacimiento se aconseja el parto por cesárea. Esta debe realizarse dentro de las tres horas de ruptura de las membranas. No se sabe si la cesárea es beneficiosa en el caso que las membranas se hayan roto por más de 4-6 horas.

Las pacientes deben seguirse a partir de la semana 32 de gestación, pues antes el feto, en general, está inmaduro para nacer. Los controles deben repetirse a las 34, 36 y luego cada semana. Este control evita una cesárea innecesaria si la mujer tuvo un brote herpético durante los primeros meses de gestación. Como no se conocen exactamente los riesgos de malformaciones congénitas en mujeres con HSV durante el primer trimestre de gestación, no se recomienda el aborto terapéutico.

De igual forma, los bebés de mujeres que entren en las tres categorías mencionadas antes, deben controlarse especialmente durante las dos semanas de vida, ya que el comienzo de una infección generalizada es alrededor de los 6 días y la de una encefalitis a los 11 días post-nacimiento.

Toda persona con HSV debe evitar estar en contacto con los niños recién nacidos.

### Terapia de las infecciones herpéticas

La terapia y también la prevención de las infecciones a HSV se ven trabadas por la poca información de la inmunidad antiherpética y la evolución natural de la enfermedad, sobre todo respecto a la latencia.

Una de las mayores dificultades encontradas en demostrar la eficacia terapéutica de distintos tratamientos es la corta evolución de la enfermedad y el curso variable de la enfermedad entre distintas personas y aún dentro del mismo paciente. Otro problema es demostrar que las recurrencias disminuyen o desaparecen luego de la terapia.

Ultimamente han sido empleadas drogas activas foto-dinámicamente como antivirales. La fotoinactivación de un virus se basa en su fotosensibilización por medio de determinados colorantes heterocíclicos como el rojo neutro, el azul de toluidina, el naranja de acridina o la proflavina. Durante la replicación viral el colorante se incorpora al AN de las nuevas partículas virales, volviendo al virión sensible a la luz. Cuando se exponen estas partículas a la energía lumínica, la luz visible se absorbe y en presencia de  $O_2$  molecular ocurre una reacción de oxidación que rompe la estructura del AN viral y hace a la partícula no infecciosa.

Se ha empleado este método experimentalmente en queratitis herpética de conejo y en infecciones humanas de córnea y piel con resultados variables a pesar que los trabajos in vitro fueron muy promisorios (140,141) Los trabajos con proflavina en el tratamiento de HSV ocular en conejo varían desde exitosos (142) hasta sin efecto (143). El tratamiento de este colorante y luz en queratitis humanas ha fracasado (144).

Roome y col. trataron infecciones herpéticas genitales con rojo neutro y foto-inactivación sin resultados efectivos (145).

Otras drogas testadas con resultados contradictorios son los análogos de nucleótidos como la 5-iodo-2-deoxiuridina (IDU), 1-β-D-arabinosilcitosina (Ara - C), 9-β-arabinosiladenina, (Ara-A), etc. In vitro estas drogas tienen un efecto inhibitor sobre la replicación herpética (146,147).

Ara-A fue aplicado exitosamente en forma tópica en queratitis herpética (148), pero fue inefectivo en el tratamiento de herpes genital masculino (149). En forma análoga, el antimetabolito más utilizado, IDU fue efectivo en el tratamiento de HSV ocular (150) aunque poco útil en infecciones con compromiso estromal. Por otro lado fue inefectivo en la curación de herpes labial (151). Ambas drogas son citotóxicas en concentraciones antivirales (152). Además se ha demostrado la teratogenicidad de la IDU en conejos preñados que recibieron esta droga en forma tópica en los ojos, en concentraciones semejantes a las usadas en infecciones humanas. Resultados semejantes se obtuvieron con Ara-A (152).

Actualmente se están ensayando otros análogos como el 5-iodo-5'-amino-2', 5'-dideoxiuridina, que es tan efectivo como la IDU en curar queratitis herpéticas en conejos, pero parece no ser tóxica ni teratogénica (152).

Ni Ara-A ni IDU modificaron el curso de infecciones herpéticas en ratas recién nacidas (153). La adenina arabinosa, administrada tempranamente a pacientes con encefalitis a HSV-1 redujo la mortalidad del 70 al 28% (154). En estudios experimentales, la administración conjunta de esta droga más inmunoglobulina inmune,

aumenta la protección contra la encefalitis a HSV (155).

En un ensayo doble ciego de HSV genital se comprobó la eficacia del tratamiento con un análogo de la glucosa, la 2-deoxi-D-glucosa (2 d Glc) (156).

Se ha ensayado una terapia tópica de ácido fosfonoacético en queratitis experimental con resultados semejantes a los obtenidos con IDU (157).

Varios tipos de agentes inmunizantes incluyendo autoinmunización, vacunas de Smallpox y BCG han sido usados con poco éxito en el tratamiento y prevención del Herpes simplex recurrente (20).

Extracto de linfocitos de animales previamente inmunizados con HSV aplicado tópicamente fue capaz de mejorar el curso de HSV ocular en cobayo (158).

También ha sido empleado, en el caso de HSV ocular, la cauterización química. La efectividad de este tratamiento esta limitada a las lesiones superficiales y en este sentido su valor es semejante al de la IDU. Los inductores del interferón, como el Poly I:C, dió buenos resultados en queratitis herpética. Este al penetrar profundamente en la cornea protege al estroma, y por lo tanto es superior a la IDU (159,160). La acción terapéutica del interferón en queratitis herpéticas ha sido testada experimentalmente en monos (161) y conejos (162,163). En el caso de infecciones humanas ha sido probado con éxito en infecciones oculares (164, 165) y en procesos mucocutáneos (166) aunque en este caso no ha sido realizado ningún estudio doble ciego controlado).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Fenner, F.; McAuslan, B.R.; Mims, C.A.; Sambrook, J.; White, D.O.: The Biology of Animal Viruses. Academic Press Ed. (1974).-
- 2) Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H. S.; Wood, W.B.: Tratado de Microbiología. Salvat Editores (1974).-
- 3) Wadsworth, S.; Jacob, R.J.; Roizman, B.: Anatomy of Herpes simplex virus DNA II. Size, composition and arrangement of inverted terminal repetitions. J.Virol.15: 1487-1497 (1975).-
- 4) Goodheart, C.R.; Plummer, G.; Waner, J.L.: Density differences of DNA of herpes simplex virus subtypes 1 and 2. Virology 35: 473-475 (1968).-
- 5) Kieff, E.D.; Bachenheimer, S.L.; Roizman, B.: Size, composition and structure of the DNA of subtypes 1 and 2 herpes simplex virus. J.Virol.8: 125-132 (1971).-
- 6) Frenkel, N.; Roizman, B.: Herpes simplex virus: genome size and redundancy studied by renaturation studies. J.Virol.8: 591-598 (1971).-
- 7) Hirsch, I.; Vonka, V.: Ribonucleotides linked to DNA of Herpes simplex Virus type 1. J.Virol.13: 1162-1168 (1974).-
- 8) Roth, Y.F.: Viral nucleoprotein complex in cells infected by Herpes type 1. Abstracts from the Herpes virus Workshop Aug.20-25th p.61 (1978).-
- 9) Sheldrick, P. Berthelot, N.: Inverted repetitions in the chromosome of Herpes simplex virus. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.39: 667-678 (1974).-

- 10) Roizman, B.; Hayward, G.; Jacob, R.; Wadsworth, S.; Frenkel, N.; Honess, R.W.; Kozak, M.: Human Herpes virus: a model for molecular organization and regulation of Herpes virus: A review. *Oncogenesis and Herpes Virus II*. G.de Thé, M.A. Epstein and A. Zur Hausen (Ed.): 3-38 (1975).-
- 11) Morse, L.S.; Buchman, T.G.; Roizman, B.; Schaffer, P.A.: Anatomy of Herpes simplex virus DNA IX. Apparent exclusion of some parental DNA arrangements in the Generation of Intertypic (HSV-1 x HSV-2) Recombinants. *J.Virol.* 24 (1): 231-248 (1977).-
- 12) Kieff, E.; Hoyer, B.; Bachenheimer, S.L., et al: Genetic relatedness of Type 1 and Type 2 herpes simplex virus. *J.Virol.* 9: 738-745 (1972).-
- 13) Heine, J.W.; Spear, P.G.; Roizman, B.: The proteins specified by Herpes simplex virus. *Viral proteins in the plasmamembrane*. *J.Virol.* 9: 431-437 (1972).-
- 14) Vernon, S.K.; Lawrence, W.C.; Cohen, G.H.: Morphological components of Herpes Virus 1. Intercapsomeric fibrils and the geometry of the capsid. *Intervirology* 4: 237-248 (1974).-
- 15) Clements, J.B.; Hay, J.: RNA and protein synthesis in Herpes virus-Infected Cells. Review. *J.Gen. Virol.* 35: 1-12 (1977).-
- 16) Gibson, W.; Roizman, B.: Compartmentalization of spermine and spermidine in Herpes simplex virion. *Proc.Natl.Acad.Sci.(Wash)* 68: 2818-2821 (1971).-
- 17) Morgan, C.; Rose, H.M.; Mednis, B.: Electronmicroscopy of Herpes simplex virus. I. Entry *J.Virol.* 2: 507-516 (1968).-

- 18) Dales, S.; Silverberg, H.: Viropexis of Herpes simplex virus by HeLa cells. *Virology* 37: 475-480 (1969).-
- 19) Sarmiento, M.; Lee, G.; Spear, P.G.: Herpes simplex virus (HSV) glycoproteins and their roles in virion infectivity. Abstracts from the Herpes Virus Workshop (Cambridge) Aug. 20-25th p.81 (1978).-
- 20) Aurelian, L.: The "Virus of Love" and Cancer. *Am. J. of Med. Tech.* 40(11): 496-512 (1974).-
- 21) Stoker, M.G.P.: Mode of intercellular transfer of Herpes virus. *Nature (Lond.)* 182: 1525-1526 (1958).-
- 22) Weissbach, A.; Hang, S.C.L.; Aucker, J.; Miller, R.: Characterization of Herpes simplex virus-induced deoxy-ribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.* 248: 6270-6277 (1973).-
- 23) Müller, W.E.G.; Zahn, R.K.; Falke, D.: Variation of DNA and RNA polymerase activities in cells infected with Herpes simplex virus type 2. *Virology* 86: 320-330 (1978).-
- 24) Müller, W.E.G.; Falke, D.; Zahn, K.; Arendes, J.: Alterations of Polyadenylate Nuclease Activities in herpes simplex virus-infected cells. *Virology* 87: 89-95 (1978).-
- 25) Costanzo, F.; Campadelli-Fiume, G.; Foa-Tomasi, L.; Cassai, E.: Evidence that herpes simplex virus DNA is transcribed by cellular RNA Polymerase B. *J. of Virology* 21 (3): 996-1001 (1977).-
- 26) Morse, L.S.; Pereira, L.; Roizman, B.; Schaffer, P.: Anatomy of herpes simplex virus (HSV) DNA. X: Mapping of Genes by Analysis of Polypeptides and Functions specified by HSV-1 x HSV-2 Recombinants. *J. of Virology* 26 (2): 389-410 (1978).-

- 27) Strandberg, J.D.; Aurelian, L.: Replication of canine Herpes virus II. Virus development and release in infected dog kidney cells. *J.Virol.* 4: 480-489 (1969).-
- 28) Ben-Porat, T.; Kaplan, A.S.: Studies on the biogenesis of herpes virus envelope. *Nature (Lond.)* 235: 165-166 (1972).-
- 29) Morgan, C.; Rose, H.M.; Holden, M.; Jones, E.P.: Electron microscopic observation on the development of herpes simplex virus. *J.Gen. Virol.* 110: 643-656 (1959).-
- 30) Falke, D.: Membranveränderungen virusinfizierter Zellen. *Drug.Res.* 22: 2040-2043 (1972).-
- 31) Huang, A.S.: Defective interfering viruses. *Annal Review of Microbiol.* 27: 101-117 (1973).-
- 32) Kaufman, R.H.; Gardner, H.L.; Rawls, W.E.; Dixon, R.E.; Young, R.L.: Clinical features of herpes genitalis. *Ca.Res.* 33: 1446-1451 (1973).-
- 33) Nahmias, A.J.; Roizman, B.: Infection with Herpes simplex virus 1 and 2. *New.Eng.J.Med.* 289: 667-674 (1973).-
- 34) Aurelian, L.: Coitus and Cancer. *Bulletin of the New York Academy of Medicine. Second Series* 52 (8): 910-934 (1976).-
- 35) Haas, R.; Vivell, O.: Infecciones humanas por virus y rickettsias. *Editorial Cientffica Médica.* (1968).-
- 36) Frezzoti, R.; Guerra, R.: Malattic oculari da herpes virus (virus dell'herpes simplex, dell'herpes zoster, varicella). *C.Mal.Infett.* 23: 689-729 (1971).-
- 37) Oh, J.O.; Kimura, S.J.; Ostler, B.: Acute ocular



- infection by type 2 Herpes simplex virus in Adults. Arch.of Ophthalmol.93: 1127-1129 (1975).-
- 38) Oh, J.O.; Stevens, T.R.: Comparison of types 1 and 2 Herpes virus hominis infection of rabbit eyes. Arch.of Ophthalmol.90: 473-476 (1973).-
- 39) Hagler, W.S.; Walters, P.V.; Nahmias, A.J.: Ocular involvement in neonatal herpes simplex virus infection. Arch.of Ophthalmol.82: 169-176(1969).-
- 40) Visintine, A.M.; Nahmias, A.J.; Josey, W.E.: Genital herpes. Perinatal care 2(9): 31-41 (1978).-
- 41) Chang, T.; Fumara, N.J.; Weinstein, L.: Genital Herpes: Rome clinical and Laboratory Observations. JAMA 229(5): 544-545 (1974).-
- 42) Nahmias, A.J.; Josey, W.E.; Naib, Z.M., et al: Antibodies to Herpes hominis types 1 and 2 in humans. I. Am.J.Epidemiol.91: 539-542 (1970).-
- 43) Melnick, J.L.; Adam, E.: Epidemiological approaches to determining whether Herpes virus is the Etiological Agent of Cervical Cancer. Prog.Exp.Tumor Res.21: 49-69 (1978).-
- 44) Chow, A.W.: Genital infection with type 2 Herpes simplex virus. Postgraduate Medicine 58 (2): 66-70 (1975).-
- 45) Nahmias, A.J.; Dowdle, W.R.; Naib, Z.M.; Josey, W.E.; McLone, D.; Domescick, G.: Genital infection with type 2 Herpes virus hominis. A commonly occurring venereal disease. Br.J.Vener.Dis.45: 294-298 (1969).-
- 46) Jeansson, S.; Molin, L.: Genital Herpes virus hominis infection: a venereal disease? Lancet 1: 1064 (1970).-

- 47) Ng, A.B.; Reagan, J.W.; Yen, S.S.: Herpes genitalis: Clinical and Cytopathologic experience with 256 patients. *Obstet. Gynecol.* 36: 645-651 (1970).-
- 48) Young, A.W.: Herpes Genitalis. *Med. Clin. North Am.* 56: 1175-1178 (1972).-
- 49) Parker, J.D.; Banatvala, J.E.: Herpes genitalis - Clinical and Virological studies. *Brit. J. Vener. Dis.* 43: 212-216 (1967).-
- 50) Centifanto, Y.M.; Deardouff, S.L.; Kaufman, H.E.: Herpes virus type 2 in the male genitourinary tract. *Science* 178: 318-319 (1972).-
- 51) Skoldenberg, B.: On the role of viruses in acute infectious diseases of the central nervous system. *Scand. J. Infect. Dis. (Suppl. 3)* 1: 96 (1972).-
- 52) Johnson, R.T.: The pathogenesis of Herpes virus Encephalitis. Virus pathways to the nervous system of suckling mice demonstrated by fluorescent antibody attaining. *J. Exp. Med.* 119: 343-356 (1964).-
- 53) Craig, C.P.; Nahmias, A.J.: Different patterns of neurologic involvement in Herpes simplex virus types 1 and 2 . Isolation of Herpes simplex virus type 2 from the Buffy Coat of two adults with Meningitis. *J. Infect. Dis.* 127: 365-372 (1973).-
- 54) Finelli, P.F.: Herpes simplex virus and the Human nervous system. Current concepts and review. *Military Medicine* 140(11): 765-771 (1975).-
- 55) Adour, K.K.; Bell, D.N.; Hilsinger, R.L.: Herpes simplex virus in Idiopathic Facial Paralysis (Bell Palsy). *JAMA* 233(6): 527-530 (1975).-
- 56) Glogan, R.; Hanna, L.; Jawetz, E.: Herpetic Whitlow as part of genital Virus Infection. *J. of Infect.*

- Dis.136 (5): 689-692 (1977).-
- 57) Britz, M.; Sibulkin, D.: Recurrent erythema Multiforme and Herpes Genitalis (Type 2). JAMA 233 (7): 812-813 (1975).-
- 58) Nahmias, A.J.; Josey, W.E.; Zaib, Z.M.; Freeman, M.G.; Fernández, R.J.; Wheeler, J.H.: Perinatal Risk associated with Maternal Herpes simplex virus Infection. Am.J.of Obstet.and Gynecol.110: 825-834 (1971).-
- 59) Stevens, J.G.: Latent Herpes simplex virus and the Nervous System. Current topics of Microbiology and Immunobiology 70: 31-50 (1975).-
- 60) Cook, M.L.; Stevens, J.: Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: evidence for intra axonal transport of infection. Inf.and Imm. 7: 272-288 (1973).-
- 61) Kristensson, K.; Lycke, E.; Sjostrand, J.: Spread of Herpes simplex virus in peripheral nerves. Acta Neuropath.17: 44-53 (1971).-
- 62) Severin, M.; White, R.: Am.J.Pathol.53: 1009-10015 (1968).-
- 63) Stevens, J.G.; Cook, M.L.: Latent Herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. Science 173: 843-845 (1971).-
- 64) Stevens, J.G.; Nesburn, A.B.; Cook, M.L.: Latent Herpes simplex virus from trigeminal ganglia of rabbits with recurrent eye infection. Nature (Lond.) New Biol. 235: 216-217 (1972).-
- 65) Walz, M.A.; Price, R.W.; Notkins, A.L.: Latent Infection with Herpes simplex virus types 1 and 2: viral reactivation in vivo after neurectomy. Science 184: 1185-1187 (1974).-

- 66) Cook, M.L.; Stevens, J.G.: Latent herpetic infections following experimental viremia. J.of General Virology 31: 75-80 (1976).-
- 67) Price, R.; Katz, B.J.; Notkins, A.L.: Latent infection of peripheral ANS with Herpes simplex virus. Nature (Lond.) 257: 686-688 (1975).-
- 68) Baringer, J.R.: Herpes simplex virus in human sensory ganglia. Oncogenesis and Herpesvirus II Part 2. G.de Thé, M.A.Epstein and H.Zur Hausen (Ed.). IARC p.73-77 (1975).-
- 69) Walz, M.A.; Price, R.W.; Hayashi, K.; Katz, B.; Notkins, A.: Effect of Immunization on acute and latent infections of Vagino-uterine Tissue with Herpes simplex types 1 and 2. The J.of Inf.Dis.135 (5): 744-752 (1977).-
- 70) Bal, E.: Latencia de los virus herpes en el sistema nervioso. Medicina 36 (4): 387-389 (1976).-
- 71) Vahlne, A.; Nyström, B.; Sandberg, M.; Hamberger, A.; Lycke, E.: Attachment of Herpes simplex virus to Neurons and Glial Cells. J.Gen.Virol.40: 359-371 (1978).-
- 72) Vahlne, A.; Lycke, E.: Herpes simplex infection of mouse neuroblastoma cells. Proc.of the Soc.of Exp. Biol.and Med.156: 82-87 (1977).-
- 73) McLennan, J.; Darby, G.: Latent HSV in sensory ganglia. Abstracts from Herpes Virus Workshop, Cambridge Aug.20-25th p.10 (1978).-
- 74) Roizman, B.: Herpes virus, latency and cancer: a biochemical approach. R.E.S.7: 312-320 (1974).-
- 75) Docherty, J.J.; Chopan, M.: The latent Herpes simplex virus. Bacteriological Review 88 (4): 337-355 (1974).-
- 76) O'Neill, F.J.; Goldberg, R.J.; Rapp, F.: Herpes simplex

- virus latency in cultured human cells following treatment with cytosine arabinoside. *J.Gen.Virol.* 14: 189-197 (1972).-
- 77) Rajčáni, J.; Čiampor, F.; Sašo, A: Explantation technique and Latent Herpes virus infection. *Herpes virus Workshop, Cambridge Aug.20-25th* p.7 (1978).-
- 78) de la Peña, N.C.; Bal, E.; Puricelli, L.; Díaz, A.; Lustig, E.: Interferon in the Replication of Herpes simplex virus in Normal and Pathological Nerve cells. *Abstracts from the Oncogenesis and Herpes virus (Boston, U.S.A.) July 25-29th* p.131 (1977).-
- 79) Váczi, L.; Boldogh, I.; Gönczöl, E.: Activation of Herpes specific antigens and infectious virus in a hamster cell line transformed by HSV-2. *Arch.Ges Virusforsch* 44: 62-69 (1974).-
- 80) Varani, J.; Kelleher, J.J.: Effects of 5-Bromo deoxyuridine and 5-Iodo deoxyuridine on a Latent Herpes simplex virus Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 8 (1): 18-21 (1975).-
- 81) Hill, T.J.; Harbour, D.A.; Blyth, W.A.: Mechanisms of Reactivation of Herpes simplex. *Abstracts from Herpesvirus Workshop, Cambridge Aug.20-25th* p.8 (1978).-
- 82) Chang, T.: Recurrent viral infection (reinfection). *N.Eng.J.of Med.* 284: 765-773 (1971).-
- 83) Glasgow, L.A.: Cellular immunity in host resistance to viral infections. *Arch.Intern.Med.* 126: 125-134 (1970).-
- 84) Pope, J.H.: Transformation in vitro by Herpes viruses: A review. *Oncogenesis and Herpes virus II part I*. G. de Thé, M.A.Epstein and H.Zur Hausen (Ed.). International Agency for Research on Cancer: 367-378 (1975).-

- 85) Boyd, A.; Orme, T.; Boone, C.: Transformation of mouse cells with Herpes simplex virus type 2. *Oncogenesis and Herpes virus II part I*. G.de Thé, M.A. Epstein and H.Zur Hausen (Ed.): 429-436 (1973).-
- 86) Duff, R.; Rapp, F.: Properties of hamster embryo fibroblasts transformed in vitro after exposure to ultraviolet-irradiated Herpes simplex virus 2. *J. Virol.* 8: 469-477 (1971).-
- 87) Munk, K.; Darai, G.: Transformation of embryonic rat fibroblasts by Herpes simplex virus type 2. *Oncogenesis and Herpes virus II Part I*. G.de Thé, M.A. Epstein and H.Zur Hausen (Ed.): 437-443 (1975).-
- 88) Darai, G.; Munk, K.: Human embryonic lung cells abortively infected with Herpes virus hominis type 2 show some properties of cell transformation. *Nature New Biol.* 241: 268-269 (1973).-
- 89) Rapp, F.; Turner, N.: Biochemical transformation of Mouse cells by Herpes simplex virus type 1 and 2: Comparison of different methods for inactivation of viruses. *Archives of Virology* 56: 77-87 (1978).-
- 90) Kucera, G.; Gudson, L.: Transformation of human embryonic fibroblasts by Photodynamically Inactivated HSV-II at supraoptimal temperature. *J.Gen.Virol.* 30: 257-261 (1976).-
- 91) Docherty, J.J.; O'Neill, F.J.; Rapp, F.: Differential susceptibility to herpes simplex viruses of hamster cell lines established after exposure to chemically inactivated herpes virus. *J.Gen.Virol.* 13: 377-384 (1971).-
- 92) Kimura, S.; Flannery, V.; Levy, B.; Schaffer, A.: Oncogenic transformation of primary hamster cells by Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) and an HSV-2 temperature-sensitive mutant. *Int.J.Cancer* 15: 786-798 (1975).-

- 93) Reed, C.L.; Cohen, G.H.; Rapp, F.: Detection of a virus specific antigen on the surface of Herpes simplex virus transformed cells. *J.Virol.* 15: 668-670 (1975).-
- 94) Munyon, W.; Buchsbaum, R.; Paoletti, E.; Mann, J.; Kraiselburd, E.; Davis, D.: Electrophoresis of thymidine kinase activity synthesized by cells transformed by Herpes virus. *Virology* 49: 683-689 (1972).-
- 95) Kraiselburd, E.; Gage, L.P.; Weissbach, A.: Presence of a Herpes simplex virus DNA fragment in an L-cell clone obtained after infection with irradiated herpes simplex virus 1. *J.Mol.Biol.* 97: 533-535 (1975).-
- 96) Leiden, J.; Locker, H.; Frenkel, N.; Rapp, F.: HSV-DNA sequences in transformed cells. Abstracts from Oncogenesis and Herpes virus III (Boston, U.S.A.) July 25-29th p.73 (1977).-
- 97) Collard, W.; Thornton, H.; Green, M.: Cells transformed by human Herpes virus type 2 transcribe virus-specific RNA sequences shared by Herpes virus type 1 and 2. *Nature New Biol.* 243: 264-266 (1973).-
- 98) Jariwalla, R.J.; Aurelian, L.; Ts'o P.O.P.: Neoplastic transformation of Syrian Hamster Embryonic fibroblasts by DNA of Herpes simplex virus type 2. Abstracts from the Fourth International Congress for Virology, The Hague, Aug.30-Sep.6 p.515 (1976).-
- 99) Howett, M.K.; Rapp, F.: Transformation of human cells by non-inactivated Herpes simplex virus. Abstracts from the Fourth International Congress for Virology, The Hague, Aug.30-Sep.6 p.514 (1976).-
- 100) Rapp, F.; Duff, R.: Transformation of Hamster Embryo fibroblasts by Herpes simplex virus type 1 and 2. *Ca. Res.* 33: 1527-1534 (1973).-
- 101) Duff, R.: Quantitative transformation of Swiss/3T3 cells by U.V-irradiated Herpes simplex virus type 2. *Oncogenesis and Herpes viruses II part I.* G.de Thé, M.A. Epstein and H.Zur Hausen (Ed.). IARC p.421 (1975).-
- 102) Kimura, S.; Sparza, J.; Benyesh-Melnick, M.; Schaffer, P.A.:

- Enhanced replication of temperature sensitive mutants of herpes simplex type 2 (HSV-2) at the non-permissive temperature in cells transformed by HSV-2. *Intervirology* 3: 162-169 (1974).-
- 103) Camacho, A.; Spear, P.G.: Transformation of hamster embryo fibroblasts by a specific fragment of the Herpes virus (HSV) genome. Abstracts from the Herpes Virus Workshop, Cambridge Aug.20-25th p. 106 (1978).-
- 104) Ablashi, D.V.; Easton, J.M.; Guegan, J.H.: Herpes viruses and cancer in man and subhuman primates. *Biomedicine* 24: 286-305 (1976).-
- 105) Geder, L.; Kreider, J.; Rapp, F.: Human cells transformed in vitro by Cytomegalovirus: Tumorigenicity in athymic nude mice. *J.Natl.Can. Res.* 58 (4): 1003-1009 (1977).-
- 106) Cassai, E.N.; Tecni, M.; Califano, A.: Caratterizzazione di un virus dell'Herpes simplex isolato da un tumore labiale insorto sulla sede di recidive erpetiche. *Tumori* 60: 325-336 (1974).-
- 107) Sabin, A.B.: Herpes simplex genitalis virus non-virion antigens and their implication in certain human cancers. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 71: 3248-3252 (1974).-
- 108) Rawls, W.E.; Gardner, H.L.; Flanders, R.W.; Lowry, S.P.; Kaufman, R.H.; Melnick, J.L.: Genital herpes in two social groups. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 110: 682-689 (1971).-
- 109) Kessler, I.; Aurelian, L.: Uterine Cervix Cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention. Current Concepts.* Schottenfeld D.(Ed.). Springfield Ill Thomas. Chap.11 (1975).-
- 110) Naib, M.; Nahmias, A.M.; Josey, W.E.; Kramer, J.H.: Genital Herpetic Infection: Association with



- cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 23: 940-945 (1971).-
- 111) Rawls, W.E.; Garfield, Ch.; Seth, P.; Adam, E.: Cervical Cancer: serological and epidemiological considerations of the role of Herpes simplex virus type 2 in cervical cancer. *Ca. Res.* 36: 829-832 (1976).-
- 112) Aurelian, L.; Strandberg, J.D.; Davis, H.J.: HSV-2 antigens absent from biopsied cervical tumor cells: a model consistent with latency. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140: 404-408 (1972).-
- 113) Pacsa, A.S.; Kummerländer, L.; Pejtsik, B.; Kromener, K.; Pali, K.: Herpes simplex virus-specific antigens in exfoliated cervical cells from women with and without cervical anaplasia. *Ca. Res.* 36: 2130-2132 (1976).-
- 114) Aurelian, L.; Strandberg, J.; Melendez, L.; Johnson, L.: HSV-2 isolated from cervical tumor cells grown in tissue culture. *Science* 174(4010): 704-706 (1971).-
- 115) Frenkel, N.; Roizman, B.; Cassai, E.; Nahmias, A.J.: A DNA fragment of Herpes simplex 2 and its transcription in human cervical cancer tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 3784-3789 (1972).-
- 116) Joncas, J.H.: Carcinoma of the Cervix and Herpes Hominis (Simplex) type 2 virus Infection. *Rev. Can. Biol.* 33 (3): 223-228 (1974).-
- 117) Aurelian, L.; Cornish, J.D.; Smith, M.F.: Herpes virus type 2-induced tumor specific antigen (AG-4) and specific antibody in patients with cervical cancer and controls. *Oncogenesis and Herpes virus II part 2*. G. de Thé, M.A. Epstein and H. Zur Hausen (Ed.). International Agency for Research on Cancer. Lyon. p. 79-88 (1975).-
- 118) Notter, M.F.D.; Docherty, J.L.: Comparative

- diagnostic aspects of HSV tumor-associated antigens. *J. of the Natl. Ca. Res.* 57 (3): 483-487 (1976).-
- 119) Centifanto, Y.; Drylie, D.; Deardourff, S.; Kaufman, H.: Herpes virus type 2 in the Male Genito-urinary Tract. *Science* 178: 318-319 (1972).-
- 120) Reddy, C.R.R.M.; Gopal Rao, T.; Venkatarathnan, G.; Kameswari, V.R.; Sashiprabha, R.; Raghavaiah, N.V.: A study of 80 patients with Penile Carcinoma combined with Cervical Biopsy study of their Wives. *International Surgery* 62 (10): 549-554 (1977).-
- 121) Martínez, I.; Llangier, R.: Cáncer del Cuello de la Matríz entre las mujeres de varones con cáncer de Pene. *Bol. Asoc. Med. P. Rico* 65(3): 55-59 (1973).-
- 122) Kessler, I.: Human Cervical Cancer as a Venereal disease. *Cancer Res.* 36: 783-791 (1976).-
- 123) Hanna, L.; Keshishyan, H.; Jawetz, E.; Coleman, V.R.: Diagnosis of Herpes virus Hominis Infections in a General Hospital Laboratory. *J. of Clin. Microbiol.* 1(3): 318-323 (1975).-
- 124) Spruance, S.L.; Overall, J.C.; Kern, E.R.; Krueger, G.; Pliam, V.; Miller, W.: The Natural History of Recurrent Herpes simplex Labialis. *The New Engl. J. of Med.* 297 (2): 69-75 (1977).-
- 125) Taber, L.H.; Brasier, F.; Couch, R.B.; Greenberg, S.B.; Jones, P.; Knight, V.: Diagnosis of Herpes simplex virus infection by immunofluorescence. *J. Clin. Microbiol.* 3: 309-312 (1976).-
- 126) Rubin, S.J.; Wende, R.D.; Rawls, W.E.: Direct immunofluorescence test for the diagnosis of genital herpes virus infections. *Appl. Microbiol.* 26: 373-375 (1973).-

- 127) Nahmias, A.J.; Alford, C.A.; Koromes, S.B.: Infection of the newborn with Herpes virus hominis. *Adv. Pediat.* 17: 185-226 (1970).-
- 128) Rawls, W.E.; Iwamoto, K.; Adam, E.; Melnick, J.L.: Measurement of antibodies to Herpes virus type 1 and 2 in human sera. *J. Immunol.* 104: 599-606 (1970).-
- 129) Plummer, G.: A review of the identification and titration of antibodies to Herpes simplex viruses type 1 and 2 in human sera. *Ca. Res.* 33: 1469-1476 (1973).-
- 130) Rapid Diagnosis. Abstracts of the Fourth International Congress for Virology, The Hague Aug. 30- Sep. 6: 625-640 (1978).-
- 131) Vahlme, A.; Bolmberg, J.; Olofsson, S.; Lycke, E.: Subtyping of Herpes simplex virus. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B* 83: 506-512 (1975).-
- 132) Parker, J.D.J.; Banatvala, J.E.: Herpes genitalis: Clinical and Virological studies. *Brit. J. Vener. Dis.* 43: 212-216 (1967).-
- 133) Cohen, G.H.; Factor, M.N.; Ponce de León, M.: Inhibition of Herpes simplex virus type 2 replication by Thymidine. *J. Virol.* 14: 20-25 (1974).-
- 134) Shinkai, K.: Plaque morphology of Herpes simplex virus in various cells under liquid overlay as a marker for its type differentiation. *Japan. J. Microbiol.* 19 (6): 459-462 (1975).-
- 135) Young, S.K.; Rowe, N.H.; Sanderlin, K.C.: Herpes simplex virus types 1 and 2 in Clinical Infections: Differences observed by Electron Microscopy. *J. of Infect. Dis.* 135(3): 486-489 (1977).-

- 136) Plummer, G.; Goodheart, C.R.; Miyagi, M.; Skinner, G. R.B.; Thouless, M.E.; Wildy, P.: Herpes simplex viruses: discrimination of types and correlation between different characteristics. *Virology* 60: 206-216 (1974).-
- 137) Goodheart, C.R.; Plummer, G.; Wanner, J.L.: Density difference of DNA of human Herpes simplex viruses types 1 and 2. *Virology* 35: 473-475 (1968).-
- 138) Ogino, T.; Rapp, F.: Differences in thermal stability of deoxythymidine kinase activity in extracts from cell infected with Herpes simplex virus type 1 or type 2. *Virology* 46: 953-955 (1971).-
- 139) Mogensen, S.C.; Teisner, B.; Kerzel Andersen, H.: Focal necrotic hepatitis in mice as a biological marker for differentiation for Herpes virus hominis type 1 and type 2. *J.Gen.Virol.* 25: 151-157 (1974).-
- 140) Khan, N.C.; Melnick, J.L.; Biswal, N.: Photodynamic treatment of Herpes simplex virus during its replicative cycle. *J.of Virol.* 21(1): 16-23 (1977).-
- 141) Chang, T.; Weinstein, L.: Photodynamic inactivation of Herpes virus Hominis by Methylene Blue. *Proc. Soc.Exp.Biol.and Med.* 148: 291-293 (1975).-
- 142) Lanier, J.D.; Witcher, J.P.; Dawson, C.R.; Oh, J.O.: Proflavine and Light in the Treatment of Experimental Herpetic Ocular Infections. *Anti-microb.Agents Chemother.* 6(5): 613-619 (1974).-
- 143) Varnell, E.D.; Kaufman, H.E.: Photodynamic inactivation with proflavine: quantitative comparison with iodo-deoxyuridine. *Infect. Immun.* 7: 518-519 (1973).-
- 144) O'Day, D.M.; Jones, B.R.; Poirier, R., et al.:

- Proflavine photodynamic viral inactivation in Herpes simplex keratitis. *Am.J.Ophthalmol.*79: 941 (1975).-
- 145) Roome, A.P.C.H.; Tinkler, A.E.; Hilton, A.L.; Montefiore, D.G.; Waller, D.: Neutral red with photoinactivation in the treatment of Herpes genitalis. *Brit.J.of Vener.Dis.*51 (2): 130-133 (1975).-
- 146) Shipman, C.; Smith, S.; Carlson, R.; Drach, J.V.: Antiviral activity of Arabinosyladenine and Arabinosylhypoxanthine in Herpes simplex virus-infected KB cells: Selective inhibition of viral Deoxy-ribonucleic Acid Synthesis in Synchronized Suspension Culture. *Antimicrob.Agents Chemother.* 9 (1): 120-127 (1976).-
- 147) Jones, S.R.; Luby, J.P.; McElligott, D.: Comparative sensitivities of Herpes simplex types 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2) to antiviral drugs. *Clin. Res.*21: 603-605 (1973).-
- 148) Pavan-Langston, D.; Dohlman, C.H.: A double-blind clinical study of adenine arabinoside therapy of viral keratoconjunctivitis. *Am.J.Ophthalmol.*74: 81-88 (1972).-
- 149) Goodman, E.L.; Luby, J.P.; Johnson, M.T.: Prospective double-blind evaluation of Topical Adenine Arabinoside in male Herpes Progenitalis. *Anti-microb.Agents Chemother.*8 (6): 693-697 (1975).-
- 150) Jawetz, R.; Coleman, V.R.; Dawson, C.; Thygeson, P.: The dynamics of IUDR action in herpetic keratitis and the emergence of IUDR resistance in vivo. *Am. N.Y.Acad.Sci.*173: 282-291 (1970).-
- 151) Kibrick, S.; Katz, A.S.: Topical idoxuridene in recurrent Herpes simplex with a note on its effect on early varicella. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*173: 83-89

- (1970).-
- 152) Puliafito, C.A.; Robinson, N.L.; Albert, D.M.; Pavan-Langston, D.; Lin, T.; Ward, D.C.; Prusoff, W.H.:  
Therapy of Experimental Herpes simplex keratitis in Rabbits with 5-Iodo-5' Amino-2', 5'-Dideoxyuridine. Proc.Soc.Exp.Biol.and Med.156: 92-96 (1977).-
- 153) Percy, D.H.; Hatch, L.A.: Experimental Infection with Herpes simplex virus type 2 in Newborn Rats. Effects of Treatment with Iododeoxyuridine and Cytosine Arabinoside. J.of Infect.Dis.132 (3): 256-261 (1975).-
- 154) Whitley, R.J.; Soong, S.; Dolin, R.; Galasso, G.; Ch'ien, L.; Alford, Ch.: Adenine Arabinoside Therapy of Biopsy-proved Herpes simplex Encephalitis. N.Eng.J.of Med.297: 289-294 (1977).-
- 155) Cho, C.T.; Feng, K.K.; Brahmactpta, N.: Synergistic antiviral effects of Adenine Arabinoside and tumoral antibodies in experimental Encephalitis due to Herpes virus Hominis. J.of Infect.Dis.133 (2): 157-167 (1976).-
- 156) Blough, H.A.; Giuntoli, R.L.: Successful Treatment of human genital Herpes with 2-Deoxy-D-Glucose (2d Glc). Abstracts from Herpes Virus Workshop. Aug.20-25th p.32 (1978).-
- 157) Gerstein, D.; Dawson, Ch.; Oh, J.O.: Phosphonoacetic Acid in the Treatment of Experimental Herpes simplex Keratitis. Antimicrob.Agents Chemother.7(3): 285-288 (1975).-
- 158) Smolin, G.; Tabbara, K.; Okumoto, M.: Guinea pig Herpes simplex Keratitis treated with a Lymphocyte Extract. Am.J.Ophthal.78(6): 921-925 (1974).-
- 159) Oosterhuis, J.A.; Nolin, W.A.; Sie, S.H.; Versteeg, J.:

- The treatment of patients suffering from herpetic keratitis with Poly I:C and IDU. *Ophthalmologica*, Baseel 171: 71 (1975).-
- 160) Kasparov, A.: Value of Interferon inducers in the contemporary antiviral therapy of herpetic eye diseases. *Vestn. Ophthalmol.* 2: 63-65 (1972).-
- 161) Neumann-Haefelin, D.; Sundmacher, R.; Sauter, B.; Karges, H.E.; Manthey, K.F.: Effect of human leukocyte interferon on vaccinia and Herpes virus infected cell cultures and monkey corneas. *Infect. and Immunol.* 12: 148-151 (1975).-
- 162) McGill, S.I.; Collins, P.; Cantell, K.; Jones, B.R.; Finter, N.B.: Optimal schedule for use of interferon in the cornea of rabbit with Herpes simplex keratitis. *J. Infect. Dis.* 133: Supp. A 13 (1976).-
- 163) de la Peña, N.C.; Díaz, A.; Bal, E.; Ejden, J.; Lustig, E.S.de: Experimental assay of a combined therapy with immunoglobulin A (IgA) and human interferon (HI) in the treatment of ophthalmic keratitis produced by Herpes virus (HSV). *Medicina* 38: 40-44 (1978).-
- 164) Jones, B.R.; Coster, D.J.; Falcon, M.G.; Cantell, K.: Topical therapy of ulcerative herpetic keratitis with human interferon. *The Lancet* 2 (7977): 128- (1976).-
- 165) de la Peña, N.C.; Díaz, A.; Damel, A.; Bal, E.; Puricelli, L.; Ejden, J.; Lustig, E.S.de: Combined therapy of human interferon (HI) and Secretory immunoglobulin A (S-IgA) in the treatment of human herpetic keratitis. *Biomedicine* 28: 104-108 (1978).-
- 166) Ikić, D.; Smerdel, S.; Šooš, E.; Jušić, D.: Our experience with topical use of Interferon in viral disease. *Proc. Symp. on Preparation, Standardization*

and Clinical use of Interferon 123: 133-135  
(1977).-



Parte II

SISTEMA INTERFERON:

PROPIEDADES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS,  
MECANISMOS DE ACCIÓN Y APLICACIONES  
TERAPÉUTICAS.

## INTRODUCCIÓN

En 1957 Alick Isaacs y Jean Lindenmann descubrieron que una sustancia liberada por células expuestas a virus protegía a otras células contra infecciones de una amplia variedad de virus. (1). Denominaron a esta sustancia Interferón (IF) ya que interfiere en la replicación viral.

Trabajos posteriores permitieron establecer algunas propiedades del IF lográndose, en parte, entender su mecanismo de acción.

Por la complejidad de eventos biológicos que involucra actualmente se habla de "Sistema Interferón". Es un mecanismo temprano de defensa celular que el hombre comparte con el resto de los Vertebrados.(2). Hay evidencias que un mecanismo análogo al sistema IF pueda ocurrir en plantas, lo que indicaría un origen muy remoto de dicho sistema. Evolutivamente, además, sería de aparición anterior a una defensa inmunitaria humoral.

Aunque el IF se reconoció primeramente como antiviral, se estableció que puede afectar otras funciones celulares vitales como se esperaría de un regulador celular.

El IF inhibe un amplio espectro de virus ARN y ADN induciendo el llamado estado antiviral (EAV). Los datos indican que el IF inhibe principalmente y en forma selectiva la replicación viral, impidiendo la traducción de los mensajeros virales. Durante las infecciones virales in vivo, el IF parece jugar un papel defensivo no sólo a nivel de tejido sino durante la diseminación del virus a través del torrente sanguíneo hasta los órganos target.

El IF además de su acción antiviral, regula la

respuesta inmune celular y humoral, y modula la síntesis proteica celular, inhibiendo el crecimiento de células normales y tumorales tanto in vivo como in vitro. In vivo se estudió dicho efecto inhibitorio sobre tumores espontáneos, transplantables e inducidos por virus o cancerígenos químicos. El efecto antitumoral incluiría una acción directa sobre la célula tumoral y una alteración de la respuesta inmune sobre el tumor.

Los mecanismos de acción del IF aún no se conocen totalmente. Los trabajos indicarían que el IF se une a receptores específicos de superficie. Esta unión es necesaria pero no suficiente para que se desarrolle el EAV. La unión trae aparejado una serie de alteraciones químicas inmunológicas, físicas e inmunológicas de la membrana plasmática.

En general el IF es específico de especie. Así el IF producido en células humanas protege a células humanas y de mono, pero no de ratón o pollo.

Debido a la universalidad del IF y a su baja toxicidad las posibilidades de su aplicación clínica han sido y están siendo testadas.

La aplicación del sistema IF incluye su administración externa así como el uso de una variedad de sustancias capaces de inducir su producción endógenamente. Por su toxicidad, éstos últimos han sido poco empleados.

Desde hace pocos años se utiliza el IF en el Hombre, debido a su especificidad de especie y a la necesidad de contar con grandes volúmenes de IF exógeno para fines terapéuticos. Esto fue posibilitado en parte por el mejoramiento de las técnicas de producción en gran escala.

El IF ha sido probado exitosamente en varios tipos

de infecciones virales agudas y crónicas como rabia, hepatitis crónica, infecciones respiratorias, encefalitis y enfermedades oculares. Está siendo probado como citostático en procesos neoplásicos con resultados promisorios.

### Inducción y Producción de Interferón

El IF no se produce espontáneamente, pero las células tienen el potencial de sintetizarlo en respuesta a una serie variada de estímulos (inductores).

Muchas células cultivadas in vitro son capaces de producirlo. En general las células muy diferenciadas son mejores productoras que las poco diferenciadas.

In vivo las células productoras por excelencia son las provenientes del sistema retículo endotelial. Los linfocitos son los responsables directos de su producción, pero necesitarían el efecto cooperativo de los macrófagos (3).

Los inductores incluyen desde microorganismos y sustancias biológicas altamente complejas hasta compuestos químicos de bajo peso molecular. (Tabla 1).

-----

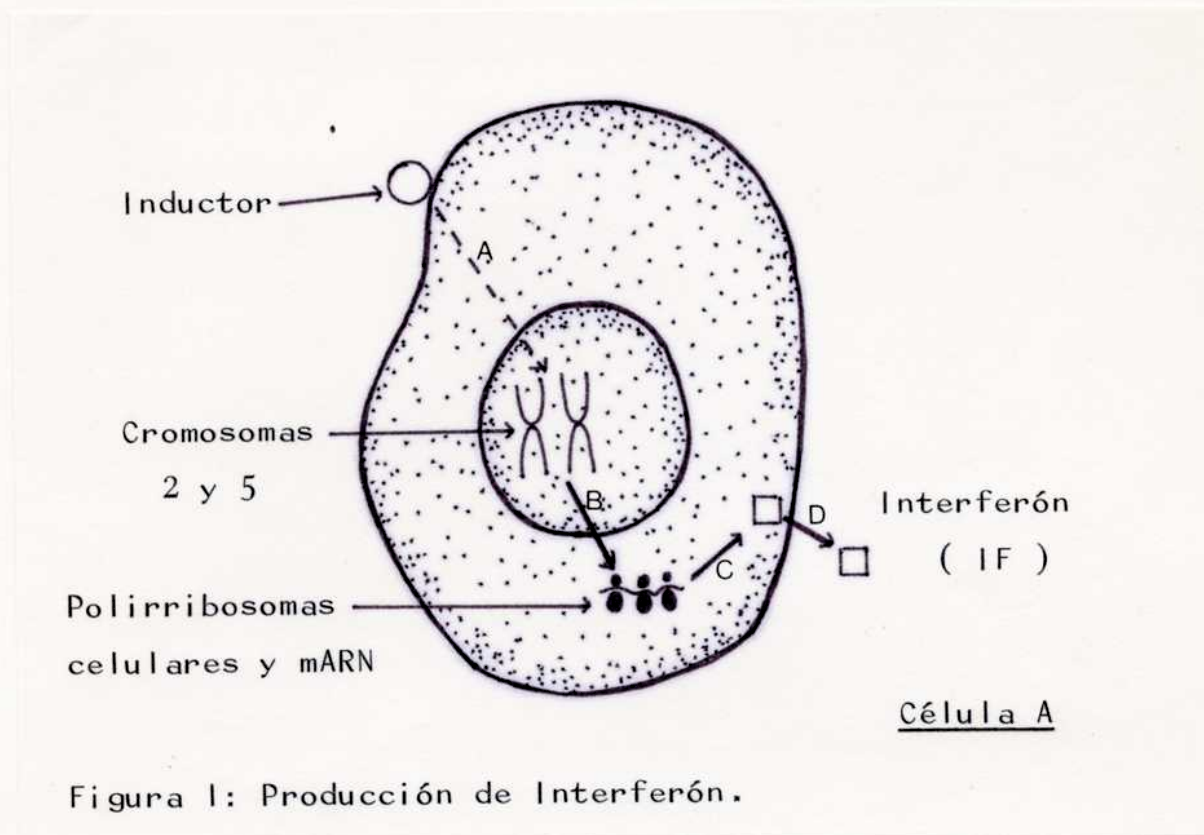
Tabla 1.- Inductores de Interferon

<u>Inductores</u>	<u>Expresión de la actividad</u>
- Virus, clamidias, rickettsias, polirribonucleótidos de doble cadena.	→ En cultivo celular e in vivo.
- Bacterias, endotoxinas, policarboxilatos.	→ In vivo luego de una administración parenteral.
-Tilorone, Miridina	→ In vivo luego de administración oral.
-Mitógenos, antígenos.	→ En linfocitos más macrófagos.

-----

Los inductores más potentes tanto en animales como en cultivos celulares, son los virus y ciertos polinucleótidos.

La figura 1 esquematiza los distintos pasos que llevan a la síntesis de IF.



No se sabe si la interacción inicial que lleva a la inducción de IF ocurre sobre la superficie celular o en algún lugar intracelular. (Fig 1, A). En el caso de la inducción viral, se cree que un Acido Nucleico doble cadena gatilla su producción.

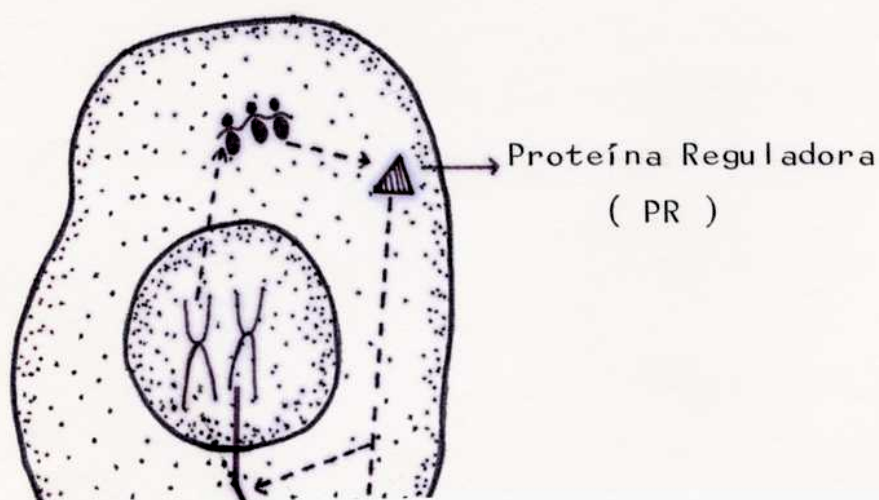
Estudios realizados con células híbridas somáticas señalan a los cromosomas 2 y 5 humanos como los portadores de la información para IF (Fig. 1, B) (4). En el cromosoma 5 los genes se encontrarían localizados en el brazo largo.

Se postuló la existencia de un represor que normalmente impediría la transcripción del gen IF. Los inductores inhibirían a este represor permitiendo la síntesis de IF (5).

Estudios realizados con células inducidas con Poly I:C demuestran que hay un aumento de los mensajeros de(mARN) para IF. Se cree que dicho aumento sería debido a la síntesis de novo de mensajeros. Sin embargo no han podido ser descartadas otras hipótesis. Podría ser que el mARN para IF estuviese presente en las células sin inducir en una forma inactiva y el inductor posibilitara su activación. O bien que el mARN para IF se destruya muy rápido en células sin inducir y esta destrucción fuese temporariamente bloqueada en las células. (6).

En la mayoría de las células estudiadas el IF se sintetiza 2 horas luego de haberse puesto en contacto con el inductor, alcanzando el pico máximo a las 3 horas. Luego declina rápidamente. Esto se debe a una inactivación irreversible del mARN de IF.

El IF sería sintetizado en polisomas unidos a membranas del retículo endoplasmático rugoso. Las moléculas recién formadas permanecerían encerradas dentro de vesículas membranosas hasta su liberación al fluido extracelular (7) que ocurre a los 20-30' luego de la síntesis intracelular (8) (C)(D). La mayoría de los IF son glicoproteínas. No hay información específica sobre el proceso de glicosilación.



Se ha postulado la existencia de una proteína reguladora, quien actuaría impidiendo que el mARN para IF sintetice más proteína. La inducción de este represor sería paralelo a la inducción del IF. Por lo tanto podríamos hablar de un control post-transcripcional, aunque no se conoce su mecanismo de acción (6) (Fig. 2).

El tratamiento de células con inhibidores de la transcripción o de la síntesis proteica luego de la exposición al inductor, pero antes que comience la producción de IF, aumenta la síntesis del mismo (9). Este fenómeno se llama "Superinducción". Se cree que dichos tratamientos aumentan la vida media de los mARN que codifican para IF (10), bloqueando preferencialmente el sistema represor sobre el sistema de síntesis de IF (6).

En los últimos años se ha reconocido *in vitro* el llamado "Efecto Priming" que aumenta marcadamente la producción de IF (11). Este aumento de síntesis se logra incubando a las células con pequeñas cantidades de IF antes de ponerlas en contacto con el inductor. Aún no se conocen los mecanismos que participan en dicho efecto.



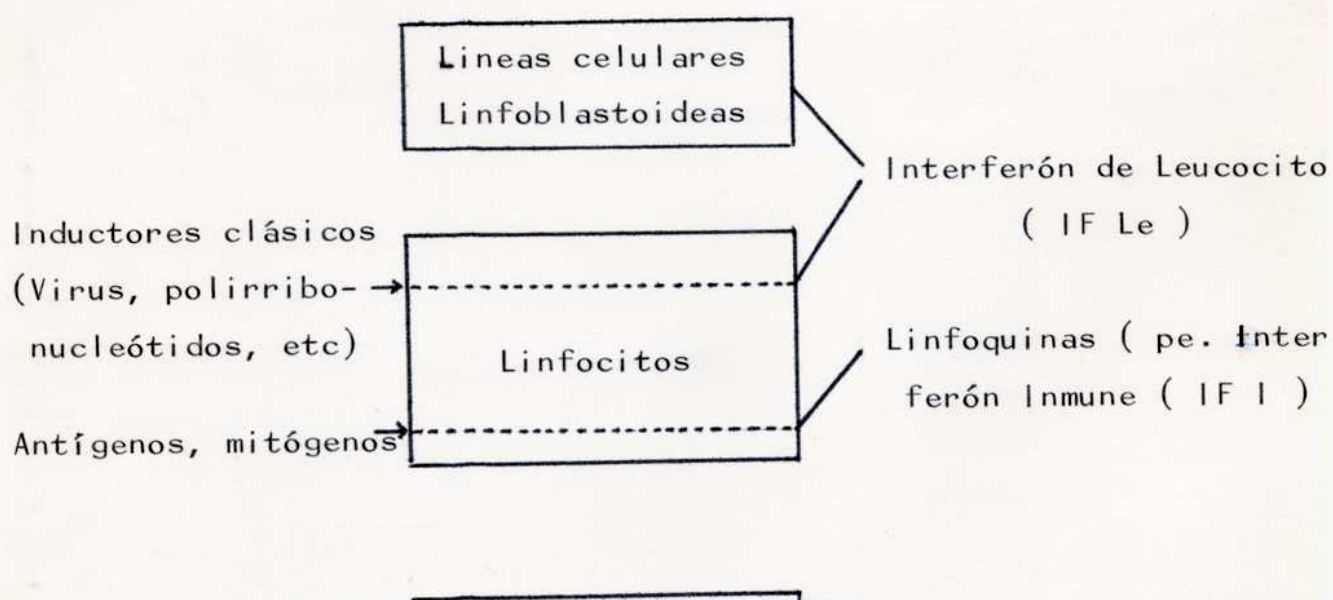
### Propiedades físico-químicas del Interferón

Han sido descriptos tres tipos de IF con propiedades físico-químicas y biológicas diferentes (Fig. 3), sin embargo su mecanismo de acción parece semejante o idéntico.

Una especie es el producido en células fibroblásticas diploides. Este es el interferón de fibroblastos (IF F). Otro tipo antigénicamente diferente, es el principal componente del IF sintetizado a partir de leucocitos y líneas linfoblastoideas (IF Le)(12).

La producción de IF por parte de los leucocitos tiene características especiales. Si son estimulados por los inductores clásicos, como los virus, producen el IF Le. Sin embargo cuando los linfocitos son expuestos a mitógenos (sustancias que los estimulan a dividirse) o a antígenos específicos que ellos reconocen, responden sintetizando el llamado interferón inmune (IF I).

El IF I es una de las moléculas mediadoras liberadas por los linfocitos T estimulados que forma parte de las linfoquinas.



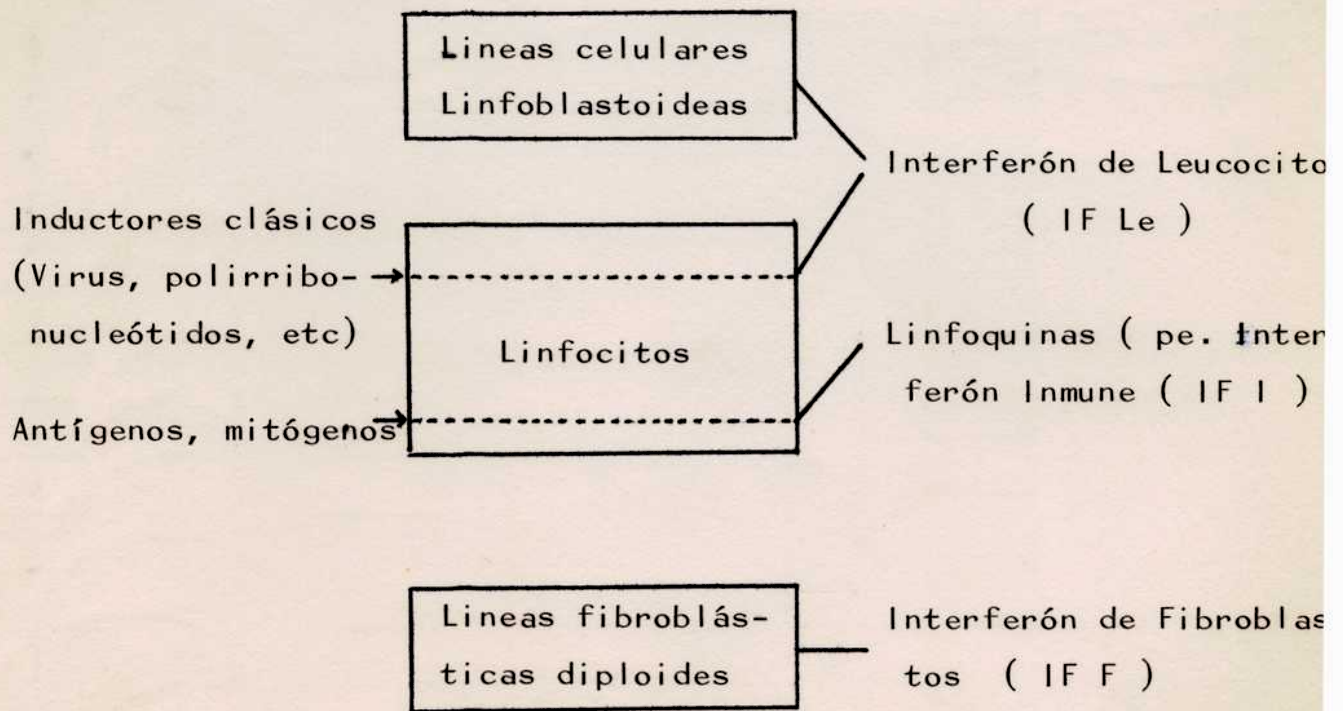


Figura 3: Tipos de Interferón.

IF F e IF Le pueden distinguirse en base a pruebas de neutralización específica de su actividad y por unión a columna de afinidad de anticuerpos (13). Pocos estudios han sido realizados con IF I.

Aún no ha sido purificado completamente el IF para estudios estructurales. Se conoce que las distintas especies varían en su secuencia de aminoácidos y en su contenido en Hidratos de Carbonos.

Trataremos las propiedades del IF Humano. Las preparaciones de IF Le contienen una pequeña fracción (1%) de IF F, quien altamente purificado, contiene un único componente de peso molecular (PM) 20.000. Por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, el IF Le da dos picos: Le<sub>s</sub> (el pico que migra más lento) de PM 21.000 y Le<sub>f</sub> (el pico que lo hace más rápidamente) con un PM 15.000. (12).

Los datos experimentales sobre cromatografía sobre lectinas inmovilizadas sugieren que el IF F es glicosilado, pero no el IF Le. Esos mismos autores demostraron que el IF F tendría residuos hidrofóbicos accesibles sobre su superficie, pero no el IF Le (14). Con otras técnicas se demostró que el IF Le tiene algunas cargas hidrofóbicas limitadas (15). Podríamos resumir las propiedades del IF diciendo que son:

- resistentes entre PH 2 y 9.
- termoestable 1 hora a 56°C.
- digerible por enzimas proteolíticas.
- no dializable.
- no sedimentable a 100.000 g durante 2 horas.

Papel del Interferón sobre la replicación viral

Todos los virus estudiados ADN o ARN, son sensibles a la actividad antiviral del IF, aunque la sensibilidad de los distintos virus pueden variar en forma muy amplia.

El mecanismo de acción antiviral no funciona sin infección viral. Una vez activado el mecanismo de defensa consiste en dos etapas:

- Inducción y Producción de IF (Fig.4).
- Desarrollo de la actividad antiviral (Fig.5).

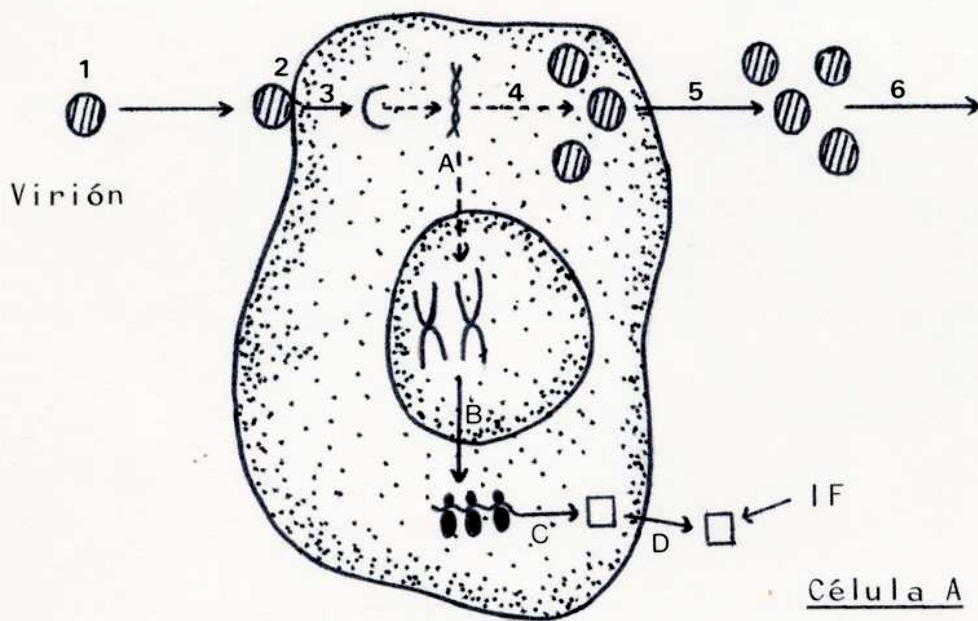


Figura 4: Inducción y Producción de IF durante la infección viral.

El virión (Fig. 4:1) se pone en contacto con la célula (2). Luego de la adsorción, penetra al interior de la célula liberando su material genético (3).

El Virus se replica utilizando la maquinaria sintética celular (4). Las nuevas partículas virales van al medio extracelular (5) y son capaces de infectar a otras células (6).



Durante las primeras etapas de la infección viral, algunos eventos, quizá el ácido nucleico de doble cadena viral (Fig.4,A) estimula el ADN celular para que sintetice mRNA (B) que codifica para IF. Este se traducirá dando la proteína IF (C) quien se liberará de la célula (D).

La producción de IF es el primer paso del "Sistema Interferon" y se sintetiza al mismo tiempo que la progenie viral.-

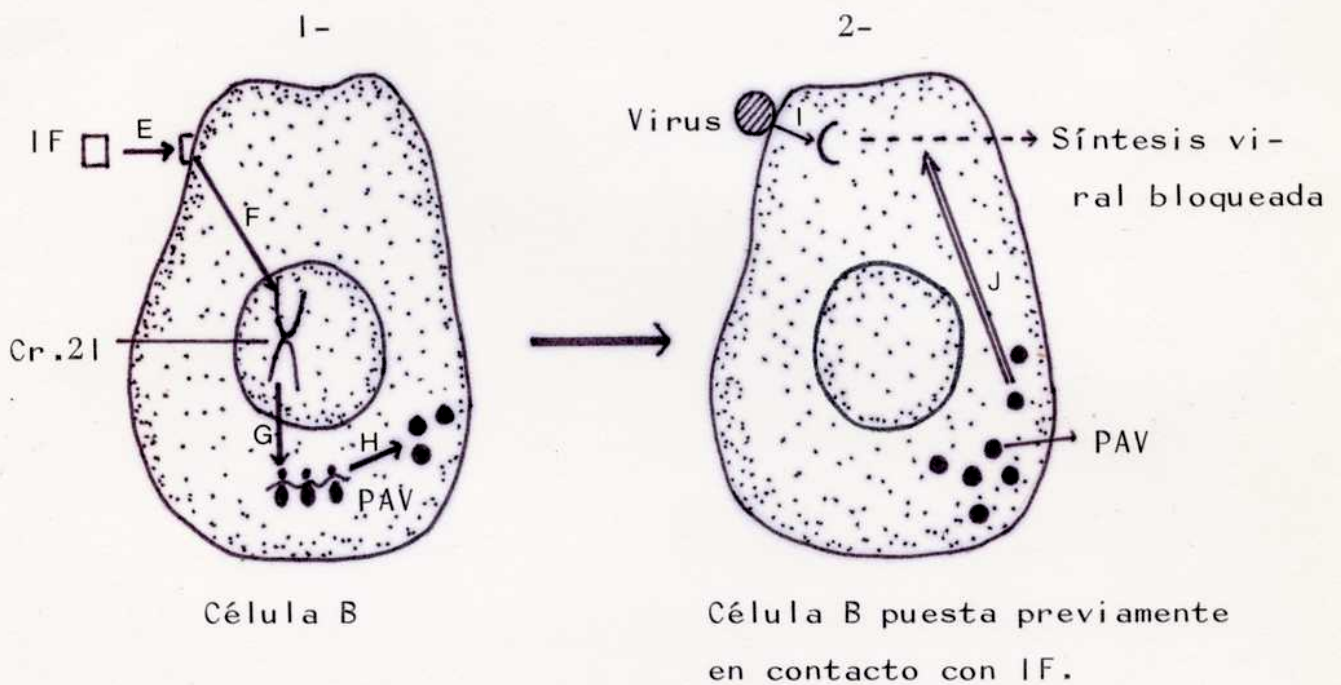


Figura 5: Desarrollo de la Actividad Antiviral en una célula puesta en contacto con IF (1) e infectada posteriormente (2).

Simultáneamente ocurren otros eventos (Fig.5). El IF secretado por la célula A pasa al fluido extracelular, pero no es capaz de bloquear la infectiosidad del virus extracelularmente. El IF se une a otra célula (Célula B) a un receptor tipo gangliósido, codificado por el Cromosoma 21 (Fig.5,E).-

La unión del IF al receptor gatilla de alguna forma no determinada (F) la producción de una proteína antiviral (PAV) (G) (H).

El cromosoma 21 codifica para dicha proteína. La célula quedará protegida de una posible infección viral posterior adquiriendo el llamado estado antiviral (EAV). Cuando un virión se pone en contacto con esta célula (puesta previamente en contacto con IF) puede adsorberse y penetrar (I), pero algún paso posterior de su ciclo será inhibido por la PAV (J). Esto impedirá una infección productiva.

En la primera célula (célula A) puede operar el mismo mecanismo de producción de PAV.

Blalock y col. indicaron que células L tratadas con IF de ratón pueden transferir su resistencia viral a células heterólogas co-cultivadas que son insensibles a dicho IF. Una vez transferida, la resistencia viral tiene las mismas características que el EAV inducido por el IF. Estudios preliminares indican la transferencia célula a célula de una molécula inducida por el IF (16).

Mecanismos de Acción del IF a nivel celular y molecular.

Cuando las células se tratan con IF, ellas se vuelven refractarias a una infección viral subsecuente adquiriendo el EAV. Las células tratadas con IF no presentan efecto citotóxico.

El Sistema IF es inespecífico en el sentido que distintos estímulos inducen el mismo tipo de IF y que éste produce resistencia contra una amplia gama de virus. Pero el IF es específico en cuanto que actúa sobre la misma especie en la que se produjo o muy relacionada.

Se indicó que el Sistema IF tiene un fuerte parecido al sistema hormonal glicoproteico. Esto está apoyado por los siguientes puntos:

- Semejanza en la composición y rango de tamaño del IF y de las Hormonas glicoproteicas.
- Ambas llevan un mensaje entre células.
- Sus receptores están químicamente relacionados.
- No hay consumo de ellos durante su acción sobre las células.
- Producen desrepresión genética e inducen a las células a sintetizar nuevas proteínas.

Consideraremos dos aspectos en el mecanismo de acción del IF:

- A) Su interacción con la célula sana que la lleva a adquirir el EAV.
- B) La interacción entre el virus y la célula pretratada con IF y cuales son las etapas del ciclo viral que se ven alteradas.

### A) Interacción del IF con la célula

Sólo una pequeña porción de IF parece interactuar directamente con las células para inducir la actividad antiviral. Este proceso de unión puede ocurrir a 0°C.

La unión del IF involucra sitios accesibles por la tripsina (17). Los receptores parecen ser gangliósidos o estructuras tipo gangliósidos, con un oligosacárido en el sitio de unión funcional. Los gangliósidos son constituyentes anfipáticos de la membrana, cuyo componente lipídico está anclado en la membrana y su porción hidrato de carbono está fuera de la célula.

El pretratamiento con algunas sustancias que se sabe tienen afinidad por los gangliósidos de membrana, como algunas toxinas bacterianas, tétanos, cólera (18) u hormonas glicoproteicas, como la tirotrófina (TSH) (19) o la gonadotrofina coriónica (Ch G) (20) inhiben la acción del IF. También el IF disminuye la sensibilidad de toxinas y hormonas. Esto puede interpretarse, o bien como una competencia directa, o bien que el pretratamiento con IF produce alteraciones de membrana que disminuyen la unión de otras sustancias activas. Si existe una competencia directa con estas varias sustancias deberían existir distintos sitios de unión para el IF.

Otra prueba que el IF se une a gangliósidos es que, la preincubación en solución del IF con los mismos inhibe su actividad (21).

Parece que el IF no penetra al interior de la célula ya que IF de ratón unido covalentemente a sefarosa (cuyo tamaño es varias veces mayor al



tamaño celular) retiene su capacidad bloqueadora de la replicación viral (22).

La unión del IF a receptores celulares no desarrolla necesariamente el EAV. Podemos considerar dos tipos de interacción: la unión propiamente dicha y la interacción con sitios específicos que resultan en la producción del EAV. Esta última reacción de activación es temperatura dependiente y es una reacción rápida.

En las células sensibles que tienen un mecanismo efector activo, la unión causa alteraciones de membranas químicas, físicas, morfológicas e inmunológicas (Fig. 6) (23).

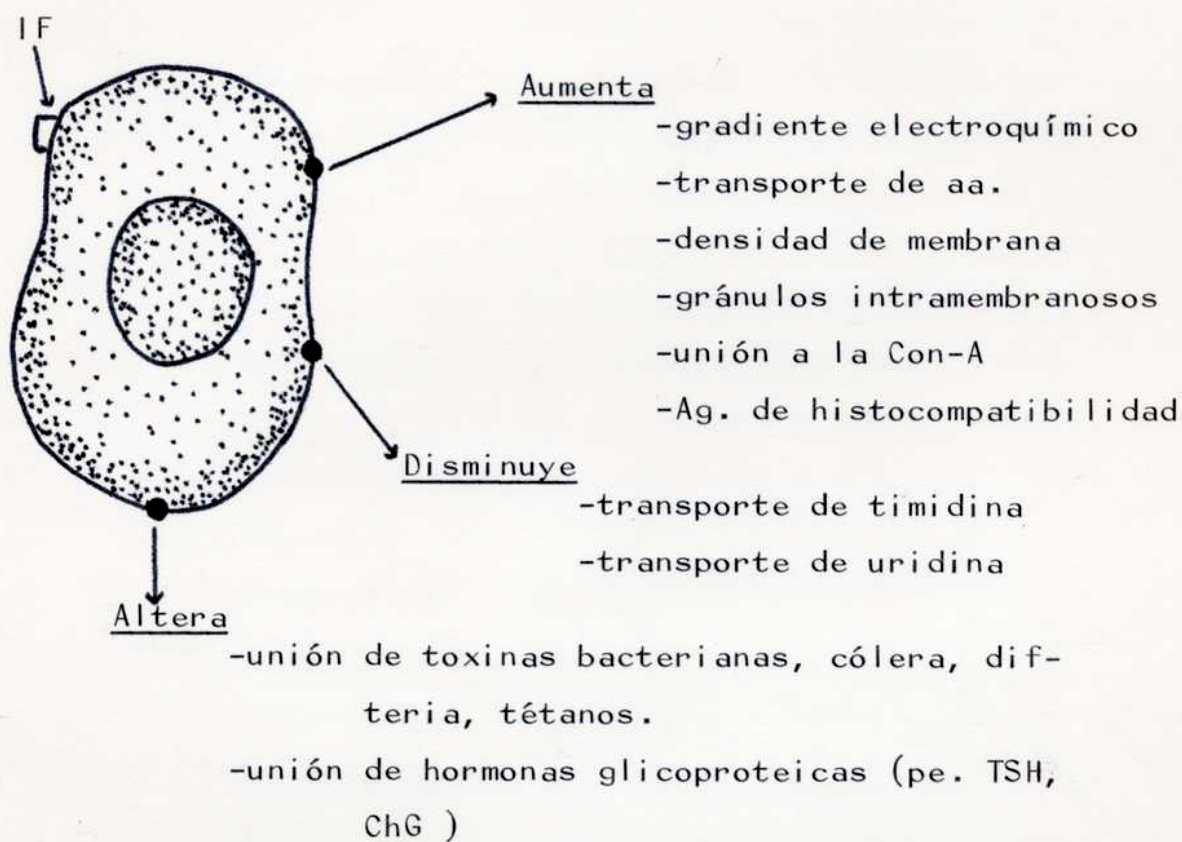


Figura 6: Alteraciones de membrana luego del tratamiento con Interferón.

Se demostró que el IF aumenta el gradiente electroquímico a través de la membrana, en vesículas de células L (fantasmas) susceptibles al IF pero no de células KB no susceptibles al mismo.

Quizá como consecuencia de las alteraciones químicas de la superficie, el tratamiento con IF aumenta las cargas negativas de superficie de células L (24).

Además se observó que hay un pequeño, pero significativo aumento de la densidad de la membrana plasmática y un aumento en el número de gránulos intramembranosos (vistos por análisis de fractura por congelación) en las células tratadas con IF respecto de las controles (23).

El tratamiento con IF aumenta el binding a la Concanavalina-A (25). También se incrementa la concentración de los antígenos de histocompatibilidad de células leucémicas o linfoides de ratón (26).

La exposición al IF produce profundos cambios de membrana. Queda en discusión si estos por sí solos pueden desarrollar el EAV.

Se ha determinado que moléculas de IF pueden eluirse espontáneamente de células donde ya han conferido EAV y adsorberse a otras células confiriéndole resistencia a la infección viral y repetir este proceso indefinidamente (27).

La producción de las primeras proteínas antivirales ocurren 30' luego de la activación y no requieren la síntesis de proteínas intermediarias.

Los eventos intracelulares que ocurren entre la activación y la desrepresión genética de la PAV quedan aún oscuros. La hipótesis que los microtúbulos estarían involucrados en este proceso parece ser la más digna de estudio. La acción del IF puede suprimirse por tratamiento con vinblastine,

citocalasina B y colchicina (28) que causan disgregación de los microtúbulos y microfilamentos celulares. Esto indicaría que ambos podrían jugar un importante papel en la transmisión al núcleo de una señal originada por el IF sobre la membrana celular.

B) Interacción entre la partícula viral y la célula pretratada con Interferón.

Para que se desarrolle el EAV deben cumplirse una serie de requisitos. Se piensa que la expresión del EAV involucra un aumento del nivel intracelular de cAMP (3'-5' adenosina monofosfato) y pasos de fosforilación que son gatillados por la infección viral en las células o por el agregado de RNA doble cadena a un sistema libre de células.

Sabemos que el IF aumenta el nivel de cAMP y, por otro lado, se determinó que un análogo del mismo, el dibutiril c-AMP aumenta la actividad AV inducida por el IF (29). Por lo tanto el c-AMP podría estar involucrado en el desarrollo del EAV.

En células tratadas con Actinomicina D (Act D), un inhibidor de la transcripción, no se adquiere el EAV (30). Pero si la Act. D se pone luego del tratamiento con IF, el EAV se establece de igual forma. Por lo tanto la síntesis de mRNA se necesita para que se inicie pero no para que el EAV se mantenga.

Varios autores demostraron que el uso de inhibidores traduccionales, como la puromicina, inhiben la expresión del EAV (31).

Por los datos que se tiene, el IF desreprime

genes celulares, permitiendo su transcripción, aunque no se conoce el mecanismo de acción.

Luego esos mRNA se traducirán dando la PAV.

Los estudios realizados para poder dilucidar los procesos moleculares implicados en la inhibición de la replicación viral se hicieron a nivel de sistemas celulares o bien, usando sistemas libres de células.

#### 1) Observaciones en sistemas celulares:

Los ensayos realizados tienen por objeto localizar cual o cuales son las etapas de la replicación viral bloqueada o alterada en las células pretratadas con IF.

A pesar que los trabajos no descartan que la adsorción, penetración y decapsidación estén afectadas en las células puestas en contacto con IF, la mayor parte de la información lo responsabiliza de inhibir la expresión genética viral (32).

Se ha estudiado en varios sistemas que la decapsidación no se ve inhibida en las células tratadas con IF, ya que la replicación viral se ve igualmente afectada cuando se infecta con virus intacto o decapsidado. Se ha observado una excepción donde la decapsidación si se ve dañada: células tratadas con IF son resistentes a una infección con SV-40 (Simian Virus-40) pero no a una infección con ADN infeccioso del virus (33).

La resistencia a la infección viral inducida por el IF está caracterizada por la inhibición de la transcripción primaria (estudiado sólo en pocos sistemas Virus-Célula) y por el daño en la traducción de los mRNA virales.

Uno de los sistemas celulares más utilizados es células de mono infectadas líticamente con SV-40, ya que la maquinaria sintética celular continúa luego de la infección. En este sistema el IF inhibe sobre todo la síntesis proteica temprana y también la tardía. Además se observaron mARN virales sin degradar, no asociados a ribosomas, lo que sugeriría una regulación a nivel post-transcripcional (34).

Con los virus ARN donde el genoma actúa directamente como mensajero se ha demostrado que el ARN viral parenteral, no se traduce en células tratadas con IF. El IF parece actuar en otro nivel en el caso de los virus de Leucemia Murina (VLM). La síntesis proteica dirigida por estos virus no se ve dañada, sin embargo se producen 100 veces menos partículas infecciosas aunque sólo 10 veces menos de partículas totales. Las partículas defectivas tienen una GP 85000, deficiente en fucosa, en vez de la GP 71000 de las partículas normales. Por otro lado se demostró una marcada acumulación de partículas virales en la superficie de células infectadas. Algunos investigadores postulan para el caso de los VLM una inhibición en la maduración intracelular o en la liberación (35). Otros postulan que en vez de un efecto antiviral directo, sería una consecuencia de las alteraciones producidas a nivel de la membrana celular (36).

## 2) Estudios en sistemas acelulares:

El efecto del IF sobre las células puede estudiarse en extractos libres de células, pretratadas con IF de varias formas. Muchos de estos efectos se

activan por el agregado de ARN de doble cadena (ARN d.c.) (pe. Poly I:C, o la forma replicativa de algún Virus como el Mengo) y de ácido trifosfato (ATP).

Kerr y col. reportaron que el agregado de ARN d.c. a sistemas acelulares tratados con IF inhiben la traducción (37).

La inhibición traduccional puede afectar tanto la iniciación como la elongación de la cadena peptídica. Proteínas kinasas (PK), una actividad endonucleasa aumentada y un oligonucleótido de bajo PM estarían involucrados en esta inhibición. Aunque la naturaleza multienzimática del mecanismo de control traduccional inducido por el IF hace difícil proponer un modelo, la Figura 7 resume algunos datos obtenidos con un sistema murino. Se purificó de sistemas libres de células, kinasas que se activan en presencia de ARN d.c. y ATP. Una de estas enzimas activada, fosforila la subunidad eIF-2 (uno de los factores iniciadores de la cadena peptídica, que se une al met-tARN) inhibiendo la iniciación de la cadena proteica. La inhibición puede bloquearse agregando al sistema eIF-2 de células o extractos no estimulados (38). Se sabe que la actividad de esta PK es 5 veces mayor en células tratadas con IF (39) y que copurifica con la PK que fosforila un polipéptido de 67000 (P 67) característico de los extractos celulares tratados con IF (39).

La fosforilación de la P67 puede servir como marcador biológico de la acción del IF ya que su aparición es bastante específica. Se la encuentra 12 horas luego de la adición de IF (en el caso de células L) y aumenta su cantidad de acuerdo a las

dosis de IF utilizadas.

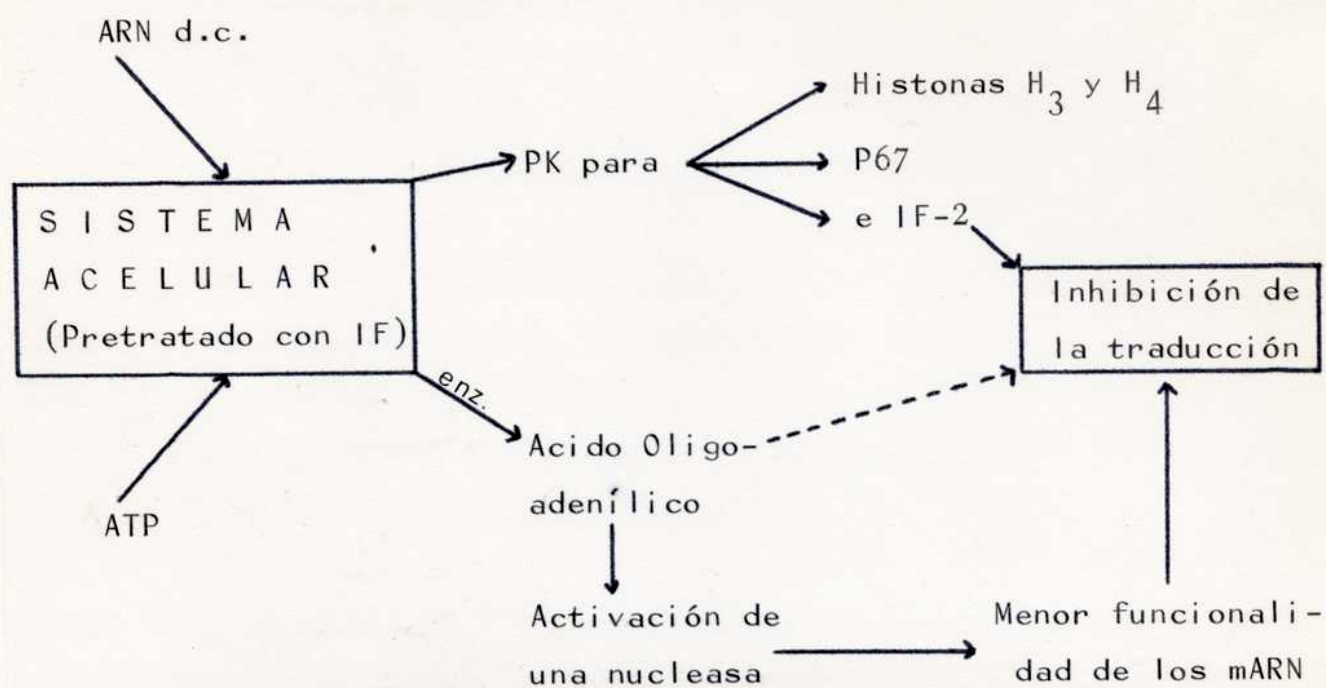
También con ARN d.c. y ATP se activa una PK (PK-i) específica para las histonas H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>. Las tres PK: PK-i y las que fosforilan la P 67 y el eIF-2 podrían ser una misma enzima ya que todas se inactivan por calor a los 47°C (39).

Purificando inhibidores traduccionales inducidos por el IF se encontró una enzima la cual en presencia de ARN d.c. polimeriza lentamente ATP en ácido oligoadenílico. Este nucleótido estable al calor inhibe la traducción.

También se encontró un factor proteico (presente en las células L control) que requiere oligoadenilato para inhibir la traducción. Este factor, que tiene actividad nucleasa, potencia el efecto del nucleótido (39). Según Williams y col. el oligonucleótido no inhibe directamente, pero requiere la formación de componente(s) quien(s) median la inhibición (40).

Los datos anteriores concuerdan en parte, con la hipótesis por la cual el oligonucleótido inhibe la síntesis proteica activando una nucleasa que disminuye de alguna forma la funcionalidad de los mARN.

Figura 7: Algunos posibles mecanismos de la acción del Interferón.



Aunque el tratamiento con IF en las células intactas parece bloquear principalmente la traducción viral, una vez que los cultivos son lisados y se preparan los extractos acelu-lares hay daño de la síntesis proteica tanto a nivel viral como celular. Esto ilustra la dificultad de reproducir en algunos sistemas la situación existente en las células (34).

En estudios de células tratadas con IF se encontraron mARN virales con una serie de alteraciones. Así se encontraron mensajeros de SV-40 con una estructura deficiente en el extremo 5' (que tiene un papel importante en la unión a los ribosomas) respecto de los mensajeros virales de células no tratadas con IF o de otros mARN (34).

En el caso de los Reovirus se observó una menor metilación (34) de los mensajeros.

En algunos sistemas donde la inhibición traduccional afecta la elongación de la cadena peptídica, ésta puede superarse por el agregado de t-ARN exógenos (41).



Otros efectos observados en los extractos parecen ser independientes del agregado de ARN d:c. y ATP. Así se encontraron algunos mensajeros de células tratadas con IF levemente más largos que los de las células control. Se sugirió que se producen cambios en los mensajeros celulares tal que la célula quizá a través de ribosomas y t-ARN modificados pudiese traducirlos mejor que los mensajeros virales no modificados (42).

El mecanismo por el cual se produce la inhibición traduccional permanece oscuro, ya que se han relatado cambios a nivel de los mensajeros celulares y virales.

Por otro lado, se ha postulado la existencia de una proteína necesaria para la expresión del EAV, quien se uniría a los ribosomas bloqueándolos específicamente en su capacidad de traducir los mensajeros virales. Así se sabe que ribosomas provenientes de células de pollo tratadas con IF son capaces de fijar ARN de virus Sindbis en menor cantidad que los ribosomas de células normales (43).

A pesar de los muchos trabajos en este campo no es posible aún hablar de un mecanismo molecular general de la acción del IF.

Queda sin entender porqué componentes que contienen ARN d.c. sirven como moduladores (tanto como inductores o como activadores) del sistema IF. Es posible que siendo el ARN d.c. un intermediario en el ciclo replicativo de muchos virus, sirva como una señal que indique a la célula la presencia de virus infeccioso.

### Otras actividades del Interferón

Se han relatado una serie de actividades, del IF independientes de la inhibición de la replicación viral. La tabla II resume los efectos más importantes.

-----

#### TABLA II: Otras actividades del Interferón.

##### Inhibe

- Multiplicación intracelular de distintos microorganismos (clamidias, protozoos, alg. bacterias).
- Crecimiento celular de células normales y tumorales, in vivo e in vitro.
- Reduce la tumorigenicidad y la capacidad formadora de colonias de células de linfoma murino.
- Producción de anticuerpos.
- Reacción de hipersensibilidad retardada.
- Síntesis de DNA de linfocitos estimulados por PHA.
- Activación de los Linfocitos B.

##### Incrementa

- Expresión de algunos antígenos de superficie celular (de histocompatibilidad).
- Síntesis de prostaglandinas.
- Nivel de c-AMP.
- Liberación de histaminas (mediadas por IgE) a partir de los basófilos.
- Efecto Priming.
- Citotoxicidad de linfocitos sensibilizados.
- Fagocitosis de macrófagos.

-----

Ampliaremos algunos de estos puntos.

Papel del IF en la regulación del Sistema Inmune:

Se sabe que los linfocitos T sensibilizados y puestos en contacto con el antígeno son capaces de producir una serie de linfoquinas que regulan la respuesta inmune. Una de estas linfoquinas es el llamado IF I. Muchas linfoquinas actúan en forma semejante al IF I.

Sin embargo el IF I es el único que tiene control positivo y negativo sobre el sistema inmune.

Se ha observado que los IF F y IF Le actúan de igual forma sobre la inmunidad.

Se demostró que el IF puede inhibir la respuesta de anticuerpos (Ac), tanto in vivo (44) como in vitro (45), cuando se lo inocula previo o al mismo tiempo de la estimulación antigénica. Usando poblaciones celulares separadas parece que actúa específicamente sobre los linfocitos B (45).

Se demostró que el IF dado en dosis de 25 a 2500 unidades a ratones incrementa la cantidad de células de bazo productoras de Ac. Sin embargo con dosis mayores (5.000 a 10.000 unidades) hay una inhibición de la síntesis de Ac (46).

También se demostró la inhibición de la respuesta de Ac primaria in vitro, si se añade IF al mismo tiempo o un día luego de la adición del antígeno. Se observa un leve incremento si se agrega 2 ó 3 días luego del antígeno (47). Por lo tanto el IF es capaz de amplificar o reprimir las reacciones inmunológicas de acuerdo a las dosis de IF y al momento empleado.

Si el IF es importante en el huésped como un mecanismo de defensa contra las infecciones virales, se podría especular que el IF sirve como un

regulador de la respuesta inmune durante las infecciones virales. Puede ser que inhiba la posterior sensibilización después que un alto número de linfocitos hayan sido estimulados, o que inhiba la proliferación o que aumente su función y actividad (36). Además el IF inhibe la reacción de hipersensibilidad retardada a productos químicos o virus, en ratón, e inhibe la síntesis de DNA de linfocitos estimulados por fitohemaglutinina o por células alogeneicas (36).

#### Acción del IF como inhibidor del crecimiento celular

Se sabe que el IF inhibe el crecimiento de células normales y tumorales tanto in vivo como in vitro. In vivo se demostró que cuando el IF se administra diariamente a ratones lactantes hay una marcada inhibición en su crecimiento y desarrollo (48). También se demostró su efecto inhibitorio en el desarrollo de una serie de tumores inducidos, transplantables o espontáneos. En cuanto a las neoplasias espontáneas, el IF demora el desarrollo de la leucemia linfoidea en ratones AKR (49) y del carcinoma mamario de ratones (50). Como ambas neoplasias se asociaron a la presencia de virus endógenos puede ser que el IF ejerza su efecto antiviral. Pero también se lo ha administrado luego de la aparición de linfomas, actuando aquí preferencialmente, a través de un efecto inhibitorio directo sobre la neoplasia. Se demostró el mencionado efecto del IF sobre neoplasias inducidos por virus; por ejemplo en linfomas inducidos en marmoset por Virus Herpes Saimiri (51). También se demostró dicha acción en hamster infectado con Polioma, pollo infectado con Sarcoma de Rous y conejos con Virus Fibroma de Shope (52).

En estos casos el IF fue efectivo sólo si se administró previamente a la inoculación viral. En contraste en ratones inoculados con Virus de leucemia de Friend o Rauscher fue necesario administrar IF repetidamente luego de la infección viral para inhibir la evolución de las leucemias y aumentar la sobrevida (52).

El IF inhibe también los tumores inducidos por carcinógenos químicos, como el 3-metilcolantreno (53), y actúa sobre varios tipos de tumores transplantables.

No se sabe si el IF actúa directamente a nivel de las células tumorales ya sea inhibiendo su multiplicación o modificando su tumorigenicidad o bien sobre el sistema inmunitario del huésped augmentando la capacidad de rechazo del tumor (52).

In vitro varias líneas celulares han sido testadas utilizando IF crudo o purificado (54) (55).

Trabajando con líneas de osteosarcoma y líneas no tumorales (glia y fibroblastos) se demostró que el efecto inhibitorio es dependiente de la dosis. A igual dosis la inhibición es mayor en las células tumorales (55). Este efecto se observa manteniendo los cultivos en presencia constante de IF y se revierte si se lo elimina del medio.

Algunos autores señalan la no especificidad del efecto inhibitorio, mientras que otros hablan de una especificidad a nivel de tejido. Así el IF F inhibe más efectivamente células de osteosarcoma, mientras que IF Le actúa preferencialmente sobre células linfoides (56).

Los trabajos son contradictorios acerca de las fases del ciclo celular alteradas. Las células tratadas tienen un índice mitótico más bajo y llegan a una menor densidad de saturación respecto del control.

El IF no es citotóxico.

En general las dosis usadas para obtener inhibición de crecimiento son mayores que las necesarias para alcanzar el EAV, aunque en algunos trabajos se obtuvo una fuerte inhibición con dosis muy bajas (pe: 30u/ml) (57).

Diferenciación entre la actividad antiviral y la inhibitoria del crecimiento:

En un principio se pensó que las actividades AV e inhibitoria del crecimiento se encontraban en la misma molécula porque el comportamiento biológico, la cinética de producción y la cinética de inactivación concordaban.

El aislamiento de una sublinea de células L de ratón sensibles al efecto AV pero resistentes al anticelular indicó que las actividades pueden separarse (58). Además la demostración que el efecto anticelular no está influenciado por la Actinomicina D sugirió su independencia de la transcripción (59), dato que no concordaba para el EAV. Dahl demostró que en el caso del IF Le ambas actividades se encuentran en distintas moléculas. El componente inhibidor del crecimiento fue asociado a una molécula de bajo PM, lábil a Ph 2, pero estable al TCA y a enzimas proteolíticas. Esta actividad puede dializarse contra PBS. Estudios preliminares le adjudican una naturaleza lipídica. Dahl señaló que este componente estaría unido a la parte proteica del IF por puentes electrostáticos, pero localizado profundamente dentro de la molécula de IF (60).

Knight no pudo demostrar lo mismo para el IF F (61).

Muchos autores se han preguntado si los distintos efectos del IF son gatillados al accionar sobre un mismo sitio celular. Es posible que el común denominador para estos diferentes efectos sean los cambios inducidos sobre la membrana plasmática.

### Uso terapéutico del Interferón

En los últimos años se ha empezado a utilizar el IF terapéuticamente en infecciones virales y en distintos tipos de tumores como antineoplásico.

Los dos caminos de aplicación clínica de IF son:

a) inducción de IF endógeno mediante la aplicación de inductores, y b) administración directa de IF exógeno al organismo.

Se han utilizado inductores virales (como el virus de la enfermedad de Newcastle: NDV) y no virales (p.e.: Poly I:C). En ambos casos se eleva el nivel de IF circulante.

La utilización de virus tiene el inconveniente que al ser inmunogénicos inducen la producción de anticuerpos, sobre todo neutralizantes. El poco éxito de la utilización de inductores no virales radica en su toxicidad. El Poly I:C es un buen inductor de IF, un buen agente antiviral y un relativamente buen agente antitumoral en roedores. Sin embargo en el hombre es un inductor menos efectivo y tóxico. Esta menor efectividad en el hombre se debe quizá a la presencia en el suero de altas concentraciones de enzimas nucleolíticas que hidrolizan e inactivan el Poly I:C. Actualmente se está ensayando un complejo de Poly I:C con polilisina y carboximetilcelulosa (Poly ICLC) el cual es más resistente a la hidrólisis enzimática. Además este compuesto es un buen inductor de IF y es poco tóxico (62).

La tendencia actual es la utilización del IF en forma exógena. La posibilidad de ensayarlo surgió luego del mejoramiento de las técnicas de producción masiva de IF y de purificación.

Las dosis a usar dependen de una serie de factores que incluyen la enfermedad a tratar, la vía elegida



de administración y en el caso de enfermedades virales, la sensibilidad del virus particular y la cantidad de IF endógeno que se estimula como consecuencia de la infección.

En la figura 8 se graficaron los niveles de IF circulantes luego de la administración a conejos de 3 millones de unidades de IF de leucocitos humano por diferentes vías (63). Resultados semejantes se obtuvieron en el hombre.

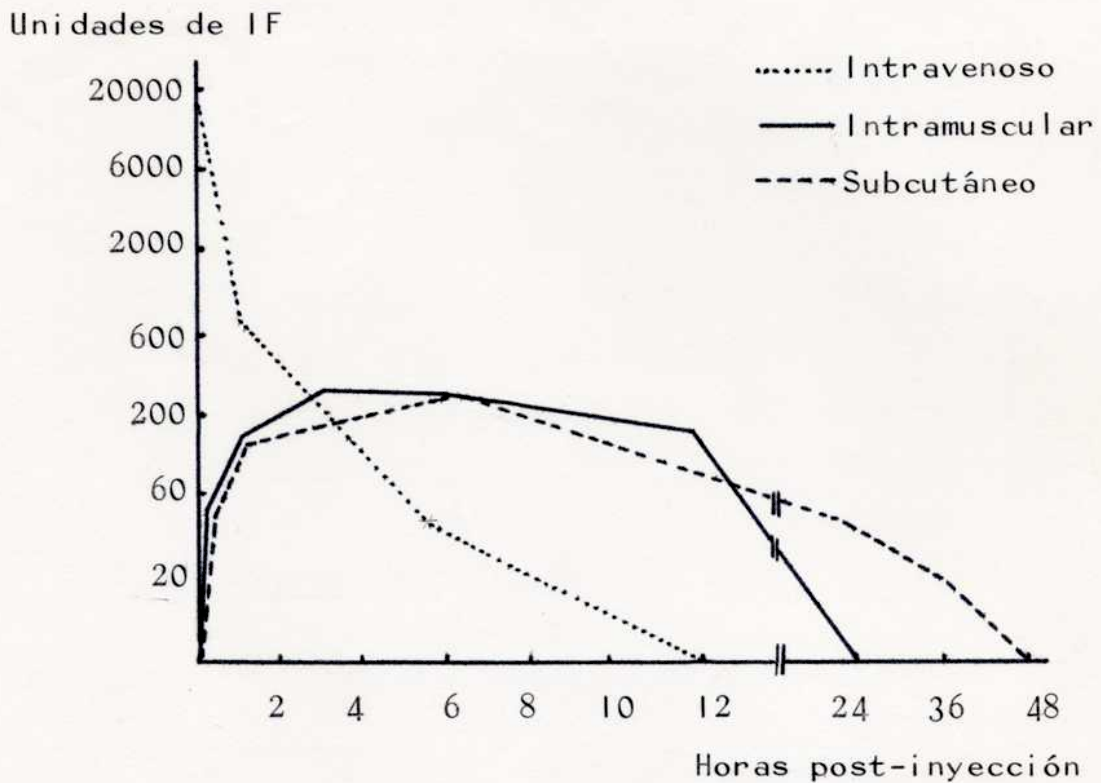


Figura 8: IF circulante en conejos, luego de la inyección de  $3 \times 10^6$  unidades de IF humano, por diferentes rutas.

El IF de leucocitos dado exógenamente desaparece rápidamente del torrente sanguíneo: algunas horas luego de la inyección intravenosa y alrededor de 24 horas luego de la inyección intramuscular (64). Por lo tanto en la mayoría de los ensayos se lo administra subcutáneo o intramuscular. Para mantener niveles efectivos de IF se necesitan dosis diarias, lo que exige grandes cantidades de IF homogó purificado.

El IF de fibroblastos no llega a niveles en el suero de pacientes comparables al de dosis equivalentes del IF de leucocitos. No se sabe si esta diferencia se debe a una pobre absorción de los sitios de inyección o si hay una más rápida inactivación del mismo (65). Deben continuarse los estudios para ver si el IF F puede usarse exitosamente en la clínica.

A pesar que se relataron efectos colaterales a la inyección de IF Le (fiebre, nauseas, vómitos, disminución pasajera de glóbulos blancos, plaquetas o reticulocitos, etc) es una droga relativamente no tóxica. Además estos efectos colaterales desaparecen cuando se usa IF altamente purificado, por lo tanto deben adjudicarse a impurezas.

El IF ha sido empleado también en forma tópica (66). Los resultados obtenidos con IF exógeno en animales con procesos tumorales impulsó su uso en el hombre. Experimentalmente se demostró que el IF demora o impide el desarrollo de tumores espontáneos o inducidos por cancerígenos químicos o por virus.

En el Hospital Karolinska se inició en 1971 un plan clínico con pacientes con osteosarcomas. Se administró IF intramuscular diariamente durante un mes y luego tres veces por semana por 17 meses. Los datos indican que el 64% de los pacientes tratados no

tuvieron metástasis en dos años y medio comparado con 30% de los controles. Además en los tratados se observó una mayor sobrevida (73%) que los no tratados (35%) (67).

Además se están realizando otros estudios con resultados preliminares exitosos sobre cáncer de mama, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, papilomas, mielomas y cancer de pulmón.

El IF demostró ser efectivo en una serie de infecciones virales a virus RNA y DNA. Debe ser administrado en forma temprana tal que inhiba la replicación viral. Ha sido empleado con éxito en infecciones agudas (pe: Influenza, Citomegalovirus, Herpes, Vacuna, etc) y en enfermedades con una replicación viral lenta o continuada (pe: Hepatitis crónica) (66) (68).

El IF de leucocitos ha sido probado intranasalmente en voluntarios para prevenir infecciones a Rhinovirus. La utilización de IF exógeno en forma profiláctica sobre una población de 12000 personas durante el curso de una epidemia gripal disminuyó entre el 60 y 70% la morbilidad de la población tratada respecto a la control (69).

Una serie de estudios demostraron que los componentes virales de la Hepatitis B en el hígado o en la sangre de portadores crónicos disminuye drásticamente durante el tratamiento con IF (70).

#### Tratamiento de infecciones herpéticas con IF:

Ha sido empleado el IF con fines terapéuticos en varios tipos de infecciones herpéticas.

Los ensayos hechos sobre animales fundamentó el uso del IF en humanos. Gresser demostró que animales inoculados intraperitonealmente con HSV-1 y tratados con inmunoglobulina anti-interferón tienen un tiempo de sobrevida

menor y la Dosis Letal 50 aumenta varios cientos de veces comparado con la cantidad de virus de los ratones control (71). También se demostró que ratones inoculados intraperitonealmente o intravaginalmente con HSV-2 son protegidos de la muerte si se los trata con IF o con inductores del mismo 24 horas pre-infección (72).

Cantell y col. trataron 55 pacientes con úlceras dendríticas herpéticas de la cornea con aplicaciones locales de IF en grandes dosis obteniendo una disminución del 20% de las recurrencias respecto a un 52% de los controles (73).

De la Peña y col. demostraron que la acción tópica combinada de relativamente bajos niveles de IF (3000 U/ml) y IgA-S (1.5 mg/ml) fue efectiva en el 95% de los pacientes con queratitis herpéticas, quienes concurren en diferentes estadios de evolución. La mayoría de ellos (72%) curó en menos de 15 días (66).

Fue realizado recientemente un ensayo no doble ciego, con dosis bajas de IF en forma tópica en el tratamiento de infecciones mucocutáneas herpéticas con resultados promisorios (74).

El Herpes Zoster es una enfermedad generalmente severa, sobre todo en ciertos pacientes con enfermedades tumorales. Merigan llevó a cabo un ensayo doble ciego administrando IF de leucocitos subcutáneamente. Este fue efectivo en limitar la diseminación cutánea distal, la progresión dentro del dermatomo primario y disminuyó el porcentaje de complicaciones viscerales y de neuralgias post-infección cuando se administró  $5,1 \times 10^5$  U/Kg/día. (75).

De la Peña y col. realizaron un estudio preliminar tópico de IF Le e IgA-S en lesiones a Herpes Zoster con resultados alentadores (76).

Todos estos datos nos llevaron a estudiar la acción tópica del IF de leucocitos humanos en lesiones herpéticas mucocutáneas: faciales, de piel y genitales.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Isaacs, A.; Lindenmann, J.: Virus Interference I. The interferon. Proc.Roy.Soc. (Ser.B) 147: 258-267 (1957).-
- 2) Oie, H.K.; Loh, P.C.: Reovirus type 2: Induction of Viral Resistance and Interferon Production in Fathead Minnow Cells. Soc.Exp.Biol.and Med.136: 369-373 (1971).-
- 3) Epstein, L.B.; Cline, J.C.; Merigan, T.C.: Selective Increase in Lymphocyte Interferon Response to Vaccinia antigen. The Journal of Clin.Invest.50: 744-753 (1971).-
- 4) Tan, Y.H.; Creagan, R.P.; Ruddle, F.H.: The somatic cell genetics of human interferon: Assignment of human interferon loci to chromosome 2 and 5. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.71: 2251-2255 (1974).-
- 5) Tan, Y.H.; Berthold, W.: A mechanism for the induction and regulation of human fibroblastoid interferon genetic expression. The Journal of Virology 34: 401-411 (1977).-
- 6) Vilček, J.; Kohase, M.: Regulation of Interferon Production: Cell Culture Studies. The Interferon System (Texas Reports on Biology and Medicine) 35: 57-62 (1977).-
- 7) Falcoff, E.; Havell, E.A.; Lewis, J.A.; Lande, M.A.; Falcoff, R.; Sabatini, D.D.; Vilček, J.: Intracellular location of newly synthesized interferon in human FS-4 cells. Virology 75: 384-393 (1976).-
- 8) Tan, Y.H.; Armstrong, J.A.; Ho, H.: Intracellular interferon: Kinetics of formation and release. Virology 45: 837-840 (1971).-
- 9) Myers, M.W.; Friedman, R.M.: Potentiation of human interferon production by superinduction. J.Natl.

- Cancer Inst.47: 757-764 (1971).-
- 10) Cavalieri,R.L.; Havell,E.A.; Vilček,J., et al:  
Induction and decay of human fibroblast interferon mRNA. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.74: 4415-4419 (1977).-
  - 11) Rosztoczy,I.: Further evidences that priming is a non-antiviral function of interferon. Acta Microbiol. Acad.Sci.Hung.23: 305-309 (1974).-
  - 12) Vilček,J.; Havell,E.A.; Yamazaki,S.: Antigenic, physiochemical and biological characterization of human interferons. Ann.N.Y.Acad.Sci.284: 703-710 (1977).-
  - 13) Berg,K.; Ogburn,C.A.; Paucker,K.; Mogenson,K.E.; Cantell,K.: Affinity chromatography of human leukocyte and diploid interferons on Sepharose bound antibodies. J.Immunol.114: 640-644 (1975).-
  - 14) Jankowski,W.J.; Davey,M.W.; O'Malley,J.A.; Sulkowski,E.; Carter,W.A.: Molecular structure of human fibroblast and leukocyte interferons: probe by lectin and hydrophobic chromatography. J.Virol.16: 1124-1130 (1975).-
  - 15) Chen,J.K.; Jankowski,W.J.; O'Malley,J.A.; Sulkowski,E.; Carter,W.A.: Nature of the molecular heterogeneity of human leukocyte interferon. J.Virol.19: 425-434 (1976).-
  - 16) Blalock,J.E.; Baron,S.: The transfer of interferon-induced viral resistance between animal cells. The Interferon System (Texas Reports on Biology and Medicine) 35: 307-315 (1977).-
  - 17) Friedman,R.M.: Interferon binding: the first step in establishment of antiviral activity. Science 156: 1760-1761 (1967).-
  - 18) Kohn,L.D.; Friedman,R.M.; Holmes,J.M.; Lee,G.: Use of thyrotropin and cholera toxin to probe the mechanism

- by which interferon initiates its antiviral activity. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.73: 3695-3699 (1976).-
- 19) Mullin,B.R.; Fishman,P.H.; Lee,G.; Aloj,S.M.; Ledley, F.O.; Winand,R.J.; Kohn,L.D.; Brady,R.O.: Thyrotropin ganglioside interactions and their relationship to the structure and function of thyrotropin receptors. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.73: 842-846 (1976).-
- 20) Lee,G.; Aloj,S.M.; Brady,R.O.; Kohn,L.D.: The structure and function of glycoprotein hormone receptors: ganglioside interactions with human chorionic gonadotropin. Biochem.Biophys.Res.Comm.73: 370-377 (1976).-
- 21) Besançon,F.; Ankel,H.: Binding of interferon to gangliosides. Nature (London) 252: 478-480 (1974).-
- 22) Knight,E.: Interferon-Sepharose: induction of the antiviral state. Biochem.Biophys.Res.Comm.56: 860-864 (1974).-
- 23) Chang,E.H.; Jay,F.T.; Friedman,R.M.: Physical, morphological and biochemical alterations in the membrane of AKR mouse cells following interferon treatment. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.75 (4): 1859-1863 (1978).-
- 24) Knight Jr.,E.; Korant,B.D.: A surface alteration in mouse L cells induced by interferon. Biochem.Biophys. Res.Comm.74: 707-713 (1977).-
- 25) Huet,C.; Gresser,I.; Bandu,M.T.; Lindahl,P.: Increased Binding of Concanavalin A to Interferon-treated Murine Leukemia L-1210 cells. Proc.Soc.Exp.Biol.Med.147: 52-57 (1974).-
- 26) Vignaux,P.; Leary,P.; Gresser,I.: Eur.J.Immunol.4: 779-783 (1974).-
- 27) Gordon,I.: Spontaneous Transfer of Interferon from cell to cell with serial induction of antiviral

- resistance. Abstracts of the Fourth International Congress for Virology - The Hague. Aug.30-Sep.6 p.105 (1978).-
- 28) Bourgeade, M.F.; Chaney, C.: Inhibition of Interferon action by cytochalasin B, colchicine and vinblastine. Proc.Soc.Exp.Biol.Med.153: 501-504 (1976).-
- 29) Friedman, R.M.; Pastan, I.: Interferon and cyclic 3' 5' AMP: potentiation of antiviral action. Biochem. Biophys.Res.Comm.36: 735-740 (1969).-
- 30) Taylor, J.: Inhibition of Interferon action by Actinomycin. Biochem.Biophys.Res.Comm.14: 447-451 (1964).-
- 31) Levine, S.: Effect of Actinomycin D and puromycin dihydrochloride on action of Interferon. Virology 24: 586-588 (1964).-
- 32) Metz, D.H.: The mechanism of action of Interferon. Cell 6: 429-439 (1975).-
- 33) Yamamoto, K.; Yamaguchi, N.; Oda, K.: Mechanism of interferon-induced inhibition of early simian virus 40 (SV-40) functions. Virology 68: 58-70 (1975).-
- 34) Revel, M.: Interferon-Induced Translation Regulation. The Interferon System (Texas Reports on Biology and Medicine) 37: 212-220 (1977).-
- 35) Friedman, R.M.; Chang, E.H.; Ramseur, J.M.; Myers, M.W.: J.Virol.16: 569-575 (1975).-
- 36) Gresser, I.: On the varied biologic effects of Interferon. Cellular Immunology 34: 406-415 (1977).-
- 37) Kerr, I.M.; Brown, R.E.; Ball, L.A.: Increased sensitivity of cell-free protein synthesis to double-stranded RNA after Interferon treatment. Nature 250: 57-59 (1974).-
- 38) Lengyel, P.; Sen, G.; Ratner, L.; Farrell, P.; Dubois,



- M.; Cabrer, B.; Taira, H.; Slattery, E.; Wiegand, R.; Desrosiers, R.; Double-stranded RNA and the mechanisms of Interferon action. Abstracts of the Fourth International Congress for Virology- The Hague. Aug. 30 Sep. 6 p. 97: (1978).-
- 39) Revel, M.; Kimchi, A.; Schmidt, A.; Shulman, L.; Zilberstein, A.: Isolation of interferon-induced translational inhibitors. Abstracts of the Fourth International Congress for Virology- The Hague. Aug. 30-Sep. 6 p. 96 (1978).
- 40) Williams, B. R. G.; Kerr, I.M.: Mechanism of cell-free protein synthesis inhibition by interferon. Abstracts of the Fourth International Congress for Virology - The Hague. Aug. 30-Sep.6 p.97 (1978).
- 41) Gupta, S.L.; Sopori, M.L.; Lengyel, P.: Release of the inhibition of messenger RNA translation in extracts of Interferon-treated Ehrlich ascites tumor cells by added transfer RNA. Biochem. Biophys. Res. Comm. 57: 763-770 (1974).
- 42) Riley, F.L.; Levy, H.B.: Effect of Interferon on cellular RNA synthesis and structure. The Interferon System (Texas Reports on Biology and Medicine) 37: 239-246 (1977).
- 43) Poindron, P.; Coupin, G.; Illinger, D.; Richards, M.: Mecanisme d'action et interet therapeutique de l'interferon. Lyon Pharmaceutique 27 (2): 121-123(1976).
- 44) Brodeur, B.R.; Merigan, T.C.: Mechanism of the suppressive effect of interferon on antibody synthesis in vivo. J. Immunol. 114: 1323-1328 (1975).-
- 45) Gisler, R.H.; Lindahl, P.; Gresser, L.: Effects of Interferon on antibody synthesis in vitro. J. Immunol. 113: 438-444 (1974).

- 46) Braun, W.; Levy, H.B.: Proc.Soc.Exp.Biol.and Med. 141: 769-773 (1972).-
- 47) Johnson, H.M.; Smith, B.G.; Baron, S.: Inhibition of the primary in vitro antibody response by interferon preparations. J.Immunol.114: 403-409 (1975).-
- 48) Gresser, I.; Tovey, M.G.; Maury, C.; Chouroulinkou, I.: Lethality of Interferon preparations for newborn mice. Nature (London) 258: 76-78 (1975).-
- 49) Gresser, I.; Copey, J.; Bourali, C.: Interferon and murine leukemia. Effect of Interferon preparation on the lymphoid leukemia of AKR mice. J.Natl.Cancer Inst.43: 1083-1089 (1969).-
- 50) Came, P.E.; Moore, D.H.: Effect of exogenous interferon treatment on mouse mammary tumors. J. Natl.Cancer Inst.48: 1151-1154 (1972).-
- 51) Laufs, R.; Steinkes, H.; Jacobs, C.; Hilfenhaus, J.; Karges, H.: Influence of interferon on the replication of oncogenic Herpes-virus in tissue cultures and non human primates. Med.Microb.Immunol. 160: 285-294 (1974).-
- 52) Gresser, I.: On the mechanisms of the antitumor effects of interferon. The Interferon System (Texas Reports on Biology and Medicine) 35: 394-398 (1977).-
- 53) Salerno, R.A.; Whitmire, C.E.; García, L.M.; Huebner, R.J.: Chemical carcinogenesis in mice inhibited by Interferon. Nature New Biology 239: 31-32 (1972).-
- 54) Lee, S.H.S.; O'Shaughnessy; Rozee, K.R.: Interferon-induced Growth depression in Diploid and Heteroploid Human Cells. PSEBM 139: 1438-1440 (1972).-
- 55) Strander, H.; Einhorn, S.: Effect of Human Leukocyte Interferon on the growth of human osteosarcoma cells in tissue culture. Int.J.Cancer 19: 468-473

(1977).-

- 56) Einhorn, S.; Strander, H.: Is Interferon tissue specific?: Effect of Human Leukocyte and fibroblast interferons on the growth of Lymphoblastoid and osteosarcoma cells lines. *J.Gen. Virol.* 35: 573-577 (1977).-
- 57) Glasgow, L.A.; Crane, J.L.; Kern, E.R.: Antitumor activity of Interferon against Murine Osteogenic Sarcoma Cells in Vitro. *J.Natl.Cancer.Inst.* 60 (3): 659-666 (1978).-
- 58) Fuchsberger, N.; Borecky, L.; Hajnická, V.: Effect of prolonged Interferon treatment on "L" mouse fibroblast cells. *Acta Virol.* 18: 85-87 (1974).-
- 59) Dahl, H.: Differentiation between antiviral and anticellular effects of Interferon. *The Interferon System (Texas Reports on Biology and Medicine)* 35: 381-387 (1977).-
- 60) Dahl, H.: Human Interferon and Cell Growth Inhibition. *Acta path.microb.Scand.Sect.B* 85: 54-60 (1977).-
- 61) Knight Jr., E.: Antiviral and Cell Growth Inhibitory activities reside in the same glycoproteins of human fibroblast interferon. *Nature* 262: 302-303 (1976).-
- 62) Levy, H.B.; Levine, A.S.; Engel, W.K.: Clinical studies with a Primate Interferon Inducer (POLY ICLC). Abstracts of the Fourth International Congress for Virology - The Hague. Aug.30-Sep.6 p.95 (1978).-
- 63) Cantell, K.: Towards the clinical use of interferon. *Endeavour, New Series* 2 (1): 27-30 (1978).-
- 64) Galasso, G.J.; Dunnich, J.K.: Interferon: an antiviral drug for use in man. *The Interferon System*

- (Texas Reports on Biology and Medicine) 35: 478-486 (1977).-
- 65) Hirsch, M.S.: Interferon: Its hour come at last. New England J. of Medicine. (May) 4: 1022-1023 (1978).-
- 66) de la Peña, N.C.; Díaz, A.; Damel, A.; Bal, E.; Puricelli, L.; Ejden, J.; Lustig, E.S.: Combined therapy of Human Interferon (HI) and secretory immunoglobulin A (IgA-S) in the treatment of Human Herpetic Keratitis. Biomedicine 28: 104-108 (1978).-
- 67) Adamson, U.; Aparisi, T.; Broström, L.; Cantell, K.; Einhorn, S.; Hall, K.; Ingimarsson, S.; Nilsson, S.; Strander, H.; Söderberg, G.: The role of non-specific immunity in the prevention and treatment of cancer. Study week of the Pontifical Academy of Sciences, Vatican City, October 17th-21st (1977).-
- 68) Desmyter, J.; Ray, M.B.; De Groote, J.; Bradburne, A.F.; Desmet, V.J.; Edy, V.G.; Billiau, A.; Desomer, P.; Mortelmans, J.: Administration of human fibroblast interferon in chronic hepatitis B infections. Lancet 2: 645-647 (1976).-
- 69) Soloviev, V.D.: Some results and prospects in the study of endogenous and exogenous interferon. "The Interferon": An International Symposium held at the University of Siena. June 5th-8th (1967).-
- 70) Greenberg, H.B.; Pollard, R.B.; Lutwick, L.I.; Gregory, P.B.; Robinson, W.S.; Merigan, T.C.: Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis. New Engl. J. Med. 295: 517-522 (1976).-

- 71) Gresser, I.; Tovey, M.G.; Maury, G.; Bandu, M.T.:  
Role of Interferon in the pathogenesis of virus  
disease in mice as demonstrated by the use of  
anti-interferon serum. Studies with Herpes  
simplex, Moloney sarcoma, Vesicular stomatitis,  
Newcastle disease and Influenza viruses. J.Exp.  
Med.144: 1316-1323 (1976).-
- 72) Kern, E.R.; Glasgow, L.A.: Effect of Interferon on  
Systemic Herpes virus infections. The Interferon  
System (Texas Reports on Biology and Medicine)  
35: 472-477 (1977).-
- 73) Jones, B.R.; Coster, D.J.; Falcon, M.G.; Cantell, K.;  
Topical therapy of ulcerative herpetic keratitis  
with human interferon. Lancet 2: 128-131 (1976).-
- 74) Ikić, D.; Smerdel, S.; Šooš, E.; Jušić, D.: Our  
experience with topical use of interferon in  
viral diseases. Proc.Symp.on Preparation,  
Standardization and Clinical use of Interferon  
(Zagreb): 123-133 (1977).-
- 75) Merigan, T.C.; Rand, K.H.; Pollard, R.B.; Abdallah,  
P.S.; Jordan, G.W.; Fried, R.P.: Human Leukocyte  
Interferon for the treatment of HZV in patients  
with cancer. The New Engl.J.of Med.298 (18):  
981-987 (1978).-
- 76) de la Peña, N.C.; Bal, E.; Loria, D.; Puricelli, L.;  
Díaz, A.; Lustig, E.S.: Herpes Zoster. Tratamiento  
local con interferon humano (IH) e Inmunoglobuli-  
na A secretoria (IgA-S). XXIII Reunión de la Soc.  
Arg.de Inv.Clínicas. 28 Nov.-7 Dic. Buenos Aires  
(1978).-

Parte III

INMUNOGLOBULINA A SECRETORIA:

ESTRUCTURA , BIOSINTESIS, PROPIEDADES  
QUIMICAS Y BIOLÓGICAS.

## INTRODUCCION

Durante los primeros tiempos de la inmunología se discutió sobre los mecanismos del estado inmunitario. El grupo de E. Metchnikoff atribuyó la inmunidad a las células del sistema retículo-endotelial mientras que P. Ehrlich y col. afirmaban que los anticuerpos (Ac) circulantes eran los primeros involucrados. Hoy sabemos que ambos mecanismos operan en distinto grado en la respuesta inmune contra diferentes agentes.

En los últimos años se dió mayor énfasis a las reacciones inmunes donde participan los Ac circulantes. Casi todos los conocimientos disponibles, referentes a la química de interacciones de Ac con antígenos (Ag) y de la estructura de la molécula de Ac derivó de estudios sobre Ac séricos.

En la mayoría de los trabajos sobre eficiencia de inmunización, los títulos de Ac del suero se toman como una medida primaria de la efectividad inmunizante del Ag. Sin embargo esta correlación no siempre es correcta.

En 1919 Besredka postuló la existencia de una inmunidad local que puede ser establecida independientemente de los Ac circulantes y la inmunidad sistémica. Se habló de una "inmunidad local", que sugirió la existencia de un estado inmune regional, sin participación significativa de los Ac del suero. Posteriormente, otras observaciones extendieron el concepto de inmunidad local. Particularmente importante fueron los trabajos de Burrows y col. en cólera experimental sobre cobayos y de Fazekas de St. Groth sobre infecciones

virales a influenza en ratón.

Burrows demostró que la resistencia al cólera en cobayo es mediada primariamente por Ac presentes en las secreciones gastrointestinales, los que llamé Coproanticuerpos. Ya que el cólera no invade debajo de la membrana mucosa y causa la enfermedad mediante la producción de una exotoxina en el lumen del intestino, es factible pensar que la inmunidad puede ser mediada por Ac presentes sobre o cerca de la membrana mucosa.

Posteriormente, en la década del 50 Fazekas de St. Groth demostró que la resistencia a infecciones experimentales de influenza en el tracto respiratorio parece estar relacionada con el contenido de Ac en los fluídos que bañan la membrana mucosa. Si en este fluído los Ac están presentes con un título significativo impiden la acción del virus de Influenza, que al igual que el Cólera, produce una infección superficial localizada en la mucosa.

Estudios posteriores afirmaron que en ciertas infecciones la inmunidad local tiene mayor importancia que los Ac circulantes en la resistencia y defensa del organismo, modificando la patogénesis y curso de ciertas enfermedades bacterianas y virales. En los años 1950-1960 se estudió la heterogeneidad de las moléculas de Ac séricos, indicándose la existencia de varias clases de Ac que difieren no sólo en su estructura química, sino también en sus propiedades biológicas.

En 1959 Heremans describió los Ac tipo Inmunoglobulina A (IgA), que son los predominantes en la mayoría de las secreciones. En 1963 Tomasi describió una serie de Ac secretorios que difieren de las Ig encontradas en el suero.



Los Ac secretorios o mucoanticuerpos se forman predominantemente en las células linfoideas plasmáticas que yacen en relación anatómica íntima con el epitelio de la membrana mucosa. Por lo tanto el fenómeno de inmunidad local depende, aparentemente, de la producción local de Ac específicos. Esta puede funcionar, en ciertas circunstancias, con relativa independencia del sistema inmune sistémico responsable de la producción de Ac circulantes. A pesar que la IgA se encuentra presente en las secreciones externas en mayor cantidad, se han encontrado otras Ig, que probablemente también se sintetizan en forma local. Ultimamente han sido descritas reacciones de hipersensibilidad retardada (inmunidad mediada por células) en los tractos respiratorio y gastrointestinal. Por lo tanto el concepto actual de "sistema secretorio" se extiende a varios tipos de Ig como así también a las reacciones de inmunidad celular.

### Características generales de la IgA.

Las Ig consisten en un sistema complejo de proteínas estructuralmente relacionadas que se encuentran en el suero y secreciones de todos los vertebrados y cuyo papel principal es actuar como Ac.

Las Ig son polimórficas, así se encuentran normalmente cientos de tipos diferentes de Ac con distinta estructura primaria (secuencia de aminoácidos). Cada una de ellas surge de un estímulo específico para el Ag correspondiente, aunque existen reacciones cruzadas con otros componentes, además del Ag estimulador.

Se reconocen 5 tipos de Ig: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE con propiedades fisicoquímicas, inmunológicas y biológicas diferentes.

La IgA fue aislada y caracterizada en 1959 por Heremans. Su concentración en el suero humano es relativamente baja, aproximadamente el 15% del total de Ig. Esta relativa baja concentración se debe principalmente a su rápido catabolismo ya que la cantidad sintetizada diariamente es mayor que la de IgG. Por lo tanto considerando en términos de síntesis diaria, la IgA es la Ig más importante.

Por otro lado la IgA es la principal Ig presente en las secreciones externas como saliva, lágrimas, secreciones del tracto respiratorio o gastrointestinal, etc. Hablamos de secreciones externas como aquellos fluidos que bañan las superficies membranas mucosas, cuyo epitelio está en directa continuidad con el medio externo. Los Ac presentes en estos fluidos se llaman mucoanticuerpos por su relación con las membranas mucosas.

La tabla I resume la cantidad de Ig en algunas secreciones.

Tabla 1.- Concentración de Ig en algunas secreciones humanas.

	Concentración de Ig (mgm %)		
	IgG	IgA	IgM
Suero	1000	160	100
Calostro	10	1234	61
Leche	30	600	50
Saliva	7	37	0.8
Lágrima	0	20	-

La IgA-S ha sido aislada de calostro, leche, saliva, fluido nasal, secreciones bronquiales y gastrointestinales, y orina. El calostro (secreción mamaria obtenida durante las primeras 48 horas post-parto), es la fuente más utilizada por su alto contenido en IgA. Así el calostro humano contiene de 0.5 a 1.3 gramos% de IgA.

### Estructura de la IgA-S

Todas las Ig normales (inclusive la IgA-S) tienen la misma estructura básica, con péptidos compartidos y diferenciales. Esta estructura básica que tiene una constante de sedimentación de 7 S, consiste en 4 cadenas polipeptídicas: 2 cadenas pesadas (H) y 2 cadenas livianas (L) (Figura 1). Las cadenas H y L son idénticas entre sí para cada Ig. Todas las Ig comparten las mismas cadenas L que se dividen en Kappa ( $\kappa$ ) y Lambda ( $\lambda$ ) de acuerdo a su composición de aminoácidos (aa). Cada Ig posee cadenas H diferentes; que se llaman  $\alpha$  en el caso de la IgA.

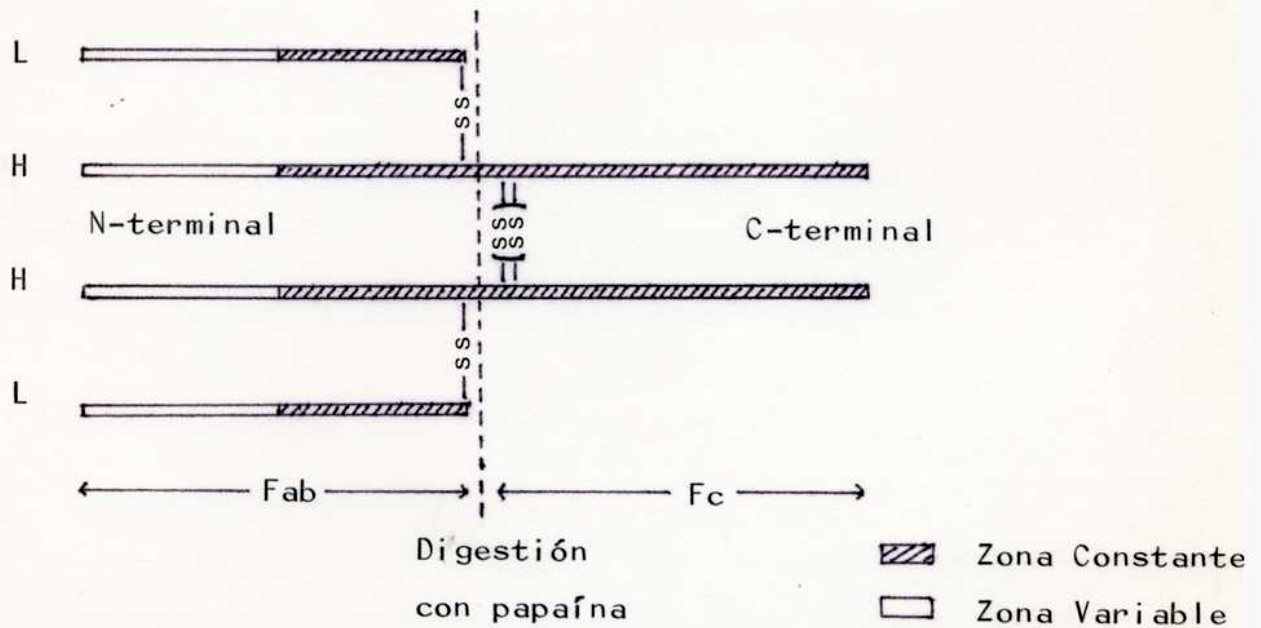


Figura 1: Estructura básica de las Inmunoglobulinas.

Tanto las cadenas H como las L poseen una región variable (V) y una constante (C) en cuanto a su secuencia de aa. Estas zonas están codificadas por genes separados. Por lo tanto las Ig son moléculas únicas en el sentido que una cadena polipeptídica está controlada al menos por 2 genes.

Tratando la molécula con papaína se obtienen dos fragmentos Fab y Fc (Figura 1).

Los datos experimentales indican que el sitio de unión de estas Ig con el Ag está localizado en el extremo Fab y formado por las zonas V de las cadenas L y H. La alta variabilidad en cuanto a la composición de Fab es responsable de la gran cantidad de sitios de combinación con los Ag y por ende de la especificidad de los Ac.

La IgA sérica se encuentra como un conjunto de proteínas con coeficientes de sedimentación entre 7 y 13 S. Estas moléculas se forman por polimerización de la estructura básica y son disociables por mercaptoetanol y urea en medio ácido.

La molécula de IgA-S está compuesta por dos subunidades monoméricas 7S de estructura tetrapeptídica. Estas subunidades son aparentemente iguales a las presentes en el suero.

Además de las cadenas L y  $\alpha$  las IgA-S tienen otras dos cadenas polipeptídicas: una es el componente secretorio (CS) que no se encuentra en las restantes Ig; y la otra, llamada J, presente también en la forma dimérica de la IgA sérica y en la IgM. Un modelo tentativo de la IgA-S está representado en la Figura 2 y está basado en datos derivados del análisis inmunoquímico de fragmentos producidos por rupturas químicas y enzimáticas.

La fórmula propuesta de la IgA-S es  $(\alpha_2 L_2)_2 J.CS.$

Las cadenas J y CS están unidas por puentes disulfuro a la parte Fc de las cadenas  $\alpha$ .

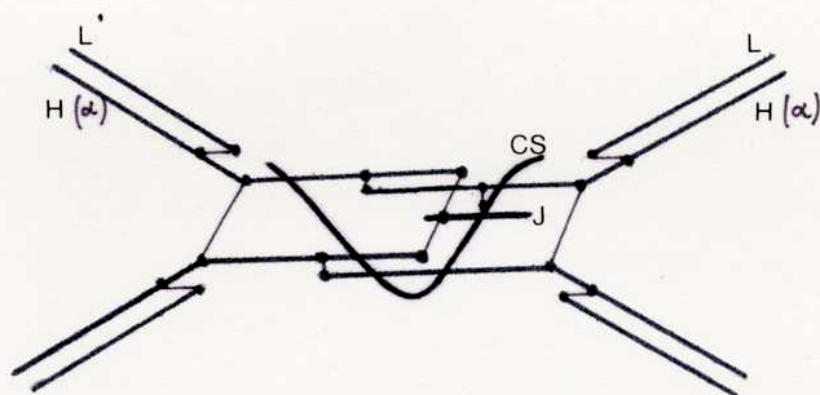


Figura 2: Modelo de la IgA-S humana.

La cadena J y la CS no están unidas entre sí por puentes disulfuros. El análisis de los productos de ruptura con bromuro de cianógeno (CNBr) indican que la cadena J está unida a los penúltimos residuos cistefnas de las dos cadenas  $\alpha$  de una misma subunidad 7 S. Por lo tanto J no une las dos subunidades tetrapeptídicas.

Se desconoce la ubicación de los puentes disulfuro que conectan las cadenas  $\alpha$  con el CS, pero se cree que se trata de dos puentes que se encontrarían en la parte Fc de la cadena  $\alpha$ . El CS estaría unido a uno sólo de los monómeros 7 S.

Por lo tanto las dos subunidades monoméricas son distintas ya que la cadena J se encuentra unida a

los dos penúltimos residuos dentro de la misma subunidad mientras que el CS está unido a la cadena  $\alpha$  de la otra subunidad.

La posición de los puentes que interconectan las subunidades 7 S entre sí se desconocen, pero se cree que estarían ubicados como señala la Figura 2.

Propiedades físico-químicas de la IgA-S

Las propiedades sobresalientes de la IgA-S son su relativo alto contenido en hidratos de carbono, su coeficiente de sedimentación de 11 S y su ubicación.

La tabla 2 señala las principales propiedades de la IgA-S respecto de la IgA sérica.

Tabla 2.- Propiedades de la IgA-S y de la IgA sérica

	<u>Tipo_de_IgA</u>	
	<u>IgA-S</u>	<u>IgA</u>
Peso Molecular (daltons)	385000	160000
Coeficiente de sedimentación ( $S_{20,w}^{\circ}$ )	11.3	6.9
Coeficiente de difusión ( $D_{20,w}^{\circ}$ )	2.43	3.0-3.6
Porcentaje de Carbohidratos	11.5	7.5
Hexosa	6.2	5
Hexosamina	4.1	2.9
Fucosa	0.7	0.2
Ac. siálico	0.7	1.8
Aminoácido N-terminal	Asp-Glu	Asp-Glu-Lis
Volumen parcial específico	0.728	0.729
Coeficiente de extinción $E_{280\text{ mu}}^{1\%}$	13.9	13.4
Subtipos de IgA	75% IgA <sub>1</sub> 25% IgA <sub>2</sub>	90% IgA <sub>1</sub> 10% IgA <sub>2</sub>



La IgA-S es más resistente al tratamiento enzimático que la IgA sérica o la IgG. Esta mayor resistencia puede representar una ventaja biológica para los Ac secretorios, los cuales funcionan en un medio con alta actividad proteolítica. Probablemente la presencia de CS hace a la molécula de IgA secretoria más resistente a la digestión enzimática. En base a su diferente antigenicidad se reconocen dos tipos de IgA: IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Estas subclases están representadas en la IgA-S pero la cantidad de IgA<sub>2</sub> parece ser mayor que en el suero. Así se encontró que la leche humana puede contener 30-50% de IgA<sub>2</sub>, mientras que en el suero sólo representa un 10%. Las cadenas L y H de la IgA<sub>2</sub>-S parecen estar unidas en forma covalente. Esto haría a la molécula más estable frente a condiciones desnaturizantes y podría ser una ventaja para Ac que funcionan en un medio hostil como las membranas mucosas.

La IgA-S no es la única IgA encontrada en las secreciones externas, aunque es la más importante. La IgA monomérica representa el 20% de la IgA del calostro humano, del fluido nasal y bronquial, el 33% del fluido duodenal y yeyunal, aproximadamente el 50% de la IgA hepática y el 10% del fluido paratiroideo. La mayoría de ellas carece de CS. También se encontró una proporción variable, alrededor del 20% de IgA más pesadas de 11 S, que se creen son polímeros de estas últimas por la presencia de CS. El CS es una glicoproteína con alto contenido en glicina y de aproximadamente 60.000 daltons. El CS parece ser una única cadena polipeptídica.

Actualmente el CS se aísla en forma libre de IgA-S de calostro y saliva. Los métodos usados para aislarlo varían, pero el más utilizado es la precipitación de

calostro con 50% de sulfato de amonio seguido por una cromatografía en DEAE y una filtración sobre Sephadex G-200.

El CS tiene un coeficiente de sedimentación de 4.2 S. No es una Ig y los datos no indican ninguna relación con las cadenas L o H.

La cadena J está presente sólo en las IgA poliméricas (no en la IgA 7 S) y en la IgM. La cadena J tiene un alto contenido en cisteína respecto a la cadena L.

El suero anti-J humano tiene una alta reactividad cruzada con la cadena J de otras especies, demostrando una similitud química en distintos grupos de animales.

### Biosíntesis y metabolismo de la IgA-S

Se ha establecido que la IgA e IgM que se encuentran en las secreciones externas son producto de numerosas células plasmáticas B que se encuentran en la lámina propia del tracto respiratorio y gastrointestinal y en el tejido intersticial de las glándulas secretorias. Avalan la hipótesis de la síntesis local de IgA una serie de evidencias bioquímicas, inmunohistológicas, estructurales y serológicas.

La presencia en las membranas mucosas y glandulares de todos los componentes de las cadenas polipeptídicas (cadenas  $\alpha$ , L, J y CS) da evidencias indirectas de una síntesis local. Datos sobre la incorporación de aa marcados demostraron que tales tejidos pueden sintetizar de novo todos los componentes de la IgA-S. Allí se encuentran abundantes células plasmáticas que sintetizan IgA, y que predominan sobre células plasmáticas que sintetizan otras Ig.

Se ha discutido si las células de la lámina propia producen IgA 7 S monomérica que dimeriza subsecuente a su secreción o bien si la dimerización ocurre intracelularmente. Las evidencias citológicas indican que la IgA oligomérica es el producto celular y no el resultado de una unión extracelular de monómeros 7 S. Se sabe que las moléculas de IgA-S 11 S contienen cadenas L de tipo K o  $\lambda$  pero no ambas, como se esperaría en un proceso de dimerización extracelular al azar. A pesar de esto es probable que algunos monómeros 7 S sean excretados al fluido intersticial por las células plasmáticas de la lámina propia, pero no transportadas a las secreciones quizá por su incapacidad de acomplejarse con el CS.

La cadena J es un componente constante e influencia

la polimerización y la siguiente unión del CS. La cadena J es sintetizada por las mismas células plasmáticas B que producen la IgA polimérica. Los datos indican que la cadena J se incorpora a los polímeros en el momento o cercanamente a la secreción. El CS no es sintetizado por las células plasmáticas pero si por las células epiteliales de las estructuras mucosas con las cuales las células plasmáticas se encuentran asociadas. Por lo tanto la molécula de IgA-S es el producto de dos tipos diferentes de células.

Los dímeros de IgA-J secretados por los plasmocitos B deben unirse al CS, para formar la molécula de IgA-S. Para ello deben atravesar la membrana basal para entrar a los acinos de las glándulas exocrinas o a la capa epitelial de la membrana mucosa. El mecanismo por el cual la IgA atraviesa la membrana basal no está entendido, ni se sabe si hay alguna selectividad involucrada.

La IgA pasa a través del espacio intercelular del epitelio. Estos espacios de 150 Å son altamente permeables a macromoléculas, pero esa migración es detenida en la parte apical por las uniones estrechas, por lo que poco o nada de proteína puede escapar directamente al lumen. Por lo tanto el camino es la difusión desde la lámina propia a través de la membrana basal al espacio interepitelial, la entrada al interior de la célula epitelial y finalmente la secreción al lumen (Fig. 3).

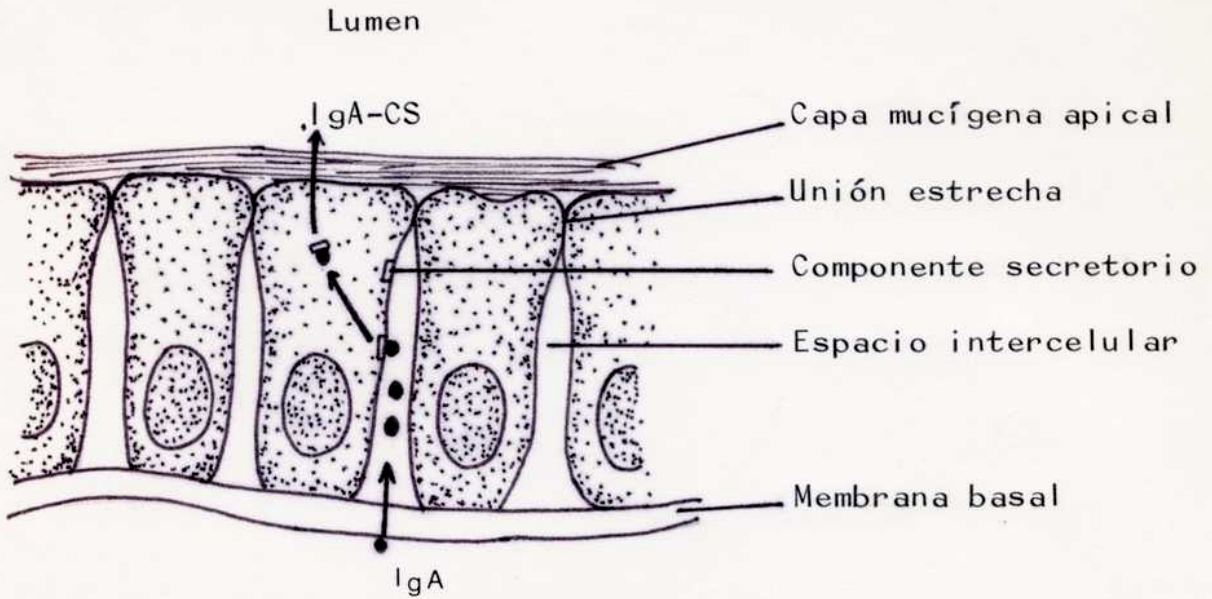
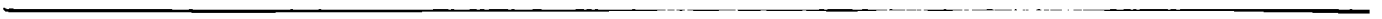


Figura 3: Modelo hipotético del transporte de IgA y CS a través de la membrana mucosa del epitelio

Huang y col demostraron que el CS es un componente de las células de carcinoma de colon en cultivo y ha sido localizado, a nivel ultraestructural, en la membrana plasmática de células epiteliales columnares normales. Este estudio demostró invaginaciones membranosas y vesículas citoplasmáticas conteniendo CS, IgA e IgM. Esto es compatible con una incorporación selectiva de IgA e IgM por pinocitosis adsorptiva debido al acomplejamiento con el CS. La formación de complejos en la membrana plasmática parece ser un mecanismo general de estimu-

,



Huang y col demostraron que el CS es un componente de las células de carcinoma de colon en cultivo y ha sido localizado, a nivel ultraestructural, en la membrana plasmática de células epiteliales columnares normales. Este estudio demostró invaginaciones membranosas y vesículas citoplasmáticas conteniendo CS, IgA e IgM. Esto es compatible con una incorporación selectiva de IgA e IgM por pinocitosis adsortiva debido al acomplejamiento con el CS. La formación de complejos en la membrana plasmática parece ser un mecanismo general de estimulación de la pinocitosis.

La función receptora del CS ha sido avalada por experiencias que muestran una inhibición de la secreción intestinal de IgA en animales luego de la inyección con Ac CS. Por lo tanto la IgA-J e IgM-J se unen espontáneamente por fuerzas no covalentes al CS ubicado en la membrana que actúa como receptor.

Las cadenas J libres tienen poca afinidad por el CS, pero se cree que el sitio de unión del CS a los polímeros Ig están constituidos por la conformación que adquiere la cadena J al unirse con la Ig. Sin embargo se necesitan más datos para corroborarlo.

El componente CS se encuentra presente normalmente en las superficies mucosas fetales y neonatales, mucho antes del desarrollo de las células plasmáticas inmunocompetentes y el sistema IgA. Se ha sugerido que CS asociado con la IgA o solo puede en forma no específica limitar la entrada y colonización de Ag potencialmente dañinos a nivel de membrana mucosa.



### Fuente de estimulación antigénica

La inmunización parenteral resulta en la producción de Ac séricos que están asociados principalmente a la IgG. Sólo trazas de Ig derivadas del suero alcanzan las secreciones externas y su falta de resistencia a las enzimas proteolíticas la hacen poco funcional en la mucosa.

La aplicación local de Ag sobre la mucosa es eficaz en inducir Ac tipo IgA-S.

Se están estudiando los eventos responsables para la inducción de IgA-S que se encuentran presentes en las secreciones externas. Se postuló que los Ag ingeridos penetran al epitelio altamente pinocitótico que cubre las placas de Peyer y estimula a precursores de clones de IgA, que se encuentran en estos tejidos linfoides. Estos precursores dejan las placas de Peyer a través de los vasos linfoides. Los linfocitos estimulados entran al torrente sanguíneo y se alojan selectivamente en la lámina propia del tracto respiratorio e intestinal, donde existe una diferenciación posterior a células plasmáticas que sintetizan IgA. Los datos indican que un proceso análogo podría ocurrir en glándula salival, mamaria y lagrimal.

Se discute si el tracto genital femenino debe considerarse parte del sistema secretorio. Sin embargo las infecciones experimentales vaginales en animales demostraron una disociación entre los títulos de Ac séricos y vaginales, lo que sugiere una concentración selectiva de los Ac séricos o una síntesis local.

La respuesta inmune uterina y vaginal tiene dos comportamientos diferenciales. Luego de la inmunización intravaginal con Poliovirus tipo 1 se detectan Ac en

los fluídos cervico-vaginales, mientras que luego de una inoculación intrauterina la respuesta al virus Polio se limita a IgG sérica principalmente. La aparición de Ac en órganos secretorios anatómicamente remotos como consecuencia de la ingestión de Ag, sugiere la existencia de un mecanismo común para la inducción de la respuesta inmune sobre la superficie mucosa. Se sabe que antígenos administrados parenteralmente son capaces de alcanzar, vía circulatoria, sitios secretorios y aumentar la producción local de Ac secretorios. Se desconocen las características de un Ag que determinen si puede o no estimular el sistema inmune local, cuando se los administra parenteralmente.

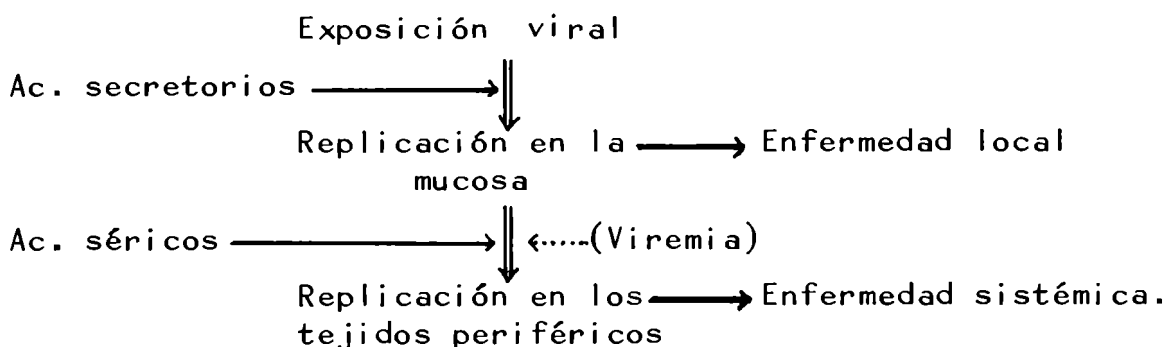
### Acción biológica de la IgA-S

La IgA-S tiene actividad Ac contra muchos microorganismos y bacterias a las que el hombre está expuesto, siendo la mucosa el portal de entrada para la mayoría de estos Ag. Los Ac secretorios tienen un importante papel protector ya que previenen el contacto entre los microorganismos y el tejido mucoso del huésped. También se han encontrado Ac tipo IgA-S dirigidos contra componentes no invasivos como alimentos.

Se sabe que el sistema secretorio regula la flora bacteriana normal y da resistencia contra la mayoría de las infecciones, aunque los mecanismos no están bien entendidos. Existe una serie de Ac antibacterianos en las secreciones que son capaces de interactuar con los Ag de superficie y con la envoltura bacteriana. Sin embargo la lisis, opsonización e inhibición del crecimiento sólo ha sido demostrado en pocos casos.

Los datos que implican al sistema secretorio en la prevención de las infecciones virales son más firmes. En la figura 4 se esquematiza un mecanismo general de diseminación viral y los sitios postulados de acción de Ac séricos y secretorios.

Figura 4.- Acción de los Ac secretorios y séricos en las infecciones virales.



Ciertos virus (Mixovirus, Virus Respiratorio Sin-cial, Rhinovirus, etc) colonizan inicialmente la membrana mucosa, replican localmente y producen enfermedades en el portal de entrada, generalmente el tracto respiratorio o gastrointestinal. En este caso hay poca o ninguna evidencia de diseminación sistémica y el virus permanece localizado en la membrana mucosa. Por lo tanto para interactuar y neutralizar los virus, los Ac deben actuar primariamente a nivel de la mucosa.

Otros virus (Polio, Sarampión, Echo, etc) replican localmente en el portal de entrada y luego se diseminan sistémicamente infectando los órganos periféricos. Aquí los Ac séricos son los más importantes en neutralizar la acción viral.

Los Ac secretorios actúan evitando la colonización inicial de ambos tipos de virus. Una vez que la infección se ha establecido y el virus replica en la membrana mucosa, se suceden una serie de eventos que llevan a la eliminación del virus. La recuperación quizá involucre, además de los Ac secretorios, la participación cooperativa de mecanismos fagocíticos, Ac séricos, inmunidad celular y sustancias no inmunes como el interferón.

En experiencias con infecciones a Parainfluenza se observó que la inmunidad muestra una mejor correlación con los niveles de Ac en las secreciones nasales que en el suero. Otro estudio indica que la aplicación de vacunas locales son más eficientes que las parenterales en el caso de algunas infecciones a Rhinovirus, Enterovirus y Myxovirus.

Uno de los trabajos que demuestra la importancia de la inmunización local fue realizado por Chanock y col. en infecciones a Rhinovirus. Se inmunizaron voluntarios

tanto parenteral como nasalmente con Rhinovirus inactivado. Ambos grupos desarrollaron Ac séricos tipo IgG e IgM, pero sólo las personas inmunizadas nasalmente desarrollaron títulos significativos de Ac secretorios en la mucosa. Luego ambos grupos fueron enfrentados con virus vivo y sólo los voluntarios vacunados intranasalmente resistieron la infección.

Los Ac secretorios inducidos luego de la inmunización intranasal con virus Polio inactivado, evitan la replicación nasofaríngea de este virus después de una reinfección oral con vacuna a virus vivo atenuado. El efecto limitante sobre las reinfecciones parece estar determinado por los niveles de Ac secretorios preexistentes al tiempo de la reinfección. A mayor nivel de Ac la infección puede ser evitada. A niveles bajos de Ac algunas replications virales pueden continuar, sin embargo en estos individuos inmunizados hay una replicación viral de corta duración y una excreción viral limitada respecto de los controles no inmunizados. Por lo tanto podemos decir que hay suficientes evidencias que indican que las inmunoglobulinas secretorias juegan un papel importante en la protección contra ciertas infecciones bacterianas y virales. El grado de respuesta inmune secretoria a nivel de la superficie mucosa y su contribución a los mecanismos de inmunidad general, parece estar relacionado con el curso y patología de dichas enfermedades.

### IgA-S y Virus Herpes

La inmunización ocular de conejos con virus HSV inactivado los protege frente a una posterior inoculación de virus vivo. Esto sólo ocurre en el ojo inmunizado. La protección está aparentemente mediada por Ac tipo IgA-S ya que se encontraron Ac específicos secretorios en secreción lagrimal, pero no se detectaron Ac séricos. Sin embargo una vez que la infección se establece en el ojo del conejo hay recurrencias a pesar de la presencia de IgA-S anti-HSV. Esto ocurre en forma semejante en el hombre. Una posible explicación sería que Ac no neutralizantes tipo IgG presentes en la lágrima eviten la neutralización con IgA.

Se ha determinado que una fracción lagrimal recubre sin neutralizar el virus y, por lo tanto el virus permanece activo. Por lo tanto la neutralización efectiva en este caso depende de la concentración relativa de IgA e IgG.

Estos datos más el hallazgo que la IgA-S tiene actividad neutralizante respecto de HSV (Amer. J. Ophthal. 68: 898-965 (1969)) nos llevó a postular una terapia combinada de la IgA-S junto a un agente antiviral como el Interferón.

Parte IV

ENSAYO EXPERIMENTAL

## A- INTERFERON HUMANO: PREPARACION Y TITULACION

Se preparó interferón (IF) a partir de un pool de leucocitos humanos ( $IF_L$  : Interferón humano de leucocitos) obtenidos de sangre periférica, utilizándose una técnica modificada de Falcoff (1), precedida por una etapa de preinducción.

### MATERIALES Y METODOS

Virus: Sendai: El stock de Virus Sendai (Parainfluenza) tipo 1 fue utilizado para inducir  $IF_L$ . Este virus fue mantenido por pasaje en líquido alantoideo de embrión de pollo de 10 días. Luego de la inoculación los huevos se incubaron a  $36^{\circ}C$ . A las 48 hs. se recogió el líquido alantoideo, se clarificó por centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos, fraccionó y conservó a  $-90^{\circ}C$ .

El virus fue titulado por un micrométodo de hemoaglutinación con glóbulos rojos de pollo. El título promedio de los stocks fue de 4000 Unidades Hemoaglutinantes (UH) por ml.

Virus Estomatitis Vesicular (VSV) cepa Indiana: VSV, utilizado para la titulación de IF, replicó en cultivo primario de embrión de pollo (EP) de 9 días.

El virus se tituló por el método de dilución al punto final en células de amnios humano (WISH). El título del stock fue  $10^7$  DICT<sub>50</sub> (Dosis Infeccionante Cultivo de Tejidos).

Células: Los cultivos de EP primarios y de Amnios humano (WISH) se mantuvieron en medio MEM (F-15, Gibco) adicionado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 100 U.I. de penicilina y 100 ug de estreptomycin por ml.



Preparación de Interferón Humano: La figura 1 resume los pasos principales de la técnica utilizada. La suspensión de leucocitos humanos se trató con cloruro de amonio para eliminar los glóbulos rojos. Se centrifugó y el pellet de leucocitos se resuspendió en medio RPMI 1640 adicionado de 4% de SFB, con una concentración final de  $5 \times 10^6$  células/ml. La etapa de preinducción con "priming" consiste en poner la suspensión de leucocitos en contacto con  $IF_L$ , para lo cual, se agregó 100 unidades (U) de  $IF_L$  por cada ml de suspensión.

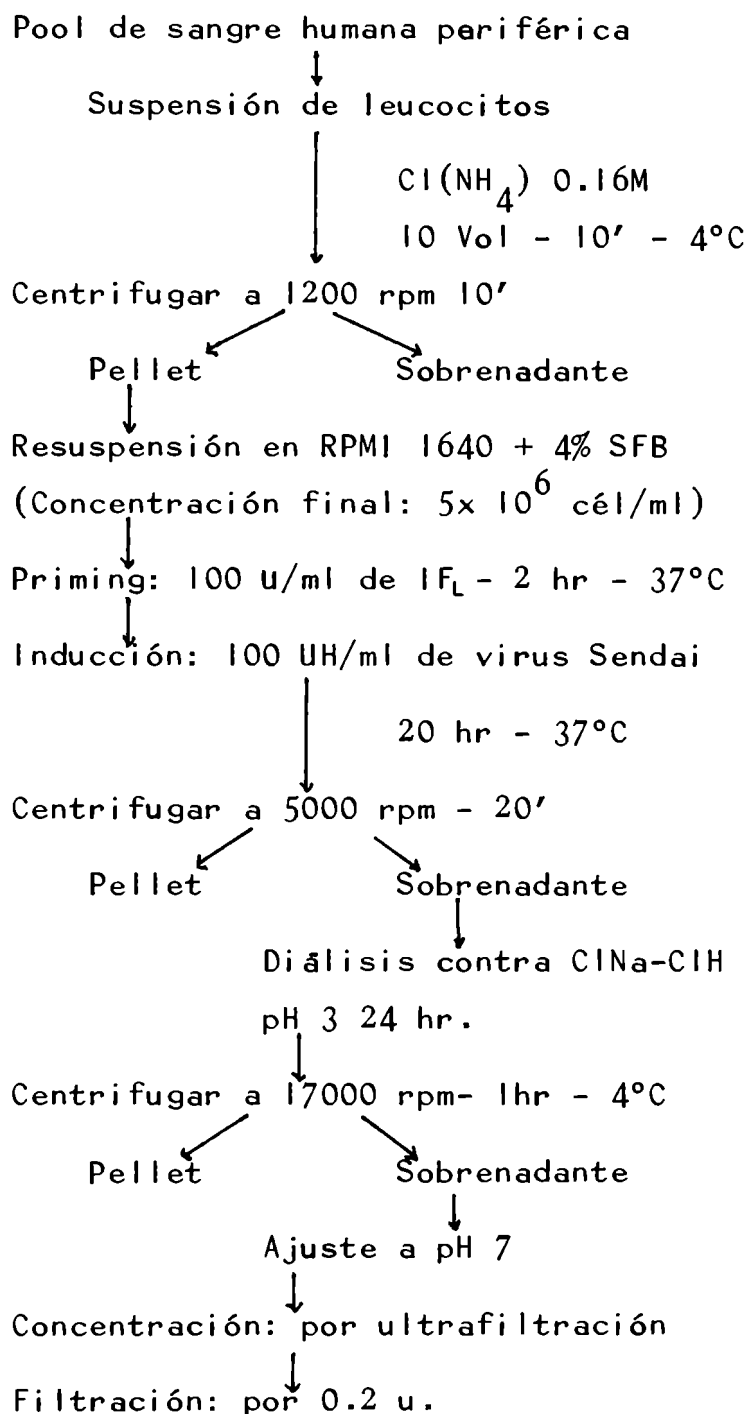
Luego de 2 horas de incubación a  $37^\circ C$ , se añadió 100 UH de virus Sendai/ml, para inducir la síntesis de  $IF_L$ . Luego de 20 horas se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos para eliminar los leucocitos. El sobrenadante, conteniendo  $IF_L$ , se dializó 24 horas contra una solución CNa-CIH a pH 3. En estas condiciones el virus Sendai se inactiva. Luego se centrifugó una hora a 17000 rpm a  $4^\circ C$ , se ajustó el pH a 7 y se concentró por ultrafiltración. El  $IF_L$  concentrado se filtró por 0.2  $\mu$ . Luego se fraccionó y congeló a  $-90^\circ C$ .

Se comprobó que la preparación carece de Virus Sendai activo y de Antígeno Australia.

Titulación de Interferón: Se realizó la titulación de  $IF_L$  sobre células WISH. Las monocapas fueron preparadas en cajas plásticas de 24 excavaciones (Linbro). Las células se trataron durante 20 horas con diluciones seriadas de  $IF_L$ . Luego se enfrentaron con  $10^{2.5}$  DITC<sub>50</sub> de VSV durante 24 horas.

La dilución de  $IF_L$  que reduce en un 50% el efecto citopático (ECP) producido por VSV en células WISH se expresa como una unidad de  $IF_L$ .

Figura 1: Preparación de Interferón Humano



El título de IF<sub>L</sub> fue ajustado con el IF<sub>L</sub> de referencia G-023-901-527, provisto por el NIH Research Resources Branch, Bethesda, Maryland (USA).

La concentración proteica de la preparación se midió por el método de Lowry (2).

La actividad específica del IF<sub>L</sub> es  $10^5$  unidades/mg de proteína.

B- SENSIBILIDAD DE HSV A LA ACCION ANTIVIRAL  
DEL IF HUMANO DE LEUCOCITOS

A pesar que es conocido el potencial antiviral del IF, se han comunicado diferencias en la sensibilidad de diferentes virus (3, 4). Así las pruebas de capacidad antiviral del IF con VSV o Virus Semliki Forest no dieron resultados que sirvieran para predecir su utilidad en terapias clínicas.

Ha sido relatado que miembros del grupo Herpes son resistentes a la actividad antiviral del IF exógeno en células humanas, cuando se usa la inhibición del ECP como criterio de evaluación de la replicación viral (5, 6). Por otro lado, se ha demostrado que el ECP es inhibido por inductores de IF, tal como poly I:C (7), y que el tratamiento con IF inhibe (8) o demora la replicación de HSV in vitro (9). Puesto que los datos anteriores son confusos respecto de la sensibilidad de los virus Herpes a los efectos antivirales del IF, y previo a su utilización en protocolos clínicos, se decidió evaluar su capacidad protectora frente a HSV-1 en un sistema de células humanas.

MATERIALES Y METODOS:

Células: Se emplearon las líneas celulares establecidas de riñon de conejo (RK-13) y de carcinoma de laringe humano (Hep-2). Estas células se mantuvieron en medio MEM (F-15 Gibco) con 5% de SFB, 100  $\mu$ l, de penicilina y 100  $\mu$ g de estreptomina por ml.

Virus: Se trabajó con un prototipo de Herpes simplex facial (HSV-F) tipo 1, provista originalmente por la Dra L. Aurelian (Department of Laboratory Medicine

"John Hopkins University", Baltimore, USA).

La cepa fue replicada en las células sensibles Hep-2, en medio sin suero. Cuando se visualizó el ECP característico, se recogió el medio con las células y se centrifugó. El pellet conteniendo las células infectadas se sometió a 7 ciclos de congelación y descongelación, a fin de romperlas y liberar las partículas virales infecciosas intracitoplasmáticas. Este pellet se resuspendió en 2/3 partes del volumen del sobrenadante, añadiéndose 1/3 parte de leche descremada para prolongar la infecciosidad del stock. Se envasó y congeló a  $-90^{\circ}\text{C}$ . El título de la cepa sock usada fue  $2.3 \times 10^8$  UFP/ml.

#### Titulación de Virus HSV: (Figura 2)

Para la titulación de HSV se emplearon células RK-13. Estas células fueron sembradas en cajas plásticas de 24 excavaciones (Linbro). Cuando el cultivo llegó a confluencia, generalmente entre las 24 y 48 horas de siembra, se lavó con solución fisiológica y se infectó.

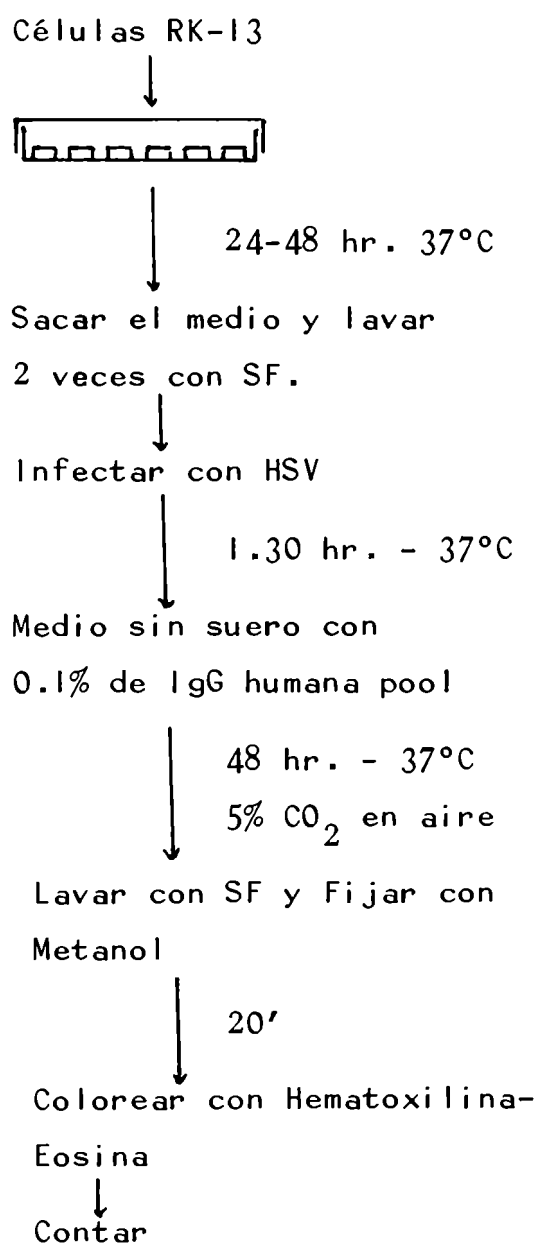
Las monocapas se incubaron con 0.2 ml de la(s) dilución(es) de HSV elegida(s) durante 1.30 hr. con agitación cada 15 minutos, tal que el inóculo se distribuya homogéneamente.

Cada dilución fue sembrada por triplicado.

Luego de la adsorción, se sacó el inóculo y se lavó para eliminar el virus residual o no adsorbido. Se añadió medio sin suero adicionado de 0.1% de Inmunoglobulina humana pool (Laboratorio Inmunoquemia, Buenos Aires). Esta IgG fue testada previamente en su capacidad bloqueadora de la infección herpética por el test de neutralización.

Luego se incubó a 37°C durante 48 hr. en una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> en aire.  
 Se fijó con alcohol metílico y coloreó con Hematoxilina -Eosina. Las placas se contaron bajo lupa y se promediaron los valores de los triplicados.  
 El título se expresó en Unidades Formadoras de Placas (UFP) por ml.

Figura 2: Método de Plaqueo para HSV



### Ensayo de inhibición viral:

La actividad antiviral del IF<sub>L</sub> se ensayó por la reducción de la producción de virus, medida por el método de plaqueo, durante el ciclo replicativo de HSV. La experiencia fue realizada sobre monocapas de células Hep-2, en cajas plásticas de 24 excavaciones.

Se trabajó con los siguientes grupos:

Grupo A: Control de replicación de HSV-1

Grupo B: Células tratadas con 1000 U de IF<sub>L</sub> 20hs. previo a la infección con HSV y con 1000 U de IF<sub>L</sub> diarias post-infección.

Grupo C: Células tratadas luego de la infección con 1000 U de IF<sub>L</sub> cada 24 horas.

Se quitó el medio y se lavó con solución fisiológica. Luego se infectó con 0.2 ml de HSV-1 con un título de  $3 \times 10^3$  UFP/excavación. Después de un período de adsorción de 1.30 hr. a 37°C, los cultivos se lavaron dos veces y se les añadió medio MEM adicionado con 2% de SFB. A los grupos B y C se les agregó IF<sub>L</sub>. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en atmósfera húmeda, con 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

El medio de cultivo de los tres grupos experimentales fue recogido a las 24, 48 y 72 hr, post-infección y congelado a -90°C para su posterior titulación por el método de plaqueo. Cada muestra fue ensayada por triplicado.

### RESULTADOS:

La figura 3 resume los datos obtenidos sobre la capacidad antiviral del IF<sub>L</sub> en el ciclo replicativo de HSV.

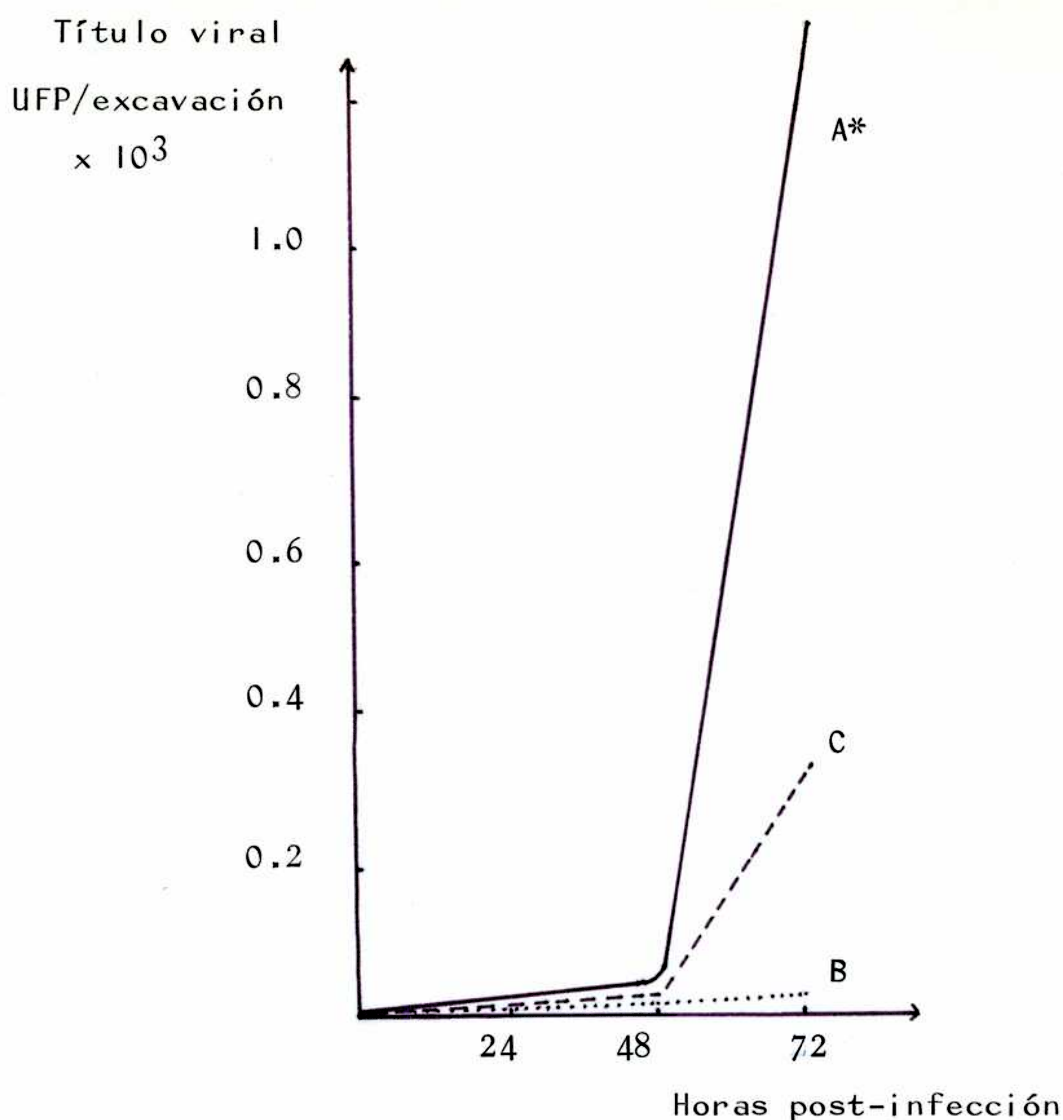


Figura 3: Efecto del IF<sub>L</sub> humano sobre la replicación de HSV-1 en células Hep-2.

\* Curva A: Control

B: Tratamiento pre y post-infección con IF<sub>L</sub>

C: Tratamiento con IF<sub>L</sub> luego de la infección.

En este sistema HSV-1-Células Hep-2, el virus comienza a detectarse en el sobrenadante después de las 48 hr. luego de la infección (Curva A). A las 72 hr. se observa un incremento en la producción de partículas virales, alcanzando valores de  $1.3 \times 10^3$  UFP/ml. HSV-1 replica poco en células pre y post-tratadas con IF<sub>L</sub>. No se detecta virus antes de las 72 hr., llegando a valores muy bajos del orden de  $2.3 \times 10$  UFP/ml (Curva B).



El post-tratamiento con  $IF_L$  de células infectadas redujo a las 72 hr., la cantidad de partículas producidas, en un logaritmo respecto del control (Curva B).

#### DISCUSION:

Los datos presentados en este estudio demuestran que HSV es inhibido por IF de leucocitos al replicarse en un sistema de células humanas. Resultados semejantes fueron obtenidos por Rasmussen y Farley (8) quienes trabajando con IF de fibroblastos señalaron que la preincubación de cultivos con dosis muy bajas de este IF, inhiben la replicación de HSV-1. Así 760 U inhibe en más de 2 log. la cantidad de virus producida.

Algunos autores no encontraron correlación entre la protección del ECP por el IF y la replicación de HSV (7). Neumann-Haefelin y col (9) demostraron que el pretratamiento de células humanas con IF de leucocitos, demora en 24 hr. la aparición del ECP, aunque luego se alcanzan valores semejantes al control. Sin embargo cuando estos mismos autores suministraron IF repetidas veces antes y durante la replicación viral, se observó una fuerte inhibición viral.

La inhibición del ECP por el IF no es un buen parámetro, ya que ha sido probado que dicho efecto puede ser provocado p.e. por proteínas virales tóxicas aún a bajo título viral (10).

En esta experiencia se observó que el pre y post-tratamiento con 1000U de  $IF_L$  inhibe fuertemente la replicación de HSV, detectándose una disminución de 2 log. a las 72 hr. La aplicación de  $IF_L$  post-infección redujo en aproximadamente 1 log. la cantidad de virus a los 3 días. La evaluación fue realizada por el método de plaqueo, que evita la interpretación dudosa del ECP.

Trabajos realizados comparando la susceptibilidad de distintos virus al IF demuestran que los ensayos de producción viral durante varios ciclos exagera sus diferencias por lo que se recomienda ensayos de un solo ciclo (11). A pesar de ello sería interesante detectar los valores máximos en la producción de HSV alcanzados con o sin IF.

Otros autores no han encontrado diferencias en la sensibilidad al IF de HSV-1 y HSV-2 (8).

Por lo tanto los datos obtenidos in vitro indican que la aplicación terapéutica del IF humano de leucocitos en infecciones herpéticas puede ser efectiva. Esto sumado al hallazgo de otros autores que la aplicación de IF o inductores del mismo durante las últimas fases de la infección viral podría no ser efectivo en el control de los procesos locales (12), indicarían que el éxito de la terapia depende de su aplicación temprana en las infecciones naturales.

### C- PREPARACION DE INMUNOGLOBULINA A SECRETORIA (IgA-S).

Se obtuvieron muestras de calostro de varias mujeres entre el primer y tercer día post-parto y se hizo un pool con los mismos.

La figura 4 resume las etapas seguidas en la preparación de la IgA-S.

El pool se centrifugó 4 horas a 25.000 g para eliminar los lípidos por flotación. La caseína se extrajo por precipitación, para lo cual, se acidificó el sobrenadante con ácido acético a pH 4.6 y centrifugó a 10.000 g durante 30 minutos y a una temperatura de 4 °C.

El sobrenadante se llevo a pH y se precipitaron las globulinas con sulfato de amonio hasta 70 % de saturación. Se centrifugó y el sedimento se disolvió con solución fisiológica. Se dializó contra Tris-ClH pH 8 y filtró por Sephadex G-200 (Pharmacia, Uppsala) a 4°C, equilibrada con buffer Tris-ClH 0.1 M conteniendo ClNa 1 M.

El pico de exclusión de la columna que contiene la IgA-S se concentró por ultrafiltración.

La pureza de la IgA-S se testó por Inmunolectroforesis, según el micrométodo de Scheidegger (13), usando antisueros totales y monoespecíficos de Laboratorios Inmunoquemia (Buenos Aires).

Se testaron muestras de varias etapas de la preparación, midiendo la cantidad de proteínas totales por el método de Lowry (2). Además se cuantificó la IgA por el método de Inmunodifusión radial (14) (Kit Inmuno-Quant de Laboratorios Inmunoquemia). Los valores obtenidos se resumen en la tabla 1.

Figura 4: Obtención de INMUNOGLOBULINA-A SECRETORIA

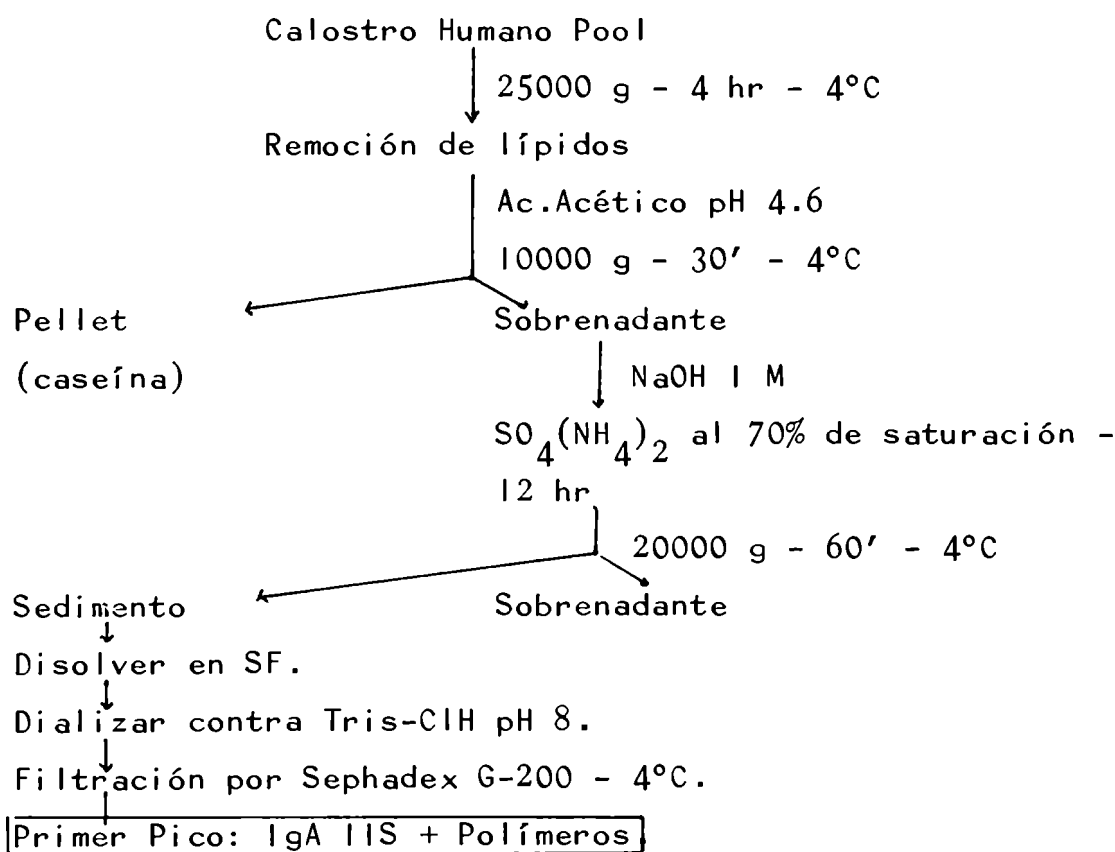


Tabla I: Purificación de la IgA-S

Fracción*	Prot. totales (mg/ml)	IgA-S (mg/ml)	IgA-S/Prot. total
A	30.46	12.2	0.40
B	11.7	9.4	0.80
C	1.9	2.02	1.06

\* A- Calostro Delipidizado; B- Fracción Dializada;  
C- Fracción Post-Sephadex.-

Se observa en esta última tabla que, a medida que se purifica, el valor de IgA-S/Proteína total es mayor, lo que indica un buen procesamiento y purificación del Ac secretorio.-

## D - CAPACIDAD ANTI-HSV DE LA IgA-S

Es sabido que la IgA-S tiene actividad Ac contra muchos microorganismos a los que el hombre y los animales están expuestos.

Considerando que HSV infecta preferentemente las zonas mucocutáneas y que, los fenómenos de inmunidad local dependen en alto grado de la producción "in situ" de Ac específicos, como la IgA-S, se consideró que esta Inmunoglobulina suministrada exógenamente en lesiones herpéticas podría contribuir a mejorar la evolución de la infección. Se suma a esto, el hecho que la IgA-S tiene propiedades antiinflamatorias, lo cual favorece la rápida curación de las lesiones a HSV. Por lo tanto, y previo a su utilización clínica, se estudió "in vitro" la capacidad anti-herpética de la IgA-S extraída de calostro humano, mediante un test de neutralización.

### MATERIALES Y METODOS:

Células y Virus: Las células RK-13 y el virus HSV-1 fueron mantenidos como se detalla en la parte B.

IgA-S: La sección C resume los pasos seguidos en la preparación de esta Ig.

Se testó la capacidad anti-herpética de las siguientes

- muestras:
- Fracción Dializada
  - Fracción Post Sephadex

### Test de Neutralización:

Se enfrentó igual volumen de HSV-1 (con un título de  $6 \times 10^3$  UFP/ml) con diluciones 1/5 seriadas de las fracciones de IgA-S, llevadas previamente a una concentración de 1.5 mg de IgA-S/ml.

Como control se utilizó igual volumen de virus con

solución fisiológica. Este control permite saber que cantidad de virus se inactiva por efecto de la temperatura.

Se dejó 1 hora a 37°C, agitando cada 15 minutos. Luego de la incubación, se tituló cada muestra por triplicado, por medio del método de plaqueo.

Se consideró el título de la IgA-S como la dilución de Ig que es capaz de neutralizar el 50% de las placas.

### RESULTADOS

La muestra tomada luego de la diálisis, dió un título de 1/3. La fracción extraída luego del pasaje por columna de Sephadex dió 1/2, que corresponde a una concentración de 0.75 mg/ml de IgA-S.

### DISCUSION:

Con este ensayo se probó que los Ac secretorios tipo IgA-S extraídos de Calostro humano, son capaces de neutralizar la capacidad infecciosa de HSV.

Las dos muestras testadas dieron valores semejantes, por lo que la IgA-S no se inactiva al pasarla por la columna de Sephadex.

Siendo que 0.75 mg/ml de IgA-S es capaz de neutralizar el 50% de  $6 \times 10^3$  UFP/ml, se decidió utilizar una concentración del doble: 1.5 mg/ml para aplicaciones clínicas en infecciones herpéticas.

## E- ESTUDIO MORFOLOGICO DE CELULAS RK-13 INFECTADAS CON HSV-1.

Los virus Herpes inducen una serie de cambios inmunológicos, bioquímicos y biológicos en la membrana plasmática de la célula infectada (15).

La presencia de glicoproteínas codificadas por HSV, ha sido involucrada en varias alteraciones físicas de las membranas celulares (15), lo cual resulta en un aumento de la adhesividad intracelular (16), de la permeabilidad (17) y del número y largo de las microvellosidades de superficie (18).

Este estudio fue realizado para detectar los cambios morfológicos producidos por HSV sobre células cultivadas in vitro. Los resultados fueron evaluados por microscopía óptica (MO) y electromicroscopía de barrido o scanning (SEM).

### MATERIALES Y METODOS:

Células y Virus: Las células RK-13 y el virus HSV-1 fueron mantenidos como se relata en la parte B.

Preparación de las células para Estudios Antigénicos y Microscópicos: Se sembraron células RK-13 en cajas plásticas de 24 excavaciones (Linbro), conteniendo cubreobjetos de vidrio. Las cajas se incubaron a 37°C en humedad, con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire. A las 24 hr., cuando las monocapas estaban formadas, se quitó el medio, lavó muy bien con solución fisiológica e infectó con  $3 \times 10^3$  UFP/ml. Luego de 1.30 hr. de adsorción, se añadió medio MEM con 2% de SFB y se incubó a 37°C en las condiciones anteriores

A las 24 hr. post-infección, cuando el efecto viral comenzaba a evidenciarse, se fijó y procesó de acuerdo a la técnica a emplear. Las células no se despegaron

del vidrio durante la preparación para su observación microscópica.

Detección de Antígenos Herpéticos (Figura 5):

Las células RK-13 infectadas con HSV forman racimos característicos. Corroboramos la presencia de Ag de HSV mediante un método inmunohistoquímico, la técnica de Inmunoperoxidasa PAP (19).

Los cultivos se fijaron 24 horas post-infección con fijador Bouin durante 1 minuto y luego se pasaron a alcohol 70 donde se guardaron hasta el momento de realizar la técnica.

Las células fueron tratadas con Agua Oxigenada ( $H_2O_2$ ) para eliminar la posible peroxidasa endógena celular. Los preparados fueron enfrentados con suero de conejo anti-HSV-1 ( Dako-Immunoglobulins- Copenhagen-Denmark ) durante 24 hr. a 4°C en ambiente húmedo. Luego de lavar con buffer Tris para eliminar el primer antisuero, se enfrentaron las muestras con un segundo suero preparado en cabra anti-IgG de conejo (Cappel Lab.- Cochranville- USA ). Se dejó 30 minutos a temperatura ambiente.

Se lavó y colocó el tercer antisuero anti-Peroxidasa, preparado en conejo y conjugado inmunológicamente con la enzima Peroxidasa (Cappel-Lab.- Cochranville- USA). La actividad peroxidasa fue revelada empleando un sustrato oxidable: la 3-3'- diaminobenzidina (DAB) bajo control microscópico, el tiempo necesario hasta obtener una buena tinción de zonas positivas (coloración marrón) con fondo incoloro.

La acción del DAB se interrumpió con Agua Destilada. Como colorante de contraste se usó Hematoxilina débil. Se deshidrató y montó de acuerdo a las técnicas de rutina.

Como controles se trató muestras en igual forma, pero



en vez del primer antisuero específico, se empleó suero normal de conejo. Este control dió negativo ya que se interrumpió la cadena de antisueros específicos. Se aplicó la técnica PAP a células sin infectar, como control negativo, para comprobar que las células RK-13 no fijan inespecíficamente los antisueros.

#### Estudios Morfológicos:

Los dos grupos estudiados son:

A- Células RK-13

B- Células RK-13 infectadas con HSV-1.

A las 24 horas post-infección los vidrios se fijaron con 3% de Glutaraldehído durante 4 hr..Luego de lavar con buffer Fosfato con Sacarosa se volvió a fijar con una solución de 1.5% de Tetróxido de Osmio, durante 2 hr.

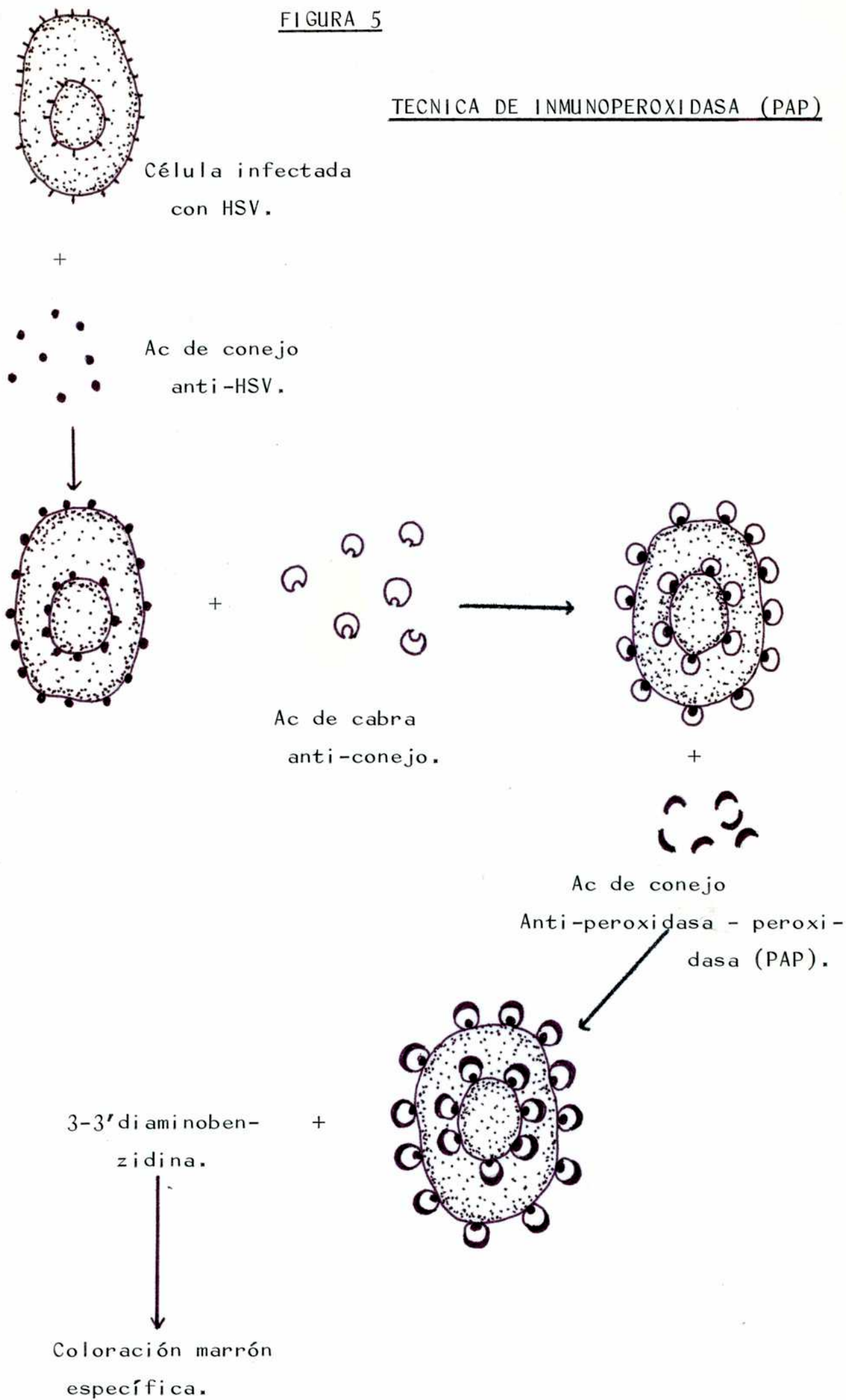
Luego de lavar con Agua Destilada las muestras fueron deshidratadas en acetonas crecientes y desecadas por el método de Critical Point en CO<sub>2</sub> fluído. Los vidrios montados fueron cubiertos por una capa delgada de oro-paladio y observados en un electromicroscópio Jeol-JSM-V7.

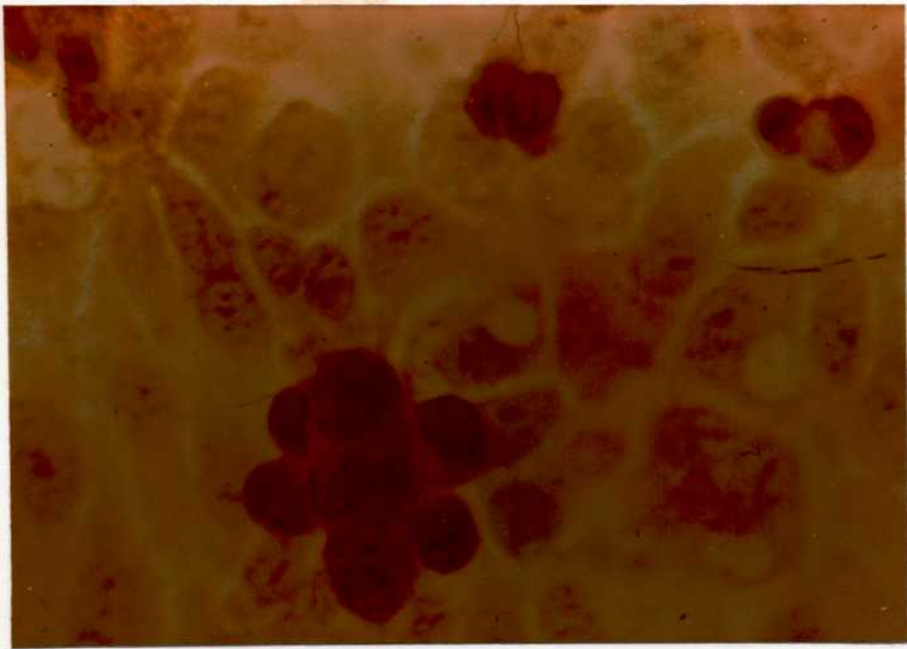
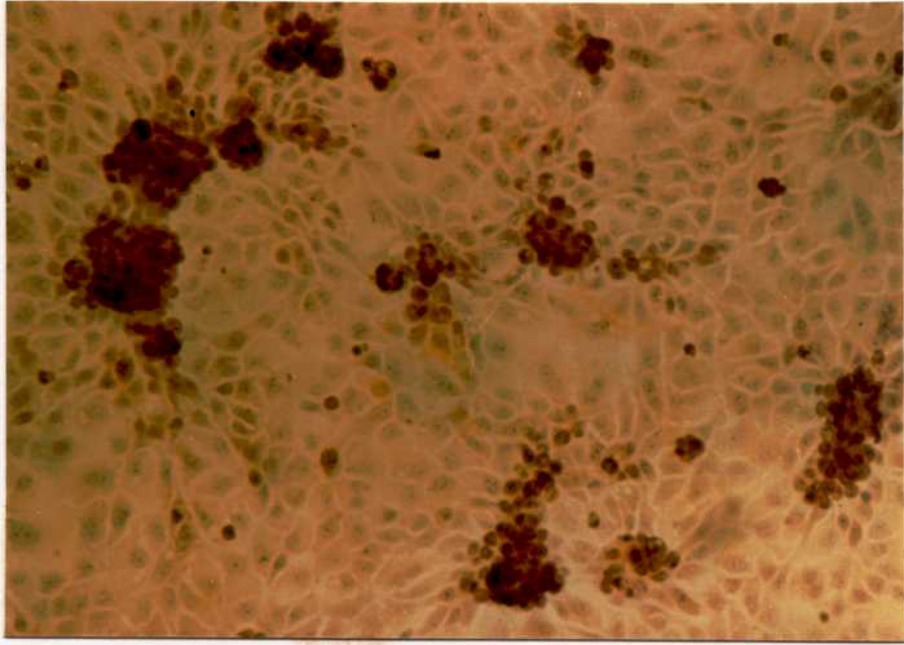
Muestras paralelas fueron fijadas en alcohol 96 y coloreadas con Hematoxilina-Eosina para observarlas con microscópio óptico común.

#### RESULTADOS:

Con la técnica de inmunoperoxidasa se corroboró que los racimos formados en las células RK 13 poseen Ag herpéticos (Fig. 6,7). Estas células se colorean típicamente de marrón. Se observan algunas células adyacentes a las redondeadas con Ag herpéticos.

FIGURA 5

TECNICA DE INMUNOPEROXIDASA (PAP)



Figuras 6 y 7: Células RK-13 infectadas con HSV-1 y tratadas con la técnica de inmunoperoxidasa.-

Fig. 6 - (100 X).

Fig. 7 - (400 X).



Las Figuras 8 y 9 muestran cultivos de RK; uno control y otro infectado con HSV-1 donde se ven los típicos racimos observados con SEM.

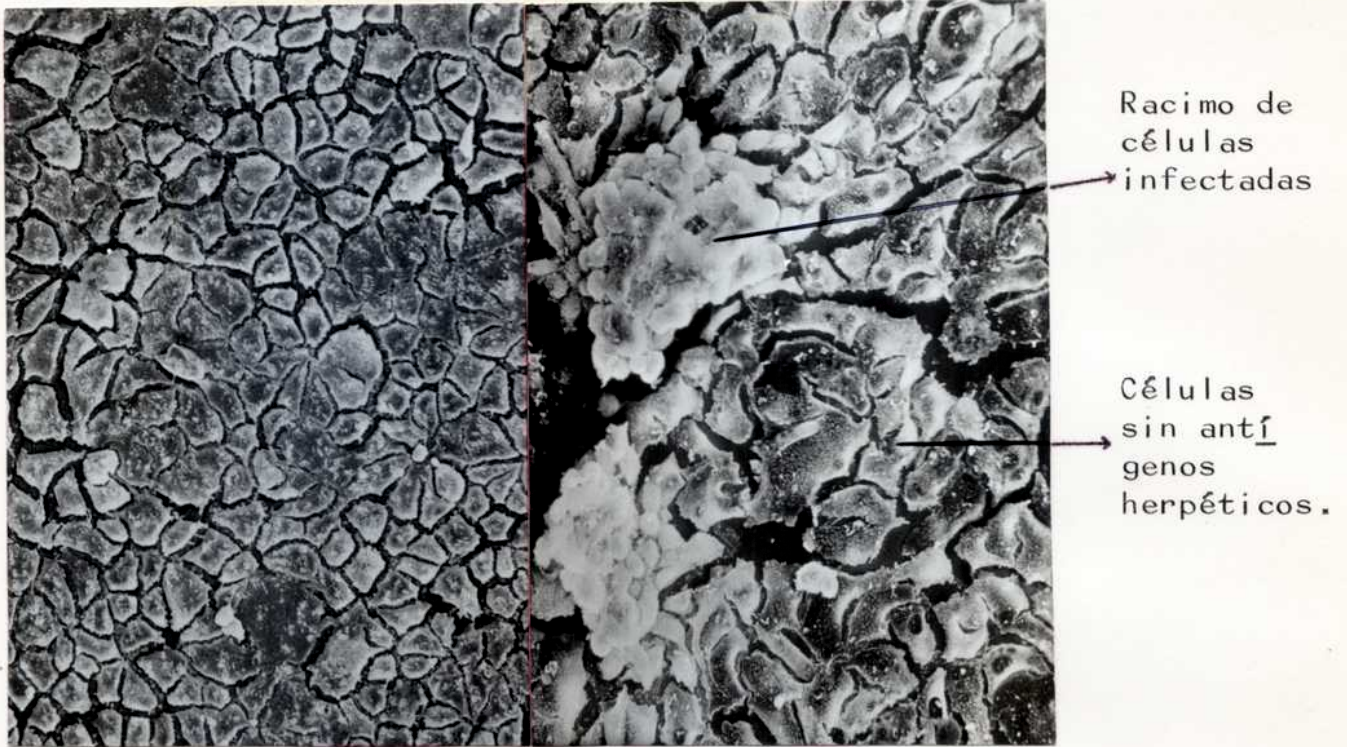


Fig. 8: Cel. RK  
( 300 X)

Fig. 9: Células RK  
infectadas con HSV-1  
( 300 X)

Las células RK-13 a mayor aumento se ven adheridas a la superficie del vidrio con prolongaciones que se proyectan del cuerpo central (microvellosidades) (Fig. 10 y 13). En estos cultivos control se observan algunas células redondeadas. Se ha sugerido que estas células están en una fase temprana de mitosis (21).

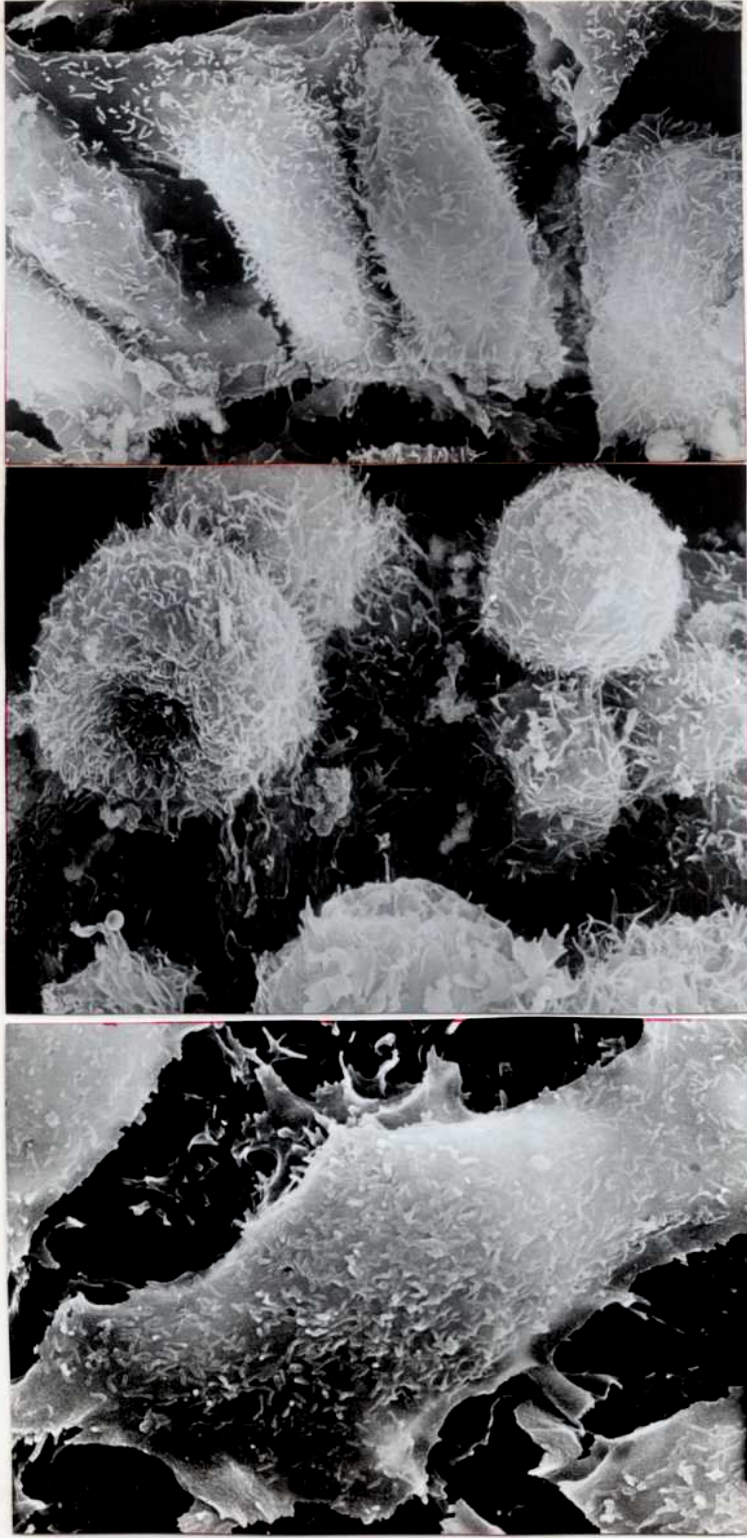


Fig. 10: Células RK  
( 5000 X)

Fig. 11: Fig. 12:  
Cultivo RK infectadas con HSV-1.

Fig. 11: Células en racimo (3000 X)

Fig. 12: Células alrededor de racimo (3000 X).



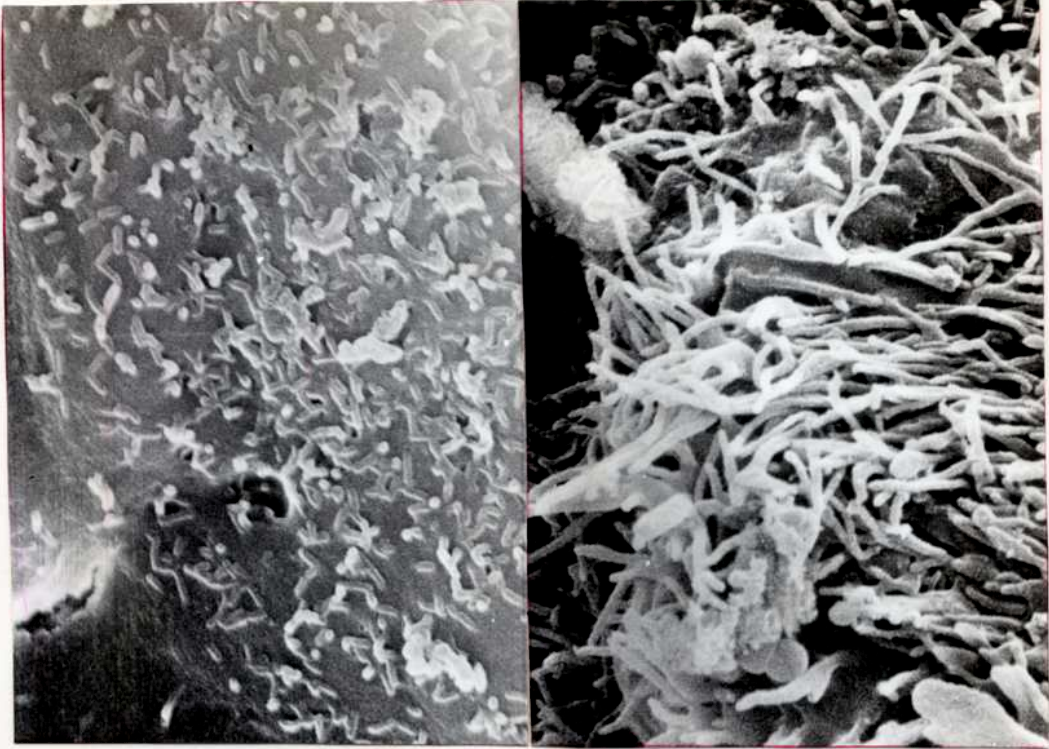


Fig. 13: Células RK  
( 10000 X)

Fig. 14: Célula RK in-  
fectada con HSV.  
( 10000 X)

Las figuras 11 y 14 muestran células RK infectadas con HSV-1. Estas células, que forman los racimos, se ven redondeadas con numerosas microvellosidades, más abundantes y largas que las observadas en las células control.

La figura 12 muestra células de un cultivo infectado con HSV-1 ubicadas alrededor de los racimos. Las microvellosidades son en número y largo intermedias entre los controles y las infectadas. Probablemente son células infectadas recientemente, donde HSV-1 comienza a replicarse.

## DISCUSION

Por medio de la técnica de inmunoperoxidasa se confirmó que las células redondeadas, ubicadas en racimos poseen antígenos herpéticos. Dichas células observadas con microscopía de scanning muestran microvellosidades en mayor número y más largas respecto de las células control. Resultados semejantes se han obtenido con células epiteliales cervicales infectadas con HSV-2 (18).

La observación de monocapas infectadas muestran que las células ubicadas alrededor del racimo, evidencian tempranamente cambios en la cantidad y tamaño de las microvellosidades, previo al redondeamiento celular. Por la técnica PAP se confirmó en estas células la presencia de Ag herpéticos. Por lo tanto la observación con SEM permite detectar cambios tempranos en las células infectadas con HSV-1 en el sistema estudiado.

Los datos obtenidos sugieren que en las células RK-13 durante las primeras etapas de infección, el HSV se disemina preferentemente célula a célula. En etapas tardías las partículas infecciosas del sobrenadante son capaces de iniciar nuevos focos, extendiendo el ECP a toda la monocapa.

## F- EFECTO ANTIMITOTICO DEL INTERFERON HUMANO DE LEUCOCITOS.

El interferon aparte de la actividad antiviral tiene una variedad de efectos biológicos sobre los organismos y sobre las células en cultivo.

Paucker y col fueron los primeros en relatar que el índice de crecimiento de célula L de ratón en suspensión disminuye en presencia de IF preparado sobre células L (20). Este efecto inhibitorio está estrechamente relacionado con la actividad IF de preparaciones crudas o purificadas.

Posteriormente se confirmó el efecto inhibitorio del IF sobre el crecimiento de otras células, normales o tumorales, de distinto origen, incluso humano (21, 22, 23). Hay poca información acerca del mecanismo por el cual las preparaciones de IF inhiben el crecimiento celular, excepto que quizá estaría relacionado con el control de la síntesis del ADN celular (23). El IF baja la tasa de multiplicación celular probablemente por aumento del tiempo de generación celular (24).

Se decidió testar el IF preparado a partir de leucocitos humanos en su capacidad de inhibir el crecimiento de células normales y tumorales in vitro.

### MATERIALES Y METODOS

Células : Las células humanas de carcinoma de laringe (Hep-2) y de amnios (RH) crecen en medio MEM (F-15, Gibco) de acuerdo a lo indicado en la parte B.

Interferón: Se utilizó Interferón humano de leucocitos (IF<sub>L</sub>) preparado según lo detallado en la parte A.



Ensayo de la actividad inhibitoria del crecimiento celular:

Placas plásticas de 24 excavaciones (Linbro) fueron sembradas con  $2.5 \times 10^4$  células /excavación en 0.5 ml de medio MEM adicionado de 5 ó 10% de SFB. Las células se hicieron crecer en presencia de 100 o 1000 U de IF<sub>L</sub> que se adicionó periódicamente al medio de cultivo. Al grupo control se le añadió igual volumen de solución fisiológica.

Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

El medio fue cambiado cada 48 horas.

Cada experiencia se realizó por triplicado. La viabilidad celular se controló por el test de exclusión al trypan-blue.

El crecimiento celular fue evaluado por medición del contenido proteico a los 2, 4 y 6 (ó 7) días, utilizando un método de Lowry modificado (25).

El porcentaje de inhibición de crecimiento se expresó de la siguiente forma:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{ug de prot. control} - \text{ug de prot. IF}_L}{\text{ug de prot IF}_L} \times 100$$

Para estudios morfológicos se agregó cubreobjetos de vidrio a las cubetas Linbro. Estos fueron fijados con metanol, teñidos con Hematoxilina-Eosina y observados al microscopio óptico común a los tiempos mencionados.

RESULTADOS:

El efecto de las distintas concentraciones de IF<sub>L</sub> sobre el crecimiento de dos líneas celulares, una de origen

tumoral (Hep-2) y otra no tumoral (RH) mantenidas en medio con 10% de SFB se observa en las figuras 15 y 16.

Fig. 15: Efecto del Interferón humano de leucocitos sobre el crecimiento de células humanas de carcinoma de laringe (Hep-2).

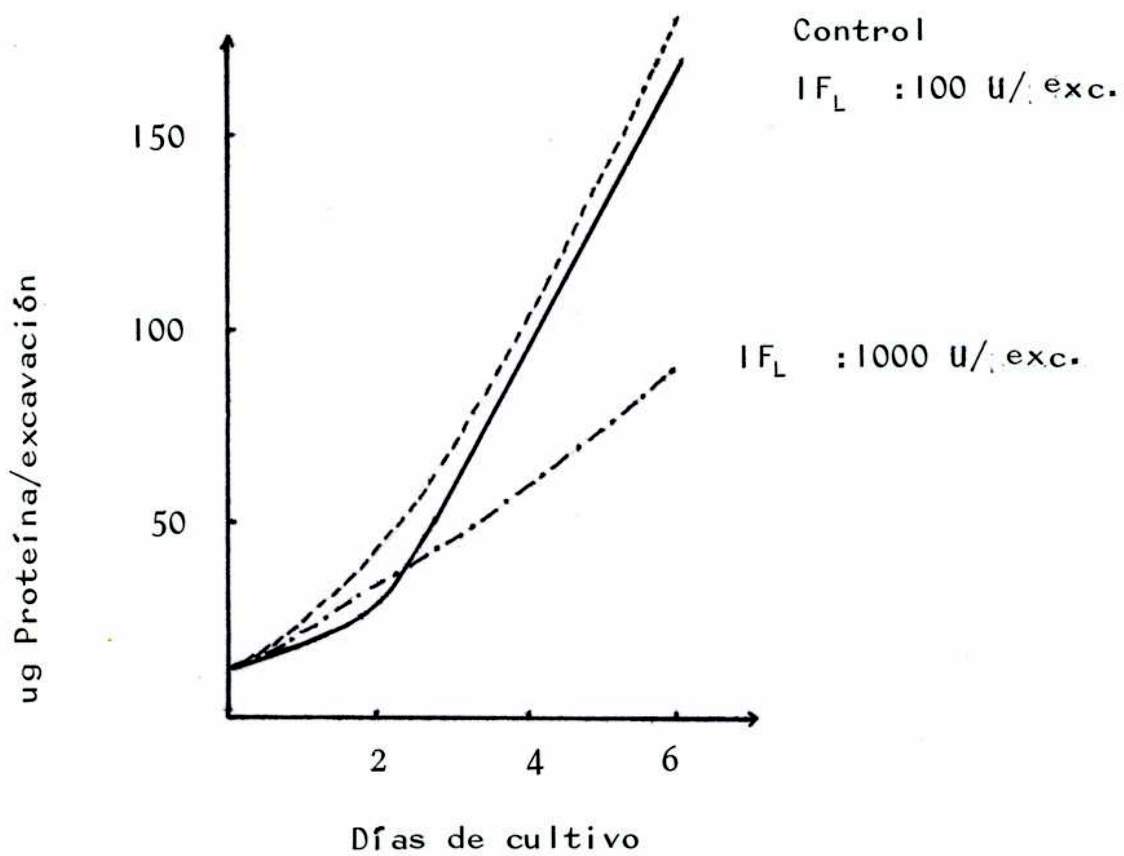
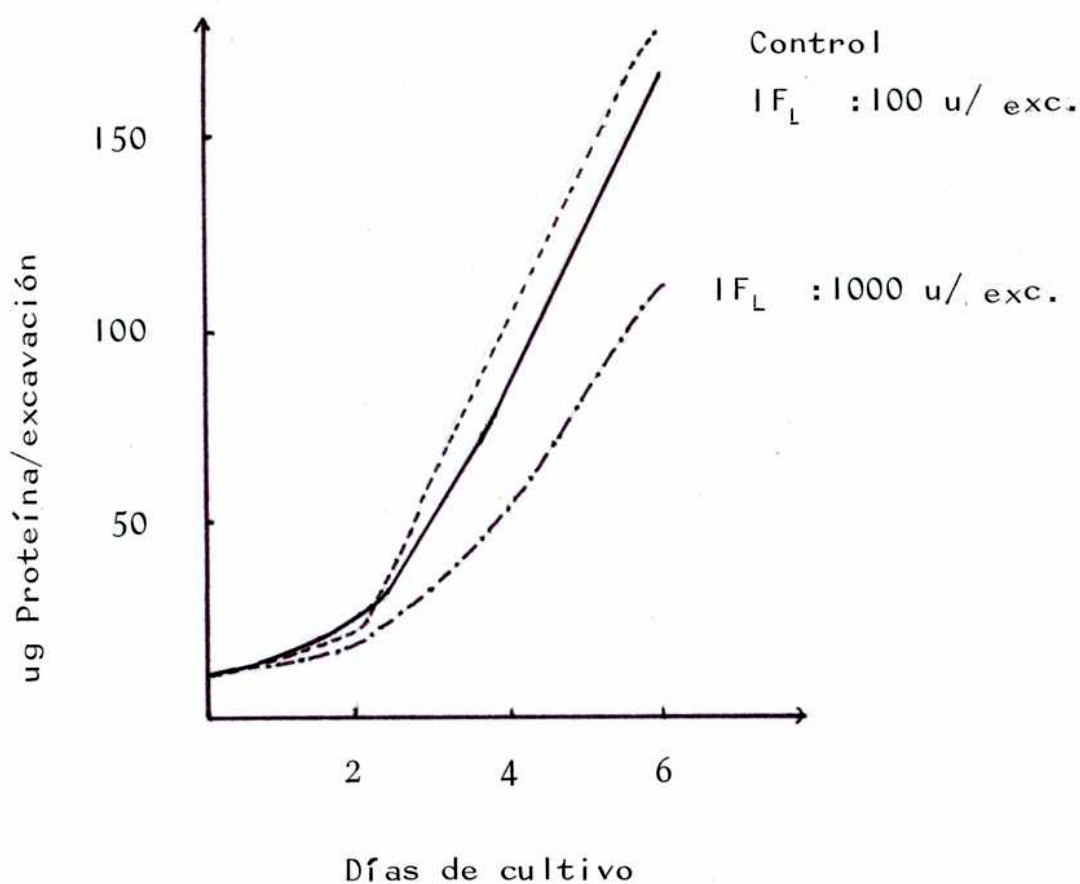


Fig. 16.- Efecto del Interferón humano de leucocitos sobre el crecimiento de células de amnios humano (AH).



Tanto las células Hep-2 como las AH tratadas con 1000 U de IF<sub>L</sub> por excavación mostraron inhibición del crecimiento. Este efecto comienza a evidenciarse a las 48-72 horas de cultivo y se hace marcado a los 6 días de tratamiento.

Los cultivos tratados con 100 U de IF<sub>L</sub> por excavación se comportaron de igual forma que el control.

La tabla 2 indica los porcentajes de inhibición de crecimiento de ambas líneas tratadas con 1000 U de IF<sub>L</sub>

respecto del control.

Tabla 2.- PORCENTAJES DE INHIBICION DE CRECIMIENTO  
DE CELULAS MANTENIDAS CON MEDIO + 10% SFB

	Días de Cultivo		
	2	4	6
Cel. Hep-2	5.9	39.3	49.2
Células RH	3.8	48.2	35.3

A los 6 días de tratamiento las células Hep-2 mostraron un mayor porcentaje de inhibición (49%) respecto de las células RH (35%).

Se usaron distintas concentraciones de suero para evaluar si este influye sobre el efecto antimítico del IF<sub>L</sub> en células Hep-2. En la tabla 3 se expresan los porcentajes de inhibición.

Tabla 3.- PORCENTAJE DE INHIBICION DE CRECIMIENTO  
DE CELULAS HEP-2 MANTENIDAS CON DISTINTAS  
CONCENTRACIONES DE SUERO.

	Días de Cultivo			
	2	4	6	7
Medio +5% SFB	0	25.6	NR	57.2
Medio + 10% SFB	5.9	39.3	49.2	NR

En las células Hep-2 se observó a los 4 días una mayor inhibición del crecimiento con 10% de SFB, pero a los 6-7 días de cultivos ambos grupos mostraron un comportamiento similar.

A los 6 días de cultivo se midió el índice de mitosis (células en mitosis/100 células) de la línea Hep-2. Se observó una fuerte inhibición en el grupo tratado con 1000 U de IF<sub>L</sub> /excavación (0.38) respecto del grupo control (3.69).

Aún con altas concentraciones de IF<sub>L</sub> ningún tipo celular mostró efecto tóxico ni citopático.

Las células Hep-2 y RH tratadas con IF<sub>L</sub> mostraron a los 6 días de cultivo variación en la morfología y tamaño celular.

Las células tumorales crecidas en presencia de IF<sub>L</sub>

mostraron formas ahusadas; con aumento del espacio intercelular, observándose pocas células de forma poliédrica normal.

En las células RH tratadas con IF<sub>L</sub> se observó un aumento del tamaño celular y nuclear y una mayor adhesividad celular al vidrio respecto de las células control.

### DISCUSION

El IF ejerce además de su actividad antiviral una serie de efectos biológicos como la inhibición del crecimiento celular.

El IF no es citotóxico.

La acción inhibitoria del IF es dependiente de la dosis (22). En las dos líneas testadas en este estudio 100 U de IF<sub>L</sub> fue insuficiente en reducir el crecimiento celular, mientras que con 1000 U se obtuvo una marcada inhibición a partir de las 48-72 horas de cultivo. Otros autores demostraron inhibición con dosis de IF muy bajas (30 U/ml) (26).

Las preparaciones de IF reducen el crecimiento de células normales y tumorales in vitro (20-23). Se han encontrado líneas resistentes al mismo (21).

Varios autores (22, 26) demostraron que el IF es más efectivo en inhibir el crecimiento de líneas tumorales que aquellas no tumorales. En este estudio se encontró a los 6 días de tratamiento una inhibición del crecimiento más marcado en las células de carcinoma Hep-2 que las RH de origen no tumoral.

Si las propiedades celulares de heteroploidía es un factor determinante en la sensibilidad a la inhibición del crecimiento aún no se sabe.

El efecto inhibitorio del crecimiento se observa manteniendo los cultivos en presencia constante de IF y se revierte si se lo elimina del medio.

Gresser y col (27) reportaron que el grado de inhibición de la multiplicación celular se incrementa cuando se trabaja con bajas concentraciones de suero, quizá por la presencia en el mismo de bloqueadores de la actividad de IF. Las células Hep-2 mantenidas en presencia de 5 ó 10% de SFB no mostraron diferencias en la cinética de división celular a los 6-7 días de tratamiento.

Los mecanismos de acción de IF no se conocen. Los datos obtenidos indican una disminución en la cantidad de células que se dividen. Las células tratadas llegan a una menor densidad de saturación respecto a los controles.

Además del efecto antimitótico se observó un efecto del IF<sub>L</sub> sobre la morfología y tamaño.

El hallazgo que el IF preparado a partir de leucocitos inhibe el crecimiento celular abre las puertas a su posible utilización como agente antimitótico in vivo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Falcoff, H.E., Falcoff, R., Fournier, F. Chany, C.  
Production en massé, purification partielle et caractérisation d'un interferon destiné a des essais thérapeutiques humains. Ann. Inst. Pasteur III. 562-584 (1966).
- 2) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurements with the Folin phenol reagents. J. Biol. Chem. 193: 265-275- (1951).
- 3) Gallagher, J.G., Khoobyarian, N. Sensitivity of adenovirus types 1, 3, 4, 5, 8, 11 and 18 to human interferon. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136: 920-924 (1971).
- 4) Youngner, J.S., Thacore, H.R., Kelly, M.E.:  
Sensitivity of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid virus to different species of interferon in cell cultures. J. Virol. 10: 171-178 (1972).
- 5) Glasgow, L.A., Hanshaw, J.B., Merigan, T.C. Petralli  
Interferon and cytomegalovirus in vivo e in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125: 843-849 (1967).
- 6) Ho, M., Enders, J.F. Further studies on an inhibitor of viral activity appearing in infected cells cultured and its role in chronic viral infections. Virology, 9: 446-447 (1959).
- 7) Weissenbacher, M. Chowchuech, E. Schumunis, G. Sawicki, L., Galin, M.A. Sensitivity of human conjunctival tissue cultures to adenovirus 8, herpes simplex and vaccinia viruses . Induction of resistance by an interferon inducer. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142: 997-1002 (1972).
- 8) Rasmussen, L., Farley, L. Inhibition of Herpesvirus homines replication by human interferon. Inf. and Imm. 12 (1): 104-108 (1975).



- 9) Neumann-Haefelin, D., Sundmacher, R., Sauter, B. Karges, H.E., Manthey, K.F.: Effect of Human Leukocyte Interferon on Vaccinia, and Herpesvirus- infected cell cultures and monkey corneas. *Inf. and Imm.* 12 (1): 148-155 (1975).
- 10) Joklic, W., Merigan, T.C.: Concerning the mechanism of action of IF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 56: 558-565 (1966).
- 11) Gallagher, J.C., Khoobyarian, N. Adenovirus susceptibility to human interferon during one-step replication. *Inf. and Imm.* 5(6): 905-908 (1972).
- 12) Santore, C.J., Langford, M.P., Baron, S. Effect of Interferon, elevated temperature and Cell type on replication of acute hemorrhagic conjunctivitis viruses. *Inf. and Imm.* 18 (2) 370-376 (1977).
- 13) Scheidegger, J.J. Une microméthode de l'immuno-electrophorèse. *Int. Arch. Allergy* 7: 103 (1955).
- 14) Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F. Immunochemical modulation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2: 235 (1965).
- 15) Roizman, B., Furlong, D. The replication of herpes viruses. In *Comprehensive Virology* Vol 3 p 229-403. H. Fraenkel-Conrat and RR Wagner (Ed) New York. Plenum Press (1974).
- 16) Ejercito, P.M., Kieff, E.D., Roizman, B. Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviors of infected cells. *J. of General Virol.* 2: 357-364 (1968).

- 17) Kamiya, T., Ben-Porat, T. Kaplan, A.S.  
Control of certain aspects of the infective cell process by viral DNA. *Virology* 26: 577-589 (1965).
- 18) Wilbanks, G.D., Campbell, J.A. Effect of herpes virus homines type 2 on the human cervical epithelium scanning electron microscopes observations. *Am. J. of Obstet. and Gynecol.* 112: 924-929 (1972).
- 19) Sternberger, L.A., Hardey, P.T., Cuculis, J.U. Meyer, H.G. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen antibody complex (horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* 18: 315-333 (1970).
- 20) Paucker, K., Cantell, K. Henle, W.: Quantitative studies on viral interference in suspended L cells. III. Effect of interfering viruses and interferon on the growth rate of cells. *Virol.* 17: 324-327 (1962).
- 21) Adams, A., Strander, H., Cantell, K. Sensitivity of the Epstein-Barr virus transformed human lymphoid cell lines to interferon. *J. of General Virol.* 28: 207-217 (1975).
- 22) Strander, H. Einhorn, S. Effect of human leukocyte interferon on the growth of human osteosarcoma cells in tissue culture. *Int. J. Cancer* 19: 468-473 (1977).
- 23) Lee S.H.S., O'Shaughnessy M.V., Rozee, K.R.  
Interferon induced growth Depression in Diploid and Heteroploid Human Cells. *PSE BM* 139:1438-1440 (1972).

- 24) - Collyn d'Hooghe, M., Brouty-Boyé, D., Malaise E.P. and Gresser, I.: Interferon and cell division XII. Prolongation by interferon of the intermitotic time of mouse mammary tumor cells in vitro. Microcinematographic analysis. Exp. Cell. Res. 105: 73-75 (1977).
- 25) - Oyama, V., Eagle, H. Measurement of cell growth in Tissue Culture with a Phenol reagent (Folin-Ciocalteu) Proc. Sci. Exp. Biol. Med. 91: 305-307 (1956).
- 26) - Glasgow, L.A., Crane, J.L., Kern, E.R. Antitumor activity of Interferon against Murine Osteogenic Sarcoma Cells in Vitro. J. Natl. Cancer Inst. 60 (3): 659-666 (1978).
- 27) - Gresser, I., Brouty-Boyé, D., Thomas, M., Macieira-Coelho, A. Interferon and cell division I. Inhibition of the multiplication of Mouse Leukemia L 1210 cells in vitro by IF preparations. PNAS (USA) 66 (4): 1052-1058 (1970).

PARTE V

ENSAYO CLINICO

## TRATAMIENTO DE LESIONES A HERPES SIMPLEX (HSV) FACIALES Y GENITALES.

Se estudió la efectividad de una crema conteniendo interferón humano de leucocitos (IF<sub>L</sub>) (3000 u/gr) adicionado de IgA-S (1.5 mg/gr) en 107 pacientes con lesiones herpéticas faciales y genitales. 26 pacientes se incluyeron en un estudio doble ciego.

Se observó una disminución significativa del dolor, tiempo de curación de vesículas o úlceras y curación total. El tiempo de curación de vesícula fue el mejor parámetro de evaluación.

27 pacientes tratados que recurrieron mostraron menor frecuencia de recurrencias y éstas fueron menos intensas y más cortas.

La crema no produjo efectos colaterales ni tóxicos. Esta terapia con dosis relativamente bajas de IF<sub>L</sub> ofrece un nuevo tratamiento para las lesiones mucocutáneas virales.

### MATERIALES Y METODOS

#### Pacientes

Fueron estudiados 107 pacientes que concurrieron al Instituto "Angel H. Roffo" con lesiones mucocutáneas a HSV (Tabla 1).

62 pacientes, entre 3 meses y 62 años padecían lesiones faciales. 45 pacientes, desde 17 hasta 72 años tenían herpes genitales. De estos últimos 35 fueron hombres y 10 mujeres.

12 pacientes tenían primoinfecciones.

TABLA 1.- LESIONES MUCOCUTANEAS A HSV

PACIENTES	LOCALIZACION	EDAD	LESIONES*	TIEMPO DE EVOLUCION PREVIO AL TRATAMIENTO.
62	Facial	3m-62a	E - V	0 - 30 d
45	Genital	17a-72a	E - U -V	1 - 30 d

\* Lesiones: E = eritema, V= vesícula, U= ulcera.

Las personas con brotes herpéticos concurren en diferentes estadios de su enfermedad.

Los pacientes fueron encuestados sobre su historia clínica, los episodios herpéticos previos y los factores subjetivos asociados con la aparición de la lesión. Además completaron una ficha en su casa, para registrar los cambios entre las visitas.

Los herpéticos fueron examinados día por medio y la evolución de la enfermedad fue seguida cuidadosamente. Algunos casos se registraron con fotografía color hasta la total curación de la lesión.

A las pacientes con infecciones bacterianas severas agregadas se les suministró antibióticos, además de la crema con IF<sub>L</sub>+IgA-S pero no se los incluyó en el presente estudio.

A las personas ya curadas se les solicitó regresar a la consulta al comienzo de su próximo episodio.

26 pacientes se incluyeron en un estudio doble ciego. Los parámetros considerados para incluirlos fueron:

- a) Tiempo de evolución de la lesión: entre 0 y 3 días.
- b) Tamaño de la lesión: de 1 a 1.5 cm<sup>2</sup>.
- c) Edad: entre 20 y 50 años.

Se aparearon ambas poblaciones: tratados y placebo del estudio doble ciego, para minimizar errores debidos a causas ajenas a la lesión. Ambos grupos tenían las mismas características.

### Lesiones

Casi todas las lesiones fueron leves y limitadas cuyos tamaños oscilaron entre 0.2 y 5 cm<sup>2</sup>. Se consideró una lesión pequeña aquella con una superficie entre 0 y 2 cm<sup>2</sup> y grandes las mayores de 2 cm<sup>2</sup>. La mayoría de las lesiones faciales estaban localizadas en labio superior o inferior. Además se trataron brotes en zona perioral, mejillas, párpados, mentón, nariz y fosas nasales. Al comienzo del tratamiento aquellas se encontraban en estadio de eritema o vesícula.

Respecto de las lesiones genitales los hombres tratados tenían vesículas o úlceras localizadas en pene, prepucio, pubis, nalga y perineo; y en el caso de las mujeres, en labios mayor y menor, pubis, vulva, nalga y perineo.

Se observó comunmente adenopatías locales acompañando los brotes de gran tamaño.

Las lesiones se clasificaron de acuerdo al tiempo de evolución, el estadio (eritema, vesícula o úlcera) y el tamaño. El tiempo de evolución se definió como el tiempo entre el primer signo de la lesión y el comienzo del tratamiento. La mayoría de los pacientes comenzó el tratamiento entre los días 0 a 5 después de iniciado el brote.

### Diagnóstico viral

Todas las lesiones fueron diagnosticadas clínicamente. Además se realizó la confirmación por aislamiento e identificación del virus en el 25% de las lesiones faciales y el 27% de las genitales.

Para el diagnóstico viral se extrajo material de las vesículas o úlceras y se conservó en medio F-15 (Gibco) adicionado de 10% de SFB y 50 ul/ml gentamicina. Las muestras fueron congeladas a -90°C.

Posteriormente estas muestras se inocularon sobre células de carcinoma de laringe humano (Hep-2) sensibles a la replicación viral. Los cultivos fueron observados por lo menos 7 días hasta la aparición del efecto citopático (CPE) característico de HSV.

Se obtuvo CPE más rápido en las muestras tomadas durante el estadio de vesícula. El porcentaje de las muestras con virus detectable disminuye si la toma fue hecha luego de 48-72 hr de comenzado el episodio. La identificación fue realizada por la técnica inmunoenzimática de peroxidasa (Cappel Lab. Inc. Cochranville PA. U.S.A. PAP-KIT) con inmunoglobulina anti-HSV de Lab Dako (Copenhagen-Denmark).

### Terapia

Se preparó una crema con un excipiente hidrosoluble conteniendo 3000 U/gr de IF<sub>L</sub> y 1.5 mgr/gr de IgA-S. La crema placebo contenía 0.1% de gentamicina en el mismo excipiente. Se eligió este antibiótico a causa de la frecuencia de contaminaciones bacterianas especialmente en las lesiones genitales.

Los pacientes se aplicaron la crema con IF<sub>L</sub> + IgA-S o placebo sobre la lesión, 4 veces por día hasta la curación total del episodio.



Para el estudio doble ciego las cremas se prepararon en recipientes iguales, fueron numeradas y entregadas al azar a aquellos pacientes seleccionados para integrar dicho estudio.

### Evaluación

Las lesiones tratadas o placebo fueron evaluadas considerando:

- 1) Alivio de la sintomatología subjetiva (dolor, ardor, picazón).
- 2) Curación de vesículas o úlceras. La etapa úlcera/vesícula fue considerada como una, ya que frecuentemente ambos tipos de lesión coexistían en un mismo brote. Además las lesiones genitales forman úlceras con asiduidad, mientras que en las faciales la aparición de vesículas es la regla general.
- 3) Curación total de la lesión, considerada como el tiempo hasta la caída de las costras.

En los pacientes que pudieron seguirse durante un año, se estudió la aparición de nuevos brotes, su frecuencia, intensidad y localización.

Cuando los datos suministrados por el paciente fueron insuficientes, se estimó el tiempo hasta la pérdida de dolor, pérdida de costra o tiempo hasta curación total como el punto medio del intervalo entre las visitas en las cuales se observó el cambio.

### Evaluación estadística

Los resultados se analizaron utilizando el test "t" de Student.

## RESULTADOS

Los resultados se muestran en las tablas 2 y 3. La tabla 2 resume los datos expresados en horas de los pacientes incluidos en el estudio doble ciego.

Tabla 2: ESTUDIO DOBLE CIEGO DE LESIONES A HSV MUCOCUTANEAS.

		IFL + IgA-S ( $\bar{x} \pm$ IDS)*	PLACEBO ( $\bar{x} \pm$ IDS)	TEST "t"
FACIAL (14 pac)	S**	33 $\pm$ 11.6	102 $\pm$ 42.8	p < 0.001
	V	57 $\pm$ 11.6	114 $\pm$ 39.3	p < 0.01
	C	93 $\pm$ 28	159 $\pm$ 64.5	p < 0.02
GENITAL (12 pac)	S	36 $\pm$ 12	105 $\pm$ 41.8	p < 0.02
	V	54 $\pm$ 26.1	153.6 $\pm$ 39	p < 0.01
	C	78 $\pm$ 54.7	180 $\pm$ 36	p < 0.01

\*  $\bar{x} \pm$  IDS está expresado en horas.

\*\* Las abreviaturas representan los tiempos hasta :

- alivio de la sintomatología: (S).
- desaparición de vesícula o úlcera: (V).
- curación total: (C).

En la tabla 3 se indica la evolución de 81 pacientes tratados con IF<sub>L</sub> + IgA-S. Estos pacientes muestran una respuesta similar a los tratados con la misma terapia del estudio doble ciego.

TABLA 3.- EVOLUCION DE LESIONES A HSV TRATADAS  
CON IF<sub>L</sub> + IgA-S.

	FACIAL* (48 pac.)	GENITAL (33 pac.)
S**	31.8 ± 11.9	32.6 ± 14.7
V	48.4 ± 18.9	53.5 ± 22.4
C	104.9 ± 48.7	95.1 ± 33.6

\* y \*\*. Ver tabla 2.-

Tanto las lesiones faciales como las genitales evolucionaron comparablemente a la terapia. Todos los pacientes tratados manifestaron una mejoría rápida de la sintomatología subjetiva dentro de las 30 horas de comenzado el tratamiento. Los datos respecto del placebo fueron altamente significativos ( $p < 0.001$ ) (Tabla 2).

El tiempo hasta la desaparición de las vesículas o úlceras es significativamente más corto en el grupo tratado respecto al placebo. Este parámetro resultó ser el mejor para evaluar la respuesta a la terapia. Aunque el tiempo de curación total, considerado como el tiempo hasta la caída de la(s) costra(s) disminuyó en los pacientes tratados, se observó una gran variación de acuerdo a la localización de la lesión y a otros factores individuales como la reepitelización.

Las fotos 1, 2 y 3 registran la evolución de una lesión facial en un niño de 4 años, que inició la terapia luego de 1 día de evolución.

La foto 1 fue tomada al inicio del tratamiento y presentaba numerosas vesículas con eritema y dolor en párpado izquierdo (superficie (S) = 0.5 cm<sup>2</sup>), mejilla izquierda (S = 4 cm<sup>2</sup>) mentón (S = 1 cm<sup>2</sup>).

A las 48 hs desapareció la sintomatología subjetiva y la lesión en el mentón curó.

A las 72 hs no se observaron vesículas; las costras comenzaron a aparecer a las 36 horas post-tratamiento. (Foto 2).

La foto 3 fue tomada a los 7 días cuando la lesión es taba totalmente curada.

Evolución de una lesión a HSV facial tratada con  
IFL+ IgA-S.



Foto 1: Lesión cutánea de un día de evolución  
sin tratamiento.



Foto 2: 72 hr. post-tratamiento.



Foto 3.- 7 días post-tratamiento: curación total.

No se pudo establecer una correlación entre el tiempo de curación de la lesión y el número de días de evolución de la enfermedad al comienzo del tratamiento. Tampoco se encontraron diferencias significativas respecto al tamaño de la lesión y los días hasta su cicatrización total.

Se observó que la iniciación temprana del tratamiento acorta la evolución del episodio.

Fueron tratados varios pacientes en el estadio prodrómico antes de la aparición de vesículas o úlceras. Se logró abortar muchos de estos episodios.

27 pacientes que recurrieron luego del primer episodio tratado pudieron seguirse durante un año. En la tabla 4 se observa que el 68.2% de estos pacientes tie-

No se pudo establecer una correlación entre el tiempo de curación de la lesión y el número de días de evolución de la enfermedad al comienzo del tratamiento. Tampoco se encontraron diferencias significativas respecto al tamaño de la lesión y los días hasta su cicatrización total.

Se observó que la iniciación temprana del tratamiento acorta la evolución del episodio.

Fueron tratados varios pacientes en el estadio prodromico antes de la aparición de vesículas o úlceras. Se logró abortar muchos de estos episodios.

27 pacientes que recurrieron luego del primer episodio tratado pudieron seguirse durante un año. En la tabla 4 se observa que el 68.2% de estos pacientes tienen una menor frecuencia de recurrencias respecto a su historia previa de episodios herpéticos.

Tabla 4: ESTUDIO DE LAS RECURRENCIAS DE PACIENTES TRATADOS CON IF<sub>L</sub> + IgA-S \*

Número de pacientes	Frecuencia ∠      ≧	Intensidad ∠      ≧	Tiempo hasta curación total. ∠      ≧	Localización Igual      Diferente
27	68.2      31.8	77      23	88      12	39.7      60.3

\* Los datos están expresados en porcentaje respecto del número total de pacientes tratados.

\*\* Este parámetro se compara respecto de la historia herpética previa del paciente.

∠ : Menor frecuencia.

≧ : Mayor o igual frecuencia.

\*\*\* Respecto del primer episodio tratado con IF<sub>L</sub> + IgA-S.



Cuando se comparan las lesiones recurrentes respecto a la primera tratada con IF<sub>L</sub>+ IgA-S, se observa que el 76.9 % de las lesiones fueron menos severas y el 88% curaron antes. El 60.3% de las lesiones tienen una localización diferente.

En la mayoría de los casos el factor desencadenante de la lesión fue exposición solar, menstruación, stress físico o emocional.

En ningún caso se presentaron manifestaciones de toxicidad ni efectos colaterales por el tratamiento.

## DISCUSION

A pesar que se han utilizado muchos tipos de terapias para las lesiones herpéticas, han sido realizados pocos ensayos controlados doble ciegos que demuestren su utilidad. Una de las mayores dificultades en demostrar la eficacia de un tratamiento en las lesiones herpéticas es su corta duración y la variabilidad de su evolución en distintos pacientes y aún en distintos episodios de una misma persona. En este estudio se presenta una nueva terapia combinada de IF<sub>L</sub> adicionada de IgA-S para el tratamiento de lesiones mucocutáneas herpéticas.

Se demostró la efectividad en 107 pacientes con herpes genital o facial. El estudio doble ciego demostró que esta terapia disminuye en forma significativa la sintomatología subjetiva y acorta el tiempo de evolución de la enfermedad.

A pesar que el tiempo hasta la desaparición de la vesícula o úlcera y el tiempo hasta curación total se acortan en los pacientes tratados, el primer criterio resultó ser el más confiable ya que la total reepitelización depende de una serie de factores individuales y de la localización de la lesión.

No se encontraron diferencias en la evolución de las lesiones grandes y pequeñas. Ambas curaron en forma significativamente menor respecto a los placebos. Spruance y col. (1) reportaron recientemente que el mejor parámetro para evaluar la respuesta a un tratamiento respecto de lesiones grandes y pequeñas es el tiempo hasta curación total. Estos autores observaron que en pacientes sin terapia el tiempo hasta la pérdida del dolor, costra y curación total son más largos en los pacientes con lesiones grandes,

mientras que el tiempo hasta la curación de las vesículas no difieren en ambos grupos.

La falta de correlación entre el tamaño de la lesión, y los días de evolución al comienzo del tratamiento respecto a los días de curación total indicarían una respuesta individual a la enfermedad mucocutánea herpética al IF<sub>L</sub> + IgA-S.

Pacientes tratados durante la fase prodrómica abortaron el episodio. A pesar que no se realizó un estudio comparativo con crema placebo para determinar el número de brotes que abortan espontáneamente, por los registros clínicos y el relato de los pacientes parece ser que el IF<sub>L</sub> + IgA-S aplicado durante la fase prodrómica previene el curso de la enfermedad herpética. La probabilidad según datos de Spruance y col. que un paciente tenga un falso prodromo es 1/10 (1).

A pesar que el tratamiento no impide nuevas recurrencias, aplicándolo en una fase inicial del episodio lo minimiza, ya que la aplicación continuada de la crema brinda la oportunidad a todas las células nuevas que se forman durante la reepitelización tomar contacto con el IF y quedar protegidas de un posible ataque viral. Por lo tanto es necesario iniciar la terapia lo antes posible tal que el tratamiento antiviral tenga la mayor oportunidad de ejercer su acción. La frecuencia de episodios en pacientes con HSV labial o genital disminuye luego de la aplicación sucesiva de la crema y en general el tamaño de la lesión es menor. Estos datos concuerdan con los de Ikic' y col (2). Se encontró además que en el 60% de los casos el brote tiene una localización diferente.

De la Peña y col. (3) en un trabajo previo en queratitis herpética inducida en conejos tratados con IF<sub>L</sub>

y/o IgA-S demostraron que a pesar que la inmunoglobulina sola no cura las úlceras, ejerce su acción aditiva al IF<sub>L</sub> contribuyendo a la disminución de la inflamación estromal (3).

In vitro se ha demostrado la acción antiviral del IF<sub>L</sub> y la actividad específica anti-herpética de la IgA-S (Parte IV).

Ikic' y col (2) emplearon una crema con IF en el tratamiento de las lesiones genitales y faciales a HSV. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por estos autores, especialmente por las bajas dosis de IF usadas.

Dianzani y col. (4) han demostrado recientemente, en un estudio in vitro que bastan bajos títulos de IF para gatillar el estado antiviral en células humanas. El IF<sub>L</sub>+ IgA-S usado tópicamente ha demostrado ser efectivo en queratitis herpéticas oculares humanas (5). Esta terapia tópica con bajas dosis de IF<sub>L</sub> ofrece una nueva arma en la lucha no sólo de infecciones herpéticas sino de otras enfermedades virales mucocutáneas.

Los resultados obtenidos ofrecen una terapia no tóxica que suma a las propiedades antivirales intracelulares del IF<sub>L</sub> las propiedades antiinflamatorias bactericidas y virustáticas de la IgA-S.

*J. E. P. de Castro*  
*W. Riccielli*

BIBLIOGRAFIA

- 1) Spruance, S.L.; Overall, J.C.; Kern, E.R.; Krueger, G.G.; Pliam, V.; Miller, W.: The natural history of recurrent Herpes simplex labiales. N. Eng. J. Med. 297: 69-75 (1977).
- 2) Ikić, D.; Smerdel, S.; Šooš, E.; Jusić, D.: Our experience with topical use of interferon in viral diseases. Proc. Symposium on preparation, standarization and clinical use of interferon. The Jugoslav Acad. of Sci and Arts. Zagreb 123-133 (1977).
- 3) Diaz, A.; de la Peña, N.C.; Bal, E.; Ejden, J.; Lustig, E.S.: Terapia combinada con inmunoglobulina A- Secretoria e interferon humano de la queratitis producida por virus Herpes simplex en el conejo. Medicina 38: 40-44 (1978).
- 4) Dianzani, F.; Levy, H.B.; Berg, S.; Baron, S.: Kinetics of the rapid action of interferon. P.S. E. B.M. 152: 593-597 (1976).
- 5) de la Peña, N.C.; Diaz, A.; Damel, A.; Bal, E.; Puricelli, L.; Ejden, J.; Lustig, E.S.: Combined therapy of human interferon (HI) and secretory immunoglobulin (S-IgA) in the treatment of human herpetic keratitis. Biomedicine, 28: 104-108 (1978).