

Tesis Doctoral

Polisacáridos y variantes del virus Herpes simplex como herramienta en el esclarecimiento de la patogenia viral

Mateu, Cecilia Gabriela

2011-12-16

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Mateu, Cecilia Gabriela. (2011-12-16). Polisacáridos y variantes del virus Herpes simplex como herramienta en el esclarecimiento de la patogenia viral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Mateu, Cecilia Gabriela. "Polisacáridos y variantes del virus Herpes simplex como herramienta en el esclarecimiento de la patogenia viral". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011-12-16.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Polisacáridos y variantes del virus Herpes Simplex como herramientas en el esclarecimiento de la patogenia viral

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Química Biológica

Lic. Cecilia Gabriela Mateu

Directora de Tesis: Dra. María Josefina Carlucci
Consejera de estudios: Prof. Dra. Elsa Beatriz Damonte

Lugar de trabajo: Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales, Departamento de Química Biológica, Laboratorio de Virología.

Buenos Aires, 2011

POLISACÁRIDOS Y VARIANTES DEL VIRUS HERPES SIMPLEX COMO HERRAMIENTAS EN EL ESCLARECIMIENTO DE LA PATOGENIA VIRAL

Los carragenanos (CGNs), galactanos sulfatados aislados de algas rojas, han sido identificados como potentes inhibidores del virus Herpes simplex tipo 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2) afectando principalmente la adsorción de HSV a la célula, etapa inicial del ciclo viral. Dado que presentan una similitud estructural con el heparan sulfato (HS), receptor celular que media la adsorción de HSV a la célula, actúan bloqueando la interacción virus-HS, en la que participan glicoproteínas de la envoltura viral. En estudios previos se seleccionaron y caracterizaron variantes virales sinciciales (syn) de HSV-1 (F) por pasajes sucesivos del virus en células Vero en presencia de un CGN natural 1C3 (de estructura relacionada con CGNs Iota (ι) y Kappa (κ)) con el fin de evaluar la capacidad de los CGNs de generar variantes virales resistentes durante el proceso de selección. En el presente trabajo se profundizó el estudio de la caracterización citopática y patogénica de las variantes 1C314-1 y 1C317-2. Las variantes mostraron un bajo nivel de resistencia a 1C3, heparina, aciclovir (ACV) y foscarnet (PFA). Las mismas resultaron avirulentas en ratones BALB/c infectados por vía intravaginal respecto de la cepa patrón que mostró alta mortalidad. La atenuación se correlacionó con bajos niveles de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6) en lavados vaginales, aunque el título viral fue similar al obtenido con la cepa patrón. Por vía intranasal las variantes mostraron una marcada virulencia en ratones BALB/c, conduciendo a una generalizada diseminación viral. En ratones C57BL/6 resultaron avirulentas empleando las mismas vías de infección. Para evaluar la capacidad de generar variantes atenuadas con otro serotipo de HSV empleando la misma estrategia usada con HSV-1, se realizaron pasajes seriados de HSV-2 cepa MS en células Vero en presencia de concentraciones crecientes de CGNs ι y κ . Se seleccionaron 4 clones, ι 22-9, ι 22-12, κ 22-12 y κ 22-13, los cuales mostraron tener fenotipo syn, leve resistencia a los CGNs y a la heparina, pero variable susceptibilidad al ACV y al PFA. Todos los clones fueron menos virulentos que la cepa patrón (100% mortalidad) particularmente para ratones C57BL/6 por inoculación intravaginal e intranasal. La atenuación de las variantes de HSV-2 se correlacionó con altos niveles de TNF- α e IL-6 en lavados vaginales, y la infectividad cuantificada en los mismos fue similar a la obtenida con la cepa parental. Las variantes mostraron una replicación similar a la cepa parental en células Vero. Sin embargo, en cultivos primarios de astrocitos murinos mostraron un menor rendimiento viral. Los estudios in vitro realizados, mostraron que los CGNs ι y κ estimulan la proliferación celular y la liberación de citoquinas en macrófagos murinos (RAW264.7). Sin embargo, inoculados en ratones BALB/c por vía intravenosa no lograron elevar los niveles de citoquinas séricas. El conjunto de estos resultados indica que el sistema inmune innato, especialmente en la regulación de los niveles de TNF- α e IL-6, juega un rol de importancia en la patología del virus herpes simplex y apunta a considerar la posibilidad que este tipo de variantes virales tanto de HSV-1 como de HSV-2 emerjan durante las terapias antivirales basadas en CGNs. **Palabras Claves:** Virus Herpes Simplex, Carragenanos, variantes virales, atenuación, sincicios.

POLYSACCHARIDES AND HERPES SIMPLEX VIRUS VARIANTS AS TOOLS FOR THE VIRAL PATHOGENY ELUCIDATION

Natural carrageenans (CGNs), extracted from red seaweeds, are well known as potent and selective inhibitors of Herpes Simplex virus type 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2). They have a chemical structure similar to heparan sulfate (HS) that serves as a primary receptor for adsorption. Their mode of antiviral action is by interference with HSV attachment to cells, blocking the interaction virus-HS, involving viral glycoprotein's. In a previous work, viral variants of HSV-1 were obtained by successive passages on Vero cells under selective pressure with the CGN 1C3, (partially cyclized μ/v -carrageenan, related to ι and κ CGNs) in order to test the ability of the carrageenan to generate resistant variants during the selection process. In the present work, a more detailed study of the cytopathic and pathogenic behavior of HSV-1 syncytial (syn) variants 1C314-1 and 1C317-2 was carried out. The variants showed low levels of resistance to 1C3, heparin, Aciclovir (ACV), and Foscarnet (PFA). They also showed to be avirulent for BALB/c mice infected by intravaginal route, although the parental strain F was highly lethal. The attenuation of the variants was correlated with lower levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) in vaginal lavages with respect to the parental strain, despite that viral titers were similar between the viral variants and the F strain. Nevertheless, the variants were highly lethal for BALB/c mice inoculated by the intranasal route, with a generalized organ spreading. To evaluate the capacity to generate attenuated variants using another HSV serotype employing the same strategy used before, 22 passages of HSV-2 (MS) were made on Vero cells with increasing amounts of κ or ι carrageenan. As a result of this, four clones were selected and named, ι 22-9, ι 22-12, κ 22-12 and κ 22-13. The clones showed a 100% syn phenotype, a mild resistance to CGNs and heparin and a variable susceptibility to ACV and PFA. All the clones were less virulent for mice intravaginal and intranasal inoculated, particularly for C57BL/6 strain, whereas MS strain produced 100% of mortality. In contrast to HSV-1 variants, the attenuation was correlated with high levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α y IL-6), on vaginal lavages. The variants of HSV-2 showed that although all of them grew equally on Vero cells, a partially restricted phenotype was observed when a primary culture of mouse astrocytes was employed. Finally, the CGNs were able to stimulate the proliferation of several cells lines and cytokines secretion in vitro but they did not showed this behavior on BALB/c mice inoculated by intravenous route.

Taking all these results together, we can conclude that the innate immune system, specially TNF- α and IL-6 expression, plays an important role in the pathology of herpes simplex virus, and the possibility that this kind of HSV-1 and HSV-2 variants could emerge during an antiviral therapy for humans based on CGNs, must be considered.

Keywords: Herpes Simplex Virus, Carrageenan, Viral Variants, attenuation, syncytium.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer especialmente a mi directora de tesis, la Dra. Josefina Carlucci, por permitirme vivir esta experiencia tan enriquecedora, por sus ideas innovadoras y sus ganas de explorar continuamente temas nuevos. Gracias a ello crecí y aprendí muchísimo a manejarme en la investigación científica y en la vida.

A la Dra. Elsa Damonte, por aceptarme en su laboratorio y aconsejarme en mi carrera de doctorado.

A Carlitos Pujol (Charly), por iniciarme en la virología, por estar siempre dispuesto a dar una mano, por su tiempo y dedicación, su amistad y cariño.

A Carolina Artuso (caro), por su compañía, su amistad y por transmitirme su buena onda y su energía cada día, por compartir conmigo largas charlas y experiencias de vida.

A Luis Scolaro (Luigi) por sus opiniones constructivas y por ayudarme con la escritura de los papers.

A las chicas del Lab. que me hicieron reír mucho y me acompañaron estos últimos años. Ana Clara, gracias por traer tu energía al Lab. y alegrarme los días, me gustó mucho compartir con vos esta experiencia y aprender un nuevo idioma!!!

A Juli, Aye, Belu por las tardes con café y galletitas, una buena idea para terminar los días...

Clau, Cybe, Erin, Andre, Fla por su buena onda, por ayudarme con las técnicas nuevas que no conocía, por las charlas de pasillo y por compartir los almuerzos todos los días.

A todos los miembros del Lab. que hacen posible el buen funcionamiento del laboratorio de Viro, especialmente Isa y guille.

A mi amor Lisandro que comparte cada día conmigo, gracias mi amor por bancarme en estos años y por escuchar todas mis anécdotas del Lab.

A mi Familia, especialmente a mi mamá por todo el esfuerzo que hizo para que yo pudiera estudiar y recibirme a término, gracias Ma, si no fuera por vos, no estaría acá en este momento.

Gracias a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA por su formación académica y por darme la posibilidad de insertarme en el campo de la investigación científica.

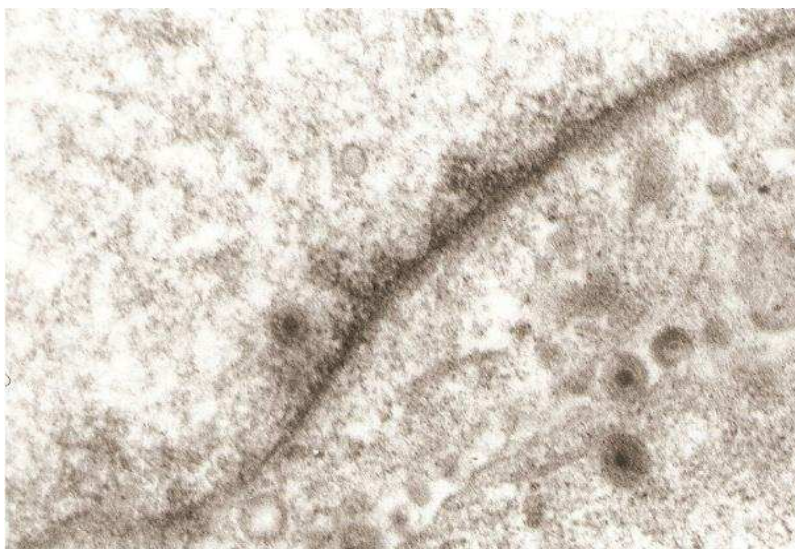
Los resultados de esta tesis fueron parcialmente publicados en los siguientes trabajos:

Cecilia G. Mateu, Mercedes Perez Recalde, María C. Artuso, Gladys Hermida, Florencia N. Linero, Luis A. Scolaro, Elsa B. Damonte, Carlos A. Pujol, María J. Carlucci. EMERGENCE OF HSV-1 SYNCYTIAL VARIANTS WITH ALTERED VIRULENCE FOR MICE AFTER SELECTION WITH A NATURAL CARRAGEENAN. Jun 2011. 38 (6):555-561, June 2011. Sexually Transmitted Diseases.

Cecilia G. Mateu, María C. Artuso, Florencia N. Linero, Luis A. Scolaro, Carlos A. Pujol, María J. Carlucci. SELECTION OF AVIRULENT HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2 VARIANTS BY SERIAL PASSAGES IN THE PRESENCE OF NATURAL CARRAGEENANS. Oct. 2011. Phytomedicine, Enviado.

El presente trabajo se realizó con la financiación proveniente de las siguientes instituciones:

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
- Agencia Nacional para la promoción Científica y tecnológica (ANPCyT)
- Universidad de Buenos Aires (UBA)



HSV-1 (F) en células Vero, 6h p.i.
Microscopía electrónica de transmisión. Facultad de Medicina, UBA. 2009. 75000X

Abreviaturas	9
Introducción	12
Familia Herpesviridae	12
Virus Herpes Simplex	13
1. Estructura Viral	13
2. Adsorción y Entrada Viral	15
3. Replicación Viral e Infección Primaria	18
4. Infección Latente	19
5. Reactivación	21
6. Patogenicidad	21
Respuesta Inmune	23
1. Inmunidad Innata	23
2. Inmunidad Adaptativa	25
Tratamiento para las Infecciones con HSV	25
1. Quimioterapia Antiherpética	26
2. Inconvenientes de la Terapia Antiviral y Antivirales Naturales	28
3. Polisacáridos Sulfatados	29
Aplicaciones Biotecnológicas del HSV	30
Antecedentes	32
Objetivos	35
Materiales y Métodos	
Compuestos	37
Células	37
1. Líneas Celulares	37
2. Células de Bazo	37
3. Astrocitos Murinos	38
4. Cultivos Primarios de Pulmón y Vagina	38
5. Macrófagos peritoneales	38
Virus	39
1. Cepas	39
2. Preparación de Suspensiones Virales	39
3. Ensayo de Plaqueo directo	39

4. Selección de Variantes	40
5. Clonado de las Variantes Virales	40
6. Efecto Citopático por Tinción con Giemsa	41
Ensayo de Citotoxicidad	41
Efecto sobre Células Confluentes	41
1. Recuento de Células Viables	41
2. Método de MTS	42
Efecto sobre la Proliferación Celular	42
Actividad Virucida	42
Actividad Antiviral	43
1. Reducción del Número de Placas Virales	43
2. Inhibición del Rendimiento Viral	43
3. Inhibición del Efecto Citopático	44
4. Acción Antiviral In Vivo	44
Curva de Crecimiento Viral	44
Efecto de la Ciclosporina A y Melitina	44
Virulencia de las Variantes	45
Infección Intravaginal	45
1. Cuantificación de Citoquinas	46
2. Método de Griess	46
Infección Intranasal	47
1. Diseminación Viral	47
2. Cortes Histológicos	48
3. Inmunohistoquímica	48
4. Efecto Inmunomodulador en Ratones	49
Resultados	
Capítulo 1: Caracterización de variantes de HSV-1 aisladas en presencia de 1C3	
Efecto citopático de variantes de 1C3 HSV-1 en cultivos primarios murinos	51
Replicación Viral en Macrófagos	53
Susceptibilidad de las variantes de HSV-1 a distintos compuestos	54
Estudio patogénico de las variantes virales de HSV-1	56
1. Modelo de Infección Intravaginal	56

	Índice
2. Modelo de infección Intranasal	57
3. Cuantificación de Citoquinas en Lavados Vaginales	58
Diseminación Viral	59
1. Estudios Histológicos	61
2. Inmunohistoquímica	61
Capítulo 2: Obtención y caracterización de Variantes de HSV-2	
1. Elección de los Carragenanos	63
2. Actividad Citotóxica, Antiviral y Virucida de los Carragenanos <i>in vitro</i>	63
3. Efecto Antiviral de los Carragenanos In Vivo	65
4. Selección y Clonado de variantes de HSV-2	66
5. Preselección de los Clones	69
6. Susceptibilidad de las variantes de HSV-2 a distintos compuestos	70
7. Replicación Viral en Células Vero	72
8. Efecto de Ciclosporina y Melitina	74
9. Replicación viral en Macrófagos	75
10. Estudios Patogénicos de las Variantes Virales de HSV-2	76
11. Cuantificación de Citoquinas en lavados Vaginales	80
12. Infección Mixta (HSV-1 + HSV-2)	82
Capítulo 3: Actividad Inmunomoduladora de los Carragenanos	
1. Ensayo de citotoxicidad	85
2. Ensayo de proliferación	87
3. Expresión de Citoquinas	89
4. Inmuno-estimulación In Vivo	91
Discusión	95
Bibliografía	103

Abreviaturas:

ACV: Aciclovir

ADCC: Citotóxicidad celular mediada por anticuerpo

ADN: Acido desoxirribonucleico

ARN: Acido ribonucleico

BVDU: Brivudin (antiviral)

C3b, C3c, C3d: Factores de Complemento

CC₅₀: Concentración Citotóxica 50%

CGNs: Carragenanos

CI₅₀: Concentración Inhibitoria 50%

CO₂: Dióxido de Carbono

Col: Colaboradores

CV₅₀: Concentración virucida 50%

DC: Célula Dendrítica

D.E: Desvío Estándar

DMEM: MEM modificado por Dubelcco

EBV: Virus Epstein Bar

FDA: Food and Drug Administration

g: Glicoproteína

GAGs: Glicosaminoglicanos

HCL: Ácido clorhídrico

HCMV: Citomegalovirus Humano

Hep: Heparina

HHV: Virus Herpes Humano

HIV: Virus de Inmunodeficiencia Humana

HLA-DM: Antígeno Leucocitario Humano, tipo de MHCII (α , β 1, β 3, β 4, β 5)

HLA-DR: Antígeno Leucocitario Humano, tipo de MHCII (α , β)

HS: Heparan sulfato

HSV-1/HSV-2: Virus Herpes Simplex tipo 1/ tipo 2

i.p: Intraperitoneal

i.n: Intranasal

i.v: Intravenoso

ι: Carragenano Iota

IL: Interleuquina

INF: Interferon

κ: Carragenano Kappa

LAT: ARN de Latencia de HSV

m.i.: Multiplicidad de Infección

ml: Mililitros

MEHV: Mediadores de Entrada del Virus Herpes

MEM: Medio Esencial Mínimo

MHCII: Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo 2

MM: Medio de Mantenimiento
MM+met: Medio de Mantenimiento + Metilcelulosa
MTS:[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio] + PMS (reactivo acoplante).
NFκB: Factor de Transcripción Kappa-B
NK: Natural Killer
NO: Oxido Nítrico
ORFs: Marcos Abiertos de Lectura
ORIs: Orígenes de Replicación
p.i.: Post infección
PBMC: Células Mononucleares de Sangre Periférica
PBS: Buffer Fosfato Salino
PFA: Foscarnet
pH: Potencial de Hidrógeno
Rpv: Receptor del Virus Polio
RR: Resistencia Relativa
RTNF: Receptor de TNF
SDRA: Síndrome de Dificultad Respiratoria
SFB: Suero Fetal Bovino
SNC: Sistema Nervioso Central
Syn: Sincicial
TGN: Red de Trans Golgi
Th: Linfocito T helper
TLR: Receptor tipo Toll
TNF: Factor de Necrosis Tumoral
UFP: Unidades Formadoras de Placas
USA: Estados Unidos
UV: Ultravioleta
VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
VZV: Virus Varicela Zoster
μg: Microgramo

Introducción

Familia Herpesviridae:

Los virus pertenecientes a la familia Herpesviridae, poseen un genoma de ADN lineal doble cadena y son envueltos. Se conocen 8 tipos de herpesvirus específicos humanos: virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) y tipo 2 (HSV-2), citomegalovirus (CMV), virus varicela-zoster (VZV), virus Epstein-Barr (EBV), virus herpes humano 6 (HHV-6), HHV-7 y HHV-8. Todos estos virus son ubicuos y producen una infección de por vida. Muchos herpesvirus son neurotrópicos (infectan activamente los tejidos nerviosos) y se los clasifica como Alfa herpesvirus. Se caracterizan por tener un amplio rango de huésped, ciclos reproductivos relativamente cortos (48h), rápida diseminación en cultivos celulares, destrucción eficiente de las células infectadas y capacidad de establecer infecciones latentes primarias en el sistema nervioso periférico, ganglio trigémino o sacro, según la vía de entrada. Ejemplo de ellos son HSV-1 y HSV-2, que causan lesiones herpéticas faciales y genitales recurrentes respectivamente, y VZV causante de la varicela.

Otros herpesvirus son linfotrópicos (replican en tejidos asociados al sistema linfático) y se los clasifica como Beta herpesvirus. En estos virus el ciclo reproductivo es largo y la infección progresa lentamente en cultivo de células. Una de las características de las células infectadas por estos virus, es su aumento de tamaño denominado citomegalia. El virus en estado latente puede permanecer en células de glándulas secretorias, células linforeticulares y tejido renal. Podemos citar como ejemplos al HCMV, HHV-6 y HHV-7.

Los Gamma herpesvirus replican *in vitro* en células linfoblastoideas, causando generalmente infecciones líticas en células epiteliales y fibroblásticas. Los virus de este grupo son específicos para linfocitos T o B. Pertenecen a este grupo el EBV y el HHV-8, entre otros (Fauquet y col., 2005).

- **Virus herpes simplex**

1. Estructura Viral

El virión consta de 4 estructuras, la interna llamada core, que contiene el genoma viral, ADN doble cadena lineal que posee 152.000 pares de bases de longitud y se convierte en circular al entrar a la célula, la cápside icosaédrica que rodea al core, el tegumento que contiene las proteínas que rodean la cápside y la envoltura viral con glicoproteínas. Estudios moleculares demostraron que el genoma viral codifica 90 transcritos que se traducen en 84 proteínas, 46 de ellas, son indispensables en la replicación viral en cultivos celulares, 12 proteínas están glicosiladas (glicoproteínas), (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM y gN, participan en la entrada viral y alguna de ellas, disparan una respuesta inmune de protección contra el virus. La cápside está formada por 5 proteínas, VP5, VP19C, VP23, VP24 y una proteína más pequeña denominada VP22 (Figura 1).

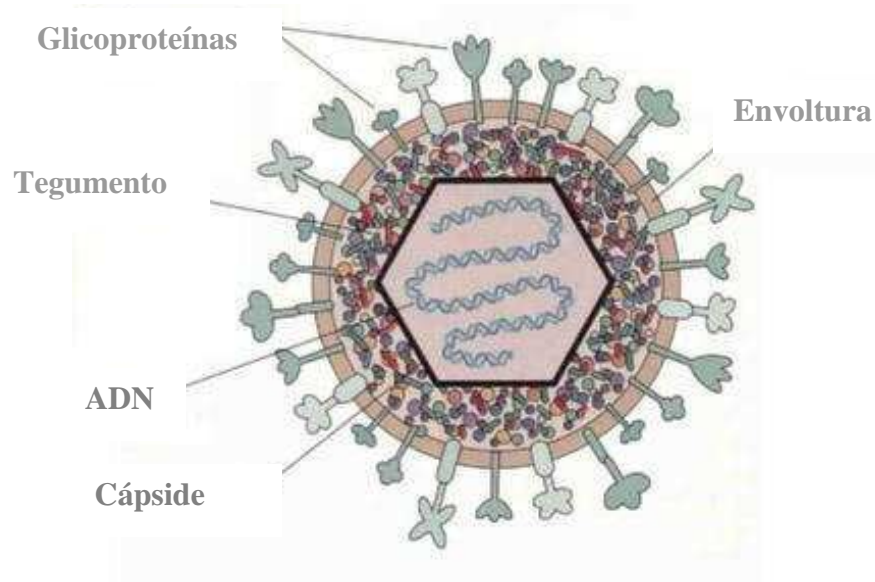


Figura 1: Partícula viral extracelular madura. Modelo de partícula viral de HSV, donde se observa las distintas estructuras virales, de adentro hacia afuera: genoma viral (ADN doble cadena lineal 152.000pb), cápside viral que rodea el ADN, tegumento, que contiene proteínas que rodean la cápside y la envoltura viral con las glicoproteínas virales (espículas).

El genoma puede dividirse en seis regiones, cada una con funciones específicas como se detalla a continuación (Figura 2).

- Los extremos del ADN contienen secuencias repetitivas y también la secuencia utilizada para el empaquetamiento del genoma en los viriones maduros.
- La región (R_L) (de 9.000 pares de bases), codifica para una proteína regulatoria inmediata-temprana ($\alpha 0$), para el promotor de la mayoría de los genes asociados al transcripto de latencia (LAT) que participa en la reactivación viral y para proteínas de reactivación.
- La región (U_L) (de 108.000 pares de bases), codifica para más de 56 proteínas diferentes. Contiene genes que codifican para enzimas de la replicación y proteínas de la cápside.
- La región (R_S) (de 6.600 pares de bases), codifica para una proteína inmediata-temprana ($\alpha 4$), que cumple las funciones de activador transcripcional y actúa en conjunto con ($\alpha 0$) y otras proteínas, estimulando las células infectadas para la expresión de todos los genes virales.
- Los orígenes de replicación (ori's), que en el caso de HSV existen tres regiones que pueden servir para ese fin.
- La región (U_S) (de 13.000 pares de bases), que codifica para 12 ORFs (Marcos abiertos de lectura). Muchos de ellos son glicoproteínas importantes en la determinación del rango de hospedador del virus y la respuesta inmune del hospedador. También codifica para dos proteínas que se expresan inmediatamente luego de la infección una de ellas participa en el bloqueo de la expresión de antígenos virales en la superficie de la célula infectada y la otra afecta la replicación del virus en ciertas células.

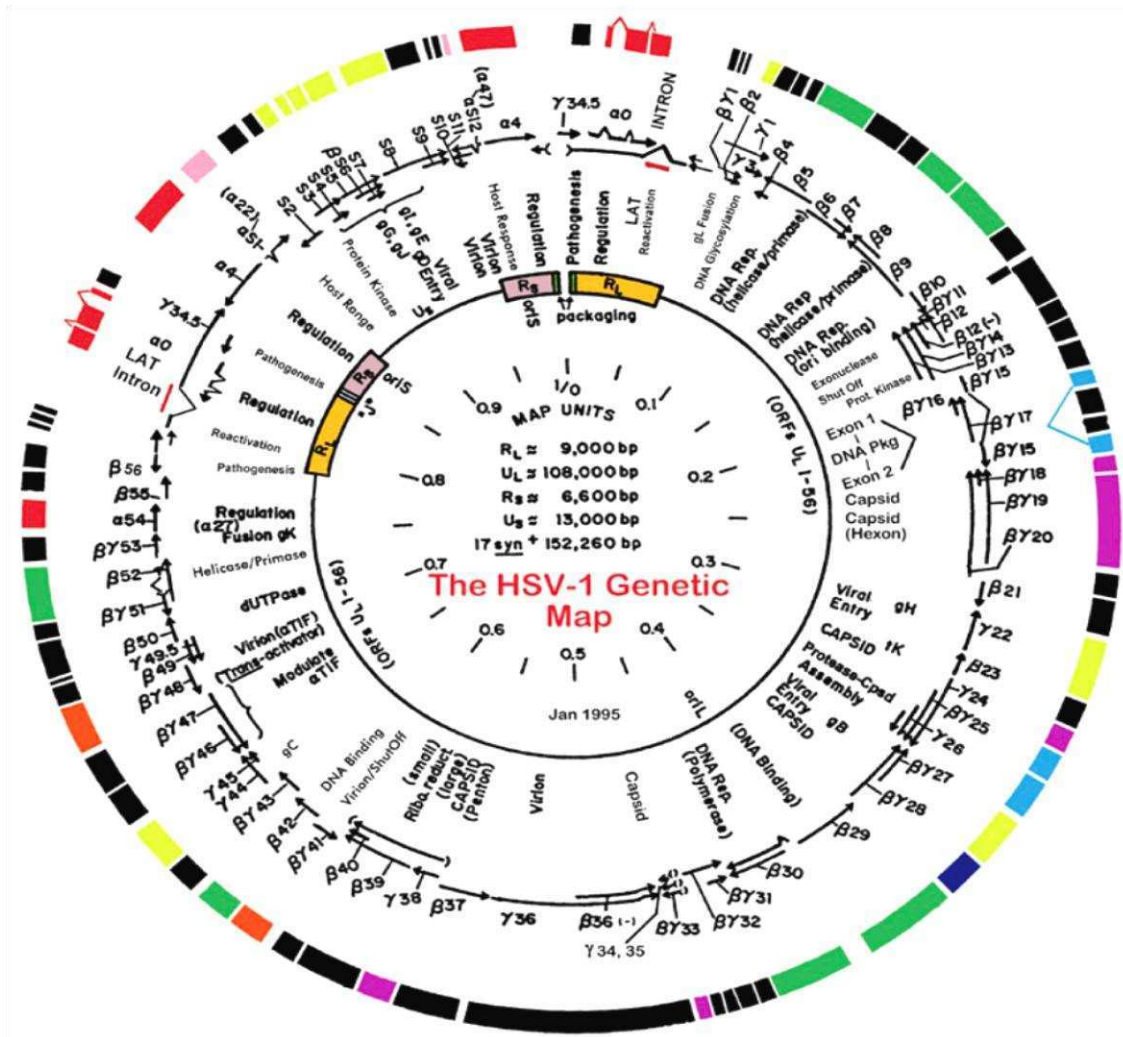


Figura 2: Mapa del genoma viral de HSV-1. El ADN viral de HSV contiene dos regiones únicas UI y Us, cada una de ellas flanqueada por repeticiones invertidas (TR_L/IR_L y TR_S/IR_S). Cada región codifica para distintas proteínas, estructurales y no estructurales (dbc.uci.edu).

2. Adsorción y Entrada viral

La adsorción del virus a la célula y su entrada requieren de la interacción secuencial entre los glicosaminoglicanos (GAGs), que son los receptores celulares y las glicoproteínas virales. Los GAGs más abundantes en la membrana celular son el heparan sulfato (HS), el condroitin sulfato y el dermatan sulfato. Distintos estudios han demostrado que la presencia de HS en la superficie celular es un requerimiento específico para la adsorción de HSV a la célula huésped. Por otro lado el condroitin sulfato no sustituye eficientemente al HS y finalmente el nivel de sulfatación del HS

juega un papel importante en la infección con HSV (Spear., 1993). Esto último se confirma con el hecho de que fracciones de heparina o cualquier polisacárido, inhiben la adsorción del virus a la célula más eficientemente al aumentar su grado de sulfatación (Lycke y col., 1991). Al menos dos glicoproteínas (g) virales tanto del HSV-1 como del HSV-2, la gC y gB, demostraron ser capaces de unirse a la heparina, polisacárido altamente relacionado al HS, (Gerber y col., 1995, Herold y col., 1991 y Tal-Singer y col., 1995). Se ha reportado que para HSV-1, gC-1 juega un rol importante en la adsorción de la cepa salvaje (Herold y col., 1991), mientras que gB-1 participa en la adsorción de variantes virales nulas en gC. Para HSV-2 en cambio, gC-2 no es una glicoproteína clave en la adsorción, siendo fundamental la gB-2 (Gerber y col., 1995; Cheshenko y col., 2002).

Existen distintos receptores que median la entrada de HSV a la célula, los conocidos hasta este momento pertenecen a tres familias diferentes (Tabla 1). Por un lado están las Nectinas, que son conocidas como moléculas de adhesión intracelulares. Son inmunoglobulinas dependientes de Ca^{+} , tipo Ig (Nectina 1 y Nectina 2). La Nectina 1 se encuentra en el sistema nervioso central (SNC), en ganglios y en epitelio de mucosas (Campadelli-Fiume y col., 2000; Spear y col., 2000) y es juega un rol importante en la infección de mucosa vaginal (Sven-Eriksen., 2005). La Nectina-2 es utilizada por algunas variantes de HSV-1 que poseen una mutación de un solo aminoácido en la gD, y que como consecuencia de ello no pueden unirse a los mediadores de entrada de herpesvirus (MEHV) (Connolly y col., 2003; Yoon y col., 2003). Estas mutaciones se denominan L25P, Q27P, Q27R o RID y ocurren en el extremo amino terminal de la gD viral. Por otro lado está la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (RTNF), que son moléculas relacionadas con la regulación de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Dentro de esta familia se encuentra el denominado mediador de entrada de herpes virus (MEHV) (Montgomery y col., 1996), que se encuentra generalmente en células del sistema inmune (linfocitos T, timo y bazo) y en tejido y órganos no hematopoyéticos como pulmón e hígado. Sirve como receptor para HSV-1 y HSV-2 y la afinidad de la unión es del mismo orden que la Nectina 1. Por último tenemos el HS modificado denominado HS 3-O-sulfatado. Esta sustitución no muy común es catalizada por la enzima glicosamino 3-O-sulfotransferasa. Este receptor es utilizado por HSV-1, no por HSV-2 ni por HSV-1 RID. Existen 6 isoformas identificadas hasta el momento. Su distribución es en cerebro, músculo esquelético y en distintos órganos y tejidos, aunque su relevancia como receptor es todavía incierta

(Shukla y col., 1999). Lo interesante es que HSV-1 utiliza al HS no solo para la adsorción sino también para la entrada en ciertas células. Dos parámetros son importantes a la hora de optar por un receptor, principalmente la afinidad en la unión y la densidad de receptores en la superficie celular (Krummenacher y col., 1998). Genes ortólogos a estos receptores se encuentran en otros mamíferos como ratones, hámsters, cobayos, vacas y monos, haciéndolos útiles como modelos animales de la enfermedad (Cocchi y col., 1998; Geraghty y col., 1998; Warner y col., 1998).

Nombre del Receptor	Nombre alternativo	HSV-1	HSV-2
HVEM	HveA	+	+
Nectina 1	Prr1, HI gR, HveC	+	+
Nectina 2	Prr2, HveB	-	+/-

Tabla 1: Receptores que median la entrada del virus Herpes simplex a la célula. Los virus HSV-1 y HSV-2 pueden unirse a distintos receptores según su afinidad, densidad y distribución.

El primer paso en la adsorción del virión a la célula es la interacción entre la gC y los proteoglicanos de la superficie celular, mediante las cadenas laterales de los GAGs. Luego, el virus interacciona mediante la gD con un segundo receptor de naturaleza proteica. Hay 3 clases de moléculas en la superficie celular que pueden actuar como receptores para gD: HVEM, también llamada HveA, un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF); Nectina 1, conocida como Prr1 o HveC, y Nectina 2 también llamada Prr2 o HveB, ambos miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas que están muy relacionadas con los receptores Pvr del virus polio. Esta unión dispara el evento de fusión de la membrana celular con la envoltura de HSV para permitir la entrada del virus a la célula. El virus puede entrar tanto por fusión de membranas como por endocitosis, dependiendo del tipo celular y de las características estructurales del receptor utilizado. En algunas células como las HeLa (células epiteliales de carcinoma cervical humano) y las CHO (células de ovario de hámster chino), la entrada viral puede ser inhibida por drogas que bajan el pH endosomal, indicando que en estas células la entrada viral es por la vía endocítica (Nicola y col., 2003).

Las glicoproteínas gB, gD, gH y gL están involucradas en realizar la fusión entre las membranas.

La entrada viral culmina con la liberación de la cápside junto con al menos 20 proteínas del tegumento al citoplasma. Luego la cápside junto con algunas proteínas del tegumento se translocan al núcleo donde el ADN viral es liberado unido a la proteína α TIF. La traslocación esta mediada por los microtubulos (Sodeik., 2000).

3. Replicación Viral e Infección Primaria

La expresión genética de HSV se manifiesta en modo de cascada coordinada y se pueden diferenciar tres grupos de genes: a) los inmediatos-tempranos que son factores de transcripción para los genes tempranos; b) los tempranos que participan en la replicación del genoma viral y c) los tardíos que codifican para proteínas estructurales.

La transcripción de los genes inmediatos-tempranos esta mediada por la proteína de tegumento α TIF que interactúa con proteínas de unión al ADN y es un potente activador de la transcripción. De esta forma, aunque la célula no se esté dividiendo, el virus puede estimular la expresión de sus propios genes. Los genes pertenecientes a este grupo son cinco y se los conoce como $\alpha 4$, $\alpha 0$, $\alpha 27$, $\alpha 22$ y $\alpha 47$. Cada una de las proteínas sintetizadas por estos genes tiene funciones diferentes, pero se caracterizan por hacer más eficientes los procesos de transcripción, el transporte de transcriptos virales para su procesamiento y la modulación de la respuesta inmune del hospedador.

La activación de la maquinaria de transcripción de la célula hospedadora, por la acción de los genes alfa, activa y da como resultado la expresión de los genes tempranos o beta, siete de ellos codifican para proteínas que participan en la replicación del genoma viral como la ADN polimerasa (UL30), proteínas de unión al ADN (UL42 y UL29), proteínas de unión al ori (UL9) y el complejo Helicasa-Primasa. Cuando los niveles de estas proteínas son elevados, comienza la replicación viral en forma de círculo rodante. Finalmente, luego de la replicación, se expresan los genes tardíos que codifican para proteínas estructurales que serán utilizadas en el ensamblado del virus, (α TIF, vhs que son incorporadas al tegumento) y genes de virulencia, necesarios para la replicación en tejido nervioso. Más de treinta proteínas son estructurales. En el núcleo, la cápside se ensambla alrededor del ADN y proteínas de andamiaje que permiten el proceso de encapsidación. La cápside madura, atraviesa la membrana nuclear que contiene las glicoproteínas virales, luego es rodeada por las proteínas del tegumento, incluyendo α TIF y vhs. Al salir de la célula por brotación, el virión obtiene su envoltura y puede

permanecer asociado a la superficie celular e infectar otras células mediante la fusión inducida por virus o salir de la célula en vesículas por exocitosis para la re-infección. Otro mecanismo de egreso es el de pasaje célula-célula, mediante el cual el virión se mueve cruzando el delgado espacio existente entre la célula infectada y la célula vecina no infectada. (Cocchi y col., 2000; Kusche y col., 2003).

Existe controversia entre el modelo de la envoltura única, que consiste en que el virus obtiene su envoltura final de la membrana celular y el modelo de la envoltura y desenvoltura, que sostiene que el virus toma su envoltura de la membrana interna nuclear y luego se fusiona con la membrana externa nuclear. Los viriones desnudos tomarían su envoltura final del aparato de Golgi (Figura 3).

4. Infección Latente

El HSV puede producir una infección latente invadiendo el axón de un nervio sensorial cercano al sitio de infección, pudiendo la partícula viral migrar al núcleo neuronal en el ganglio nervioso. Como HSV-1 afecta mayormente mucosas, labios y distintas áreas faciales, el ganglio invadido en este tipo de infección latente es el ganglio trigémino. En los casos de infección por HSV-2 que tiene como blanco principal la mucosa genital, el nervio invadido es el ciático.

El genoma viral permanece en forma circular como episoma en las neuronas en estado latente, del cual podrá reactivarse y producir virus infeccioso. La reactivación puede ocurrir por distintos factores tales como el estrés, radiación UV, depresión del sistema inmune, etc.

Hasta el presente se han reconocido tres etapas en el período de latencia. El primero es el de establecimiento de la latencia, que ocurre seguido a la infección primaria, donde se puede detectar pequeñas cantidades de virus infeccioso en algunas neuronas. En aquellas neuronas donde va a ocurrir la latencia, la infección productiva y la muerte celular son detenidas, estos mecanismos son todavía desconocidos. Luego sigue una etapa de mantenimiento de la latencia, donde el genoma viral parece estar silenciado y todos los genes líticos se encuentran reprimidos. Solo una región permanece activa, liberando los transcritos asociados a latencia denominados (LATs), del procesamiento de LAT se obtiene un intrón estable que se acumula en la célula. La última etapa es la

de reactivación, en donde el genoma parece responder a los estímulos antes mencionados despertando la expresión de todos los genes virales.

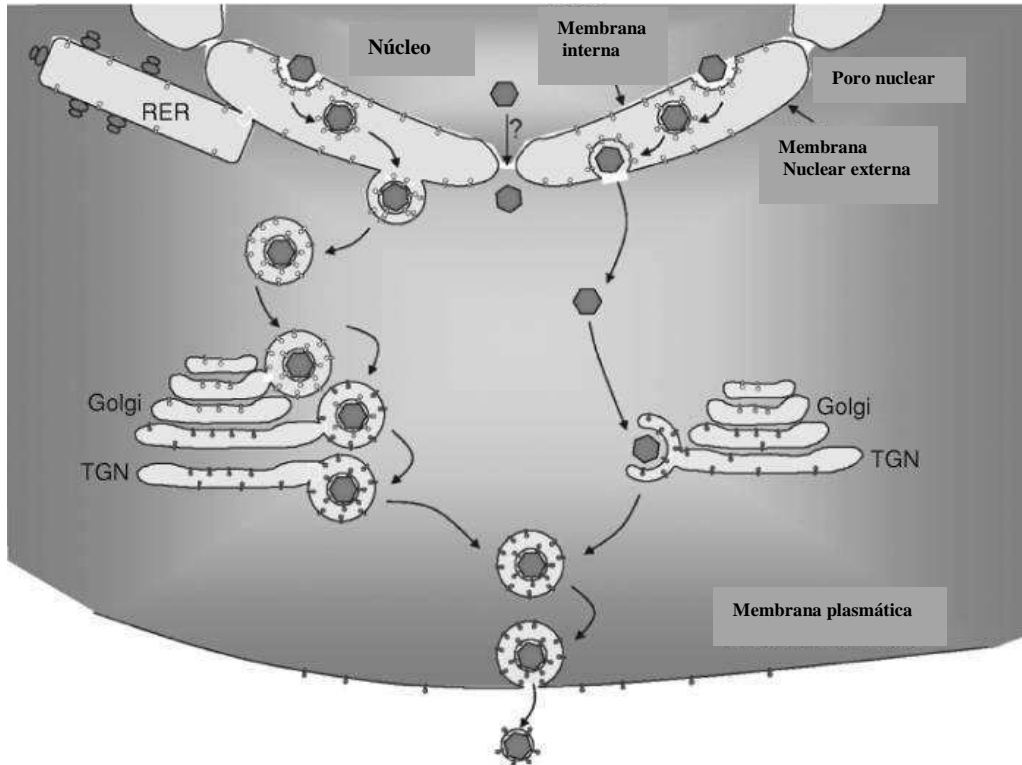


Figura 3: Esquema que muestra dos modelos alternativos de egreso de HSV. El patrón de envoltura simple está esquematizado a la izquierda, y el de la doble envoltura a la derecha, no se muestran en el esquema cambios estructurales el golgi ni en el TGN. En la imagen, los viriones perinucleares y las membranas nucleares tienen sus glicoproteínas de distinto color que los viriones que se encuentran a nivel del aparato de Golgi y el TGN, así como también los viriones extracelulares para enfatizar el nivel de madurez de las glicoproteínas virales, en compartimientos tempranos esta inmaduro y en los compartimientos tardíos alcanzan la madurez. Se muestra en el esquema la posibilidad de que las cápsidas salgan del nucleoplasma a través del poro nuclear, sin transitar por el lumen perinuclear. Cortesía de L. Menotti.

Estudios recientes lograron determinar que el transcripto asociado a latencia contiene dos marcos abiertos de lectura (ORFs), que codifican para dos proteínas de 30 y 15 Kd, respectivamente. Aunque no se conoce bien cuál es la función de estas proteínas se sospecha que podrían tener algún tipo de rol en la modulación de la latencia y en la reactivación viral (Thomas y col., 2002).

5. Reactivación

La reactivación o infección recurrente, puede ocurrir por distintos factores tales como el estrés, radiación UV, depresión del sistema inmune, etc. Cuando estos factores aparecen, unas pocas células pueden reanudar los procesos de expresión viral en respuesta a estos factores. En muchos casos la reactivación da lugar a una pobre producción viral que es neutralizada por el sistema inmune y se produce en consecuencia el retorno al estado de latencia. Si el sistema inmune está deprimido, la reactivación es más potente y se produce la infección de nuevas células de la mucosa (Figura 4).

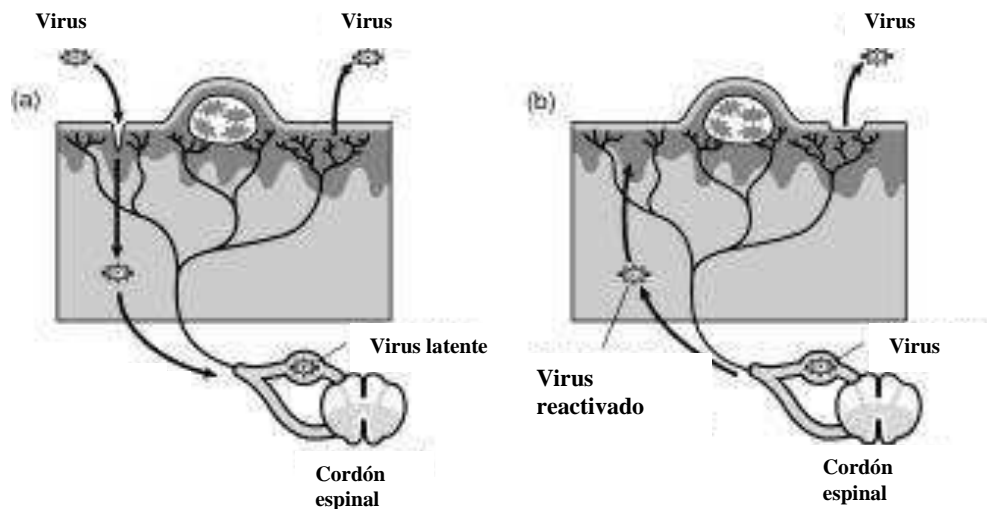


Figura 4: a) **modelo de infección primaria:** El virus toma contacto con alguna superficie mucosa o piel lastimada y comienza la infección y aparecen los primeros signos de enfermedad, vesículas, dolor irritación. Luego la cápside es transportada por las neuronas de forma retrograda al cordón espinal, donde luego de otro ciclo de replicación, se establece la latencia. b) **modelo de infección recurrente:** Una vez establecida la latencia, distintos estímulos pueden causar la reactivación, el virus viaja hacia la superficie mucocutánea y aparecen los primeros signos de enfermedad: las vesículas. Cortesía de David W. Kimberlin.

6. Patogenicidad

El HSV se trasmite solo por contacto directo con las mucosas o con alguna herida en la piel. HSV-1 está asociado a infecciones que involucran las superficies mucocutáneas, el sistema nervioso central y ocasionalmente órganos viscerales como el pulmón. Se adquiere con mayor frecuencia en la niñez, comúnmente causa lesiones, malestar

general, fiebre y ampollas en la cavidad bucal y se trasmite por contacto con la saliva infectada. El 90 % de la población adulta posee anticuerpos contra HSV-1. En 1949 se publicó que el HSV estaba asociado a enfermedades respiratorias (Morgan y col., 1949). Tiempo después se lo diagnosticó en pacientes con enfermedades pulmonares, con quemaduras graves, cáncer o que habían pasado por quimioterapias y rayos, así como también en pacientes que sufrían del síndrome de distres respiratorio agudo (SDRA) o cirugía general, (Shuller y col., 1994). Sin embargo aun en la actualidad la neumonía herpética resulta difícil de diagnosticar a causa de que la toma de muestra (biopsia) es invasiva, difícil de realizar y la sintomatología se confunde con la de otros virus respiratorios.

El HSV-2 está asociado a la infección genital y afecta tanto al hombre como a la mujer. Se trasmite sexualmente y en el parto puede transmitirse al neonato. Sin embargo, información reciente permitió identificar que un 33 % de las lesiones genitales correspondían a HSV-1, y un 10-20% de las lesiones oro labiales correspondían a HSV-2.

Además de las ulceraciones genitales u orales que causa el HSV, también puede producir complicaciones como meningoencefalitis (inflamación de las meninges) y afecciones oculares denominada queratitis herpética (conjuntiva y cornea). Aproximadamente el 75 % de la población infectada no tiene síntomas visibles lo que hace que la transmisión horizontal sea más frecuente.

La excreción viral asintomática se produce hasta 3 semanas después de la primo infección, donde el riesgo de contagio es alto.

Aproximadamente un 75 % de las infecciones neonatales se deben al HSV-2 y sólo un 25 % al HSV-1. La infección genital con herpes virus aumenta el riesgo de adquirir el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y la reactivación de HSV-2 en pacientes infectados con HIV es 2-3 veces mayor que en pacientes no infectados (Corey y col., 2004). Una de las características biológicas principales de la patogenicidad del HSV es su capacidad de invadir y replicar en el sistema nervioso central (SNC) y el hecho de establecer latencia en los ganglios dorsales (Roizman-Pellett., 2001). Esta característica es mantenida por distintas proteínas, de hecho, la ausencia de alguno de los genes esenciales para la replicación del virus en cultivos celulares, disminuye notablemente la capacidad de invadir y replicar en el SNC. Mutaciones relacionadas con esta capacidad han sido también mapeadas en los genes de las glicoproteínas.

La histopatología característica en una infección primaria por HSV, muestra muerte celular mediada por el virus y una respuesta inflamatoria asociada. La infección viral induce la condensación de la cromatina en el núcleo celular, seguida por una ruptura del núcleo. A veces se observan células multinucleadas a causa de las fusiones de las membranas plasmáticas entre las células vecinas. Con la lisis celular, se vuelcan fluidos que contienen grandes cantidades de partículas virales, estos fluidos se acumulan entre la epidermis y la dermis, formando las comunes vesículas. En la dermis ocurre una intensa respuesta inflamatoria, que suele ser más agresiva en las infecciones primarias que en las recurrentes. Cuando participan las membranas mucosas, las vesículas se reemplazan por úlceras poco profundas.

Respuesta Inmune asociada a la infección Herpética

1. Inmunidad Innata

La inmunidad innata ha demostrado ser muy importante tanto en la infección primaria con HSV como en la infección recurrente y su estudio es relevante para el desarrollo de vacunas terapéuticas o preventivas, la inducción de inmunopatologías herpéticas, como así también para el uso de vectores de HSV modificados genéticamente para terapias génicas o cáncer. Las células dendríticas son las intermediarias entre inmunidad innata y adquirida, así como el complemento (Mullick y col., 2003). La gC se une específicamente a algunos componentes del complemento de forma de escapar ó evadir su acción (Lubinski y col., 2002). Los neutrófilos no poseen un efecto típico antiviral, pero están asociados mayormente en la infección genital con HSV-2. Se los encuentra formando infiltrados en las lesiones pustulares genitales de humanos y ratones. Muchas células del sistema inmune responden a la infección herpética liberando Interferon 1 (INF) (alfa o beta), estas citoquinas poseen una efectiva actividad antiviral tanto en animales como en humanos, (Connell y col., 1985, Lebwohl y col., 1992). Distintos tipos de células mononucleares presentes en sangre periférica (PBMC) son capaces de ser estimuladas por el virus y generar una respuesta inmune, como los monocitos y las células dendríticas. La gD de HSV es uno de los factores que estimula la liberación de INF (Fitzgerald-Bocarsly y col., 1991; Ankel y col., 1998). En cuanto a los factores del huésped, están involucrados distintos receptores como los TLR (receptores tipo Toll). TLR2, participa en la detección de HSV-1 en un modelo murino (Wakimoto y col.,

2003, Finberg y col., 2003) y el TLR9 detecta HSV-2 en humanos y en ratones (Kadowaki y col., 2003, Boonstra y col., 2003).

Los monocitos y macrófagos, además de secretar INFs, secretan citoquinas inmunomoduladoras como el factor de necrosis tumoral TNF- α , esta citoquina posee una actividad antiherpética sinérgica con INF (Wong y col., 1986), regula positivamente la liberación de óxido nítrico (NO) y juega un rol de protección como también puede ser inmunopatológica (Kodukula y col., 1999; Keadle y col., 2000). La expresión de TNF- α por los macrófagos esta mediada por la activación de los factores transcripcionales NF κ B y ATF/jun, (Paludan y col., 2001). IL-12 es otra citoquina que juega un rol importante en la polarización de linfocitos T-helper (Th). El mensajero de IL-12 se encuentra aumentado en las lesiones genitales causadas por HSV-2 en humanos y luego de la infección murina con HSV-1 (Voorhis y col., 1996, Kanangat y col., 1996). Asimismo es detectada en los fluidos vesiculares en humanos infectados por HSV-1 y es utilizada como coadyuvante en vacunas contra HSV (Lee y col., 2003). IL-18 es una citoquina de la familia de IL-1, que posee una acción sinérgica con IL-12 en la inducción de la secreción de INF- γ en respuesta a HSV. Se ha demostrado que la administración de IL-18 exógena mejora la sobrevida en una infección aguda con HSV-1 y este efecto es dependiente del INF y no de las células natural killer (NK) (Fujioka y col., 1999). IL-15 e IL-2 son citoquinas que participan en la activación de las NK. IL-10 es una citoquina con importante actividad anti-inflamatoria, producida mayormente por monocitos que juega también un rol inmunomodulador.

En un modelo murino los macrófagos y las células dendríticas (DC), actúan como fuente de liberación de citoquinas luego de una infección herpética. Las citoquinas más prominentes son IL-1, IL-6 y TNF- α , pudiendo ser liberadas por células epiteliales infectadas (Tran y col., 1998; Kanangat y col., 1996). La activación de los macrófagos deriva en un aumento de la fagocitosis viral, la quimiotaxis, y la presentación de antígenos a las células T. Todos estos efectos ayudan como estrategia preventiva y/o terapéutica en la infección (Desai y col., 2007). Otros eventos tempranos incluyen la liberación de IL-12, el factor de angiogénesis VEGF y TNF- α . IL-6 puede estimular a los macrófagos in vitro para la liberación de VEGF, así como IL-1 estimula a monocitos en la liberación de TNF y demás citoquinas, (Neta y col., 1992). Tanto los linfocitos T CD8+ y los CD4+ contribuyen en la protección contra HSV, los CD4+ participan en la

activación de linfocitos B y linfocitos T CD8+ (Lu y col., 2000; Wong y col, 1986), secretan distintas moléculas como IFN- γ and TNF- α , y son citotóxicos (Yasukawa y col, 1984,1988). La respuesta CD4+ es dependiente de la cepa de ratón utilizada. En algunos ratones como los BALB/c, predomina la respuesta Th-2. Esta respuesta se caracteriza por ser una respuesta humoral, donde se liberan citoquinas tales como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que estimulan a los linfocitos B para la liberación de anticuerpos (Ac) anti-HSV. Para otras cepas de ratones como los C57BL/6, la respuesta predominante es la Th-1. La misma es una respuesta celular donde se liberan citoquinas como IL-12, INFs, IL-2, que activan a macrófagos, LT CD8+ (citotóxico) y células NK. Por otro lado la respuesta de T CD8+ está asociada al control de la replicación viral de HSV en los ganglios murinos y la latencia.

2. Inmunidad Adaptativa

La respuesta de Acs mediada por HSV, es muy importante en el contexto de una infección neonatal. Los Acs interactúan con neutrófilos, monocitos y NK en la activación de la citotoxicidad celular mediada por Ac (ADCC) (Kohl, 1991). También es importante la respuesta de Ac en tracto genital femenino en un modelo murino de infección vaginal, se encontró IgG local con actividad neutralizante pero no IgA (Bogges y col., 1997). HSV expresa en su envoltura gE y gI, que funcionan como un receptor que une la parte Fc del Ac, este complejo se expresa sobre la superficie de las células infectadas y se une a Ig humanas, lo que posibilita al virus a evadir el ataque de los AC in vivo (Nagashunmugam y col., 1998). Aunque los anticuerpos pueden mediar distintas funciones como inhibir la diseminación viral en neuronas (Mikloska y col., 1999) y prevenir la enfermedad cuando se los administra localmente luego de una infección intravaginal (Whaley y col., 1994), no se logró encontrar una vacuna efectiva que pueda generar títulos virales neutralizantes, como los que se observan en infecciones naturales, (Koelle y col., 2003).

Tratamientos para las infecciones con HSV

Las sustancias con actividad antiviral son aquellas sustancias que intervienen en el ciclo viral, ya sea interfiriendo en las etapas tempranas como ser la adsorción o la entrada del virus a la célula, como así también en las etapas de replicación del virus dentro de la

célula; impidiendo la formación de progenie viral o disminuyendo la carga viral en el huésped.

Existen también sustancias que actúan directamente sobre la partícula viral, antes de que el virus tome contacto con la célula huésped. Esta característica denominada actividad virucida, se encuentra generalmente presente en soluciones a base de formoles, fenoles, hipocloritos, etc. Un antiviral ideal es el que posee las siguientes características:

- Alta eficiencia a bajas dosis.
- Baja o nula toxicidad celular.
- Bajos efectos secundarios adversos.
- Bajos costos de producción.

1. Quimioterapia anti-Herpética

En el marco de los antivirales efectivos contra herpesvirus, existe una variedad de sustancias utilizadas en la actualidad, como el aciclovir y sus derivados: (valaciclovir, famciclovir y ganciclovir) y el foscarnet, con alta efectividad en reducir la duración de los episodios de reactivación y aumentar la cicatrización de las ampollas producidas durante el episodio.

El aciclovir (ACV) (9-(2-hidroxietoximetil) guanina) aprobado por la Food and Drug Administration (FDA), USA en 1997, es activo in vitro e in vivo contra los tipos 1 y 2 de HSV, y el VZV. Es un análogo de nucleósido que actúa interrumpiendo la duplicación del genoma viral. Su estructura de guanosina acíclico se activa por fosforilación y en su forma trifosfatada, se une a la polimerasa impidiendo que la misma continúe la replicación del genoma viral (Dorsky y col., 1987, Gnam y col., 1983).

En la fosforilación participan la timidina-quinasa viral y la celular. La enzima viral se encarga de la primer fosforilación y la enzima celular de las últimas dos fosforilaciones que dan lugar a la forma trifosfato activada del aciclovir. Por lo tanto es importante tener en cuenta su alta selectividad por las células infectadas ya que en ausencia de virus no se activa, minimizando los efectos secundarios. Al ser administrado en altas dosis, puede alterar la función renal.

El valaciclovir (9-(4acetoxi-3-acetoximetil-1-butil) guanina), *1997, es un 1-valil éster del ACV. Después de su administración oral es convertido rápida y extensamente en ACV a través de un metabolismo de primer paso. Es eficaz en infecciones por HSV y VZV. Posee los mismos efectos secundarios que el ACV. El ganciclovir, (9-[(1,3-dihidroxi-2-prproxi)-metil] guanina), *1989, es un análogo de nucleósido acíclico de la guanosina y es similar en estructura al ACV (Meyers y col., 1988). Es activo contra todos los herpesvirus humanos y es una de las pocas drogas antivirales que tienen actividad in vivo contra CMV (Biron y col., 1984). Además de producir insuficiencia renal, también puede provocar supresión medular (granulocitopenia) si es administrado en altas dosis. El famciclovir (diacetil-6-dioxi-penciclovir), *1997, es la forma administrable por vía oral de la droga penciclovir (9-(4-hidroxi-3-hidroximetil-1-butil), (1996) que es un antiviral derivado de guanosina similar a ACV, con actividad girostática frente a HSV (tipos 1 y 2) y VZV (1-3). Su uso está indicado para el tratamiento por vía tópica del herpes labial, en forma de crema al 1%. Los efectos adversos del famciclovir son náuseas, cefaleas y vómitos.

El foscarnet (fosfonoformato), *1991, es un análogo de pirofosfato. Actúa como un inhibidor potente de las polimerasas, afectando el sitio de transporte de pirofosfatos donde ocurre un intercambio de esta sustancia durante la duplicación del ADN. Aunque la polimerasa viral es más sensible al foscarnet, la polimerasa celular también puede afectarse, y ocasionar mayor toxicidad (disfunción renal) (Biron y col., 1984). La droga es usada en ocasiones para tratar infecciones muy graves por HSV y hepatitis B y D. También tiene un papel relevante en el tratamiento de las infecciones por HSV resistentes al ACV, así como infecciones por CMV refractarias a la terapia con ganciclovir, (Goldstein y col., 1988). Los efectos adversos además de la insuficiencia renal son hipocalcemia, náuseas y vómitos.

*Año de aprobación de la FDA.

Los distintos agentes antivirales actúan en distintas etapas del ciclo viral:

Ciclo viral

Agentes antivirales

Adsorción y/o entrada viral

. Polisacáridos sulfatados (Heparina/Dextrán sulfato) (HSV, CMV, Influenza A, VRS, etc.)

Replicación Viral

Inhibidor selectivo

. Aciclovir (HSV y VZV)

Inhibidor no selectivo

. Foscarnet (HSV,CMV y hepatitis B y C)

. Ganciclovir (HSV,CMV)

. Valciclovir (HSV, VZV)

. Fanciclovir (HSV, VZV)

2. Inconvenientes de la Terapia Antiviral y Antivirales Naturales:

Los agentes antivirales descriptos anteriormente son efectivos en la eliminación de la infección viral y se continúan utilizando en la actualidad. Sin embargo uno de los grandes inconvenientes de su utilización continua es la generación de resistencia viral, generando cepas resistentes que escapan de la acción de los mismos. Por ello surgió la necesidad de una búsqueda de nuevos antivirales que actúen en distintas etapas del ciclo viral, afectando aquellas cepas resistentes a las terapias tradicionales. Tal es el caso de los polisacáridos sulfatados, que afectan la adsorción o penetración de la partícula viral a la célula hospedadora. Distintos grupos de investigación demostraron que polisacáridos obtenidos de algas marinas poseen actividad antiviral contra HSV-1, HSV-2, virus vaccinia y VSV (Dieg y col., 1974; Richard y col., 1978) al igual que la heparina y otros polisacáridos que inhiben selectivamente la replicación del HIV-1 in vitro (Hayashi y col., 1996; Sekine y col.,1995; Witvrouw y col., 1994).

3. Polisacáridos sulfatados

Los polisacáridos sulfatados, además de poseer actividad inmunomoduladora, antitumoral e interferir con el sistema de coagulación y los procesos inflamatorios con mínimos efectos adversos, son altamente reconocidos por su amplia acción antiviral. Una fuente rica en polisacáridos son las algas marinas que abundan en la naturaleza y son de fácil recolección.

Desde 1988, el estudio de la actividad antiviral de los polisacáridos sulfatados ha demostrado un amplio espectro en la acción inhibitoria que ejercen en distintos tipos de virus como HSV, CMV, virus influenza A, virus respiratorio sincicial, virus encefalomiocarditis, virus vaccinia, virus de la hepatitis A, etc. (Gonzales y col., 1987, Nakashima y col., 1987), así como también en cepas mutantes resistentes en infecciones con HIV-1 (Esté y col., 1996) siendo de sumo interés en el tratamiento de infecciones oportunistas en los pacientes inmunosuprimidos. La estructura de los polisacáridos está altamente relacionada con la actividad antiviral siendo importante el peso molecular, el grado de sulfatación y la distribución de los grupos sulfato en la molécula (Neyts y col., 1995). Por su estructura similar al HS, compiten con el virus en la unión de las glicoproteínas virales al HS, principal receptor celular, inhibiendo la adsorción del virus a la célula huésped (Damonte y col., 1994, Neyts y col., 1995). La mayor parte de ellos no presentan actividad virucida, aunque se han reportado casos donde la misma juega un papel importante en la inhibición viral (Ghosh y col., 2009). Los carragenanos (CGN), galactanos sulfatados extraídos de algas rojas, han sido estudiados y utilizados como microbicidas y se ha probado su eficacia en prevenir la infección vaginal por HSV-2, la transformación celular por el virus papiloma, bloquear el HIV, siendo altamente seguro para la administración intravaginal en humanos, (Fernandez-Romero y col., 2007).

En trabajos previos, se ha estudiado el rol de distintos polisacáridos sulfatados sobre la actividad de macrófagos murinos *in vitro* (Schepetkin-Quinn., 2006, Abdala-Diaz y col., 2010), donde se observó una inducción de la acumulación de ciertas citoquinas (IL-6 y TNF- α), así como la producción de ON utilizando distintas concentraciones de polisacáridos. Tampoco se observó citotoxicidad en concentraciones elevadas de los mismos.

Por otro lado se ha estudiado el efecto de protección *in vivo* de los CGNs iota (ι) y 1C3 sobre la infección con distintos herpesvirus, (Hamashuna y col., 1993, Pujol y col.,

2005). Se evaluó la capacidad de protección de los CGNs utilizando distintas vías de inoculación y se observó para τ que el pre-tratamiento protege al ratón de la infección letal con CMV cuando es administrado por la misma vía de infección, en este caso intraperitoneal (i.p). Esta protección podría estar mediada por un aumento en los neutrófilos, inducido por el CGN (Hamashuna y col., 1993). Para 1C3, el efecto protector fue alto (80% sobrevivida) cuando fue administrado inmediatamente después de la infección con HSV por la misma vía de inoculación viral (i.p), mientras que cuando se lo administró por una vía diferente, intravenosa (i.v), se logró un 40% de sobrevivida. Este efecto podría deberse a la acción directa del CGN como antiviral sobre el virus.

Aplicaciones biotecnológicas de HSV

El gran conocimiento de la secuencia genómica de HSV y el progreso en las técnicas moleculares, ha llevado al desarrollo de HSV como vector, con distintas y potenciales aplicaciones en la salud humana (Glorioso y col., 1995, Lachmann y col., 2004). Estas aplicaciones abarcan desde la expresión y transporte de genes humanos en células del sistema nervioso, destrucción selectiva de células cancerosas, inmunoterapias y profilaxis contra tumores, hasta terapias profilácticas contra infecciones con HSV y otros agentes infecciosos, (Marconi y col., 2007).

Los vectores denominados Amplicones son partículas idénticas a las partículas salvajes de HSV-1 en cuanto a estructura, rango de huésped y respuesta inmunológica, pero lleva consigo en lugar de genoma viral, un plásmido con múltiples repeticiones en tándem de secuencias de DNA denominado plásmido amplicon. Estos vectores poseen grandes ventajas en el transporte dirigido de genes, como ser una gran capacidad de carga (150kb), capacidad de introducir múltiples copias del transgen en cuestión por célula infectada, capacidad de infectar una gran variedad de células, incluyendo células dendríticas, facilidad de construcción del vector y baja toxicidad, debido a la falta de secuencias del genoma viral (Marconi y col., 2007). Sin embargo para poder empaquetar estos vectores es necesario un sistema de virus auxiliar (Helper) que contenga las enzimas y secuencias necesarias para replicar y amplificar las partículas con el vector como genoma (Halterman y col., 2006). Muchas veces estos virus auxiliares contaminan las suspensiones de amplicon. En la actualidad se siguen desarrollando sistemas de virus auxiliares para minimizar los efectos adversos ocasionados en el pasado, como ser: inflamación y muerte celular, reversión del virus

auxiliar a virus infectivo salvaje, interacción con distintos virus y posible recombinación, etc. Para ello se trata de encontrar variantes de HSV defectivas, atenuadas y con distintas mutaciones para ser usadas como virus auxiliar con mínimos efectos adversos (Frenkel y col., 2006). HSV-2 también ha sido utilizado en distintas terapias. Se ha encontrado una variante defectiva en su replicación (HSV-2 dl5-29) que logra inmunizar y proteger ratones contra la infección con HSV-2, así como también reducir la replicación de HSV-1 en cornea, protegiendo al ratón y disminuyendo la latencia (Jones y col., 2000, Van Lint y col., 2007). El uso de vectores en terapias oncolíticas ha sido altamente desarrollado y en la actualidad existen varios ensayos clínicos con variantes de HSV-1 que poseen replicación selectiva. Uno de ellos, el HSV1617, ha sido probado en pacientes con glioma y melanoma. En ambos casos se pudo observar una replicación específica en células tumorales y una respuesta inmune elevada que ayudaría a erradicar las células cancerosas, aunque todavía no se entiende bien el mecanismo implicado en dicho efecto (Harrow y col., 2004, Mackie y col., 2001).

Resumiendo, los distintos tipos de variantes, recombinantes y amplicones de HSV son ampliamente utilizados como agentes terapéuticos, vectores, vacunas y contra el cáncer. Aunque todavía quedan muchas incógnitas por resolver, es importante resaltar la importancia que poseen los estudios de obtención y caracterización de variantes virales atenuadas para continuar con el desarrollo de terapias medicinales utilizando al HSV.

Antecedentes

En nuestro laboratorio se trabaja desde hace más de una década con polímeros sulfatados de origen natural. Carragenanos de diversos tipos estructurales aislados del alga roja *Gigartina skottsbergii* fueron identificados como potentes y selectivos inhibidores de HSV-1 y HSV-2. En los últimos años, se ha demostrado la eficacia de los polisacáridos como microbicidas de uso tópico para la prevención de enfermedades de transmisión sexual, siendo evaluados actualmente en tratamientos clínicos (www.microbicide.org). El estudio del mecanismo de acción de los carragenanos sobre la replicación de HSV demuestra que afectan principalmente la adsorción, etapa inicial del ciclo viral, donde participan glicoproteínas de envoltura (Carlucci y col., 1999a; Carlucci y col., 1999b). Por otro lado se sabe que el uso frecuente de antivirales genera resistencia, lo cual fue confirmado in vitro con HSV-1 y concentraciones crecientes del carragenano μ/v 1C3 (Carlucci y col., 2002), logrando la obtención de variantes con diferentes características citopáticas, diferente resistencia a la droga y virulencia.

Las variantes estudiadas 1C3 syn13-8 y 1C3 syn14-1 mostraron variabilidad en la acción citopática dependiente del tipo celular ensayado, generando redondeamiento similar a la cepa patrón ó sincicios. Pero no mostraron cambios de patogenicidad in vivo inoculadas por las vías intracerebral e intraperitoneal. (Carlucci y col., 2002). Cepas de características similares de HSV-2 fueron aisladas con los mismos procedimientos en Mount Sinai School of Medicine, New York, NY con el polímero sulfatado PRO2000 (Carlucci y col., resultados no publicados). Esto nos permite suponer que esta clase de compuestos utilizados en forma reiterada podrían modificar el comportamiento viral y patogénico, si se utilizaran rutas naturales de infección, como son las vías mucosas intravaginal e intranasal, donde el virus necesita emplear su mecanismo de entrada natural.

HSV ha desarrollado múltiples habilidades estratégicas de defensa por estar equipado óptimamente para la evasión inmune y para responder a los ataques del huésped durante la infección y la reactivación.

Algunos determinantes para la evasión inmune están en las glicoproteínas (g) de superficie de HSV-1, expresándose sobre la envoltura viral y en las superficies de las células infectadas. Así la gB interacciona con los polipéptidos HLA-DR y HLA-DM reduciendo la expresión de la cadena invariante e interrumpiendo la presentación del antígeno MHCII (Neumann y col., 2003); gC interviene evadiendo la neutralización

mediada por complemento, específicamente gC se une a C3 y productos de activación, C3b, iC3c y C3c, bloqueando la interacción de C5 y properdina con C3b (Friedman y col., 2000,); gD induce la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) y su protección contra la apoptosis en la fase temprana de la infección asegurándose una suficiente replicación viral (Novak y col., 2005). Por lo tanto, alteraciones en estas glicoproteínas provocadas por las interacciones sucesivas de polisacáridos endógenos solubles ó exógenos (ej. microbicidas), podrían modificar su normal comportamiento dando infecciones asintomáticas ó subclínicas. Como en toda infección viral, es importante la respuesta del sistema inmune en virtud a que induce la producción de factores antivirales (tales como IFNs), los cuales previenen la replicación y consecuentemente la diseminación viral. También juegan un rol importante las citoquinas inflamatorias (como IL-6 y TNF- α), las cuales reclutan y activan células efectoras aunque a veces pueden empeorar la afección y frecuentemente son responsables de los síntomas que se manifiestan durante la enfermedad (fiebre, mialgias, dolor relacionado con inflamación local). Como ocurre con la sepsis bacteriana, la respuesta inflamatoria por citoquinas puede, en algunos casos, conducir a la morbilidad o mortalidad, por ejemplo en el caso de la encefalitis herpética, como consecuencia de la activación del TLR-2 resultando en inflamación cerebral y muerte (Kurt-Jones y col., 2004).

Asimismo nuestro laboratorio demostró la actividad inhibitoria de 1C3 contra HSV-1 in vivo, utilizando dos vías diferentes, intraperitoneal e intravenosa, registrándose 87,5% y 40,0% de sobrevida respectivamente (Pujol y col., 2006). En este caso, no fue evaluado si la protección observada se debió a la inactivación del virus por el carragenano, a la activación inmunológica de polisacárido generando una respuesta contra el virus ó a ambos efectos combinados (Leung y col., 2006).

Objetivos

Objetivo General

Obtención y caracterización de variantes virales atenuadas del virus Herpes simplex generadas bajo presión de selección con un carragenano, como alternativa para uso profiláctico y/o terapéutico.

Objetivos específicos

- 1- Obtener variantes del virus herpes simplex mediante sucesivos pasajes en cultivos celulares, bajo presión de selección con distintos carragenanos.
- 2- Caracterizar las variantes según sus características biológicas in vitro y su patogenicidad en mucosas empleando un modelo murino.
- 3- Analizar comparativamente las variantes obtenidas con el fin de definir la eficiencia de la estrategia de atenuación viral.
- 4- Determinar la acción inmunomoduladora de los carragenanos utilizados en la obtención de las variantes.

Materiales y Métodos

Compuestos

Los CGNs τ y κ , Heparina, Brivudin (BVDU), Aciclovir (ACV) y Foscarnet (PFA) provienen de Sigma- Aldrich, USA.

Células

1. Líneas celulares

Las células Vero (riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*), se cultivaron en medio mínimo esencial Eagle (MEM) (GIBCO, USA) suplementado con 5% suero de ternera inactivado (GIBCO, USA) y 50 μ g/ml de gentamicina (Sigma, Aldrich, USA). Para el medio de mantenimiento (MM), la concentración de suero fue disminuida a 1,5%.

La línea celular de macrófagos murinos, RAW 264.7 (ATCC, TIB-71), se cultivó en medio mínimo esencial Eagle Dulbecco's, (DMEM, con glucosa, piruvato y glutamina (GIBCO, USA) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), (Natocor, Argentina), 10% HEPES (GIBCO, USA) y 10% Mezcla de antibióticos (penicilina-estreptomocina, GIBCO, USA). Para el medio de mantenimiento (MM), la concentración de SFB fue disminuida al 5%.

2. Células de Bazo

Se extrajo en esterilidad el bazo de un ratón BALB/c y se colocó en una placa de Petri conteniendo PBS suplementado con 10 % SFB. Se lo perfundió varias veces con 2 ml de medio RPMI 10 % SFB. Luego, se disgregó totalmente el órgano por métodos mecánicos manteniendo la esterilidad. Se centrifugó la suspensión celular 10 min a 1000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió durante 4 min el precipitado en 2 ml de buffer de lisis de eritrocitos (Tris HCL 0,17 M, Cloruro de amonio 0,16 M, pH 7,1). Se centrifugó nuevamente, descartándose el sobrenadante y lavando dos veces más con 1 ml de medio RPMI 10 % SF. La última resuspensión se realizó en 1 ml de RPMI

5 % y procedió al recuento de células viables por el método de exclusión con azul Tripan empleando cámara Neubauer.

Cálculos: N° de Cel. Viables/ml: promedio de Cel. Viables en 1 cuadrante x 10^4 /ml x 1/dilución.

% de Cel. Viables: N° de Cel. Viables / (N° de Cel. Viables + N° de muertas) x 100%

3. Astrocitos murinos

Cultivos primarios de astrocitos se obtuvieron de cerebro de ratón CF1 de 1-3 días de vida. Para ello los ratones fueron decapitados y sus cabezas lavadas con alcohol étílico 96°. Se les abrió el cráneo y su cerebro fue retirado suavemente y lavado con PBS. Los cerebros se cortaron finamente con tijeras de cirugía y las células se disgregaron con tripsina durante 15 minutos 37°C. Las células se centrifugaron a 1000 rpm y se suspendieron en medio de crecimiento. Luego se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/ml y se incubaron por 5 días a 37°C, los cultivos se sub-cultivaron y se dejaron crecer entre 3 a 4 días antes de la infección.

4. Cultivos primarios de pulmón y vagina

Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad. Los mismos fueron sacrificados empleando Xilacina 91mg/ml- Ketamina 9mg/ml (0,3 ml en 200 gr) por vía intramuscular. Se desinfectó el tórax y el abdomen del ratón con Etanol 70%, se cortó la piel separándola de la pared muscular y posteriormente se cortó la pared muscular y el peritoneo procediéndose a retirar cuidadosamente los pulmones y la vagina. Una vez obtenido los órganos, se los cortó en trozos pequeños y se los lavó con PBS c/ suero, se hicieron 2 digestiones de 20 minutos con tripsina a 37°C en agitación. Se tomó el sobrenadante y se inactivó la digestión con SFB, luego se centrifugó la suspensión a 2500 rpm, se resuspendió en medio MEM 10% SFB y se sembró en botella T25.

5. Macrófagos peritoneales

Se emplearon ratones BALB/c de 8-10 semanas de vida. Los animales recibieron una inyección intraperitoneal de 2 ml de caldo tioglicolato estéril. Cinco días después se

sacrificaron por anestesia, se inyectaron en la cavidad peritoneal 3 ml de medio de cultivo con heparina 5 UI/ml y luego se aspiró el líquido inyectado, obteniéndose una suspensión de macrófagos para ser cultivados in vitro.

Se colocaron 1×10^6 células por pocillo en microplacas de 24 pocillos y se dejaron 24 h para adherencia. Luego, se realizaron 2 lavados con PBS para retirar aquellas células no adherentes.

Virus

1. Cepas

Se utilizaron las cepas HSV-1 (F) y HSV-2 (MS) obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC), se usaron como cepas de referencia. Las variantes de HSV-1 (F), 1C314-1 y 1C317-2, fueron obtenidas previamente por pasajes sucesivos del virus con concentraciones crecientes de 1C3 (Carlucci y col., 2002).

2. Preparaciones de las suspensiones virales

Las suspensiones virales de HSV-1 (F) y HSV-2 (MS) y de las variantes se prepararon, amplificaron y titularon sobre células Vero por plaqueo directo. Para la infección de las células Vero se empleó una multiplicidad de infección (m.i.) que osciló entre 1 y 0,01 UFP/célula. Se dejó adsorber el virus 1h a 37°C en atmósfera de CO₂. Luego se retiró el inóculo y se cubrió con MM. Transcurridas 24 h post infección (p.i.) y observando un ataque del 90% de las monocapas por la acción citopática viral, se lisaron las células mediante congelamiento y descongelamiento. Se eliminaron los restos celulares por centrifugación durante 15 minutos a 1000 g y se guardó el sobrenadante a -70°C hasta su posterior utilización. Los títulos virales obtenidos oscilaron entre 10^6 y 10^8 UFP/ml.

3. Ensayo de plaqueo directo

Se titularon las suspensiones virales por cuantificación de unidades formadoras de placas (UFP). Para ello se infectaron monocapas de células Vero crecidas en placas de 24 pocillos con diluciones seriadas al décimo de las distintas suspensiones virales. Se dejó adsorber el virus 1h a 37°C en atmósfera de CO₂. Luego se retiró el inóculo y se

cubrió cada pocillo con MM conteniendo 0,7% de metilcelulosa (MMmet). Después de 48 h de incubación, se fijaron las células con formol al 10 % durante 15 minutos y se tiñeron con cristal violeta (1 % en metanol 10 %). Se contaron las UFP en cada pocillo y se determina el título viral mediante la siguiente fórmula:

Título viral: N° promedio de UFP/ (dilución x Vol. del inóculo).

4. Selección de las variantes

Se realizaron pasajes sucesivos de HSV-2 cepa MS (m.i.: 0,1) en monocapas de células Vero en presencia de concentraciones crecientes de los CGNs ι y κ , de estructuras químicas similares a 1C3 (CGN híbrido μ/v parcialmente ciclado), presentes durante y después de la infección. Se comenzó con una concentración de los compuestos inicial correspondiente a la mitad de sus CI_{50} , duplicándose en cada pasaje. Se incubaron las células durante un período comprendido entre 24 y 72 h p.i., hasta que la monocapa presentaba una acción citopática (ACP) entre 70-90 %, procediéndose a lisar las células con dos ciclos de congelamiento y descongelamiento. Con el fin de eliminar los restos celulares, se centrifugó el lisado durante 15 min a 1000 rpm, conservándose el sobrenadante a $-70^{\circ}C$. Se realizaron 22 pasajes llegando a una concentración final 200 veces mayor a la CI_{50} inicial de cada CGN. Se determinó el título y la CI_{50} de cada pasaje utilizando el método de reducción en el número de placas virales. Como control se realizaron pasajes sucesivos de HSV-2 cepa MS en ausencia de los CGNs. Se hicieron entre 5-10 pasajes en células Vero sin compuesto de todas las variables virales para comprobar la no reversión a la cepa parental.

Cepas resistentes al ACV se obtuvieron de igual manera que para ι y κ . Se realizaron 6 pasajes del HSV-1 (F) y HSV-2 (MS) en presencia de concentraciones crecientes de ACV, llegando a una concentración máxima 30 veces mayor a la CI_{50} inicial. Los pasajes 6 de HSV-1 y HSV-2 fueron denominados ACV-6F y ACV-6MS.

5. Clonado de las variantes virales

Para la obtención de los clones a partir de los pasajes realizados, se infectaron monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 6 pocillos con 10 UFP totales de cada pasaje, por duplicado. Después de 1 h de adsorción se retiró el inóculo y se cubrió

con una mezcla de MM (2X) y agarosa (1,2 % concentración final) en partes iguales. Se incubó a 37°C por 48-72 h y se incorporó rojo neutro 2 % mezclado en partes iguales de MM (2X) y agarosa 1,2 %. Se cubrió la placa con papel de aluminio y se mantuvo por 2 h a 37°C. Con la ayuda de un transiluminador se procedió a picar los clones aislados, cada uno se diluyó en MM y se lo sometió a una vigorosa agitación.

Los clones fueron luego amplificados en células Vero y titulados por plaqueo directo.

6. Efecto citopático por tinción con Giemsa

Se infectaron monocapas de células Vero y macrófagos crecidas sobre cubreobjetos con m.i. 1 y 0,1 UFP/célula de cada virus y variante viral. Luego de 1 h a 37°C se retiró el inóculo y se cubrió con MM. A las 24 y 48 h p.i. se hicieron 2 lavados con PBS, se fijaron las células con metanol frío y se tiñeron con Giemsa.

Ensayos de Citotoxicidad

▪ Efecto sobre células confluentes

1. Recuento de células viables

Se incubaron monocapas confluentes de células (Vero, RAW. 264.7, células murinas de Bazo) en presencia de distintas concentraciones de los compuestos en MM durante 48 h a 37°C. Cada concentración se ensayó por duplicado. Luego se retiró el medio, se levantaron las células con tripsina y se determinó el número de células viables por el método de exclusión con azul Tripan. Como control se utilizaron células que recibieron idéntico tratamiento pero en ausencia de compuesto. La concentración citotóxica 50 % (CC₅₀) fue definida como la concentración de compuesto capaz de reducir el 50% de las células viables respecto del control.

2. Método del MTS

[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio] + PMS (reactivo acoplante).

Células Vero crecidas en microplacas de 96 pocillos se incubaron con diferentes concentraciones de los compuestos por triplicado por 48 h a 37°C. Luego, sin retirar el medio se incorporaron 20 µL/pocillo de MTS (CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay-Promega) y se dejó actuar durante 2 h a 37°C. El MTS es reducido por acción de enzimas mitocondriales celulares a formazan, (producto acuoso soluble en el medio de cultivo).

Posteriormente, se midió la absorbancia con una longitud de prueba 490 nm y de referencia de 630 nm. Se consideró la absorbancia del control celular como el 100 % de viabilidad.

▪ Efecto sobre la Proliferación Celular

Se sembraron las células (RAW 264.7 y células murinas de Bazo) en placas de 96 pocillos (10^4 cel. /pocillo) junto con distintas concentraciones de los compuestos. Los cultivos se incubaron a 37°C por 24-48 h, procediéndose posteriormente a definir el número de células presente en cada pocillo por el método del MTS. Se midió la absorbancia con una longitud de prueba 490 nm y de referencia de 630 nm. Se utilizó como control positivo LPS (5 µg/ml). Se ensayó cada dilución por duplicado. Se estimó el número de células por pocillo interpolando los valores promedio de absorbancia con la pendiente de la curva de calibración.

Actividad Virucida

Se define actividad virucida a la capacidad que tiene un compuesto en inactivar el virus en suspensión. Una suspensión de HSV-2 (MS) (2×10^4 UFP) se incubó por 2 h a 37°C en ausencia o presencia de distintas concentraciones de los compuestos a ensayar. Luego se realizaron diluciones de las distintas mezclas y se procedió su titulación por UFP en células Vero, tomando en cuenta que en las diluciones ensayadas sobre las

células los compuestos no ejercieran efecto antiviral. Se calculó la infectividad residual del virus en presencia de los compuestos respecto al control. La concentración virucida 50 % (CV₅₀) se definió como la concentración de compuesto capaz de reducir la infectividad en un 50 %.

Actividad Antiviral

1. Reducción del número de Placas Virales

Se infectaron monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos con 60-80 UFP/pocillo de los distintos virus en ausencia o presencia de distintas concentraciones de los compuestos. Se ensayó cada dilución por duplicado. Luego de 1h a 37 °C en estufa gaseada (4 % de CO₂), se descartó el inóculo y se cubrió cada pocillo con MM conteniendo 0,7% de metilcelulosa (MMmet). Luego de 48 h de incubación, se fijaron las células con formol al 10 % durante 15 minutos y se tiñeron con cristal violeta (1 % en metanol 10 %). Se calculó la CI₅₀, definida como la concentración del compuesto requerida para reducir el número de placas en un 50% respecto del control viral. Cuando el compuesto ensayado actúa después de la adsorción (ACV y BVDU), se cubre con MMmet conteniendo las distintas concentraciones de compuesto.

2. Inhibición de Rendimiento Viral

Se infectaron monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos con los distintos virus (m.i.: 0,1) en ausencia o presencia de distintas concentraciones de los compuestos. Luego de 1h de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y se cubrieron las monocapas con MM y se incubaron durante 24-48h a 37°C. Luego los cultivos se sometieron a 2 ciclos de congelamiento y descongelamiento para romper las células. Se tomaron los sobrenadantes y se centrifugaron para eliminar los restos celulares durante 15 minutos a 1000g y se procedió a la titulación viral del sobrenadante mediante plaqueo directo en células Vero.

3. Inhibición del Efecto Citopático

Se infectaron monocapas de células Vero crecidas en placas de 96 pocillos, con los distintos virus en presencia o ausencia de distintas concentraciones de los compuestos a ensayar. Luego de 1h a 37°C, se retiró el inóculo y se cubrió con MM incubándose 24-48 h a 37°C con observación diaria del efecto citopático. La CI_{50} , concentración que redujo al 50% el efecto citopático respecto al control viral sin compuesto, se calculó según el método de Reed Muench.

Se calculó la resistencia relativa (RR) de cada variante viral a un compuesto determinado como la relación entre la CI_{50} del compuesto obtenida para la variante y la CI_{50} del compuesto obtenida para la cepa parental. (RR): CI_{50} variante/ CI_{50} cepa parental.

4. Acción antiviral in Vivo

(Ver Infección Intranasal)

Curva de Crecimiento viral

Se infectaron monocapas de células Vero y astrocitos murinos con HSV y las variantes (m.i. 0,1). Luego de 1h a 37°C, se descartó el inóculo y se adicionó MM. Simultáneamente (tiempo 0) o a distintos tiempos p.i. las monocapas se lisaron realizando 2 ciclos de congelamiento y descongelamiento. Se centrifugó para eliminar restos celulares y en el sobrenadante se determinó el título viral por UFP.

Efecto de la Ciclosporina A y Melitina

Con el fin de establecer en forma preliminar posibles mutaciones en gB, gK o UL24, genes responsables del fenotipo syn en las variantes de HSV-2 (MS), se utilizaron dos inhibidores de la formación de syn inducidos por HSV: la Ciclosporina A y la Melitina (Walev y col., 1991). Se infectaron por duplicado monocapas de células Vero confluentes crecidas en placas de 6 pocillos con 100 UFP/pocillo. Luego de 1h a 37°C, se retiró el inóculo y se cubrió con MMmet conteniendo Ciclosporina A o Melitina, 100

y 1 μ M respectivamente. Luego de 48 h de incubación a 37°C, se cuantificaron las placas virales y se determinó el porcentaje de placas no syn.

Virulencia de las variantes

▪ Infección intravaginal

Se infectaron ratones hembras BALB/c y C57BL/6 de entre 8-10 semanas de edad (18-21g) por vía intravaginal con 0,02 ml de diluciones seriadas de HSV y sus variantes. Paralelamente se infectaron monocapas de células Vero para determinar el título de las cepas empleadas. Cinco días antes de la inoculación, los animales fueron inyectados subcutáneamente con 0,05 ml (25 mg/ml en PBS) de medroxiprogesterona (Medrosterona, Gador, Argentina), tratamiento que mostró incrementar la susceptibilidad de los ratones a la infección con HSV. Durante 2 semanas luego de la inoculación se siguió la evolución de la morbilidad y mortalidad de los animales infectados. Se calculó la Dosis Letal 50% (DL₅₀) definida como la dosis capaz de matar al 50% de los animales respecto del control sin infectar. Posteriormente se calculó el Índice de Virulencia (UFP/DL₅₀).

Para definir la virulencia de las variantes, cinco días después del tratamiento con medroxiprogesterona, se infectaron ratones BALB/c y C57BL/6 por vía intravaginal con 0,02 ml (5×10^5 UFP) de distintos virus.

Infección Mixta: Previo tratamiento con medroxiprogesterona, se infectaron ratones BALB/c por vía intravaginal con 0,02 ml de una mezcla de variantes asintomáticas de los dos serotipos (1C314-1 (HSV-1) + 122-12 (HSV-2)) en partes iguales conteniendo 10^6 UFP/ratón. Como control se utilizó una mezcla viral de las cepas parentales HSV-1(F)+HSV-2 (MS) en partes iguales.

Al tercer día p.i. se realizaron lavados vaginales con 100 μ l de PBS a todos los animales. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta la cuantificación de citoquinas y titulación viral en células Vero por UFP. Se registró la morbilidad y mortalidad de los animales diariamente durante dos semanas. Se utilizó la siguiente clasificación para infección con HSV-1: 0) infección inaparente; 1) enrojecimiento perivaginal; 2) eritema moderado y/o inflamación perineal 3) eritema severo perineal y/o constipación 4) distensión abdominal y obstrucción severa de esfínteres anal y urinario; 5) enfermedad

neurológica y necrosis abdominal. Los animales que mostraron signos de enfermedad con niveles 4 y 5 fueron sacrificados. La clasificación para infección con HSV-2 fue la siguiente: 0) infección inaparente; 1) leve enrojecimiento perivaginal; 2) inflamación y enrojecimiento perivaginal; 3) eritema severo con caída de pelo en el área genital; 4) ulceración severa genital extendiéndose a otros tejidos (patas traseras); 5) enfermedad neurológica. Los animales que alcanzaron los niveles 4-5 fueron sacrificados en conformidad con las leyes y políticas nacionales e internacionales en procedimientos de manipulación y cuidados de animales.

1. Cuantificación de Citoquinas

Las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α y la citoquina anti-inflamatoria IL-10 se cuantificaron en los lavados vaginales empleando el método ELISA (BD Biosciences OptEIA™) de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante.

En ensayos in vitro, las células crecidas en placas de 6 pocillos se estimularon con distintas concentraciones de los CGNs ι y κ , durante 24 y 48 h. Cada concentración se realizó por duplicado. Como control negativo se utilizó un cultivo sin droga y LPS como control positivo. Al cabo del tiempo correspondiente, se cosecharon los sobrenadantes y se cuantificó la concentración de IL-6 y TNF- α . Cada ensayo se realizó por triplicado. Las placas fueron leídas en un lector de ELISA (Biotek ELX808IU) a 490 nm con referencia 630 nm y la concentración se determinó empleando una curva de calibración.

2. Método de Griess

Para determinar la concentración de óxido nítrico (NO) en los sobrenadantes de células estimuladas con los CGNs se realizó el método de Griess. En una microplaca de 96 pocillos se colocaron 100 μ l de las muestras por pocillo, luego se agregó 50 μ l de Sulfanilamida y 50 μ l de Naftiletildiamina (NEDA), se homogeneizó y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Como control negativo se empleó PBS. Se midió la absorbancia a 570 nm. Se cuantificó el óxido nítrico empleando una curva de calibración con distintas concentraciones de nitrito de sodio.

▪ **Infección Intranasal**

Se infectaron hembras BALB/c y C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad, por vía intranasal con 0,02 ml de diluciones seriadas de HSV y sus variantes. Los animales fueron previamente anestesiados por vía intraperitoneal con 2 mg de ketamina (Ketalar, Parke Davis, Argentina) y 0.04 mg Xilacina (Rompun, Mosby, Argentina) en 0.1 ml de PBS. Se siguió la evolución de la morbilidad y mortalidad de los animales infectados durante 2 semanas. Se utilizó la siguiente clasificación: 0) infección inaparente; 1) pelos erizados; 2) ojos irritados; 3) lesiones y/o encorvamiento; 4) disfunciones neurológicas (parálisis patas traseras); 5) Insensibilidad (no responde a estímulos). Los animales que mostraron niveles 4-5 fueron sacrificados.

Se determinó también la DL₅₀ y el índice de virulencia (UFP/DL₅₀).

Para el ensayo antiviral de los carragenanos in vivo, se infectaron hembras BALB/c con un inóculo de 0,02 ml conteniendo 4×10^5 UFP de HSV-2 MS y tratando los animales inmediatamente después con 0,02ml de CGNs kappa o iota (5mg/kg) administrados por la misma vía. Se observó la morbilidad y mortalidad de los animales diariamente durante 2 semanas.

Todos los procedimientos de manipulación y cuidados de animales se realizaron en conformidad con las leyes y políticas nacionales e internacionales (Regulación para el cuidado y el uso de animales de laboratorio, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires, Argentina, aprobado por CD 140/00, y el Departamento de salud y Servicio humano, Public Health Service, NIH, 2002. Assurance Identification #A5523-01.

1. Diseminación Viral

Se infectaron hembras BALB/c de 6 a 8 semanas de vida por vía intranasal con 10^6 UFP/animal de los virus HSV-1 F, 1C314-1 y 1C317-2. Al cabo de los días 3 y 6 p.i. fueron sacrificados tres ratones de cada grupo para la obtención de órganos (cerebro, médula espinal, pulmón y vagina-útero). Se colocaron los órganos en PBS (10% Peso/volumen con 5% SFB) y se procedió a cortarlos finamente con tijeras. Se

centrifugaron las muestras por 5 min a 10.000 g y el sobrenadante fue utilizado para calcular el título viral/gr de órgano empleando plaqueo directo.

2. Cortes histológicos

Se infectaron hembras BALB/c de 6 a 8 semanas de vida por vía intranasal con 10^6 UFP/animal de los virus HSV-1 F, 1C314-1 y 1C317-2. Al cabo de los días 2 y 5 p.i. fueron sacrificados dos ratones de cada grupo para la obtención de órganos (cerebro, pulmón y vagina-útero). Se fijaron los órganos con formaldehído al 4% y solución de Bouin (ácido pícrico/formaldehído/ácido acético (15:5:1) durante 18 h. Transcurrido ese tiempo los órganos se conservaron en alcohol 70° hasta el momento de su procesamiento. Las piezas se deshidrataron utilizando graduaciones crecientes de alcohol etílico (80°-90°-96°). A fin de poder incluir el material en Paraplast (punto de fusión 56°-58°) se sumergieron las piezas en alcohol butílico (solvente intermediario) que es miscible en alcohol y en el medio de inclusión. Las muestras se transfirieron posteriormente a una solución 50:50 butílico-Paraplast líquido, conservada en la estufa por 2 h. Finalmente se procedió a la impregnación definitiva de los órganos con Paraplast puro. Antes de la solidificación de las piezas se procedió a la orientación de las mismas con el fin de obtener cortes sagitales para los órganos del sistema nervioso y cortes longitudinales para el pulmón. Se obtuvieron cortes de 6 μ m de espesor con un micrótopo de deslizamiento, los cuales fueron montados en portaobjetos previamente embebidos en albúmina de Mayer para su posterior tinción con la coloración topográfica hematoxilina-eosina. Cinco cortes representativos de cada órgano fueron examinados al microscopio (Olympus BX51) con el fin de observar y definir la histopatología y la presencia de infiltrados inflamatorios. Las imágenes fueron recolectadas utilizando el software Image-Pro Express.

3. Inmunohistoquímica

Se utilizaron cortes histológicos de pulmón y vagina de los días 2 y 5 p.i. procedentes de hembras infectadas por vía intranasal con HSV-1 y sus variantes como se explicó anteriormente. Se utilizó el kit de Inmunohistoquímica para detección de HSV (Millipore, USA). Se desparafinaron los cortes con xilol y gradiente de alcoholes.

Luego se desenmascaró el antígeno en PBS con horno microondas 5 minutos a máxima potencia, se bloquearon las peroxidadas y se incubaron con el primer anticuerpo (IgG de conejo anti HSV-1) dilución 1/150 durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Se hicieron lavados y se incubaron con el segundo anticuerpo anti-conejo conjugado a peroxidasa por 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Luego de varios lavados se incubaron los cortes con el DAB Cromogen Buffer por 5 minutos y se realizó la contra-tinción con hematoxilina. Se cubrió cada portaobjeto con medio de montaje y cubreobjeto. Las muestras se observaron en microscopio óptico (Olympus BX51).

4. Efecto inmuno-modulador en ratones

Para estudiar el efecto inmuno-estimulador de los carragenanos in vivo, se inocularon grupos de 5 hembras BALB/c de 6-8 semanas de edad por vía intravenosa con cada carragenano (κ o ι), llegando a una concentración final de 30 mg/kg en un inoculo de 0,2 ml. Como control positivo se inyectaron 5 ratones con 10 μ g/ml de LPS.

A distintos tiempos post infección, 30 60 y 90 minutos se anestesiaron 4 ratones por grupo con 2mg de ketamina (Ketalar, Parke Davis, Argentina) y 0.04 mg Xilacina (Rompun, Mosby, Argentina) en 0.1 ml de PBS y se los sangra a blanco, quedando el 5to animal en observación. La sangre se recolectó en tubos ependorf, se centrifugó para separar el suero (10 minutos a 1000g) y se guardó a -70 para su posterior uso. Se midieron los niveles de IL-6 y TNF- α por el método de ELISA y los niveles de NO por el método de Griess.

Resultados

Capítulo 1: Caracterización de variantes de HSV-1 aisladas en presencia de 1C3

Capítulo 2: Obtención y Caracterización de variantes virales de HSV-2

Capítulo 3: Efecto Inmuno-modulador de los carragenanos

Capítulo 1

Caracterización de variantes de HSV-1 aisladas en presencia de 1C3

Uno de los mayores problemas en el uso de antivirales es la generación, ante el empleo continuo de una droga, de variantes resistentes a la misma. Por otra parte, estas variantes sirven como herramienta para caracterizar el blanco de acción del compuesto en el virión. Además, las variantes por tener alteradas las glicoproteínas de envoltura podrían colaborar en el esclarecimiento del inicio de la patogenia viral. Para evaluar esta situación, se inició el estudio utilizando como compuesto modelo el carragenano 1C3.

Efecto citopático de variantes de 1C3 HSV-1 en cultivos primarios murinos

Con el propósito de estudiar el comportamiento de las variantes en tejidos relacionados con las vías naturales de entrada del HSV, se emplearon cultivos primarios de vagina y pulmón de ratón. Estudios previos revelaron que la capacidad de formar sincicios era dependiente del tipo de célula empleada. Así, las variantes no formaron sincicios en células fibroblásticas de prepucio humano ni en astrocitos murinos, produciendo un efecto citopático de redondeamiento celular característico de la cepa salvaje (Carlucci y col, 2002). Todos los clones analizados mostraron capacidad de formar sincicios en células Vero, induciendo una extensa fusión célula-célula en los cultivos infectados, a diferencia de lo que se observó con la cepa salvaje que produjo redondeamiento celular y desprendimiento de la monocapa al sobrenadante. Sin embargo, en cultivos murinos de pulmón y de vagina, las variantes produjeron un efecto citopático *syn* comparable con el obtenido en células Vero (Figura 1). Al observar los títulos virales obtenidos a las 24h p.i., la variante 1C314-1 alcanzó valores en el orden de 10^6 UFP/ml, mientras que los obtenidos por la cepa parental F fueron menores, en el orden de 10^4 UFP/ml, tanto en cultivos de pulmón como en vagina.

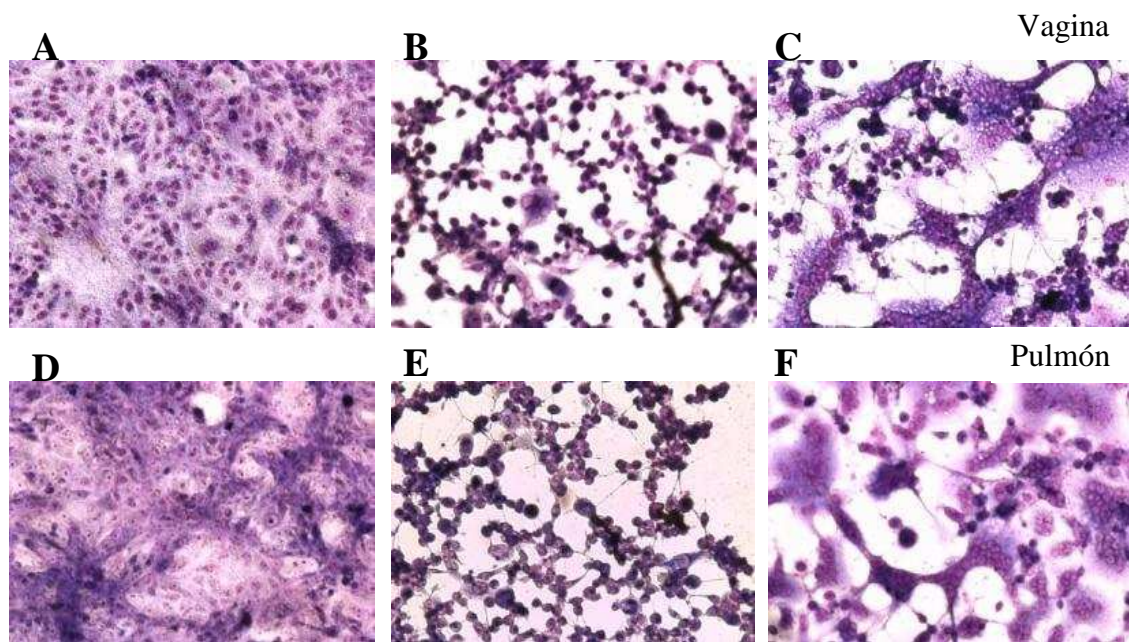


Figura 1: Efecto citopático de las variantes de HSV-1 en cultivos primarios de ratón. Cultivos murinos de vagina y pulmón crecidos sobre vidrio se infectaron con variantes de HSV-1 (F) utilizando una m.i. de 0,1. A las 24h p.i. las células se fijaron con metanol frío y se tiñeron con GIEMSA. A y D: PBS, B y E: F, C y F: 1C314-1. Aumento 100X.

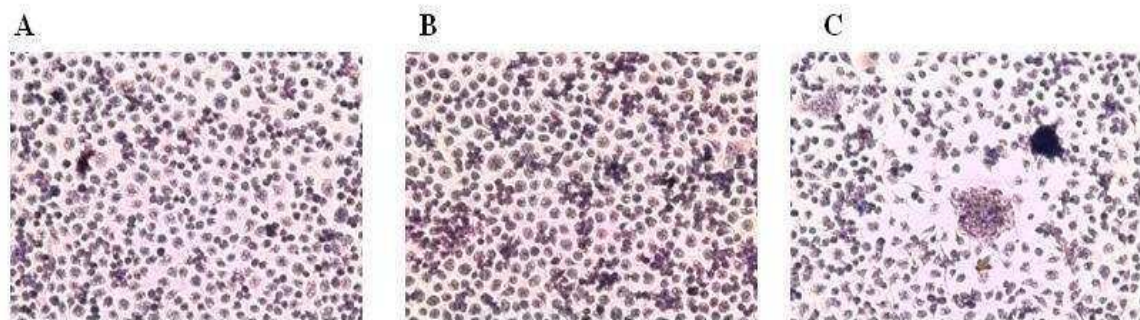


Figura 2: Efecto citopático de las variantes de HSV-1 en cultivo de células macrofágicas de ratón. Cultivos de macrófagos peritoneales crecidos sobre vidrio se infectaron con variantes de HSV-1 (F) utilizando una m.i. de 0,1. A las 48h p.i. las células se fijaron con metanol frío y se tiñeron con GIEMSA. A: PBS, B: F y C: 1C314-1. Aumento 100X.

Replicación viral en macrófagos

Las etapas iniciales de una infección por HSV están influenciadas principalmente por los macrófagos que participan en forma temprana limitando la replicación y diseminación del virus. Por lo tanto, se definió la susceptibilidad de los macrófagos a la infección. En macrófagos peritoneales, tanto la cepa parental F como las variantes fueron capaces de replicar alcanzando títulos virales similares en el orden de 10^3 UFP/ml a las 48h p.i. (Figura 2).

Sin embargo, cuando se emplearon macrófagos de la línea celular RAW 264.7, la replicación fue en general mayor y las variantes alcanzaron a las 48 h, títulos virales 1,5 log mayores en relación a la cepa parental F, (Figura 3). Se incorporó como control una variante viral no sincicial, ACVp6F, que se obtuvo de 6 pasajes sucesivos del virus HSV-1 (F) sobre células Vero en presencia de concentraciones crecientes de ACV.

Tanto en macrófagos murinos como en células RAW 264.7, la cepa parental y las variantes mantuvieron sus efectos citopáticos característicos de redondeamiento celular y syn, respectivamente.

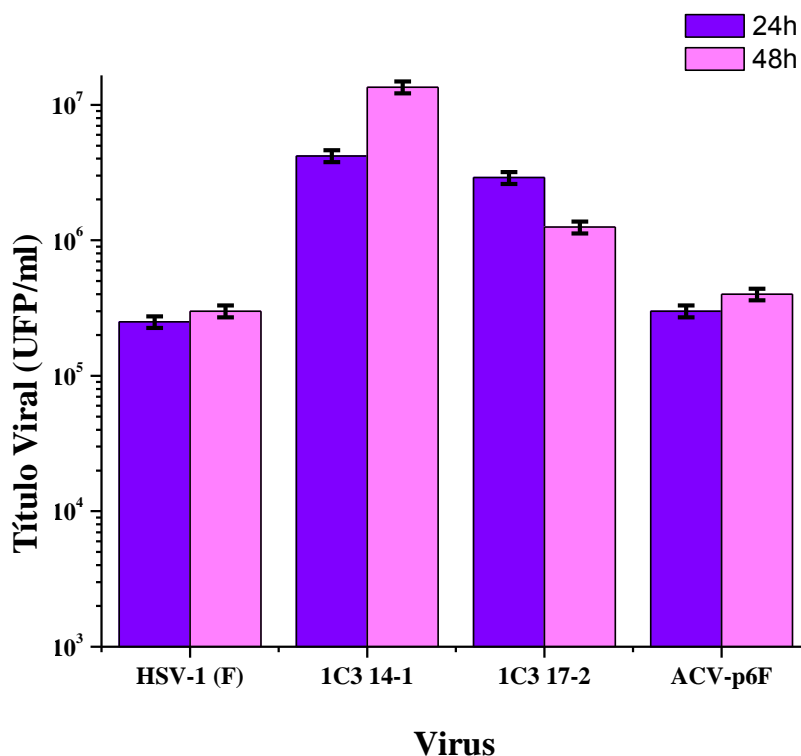


Figura 3: Replicación de las variantes de HSV-1 en células RAW. Monocapas de células RAW 264.7 se infectaron con las variantes de HSV-1, utilizando una m.i. de 0,1. A las 24 y 48h p.i. se tomaron los sobrenadantes y se titularon por el método de unidades formadoras de placa. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes, \pm D.E.

Susceptibilidad de las variantes de HSV-1 a distintos compuestos

Estudios anteriores con este tipo de variantes mostraron que no hay correlación entre el grado de resistencia a la droga y la característica syn. Sabiendo que a partir del pasaje 14 todas las variantes de HSV-1 presentaron un fenotipo syn, se evaluó la relación entre la presión de selección a la que fueron sometidas las variantes y la resistencia a los compuestos antivirales (actualmente en uso). Evaluando la participación de otras proteínas virales distintas a las glicoproteínas como las proteínas no estructurales (enzimas). Para ello, se clonaron variantes del virus F correspondientes a pasajes mayores. Se procedió a determinar la CI_{50} de las variantes por plaqueo directo o por inhibición del efecto citopático en monocapas de células Vero frente a distintos compuestos: heparina, Aciclovir (ACV), Foscarnet (PFA) y Brivudin (BVDU).

Como controles, se utilizaron la cepa F y el pasaje 17 de la cepa F en células Vero en ausencia de 1C3 (F-cp17). El nivel de susceptibilidad de cada variante a los distintos compuestos se lo expresó como resistencia relativa (RR). (Tabla 1).

Cepas Virales	CI ₅₀ ^a (RR) ^b			
	Brivudin	Aciclovir	Foscarnet	Heparina
HSV-1 (F)	0,01 ± 0,10	0,02 ± 0,01	4,7 ± 2,2	0,9 ± 0,07
1C3 14-1	0,02 ± 0,01 (2,0)	0,07 ± 0,01 (3,4)	4,7 ± 2,2 (1,0)	8,5 ± 0,9 (9,3)
1C3 17-1	0,08 ± 0,01 (6,2)	0,28 ± 0,05 (12,7)	17,6 ± 0,1 (3,7)	7,5 ± 0,7 (8,2)
1C3 17-2	0,10 ± 0,03 (10)	0,20 ± 0,01 (9,1)	12,5 ± 2,3 (2,6)	15 ± 1,5 (16,4)
1C3 17-3	0,08 ± 0,02 (8,0)	0,20 ± 0,03 (9,1)	15,1 ± 3,6 (3,2)	6,0 ± 0,6 (6,6)
1C3 20-1	0,08 ± 0,02 (8,0)	0,24 ± 0,05 (10,9)	10,7 ± 2,1 (2,3)	15,0 ± 1,5 (16,4)
1C3 20-2	0,05 ± 0,01 (5,0)	0,40 ± 0,02 (18,8)	12,5 ± 1,2 (2,7)	15,0 ± 1,5 (16,4)
1C3 20-3	0,05 ± 0,01 (5,0)	0,30 ± 0,14 (13,6)	15,1 ± 3,6 (3,2)	15,0 ± 1,5 (16,4)
1C3 21-1	0,04 ± 0,01 (4,0)	0,17 ± 0,04 (7,7)	10,7 ± 2,1 (2,3)	8,5 ± 0,9 (9,3)
1C3 21-2	0,06 ± 0,01 (6,0)	0,40 ± 0,01 (20,0)	11,9 ± 8,1 (2,6)	7,5 ± 0,8 (8,2)
1C3 21-3	0,07 ± 0,02 (7,0)	0,24 ± 0,05 (12,0)	10,7 ± 2,1 (2,3)	7,1 ± 0,8 (7,8)
F-cp17	0,014 ± 0,035 (1,4)	0,03 ± 0,014 (1,5)	4,07 ± 0,01 (1,0)	0,4 ± 0,01 (1,0)
ACVp6 F	n.d	3,19 ± 0,03 (160)	4,07 ± 0,02 (1,0)	2,01 ± 0,1 (2,2)

Tabla1: Susceptibilidad de las variantes a distintos compuestos con acción antiherpética. Monocapas de células Vero crecidas en placas de 24 pocillos, se infectaron con 80UFP por pocillo. Durante la adsorción (heparina) o luego de la adsorción (ACV, BVDU, PFA), los distintos compuestos se adicionaron en distintas concentraciones a fin de determinar la CI₅₀. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes, ± D.E. ^aCI₅₀ (μg/ml). ^bResistencia relativa: relación entre la CI₅₀ de cada clon y la CI₅₀ de HSV-1 (F). n.d: no determinado.

Como se observa en la Tabla 1, las variantes de HSV-1 mostraron un rango variado de susceptibilidad frente a la heparina, polisacárido sulfatado con similar mecanismo de acción que 1C3, respecto de la cepa parental. Los valores más altos de resistencia (RR: 16,4) pertenecen a las variantes 1C317-2, 1C320-1, 1C320-2 y 1C320-3. La mayoría de los clones fueron susceptibles al PFA (análogo del pirofosfato), datos que mostrarían que la ADN polimerasa viral no estaría alterada. Para el ACV y el BVDU, ambos análogos nucleosídicos con mecanismos de acción similares, los valores de

resistencia de los clones no siguen el mismo patrón. Así, mientras que el mayor valor de resistencia al BVDU lo presentó 1C317-2 (RR: 10), para el ACV lo mostró el clon 1C321-2 (RR: 20). Estos resultados indicarían posibles mutaciones en la TK viral.

La variante ACVp6F, mostró una alta resistencia al ACV (RR: 160) después de solo 6 pasajes en presencia del mismo, mientras que fue susceptible a heparina y PFA.

A partir de estos resultados, se eligieron las variantes 1C314-1, 1C317-2 y ACVp6F, con diferentes niveles de susceptibilidad a la heparina y al ACV a fin de caracterizar su patogenicidad.

Estudio patogénico de las variantes virales de HSV-1

Se evaluó la virulencia de las variantes en ratones empleando dos modelos experimentales de infección utilizando en un caso la vía intravaginal y en el otro la vía intranasal, con el fin de reproducir las rutas naturales de infección en el humano.

1. Modelo de infección intravaginal

Como se puede ver en la Tabla 2, la virulencia de las variantes ensayadas en ratones BALB/c difirió marcadamente respecto de la cepa parental F. La cepa F fue altamente virulenta al ser inoculada por vía intravaginal. Sin embargo sus variantes no causaron morbilidad ni mortalidad en los animales aun cuando se empleó una dosis alta de virus (10^6 UFP/ratón). La relación UFP/DL₅₀ de las variantes fue mayor a 2 logaritmos que la correspondiente a la cepa F. A pesar de estas diferencias, se recuperó en los lavados vaginales una cantidad similar de virus infectivo sugiriendo que los niveles de virus producido en el sitio de la inoculación no estarían asociados con la virulencia. Los síntomas para la cepa patrón F, fueron los característicos para una infección intravaginal con HSV-1, (Tabla 4).

HSV-1	UFP/DL50	UFP/ml
Cepa parental F	$1,8 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
1C314-1	$> 6,0 \times 10^6$	$3,7 \times 10^4$
1C317-2	$> 1,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^4$
ACVp6F	$> 1,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^5$

Tabla 2: Virulencia de las variantes por vía intravaginal. Grupo de 6-10 hembras BALB/c de 6-8 semanas de vida se infectaron por vía intravaginal con distintas diluciones seriadas al décimo de las variantes virales de HSV-1 (inóculo: 20 μ l). Los animales se monitorearon diariamente por dos semanas registrándose la morbilidad y mortalidad. La DL₅₀ se determinó por el método de Reed y Muench. El título viral se determinó en lavados vaginales al día 3p.i. El índice de virulencia se calculó como la relación: Título viral (UFP/ml)/ Título Viral (DL₅₀/ml).

2. Modelo de infección intranasal

Sorpresivamente, cuando se realizó la inoculación de las cepas por la vía intranasal se obtuvieron distintos resultados (Tabla 3). Aunque todos los ratones BALB/c inoculados con altas dosis de virus de la cepa parental F y sus variantes se enfermaron, aquellos infectados con la cepa F se recuperaron, registrándose un 100% de sobrevida. Sin embargo se observó un 100% de mortalidad en los ratones inoculados con las variantes syn (1C314-1 y 1C317-2). Los signos evidentes de enfermedad en los animales se manifestaron como lo muestra la Tabla 4. Por otra parte, los ratones infectados con ACVp6F no se enfermaron.

Es de destacar que cuando se emplearon ratones C57BL/6 tanto la cepa parental, las variantes syn y ACVp6F, no mostraron virulencia para esta cepa.

HSV-1	DL ₅₀ (UFP/ml)	
	BALB/c	C57BL/6
Cepa parental F	> 1,0x10 ⁶	> 1,0x10 ⁶
1C314-1	3,6x10 ⁴	> 0,5x10 ⁶
1C317-2	4,0x10 ⁴	> 1,0x10 ⁶
ACVp6F	> 1,0x10 ⁶	> 1,0x10 ⁶

Tabla 3: Virulencia de las variantes por vía intranasal. Grupos de 6-10 hembras BALB/c y C57BL/6 se infectaron con diluciones seriadas al décimo de las variantes virales de HSV-1 (inóculo: 20µl). Los animales se monitorearon diariamente por dos semanas registrándose la morbilidad y mortalidad. La DL₅₀ se determinó por el método de Reed y Muench. El índice de virulencia se calculó como la relación: Título (UFP/ml) / Título (DL₅₀/ml).

HSV-1	Sintomatología en BALB/c	
	Intravaginal	Intranasal
Cepa parental F	3-4*	2
1C3 14-1	0	2-3
1C3 17-2	0	2-3
ACVp6F	0	0

Tabla 4: Sintomatología en BALB/c. * nivel de sintomatología: **Intravaginal:** 0) infección inaparente; 1) enrojecimiento perivaginal; 2) eritema moderado y/o inflamación perineal 3) eritema severo perineal y/o constipación 4) distensión abdominal y obstrucción severa de esfínteres anal y urinario; 5) enfermedad neurológica y necrosis abdominal **Intranasal:** 0) infección inaparente; 1) pelos erizados; 2) ojos irritados; 3) lesiones y/o encorvado; 4) disfunciones neurológicas (parálisis patas traseras); 5) Insensible (no responde). Para ambos casos los animales en nivel 5 fueron sacrificados.

3. Cuantificación de citoquinas en lavados Vaginales

Con el fin de determinar si el factor principal responsable de las diferencias en la virulencia entre las variantes y la cepa F está relacionado con la respuesta inmune innata se midieron distintas citoquinas (Tabla 5).

Cuando se analizaron las citoquinas en lavados vaginales de ratones BALB/c infectados por vía intravaginal, se observó que los animales inoculados con 1C314-1 y 1C317-2

produjeron una baja respuesta de citoquinas proinflamatorias. Los niveles de TNF- α y IL-6 fueron 5 y 8 veces menores que aquellos obtenidos para F respectivamente. La variante 1C317-2 presentó valores similares a 1C314-1 (datos no mostrados). La variante ACVp6F presentó un valor de TNF- α similar a la cepa patrón F, mientras que el valor de IL-6, fue muy bajo, similar al control con PBS.

Para asegurarnos que la baja concentración de citoquinas proinflamatorias observadas para 1C314-1 no se debía a un incremento de citoquinas anti-inflamatorias, se analizó concentración de IL-10. Los resultados mostraron bajos niveles de IL-10 y por lo tanto se relativizó su efecto sobre las citoquinas proinflamatorias.

Citoquinas (pg/ml)	HSV-1 (F)	Syn 14-1	ACVp6F	PBS
TNF-α	37,1 \pm 2,0	7,5 \pm 0,4	23,3 \pm 0,2	0,86 \pm 0,01
IL-6	4040,3 \pm 69,2	512,7 \pm 24,8	5,0 \pm 0,1	9,05 \pm 0,80
IL-10	4,8 \pm 1,1	2,4 \pm 8	2,0 \pm 0,3	0,8 \pm 0,1

Tabla 5: Cuantificación de citoquinas en lavados vaginales. Se obtuvieron lavados vaginales de animales infectados por vía intravaginal al día 1p.i. Las citoquinas se cuantificaron por el método de ELISA. Los valores representan un promedio entre dos experimentos independientes \pm DE.

Diseminación Viral

Para profundizar el estudio de la virulencia de la cepa F y sus variantes, se investigó comparativamente la diseminación viral a diferentes órganos en ratones BALB/c inoculados por vía intranasal. Como puede verse en la Figura 4 (A y B), los tres virus fueron capaces de invadir y replicar en el sistema nervioso central, exhibiendo el típico neurotropismo de HSV-1 en ratón. Con el tiempo se incrementó la carga viral en cerebro y en médula espinal. El título viral fue variable aunque se pudo recuperar virus a partir de todos los animales inoculados con 1C317-2 y F hasta el día 6 p.i. Sin embargo, 1 de 3 y 2 de 3 animales inoculados con 1C314-1 mostraron bajos títulos en cerebro y médula espinal, respectivamente. También se recuperó virus a partir de los pulmones de animales infectados con la cepa F (2 de 3 ratones), 1C314-1 (2 de 3

ratones) y 1C317-2 (1 de 3 ratones) luego de 3 días p.i., no detectándose virus a tiempos posteriores (Fig. 4C). Con respecto a los tejidos de vagina-útero, se detectó virus infectivo sólo al día 3 p.i. en 2 de 3 ratones infectados con 1C314-1, sin embargo no se recuperó virus de los ratones infectados con F o 1C317-2 a ningún tiempo p.i. (Fig. 4D). Se registro el día 6 y 7 p.i. como el día promedio de muerte para los ratones infectados con 1C317-2 y 1C314-1, respectivamente. Sin embargo no se registraron muertes en el grupo de ratones inoculados con la cepa F. Estos resultados sugieren una diseminación viral similar de la cepa F y las variantes en todos los órganos estudiados luego de una inoculación intranasal, excepto para 1C314-1 que fue también capaz de infectar vagina-útero como se observó el día 3 p.i.

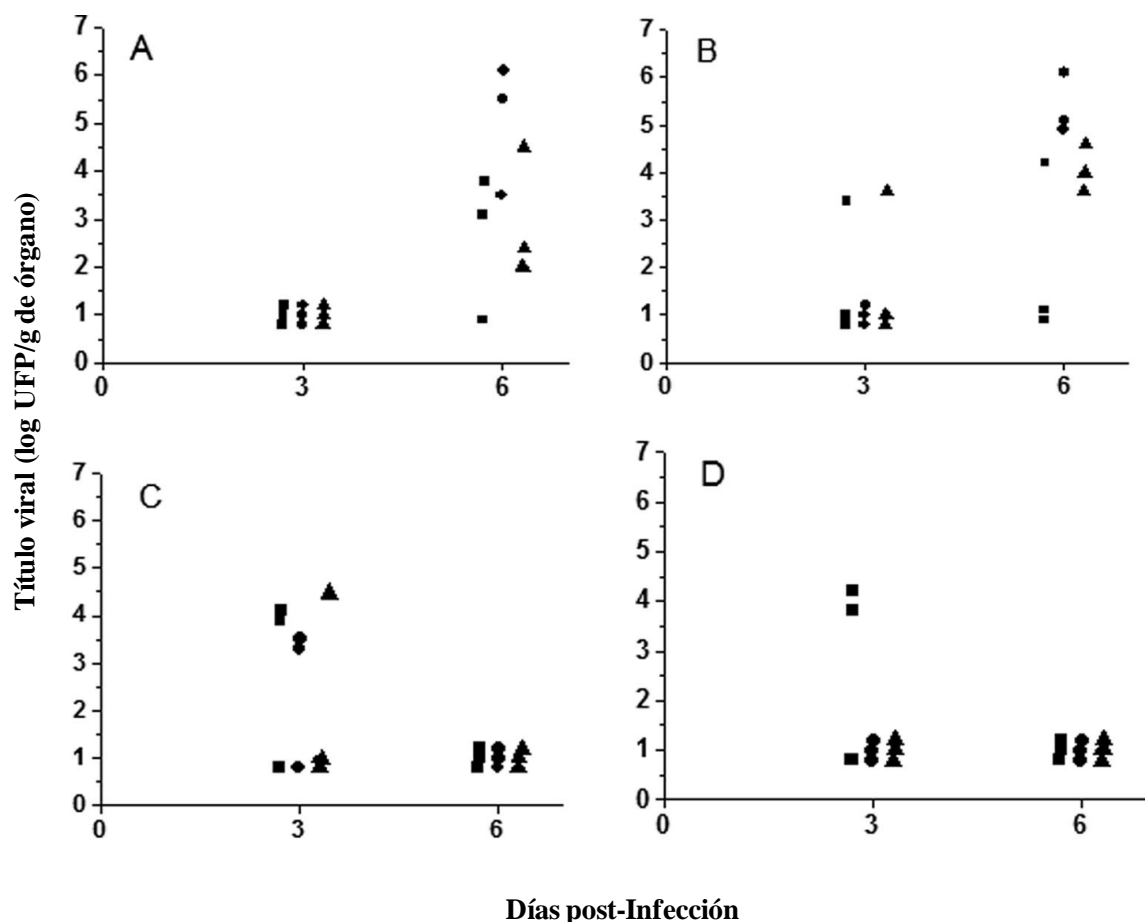


Figura 4: Diseminación viral de variantes de HSV-1(F) en BALB/c. Hembras de 6-8 semanas de edad se inocularon por vía intranasal con 10^6 UFP /ratón de la cepa parental F (●), 1C314-1 (■) y 1C317-2 (▲). A los 3 y 6 días post-infección, se sacrificaron grupos de 3 ratones, se recolectaron los órganos cerebro (A), médula espinal (B), pulmón (C) y vagina-útero (D) y se procesaron para la determinación del título viral, el mismo está expresado como UFP/g de órgano.

1. Estudios Histológicos

Para completar el estudio de virulencia, se realizaron estudios histopatológicos comparativos de cerebro y pulmón de ratones BALB/c no infectados e infectados por vía intranasal. El cerebro de los animales infectados con las variantes no manifestó mayores diferencias respecto al control, y se preservó la estructura como así también la morfología de sus células (datos no mostrados).

Se observó en los pulmones de los animales infectados con la cepa F y 1C314-1 la presencia de grandes infiltrados leucocitarios, especialmente cerca de los vasos sanguíneos y los bronquiólos, mientras que en los animales infectados con 1C317-2, los pulmones mostraron una evidente pérdida de la morfología alveolar (Figura 5).

No se observaron sincicios en los tejidos infectados con las variantes sinciciales, siendo considerado este efecto como una manifestación meramente “in vitro”. De todas maneras podemos confirmar que las variantes sinciciales obtenidas son infectivas y no se ve alterado su ciclo replicativo.

2. Inmunohistoquímica

Para definir la presencia de antígenos virales en muestras de pulmón y vagina infectados con las variantes de HSV-1, se procedió a realizar un ensayo de Inmunohistoquímica con suero hiper-inmune específico anti-HSV-1, (Figura 6). En todas las muestras de cortes de pulmón al día 2p.i se observó tinción en los bordes de los bronquiólos (epitelio). Al día 5 p.i., sólo se observó marca positiva para 1C317-2 (datos no mostrados).

Asimismo, se observó marca positiva en cortes histológicos de vagina de animales infectados con 1C314-1 pero no con F ni con 1C317-2 el día 2 p.i., en concordancia con la diseminación viral en dicho órgano (Figura 5).

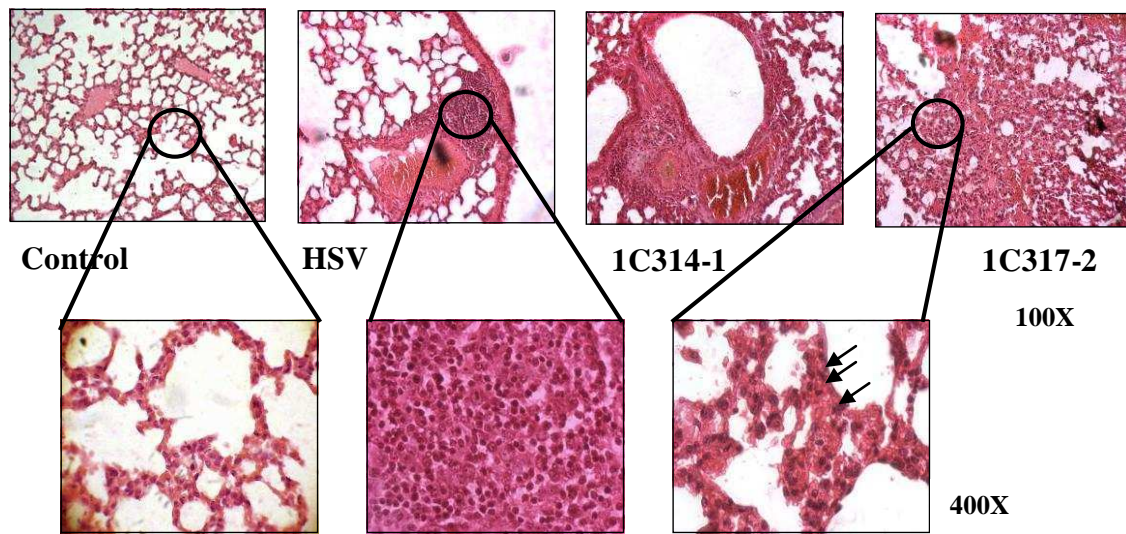


Figura.5: Histopatología de pulmón en BALB/c. Hembras de 6 a 8 semanas se infectaron por vía intranasal con 10^6 UFP/ ratón de las variantes de HSV-1 (F). A distintos días post-infección los ratones se sacrificaron, y los órganos se utilizaron para estudios histológicos. Las fotografías corresponden a cortes de pulmón del día 5 p.i., Las flechas indican delgadez de la pared alveolar.

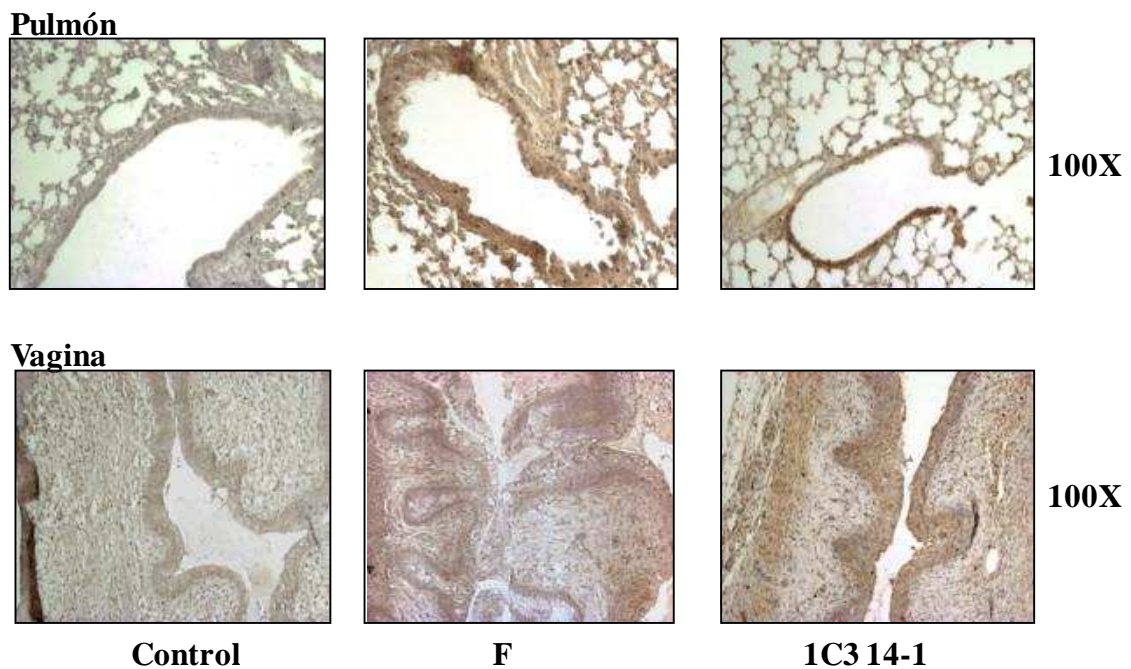


Figura 6: Antígenos de HSV-1 en cortes de pulmón y vagina de BALB/c. Hembras de 6 a 8 semanas se infectaron por vía intranasal con 10^6 UFP/ ratón de las variantes de HSV-1 (F). A distintos días post-infección los ratones se sacrificaron y los órganos se utilizaron para estudios histológicos. Para la Inmunohistoquímica se utilizó un suero hiper-inmune anti-HSV-1. Las fotografías corresponden al día 2 p.i.

Capítulo 2

Obtención y Caracterización de variantes de HSV-2

Las terapias antivirales contra HSV basadas en polisacáridos sulfatados como los CGNs, representan una nueva alternativa para el tratamiento de la infección herpética genital. Como consecuencia de estas terapias la aparición de poblaciones virales resistentes es frecuente y su estudio es de gran interés. Para evaluar esta situación, se amplió el estudio iniciado con HSV-1 utilizando de ahora en adelante variantes de HSV-2 obtenidas con dos tipos de CGNs naturales.

1. Elección de los carragenanos

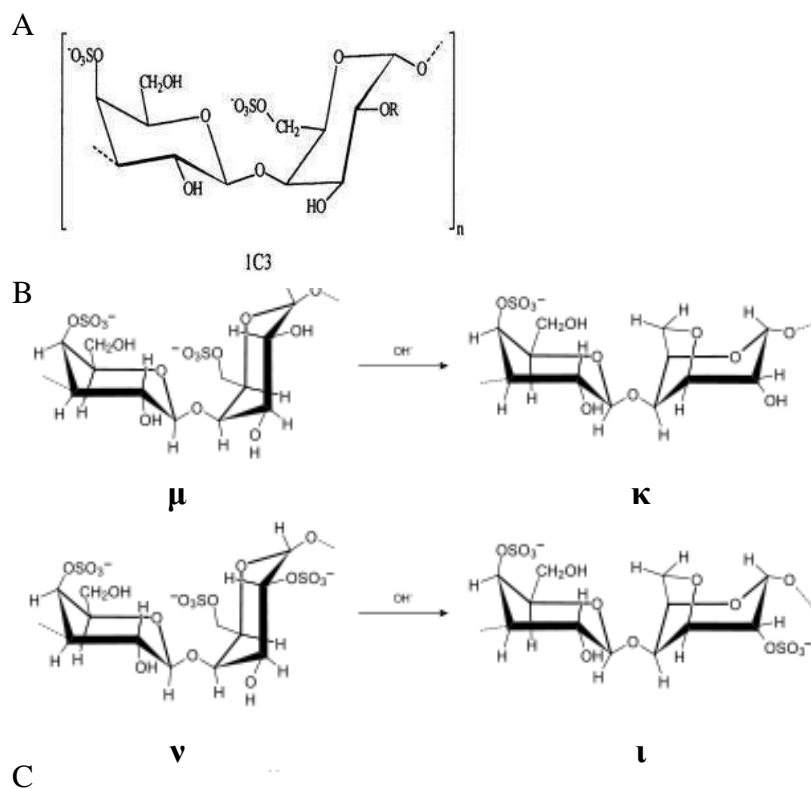
Para la selección de variantes de HSV-2 cepa MS se utilizaron los CGNs κ e ι , que vienen del ciclado de μ y ν respectivamente, por su similitud estructural con 1C3, híbrido μ/ν parcialmente ciclado, (Figura 7) con el cual se obtuvieron las variantes de HSV-1. Se eligió trabajar con CGNs comerciales, evitando con ello realizar los procesos de extracción, fraccionamiento y tratamiento alcalino empleado anteriormente para la obtención de 1C3.

2. Actividad Citotóxica, Antiviral y Virucida de los carragenanos in vitro

Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos en células Vero se midió la viabilidad celular por exclusión de azul Tripan luego de 48 h de incubación con distintas concentraciones de los CGNs. No se observó citotoxicidad hasta una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ para el CGN ι , mientras que el CGN κ mostró un valor de CC_{50} de 423,3 $\mu\text{g/ml}$. A fin de evaluar su mecanismo selectivo de acción, se calculó el índice de selectividad (IS) que es la relación $\text{CC}_{50}/\text{CI}_{50}$ (Tabla 6).

La actividad antiviral fue determinada para los CGNs ι y κ , contra HSV-2 MS, por el método de reducción en el número de placas virales. Estos CGNs mostraron ser potentes inhibidores de HSV-2 con un valor de CI_{50} menor a 0,30 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 6).

Para investigar la posibilidad de que los CGNs actúen directamente sobre la partícula viral, se definió la actividad virucida. Se observaron valores similares de (CV_{50}) para ambos CGNs. Mostrando ser superior a sus correspondientes CI_{50} , minimizando de esta manera su capacidad virucida (Tabla 6).



Carragenano	Tipo	PM (KD)	Sulfatación
1C3	Híbrido μ/ν parcialmente ciclado	198	33,6%
Kappa	κ	296	25-29%
Iota	ι	717,6	40-42%

Figura 7: Estructura química de los carragenanos. A) Carragenano 1C3 (híbrido μ/ν parcialmente ciclado), B) Carragenanos κ e ι , que vienen del ciclado de μ y ν respectivamente, C) Características químicas de los carragenanos 1C3, κ e ι .

Carragenano	CI50 (µg/ml)	CV50 (µg/ml)	CC50 (µg/ml)	IS (CC ₅₀ /CI ₅₀)
κ	0,15±0,01	2,38±0,10	423,33±10	2822
ι	0,27±0,01	2,11±0,10	>1000	>3703

Tabla 6: Actividad antiviral, virucida y citotóxica de carragenanos Kappa e Iota. Todos los ensayos se realizaron sobre células Vero. Para los ensayos de actividad antiviral y virucida se utilizó el virus HSV-2 (MS), los mismos se determinaron por el método de reducción del número de Placas. La concentración citotóxica 50% se determinó por el método de exclusión de azul tripan. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes ± D.E

3. Efecto Antiviral de los carragenanos in Vivo

Resultados previos demostraron el efecto antiviral de 1C3 en una infección con HSV-1 por vía intraperitoneal (Hamashuna y col., 1993, Pujol y col., 2005). Con el fin de confirmar la acción antiviral de los CGNs ι y κ por una vía mucosa de inoculación, se utilizaron animales BALB/c infectados por vía intranasal con HSV-2 (MS), colocando inmediatamente después de la infección, por la misma vía, el CGN a ensayar (5mg/kg de animal). Se utilizó un grupo control de ratones donde se reemplazó el CGN por PBS. Se monitorearon los síntomas de los animales y el tiempo de sobrevida. En paralelo, se determinó el título viral de la suspensión utilizada, para corroborar la carga viral del inóculo.

Grupo	Morbilidad (%)	Mortalidad (%)	Día de Muerte
HSV-2 +PBS	5 / 5 (100)	5 / 5 (100)	13 ± 1
HSV-2 + κ	5 / 5 (100)	4 / 5 (80)	11 ± 2
HSV-2 + ι	3 / 5 (60)	2 / 5 (40)	9 ± 1

Tabla 7. Ensayo antiviral de carragenanos kappa e Iota in vivo. Hembras BALB/c de 6-8 semanas de edad, se infectaron por vía intranasal con 2×10^5 UFP de HSV-2 (MS). Inmediatamente después se inóculó al ratón con el carragenano por la misma vía (5mg/kg ratón). Se monitorearon los síntomas de los animales y el tiempo de sobrevida durante dos semanas.

Como se puede observar en la Tabla 7, el CGN κ no disminuyó la morbilidad y protegió solo un 20%, en cambio el CGN ι logró una disminución del 40 % en la enfermedad y protegió un 60% cuando se empleó solo una dosis de CGN.

4. Selección y clonado de Variantes de HSV-2

Para estudiar el efecto del tratamiento prolongado con los CGNs, se realizaron pasajes del virus HSV-2 cepa MS sobre células Vero, en presencia de concentraciones crecientes de los CGNs ι y κ como se describe en Materiales y Métodos, (Tablas 8 y 9). Se observó que al ir aumentando en número de pasajes el tiempo necesario para obtener efecto citopático era mayor (de 24 a 80 h, aproximadamente). Asimismo, como control se realizaron pasajes sucesivos de HSV-2 en las mismas condiciones pero en ausencia de droga.

Para evaluar el patrón de resistencia generada por los CGNs, se repitió el ensayo de selección de variantes utilizando aciclovir (ACV), con el mismo procedimiento de pasajes sucesivos de HSV-2 en células Vero. En este caso, la CI_{50} aumentó muy rápidamente en los primeros pasajes y la resistencia relativa se vio incrementada notablemente llegando a un valor de RR: 52 en el pasaje 6, poniéndose de manifiesto la aparición de resistencia en escasos pasajes.

Como se muestra en las Tablas 8 y 9, el virus fue cambiando su efecto citopático a medida que fue aumentando la concentración del carragenano en cada pasaje. Este cambio resultó de forma gradual y variable, oscilando entre redondeamiento celular (efecto citopático característico de HSV), rosetas (acúmulos celulares) y sincicios (formación de células multinucleadas por fusión de células contiguas infectadas). Para ambos CGNs se observó un fenotipo 100% syn a partir del pasaje 18. Sin embargo, para la cepa parental sólo se observó un 10% de sincicios después de igual números de pasajes en ausencia de drogas.

Para estudiar mejor las variaciones producidas en HSV-2 por los pasajes seriados en presencia de los CGNs, se aislaron 15 clones de cada tratamiento con ι y κ , a partir del pasaje 22.

N° pasaje	Concentración ι ($\mu\text{g/ml}$)	Tiempo (h)	Título (UFP/ml)	CI ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) (RR) Efecto citopático
0	-	24	$4,0 \times 10^5$	$0,27 \pm 0,01$
1	0,14	24	$2,0 \times 10^6$	R
2	0,20	30	$2,3 \times 10^6$	R
3	0,27	30	$5,6 \times 10^7$	R
4	0,27	48	$2,7 \times 10^8$	$0,31 \pm 0,02$ (1,2) Syn
5	0,30	26	$4,3 \times 10^7$	$0,27 \pm 0,02$ (1) Syn
6	0,33	27	$4,2 \times 10^7$	R
7	0,37	48	$4,6 \times 10^7$	R
8	0,47	24	$2,1 \times 10^7$	Syn
9	0,55	58	$7,7 \times 10^6$	Syn
10	0,65	48	$1,9 \times 10^7$	Syn
11	0,75	48	$1,0 \times 10^8$	Syn
12	0,90	43	$2,7 \times 10^8$	Syn
13	1,1	48	$2,6 \times 10^7$	Syn
14	1,3	48	$2,5 \times 10^6$	Syn
15	1,5	45	$6,3 \times 10^7$	Syn
16	1,9	44	$3,4 \times 10^7$	Syn
17	2,4	52	$2,5 \times 10^5$	R
18	3,8	52	$2,5 \times 10^3$	Ros
19	7,6	50	$3,3 \times 10^6$	Syn
20	15,2	80	$2,5 \times 10^5$	Syn
21	30,4	52	$3,7 \times 10^6$	Syn
22	60,8	48	$3,3 \times 10^5$	Syn

Tabla 8: Pasajes de HSV-2 en presencia del CGN ι . Se realizaron 22 pasajes del virus HSV-2 (MS) sobre células Vero en presencia de concentraciones crecientes del CGN ι . Se determinó el tiempo de ataque viral, el título viral por plaqueo directo, la susceptibilidad al carragenano de origen (ι) calculando la CI₅₀ y la resistencia relativa RR: (CI₅₀pasaje/CI₅₀MS) y el efecto citopático de los pasajes donde R: redondeamiento celular, Syn: sincicios, Ros: rosetas.

N° pasaje	Concentración κ ($\mu\text{g/ml}$)	Tiempo (h)	Título (UFP/ml)	CI ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)(RR) Efecto Citopático
0	-		$4,0 \times 10^5$	$0,15 \pm 0,01$ R
1	0,08	24	$2,0 \times 10^6$	R
2	0,12	30	$5,3 \times 10^5$	R
3	0,15	24	$1,8 \times 10^6$	R
4	0,15	48	$2,0 \times 10^7$	$0,15 \pm 0,02$ (1) Syn
5	0,20	24	$1,6 \times 10^8$	$0,15 \pm 0,01$ (1) Syn
6	0,25	27	$3,5 \times 10^7$	R
7	0,30	24	$1,3 \times 10^8$	R
8	0,40	24	$7,0 \times 10^7$	R
9	0,50	28	$2,8 \times 10^8$	R
10	0,60	48	$1,9 \times 10^7$	Ros
11	0,70	48	$2,0 \times 10^8$	$0,98 \pm 0,10$ (6,5) Ros
12	0,90	52	$3,5 \times 10^5$	$1,31 \pm 0,19$ (8,7) Ros
13	1,1	48	$2,3 \times 10^6$	Ros
14	1,3	48	$3,5 \times 10^7$	Ros
15	1,5	45	$2,9 \times 10^6$	Ros
16	1,9	26	$6,8 \times 10^6$	R
17	2,4	48	$4,6 \times 10^6$	R
18	3,8	52	$2,5 \times 10^3$	Ros
19	7,6	50	$1,6 \times 10^4$	Syn
20	15,2	80	$1,8 \times 10^5$	Syn
21	30,4	52	$1,4 \times 10^6$	Syn
22	60,8	48	$3,3 \times 10^5$	Syn

Tabla 9: Pasajes de HSV-2 en presencia del CGN κ . Se realizaron 22 pasajes del virus HSV-2 (MS) sobre células Vero en presencia de concentraciones crecientes del CGN κ . Se determinó el tiempo de ataque viral, el título viral por plaqueo directo, la susceptibilidad al carragenano de origen (κ) calculando la CI₅₀, y la resistencia relativa RR: (CI₅₀Pasaje/CI₅₀MS) y el efecto citopático de los pasajes donde R: redondeamiento celular, Syn: sincicios, Ros: rosetas.

5. Preselección de los clones

Cada clon fue amplificado en células Vero, las correspondientes suspensiones virales fueron tituladas y se determinó el efecto citopático que producían. Por otro lado, se procedió a determinar la CI_{50} del carragenano que le dio origen y del ACV, en monocapas de células Vero, para cada una de las variantes (Tablas 10 y 11). Además se determinó la resistencia relativa (RR) de cada clon. Como control se empleó la cepa MS y el pasaje 22 del virus en ausencia de CGN (MSpc22). Todos los clones mostraron un fenotipo sincicial.

Clones	Título (UFP/ml)	CI_{50} ι (RR)	CI_{50} ACV (RR)
ι 22-1	$3,1 \times 10^7$	$0,60 \pm 0,02$ (3,1)	$2,00 \pm 0,10$ (2,0)
ι 22-2	$3,4 \times 10^7$	$0,80 \pm 0,02$ (4,2)	$1,20 \pm 0,20$ (1,5)
ι 22-3	$3,5 \times 10^7$	$1,20 \pm 0,01$ (6,3)	$3,90 \pm 0,10$ (5,0)
ι 22-4	$1,9 \times 10^7$	$1,80 \pm 0,20$ (9,4)	$3,90 \pm 0,20$ (5,0)
ι 22-5	$5,0 \times 10^7$	$1,50 \pm 0,10$ (7,9)	$2,50 \pm 0,12$ (3,2)
ι 22-6	$2,0 \times 10^7$	$1,70 \pm 0,20$ (8,9)	$2,80 \pm 0,20$ (3,5)
ι 22-7	$7,2 \times 10^7$	$1,40 \pm 0,10$ (7,3)	$3,90 \pm 0,30$ (5,0)
ι 22-8	$4,6 \times 10^7$	$1,60 \pm 0,20$ (8,4)	$3,90 \pm 0,10$ (5,0)
ι 22-9	$5,4 \times 10^7$	$1,98 \pm 0,03$ (10,4)	$1,39 \pm 0,20$ (2,0)
ι 22-10	$5,8 \times 10^7$	$1,50 \pm 0,20$ (7,8)	$1,20 \pm 0,10$ (2,0)
ι 22-11	$3,0 \times 10^7$	$1,25 \pm 0,12$ (6,5)	$1,25 \pm 0,15$ (1,6)
ι 22-12	$6,3 \times 10^7$	$0,60 \pm 0,04$ (3,2)	$6,89 \pm 0,20$ (8,5)
ι 22-13	$7,6 \times 10^7$	$0,50 \pm 0,10$ (2,6)	$2,50 \pm 0,14$ (3,0)
ι 22-14	$1,7 \times 10^7$	$0,87 \pm 0,12$ (4,5)	$1,20 \pm 0,13$ (1,5)
ι 22-15	$3,4 \times 10^6$	$1,10 \pm 0,10$ (5,7)	$0,79 \pm 0,10$ (1,0)
MSpc22	$3,1 \times 10^8$	$0,23 \pm 0,10$ (1,2)	$0,80 \pm 0,02$ (1,0)
HSV-2 (MS)	$9,0 \times 10^5$	$0,19 \pm 0,08$	$0,78 \pm 0,03$

Tabla 10: Preselección de clones ι . Se calculó el título viral de cada clon y se determinó la susceptibilidad de los clones contra el carragenano de origen (ι) y el ACV por plaqueo directo, se calculó la resistencia relativa (RR) como la relación ($CI_{50} \text{clon} / CI_{50} \text{MS}$). Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes, \pm D.E.

Clones	Título (UFP/ml)	CI ₅₀ κ (RR)	CI ₅₀ ACV (RR)
κ22-1	6,6x10 ⁶	0,30±0,01 (1,5)	1,98±0,12 (2,4)
κ22-2	6,6x10 ⁷	0,50±0,03 (2,6)	2,50±0,10 (3,0)
κ22-3	1,0x10 ⁸	0,70±0,02 (3,6)	3,96±0,21 (5,0)
κ22-4	7,2x10 ⁷	0,45±0,12 (2,3)	7,11±0,12 (8,5)
κ22-5	1,4x10 ⁸	0,80±0,20 (4,2)	3,90±0,01 (5,0)
κ22-6	5,0x10 ⁷	0,60±0,10 (3,1)	2,20±0,20 (2,8)
κ22-7	4,8x10 ⁸	0,54±0,25 (2,8)	1,50±0,30 (1,9)
κ22-8	1,3x10 ⁵	0,70±0,10 (3,6)	1,78±0,09 (3,0)
κ22-9	4,2x10 ⁷	1,20±0,03 (6,3)	2,50±0,06 (3,0)
κ22-10	7,6x10 ⁷	0,90±0,20 (4,7)	5,10±0,20 (6,0)
κ22-11	1,1x10 ⁸	0,60±0,12 (3,1)	2,50±0,03 (3,0)
κ22-12	5,0x10 ⁷	1,20±0,09 (6,3)	1,42 ±0,05 (1,8)
κ22-13	7,0x10 ⁷	1,23±0,05 (6,4)	6,77±0,08 (8,7)
κ22-14	6,2x10 ⁸	0,90±0,10 (4,7)	4,50±0,20 (5,7)
κ22-15	1,4x10 ⁸	1,13±0,12 (5,4)	3,96±0,08 (5,0)
MSpc22	3,1x10 ⁸	0,22±0,01 (1,1)	0,80±0,02 (1,0)
HSV-2 (MS)	9,2x10 ⁵	0,19±0,08	0,78±0,03

Tabla 11: Preselección de clones κ. Se calculó el título viral de cada clon y se determinó la susceptibilidad de los clones contra el carragenano de origen (κ) y el ACV por plaqueo directo, se calculó la resistencia relativa (RR) como la relación (CI₅₀clon/ CI₅₀MS). Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes ± D.E.

6. Susceptibilidad de las variantes virales a distintos compuestos

Se eligieron 4 clones, ι22-9, ι22-12, κ22-12 y κ22-13, cuyo efecto citopático se muestra en la Figura 8. Los mismos presentaron características distintas de resistencia tanto al CGN que le dio origen como al ACV. Al ensayar la susceptibilidad de los mismos a distintos compuestos (Tabla 12), pudimos observar que ningún clon fue resistente a la heparina mientras que todos los clones mostraron diferentes niveles de resistencia a su CGN parental (RR entre 1,5-10,4). Estos resultados demuestran que el fenotipo syn de las variantes no estaría relacionado con el nivel de susceptibilidad al CGN que le dio origen.

Respecto a los antivirales comerciales el clon ι 22-12 mostró valores altos de resistencia relativa para ACV y PFA de 8,8 y 14,7 respectivamente, sin embargo, el clon κ 22-13 solo mostró alto valor de RR al ACV (8,6). A pesar de la RR para el ACV de ambos clones, no se encontró ningún cambio en la secuencia del gen de TK (datos no mostrados). Se detectó baja RR al PFA y al ACV con κ 22-12 (1,8 y 2,2 respectivamente) y ι 22-9 (3,4 y 1,7 respectivamente). Mientras que el pasaje 6 de MS con ACV (ACVp6MS), de fenotipo no sincicial, solo mostró valores altos de RR al compuesto que le dio origen (ACV) y al PFA, RR: 52 y 12 respectivamente, sin mostrar resistencia a los CGNs.

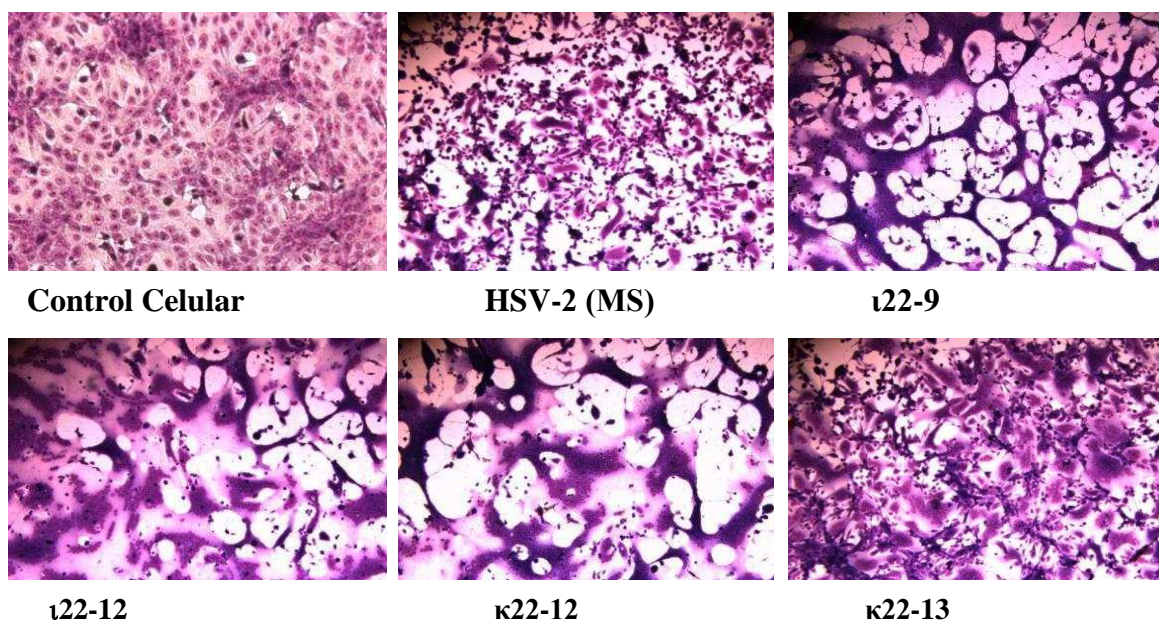


Figura 8: Efecto citopático de los clones seleccionados. Células Vero crecidas sobre vidrios se infectaron con los distintos clones virales utilizando una m.i.: 1. A las 24h post-infección las células se fijaron con metanol frío y se tiñeron con Giemsa. Aumento 100X.

Virus	CI ₅₀ (RR)				
	Kappa	Iota	Heparina	ACV	PFA
HSV-2 (MS)	0,19±0,08	0,19 ± 0,03 (9,1)	0,81 ± 0,04	0,78 ±0,02	1,02± 0,10
κ22-12	1,20 ± 0,09 (6,3)	0,30 ± 0,05 (1,5)	0,83± 0,05 (1,0)	1,42± 0,03 (2,2)	1,83±0,02 (1,8)
κ22-13	1,23 ± 0,05 (6,4)	0,30 ± 0,02 (1,5)	0,60 ± 0,03 (0,7)	6,77 ± 0,09 (8,6)	3,62 ± 0,16 (3,5)
ι22-9	0,60 ± 0,07 (3,2)	1,98± 0,03 (10,4)	1,59 ±0,02 (1,9)	1,39 ±0,05 (1,7)	3,46 ± 0,11 (3,4)
ι22-12	0,60 ± 0,07 (3,2)	0,60 ± 0,04 (3,2)	0,80 ± 0,09 (0,9)	6,89 ± 0,09 (9,3)	15,0 ± 0,10 (9,3)
ACV-p6Ms	0,17±0,10 (1,0)	0,15±0,30 (1,0)	0,60±0,10 (1,0)	40,8±0,10 (52)	12,2±0,20 (12)

Tabla 12: Susceptibilidad de los clones a distintos compuestos con actividad antiherpética. Se determinó la susceptibilidad de los clones contra los distintos compuestos por plaqueo directo y se calculó la resistencia relativa (RR) como la relación (CI₅₀clon/ CI₅₀MS). Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes ± DE.

7. Replicación Viral en Células Vero

Para conocer si el fenotipo syn de las variantes se encuentra relacionado con la replicación viral, se realizó una curva de crecimiento de un ciclo para todas las variantes y la cepa parental. Como puede observarse en la Figura 9, todos los clones replicaron de modo similar que al control viral en células Vero, alcanzando valores de 10⁸ UFP/ml. Por el contrario, cuando se ensayó la multiplicación en cultivos primarios de astrocitos murinos, los clones ι22-12 y κ22-13 y ACVp6MS mostraron una marcada alteración en su replicación, alcanzando títulos que no excedieron de 2x10² UFP/ml a las 24 h p.i. sin embargo, la cepa parental alcanzó valores en el orden de 10⁴ UFP/ml (Figura 10). Un comportamiento intermedio se observó para los demás clones. Las variantes mantuvieron su fenotipo syn en cultivos de astrocitos murinos.

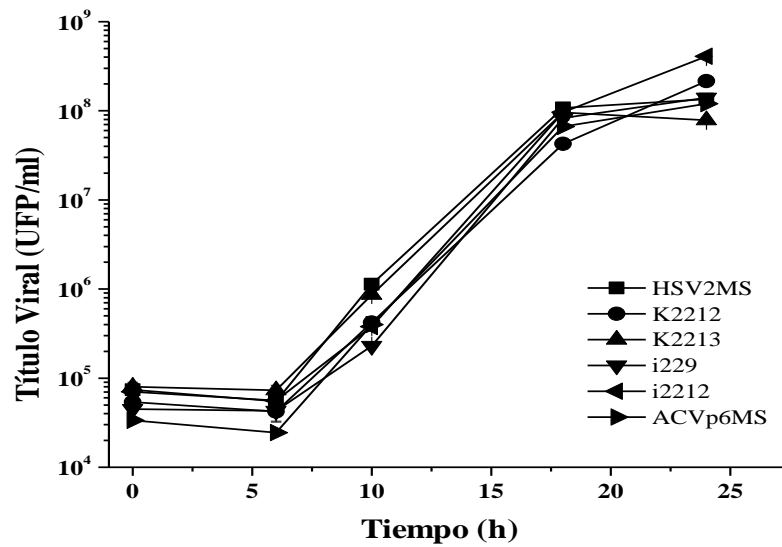


Figura 9: Cinética de replicación viral en células Vero. Monocapas de células Vero crecidas en placas de 24 pocillos se infectaron con las distintas variantes de HSV-2, utilizando una m.i.: 0,1. A distintos tiempos post-infección las monocapas se congelaron y descongelaron dos veces y luego se determinó el título viral de los sobrenadantes por plaqueo directo. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes \pm D.E.

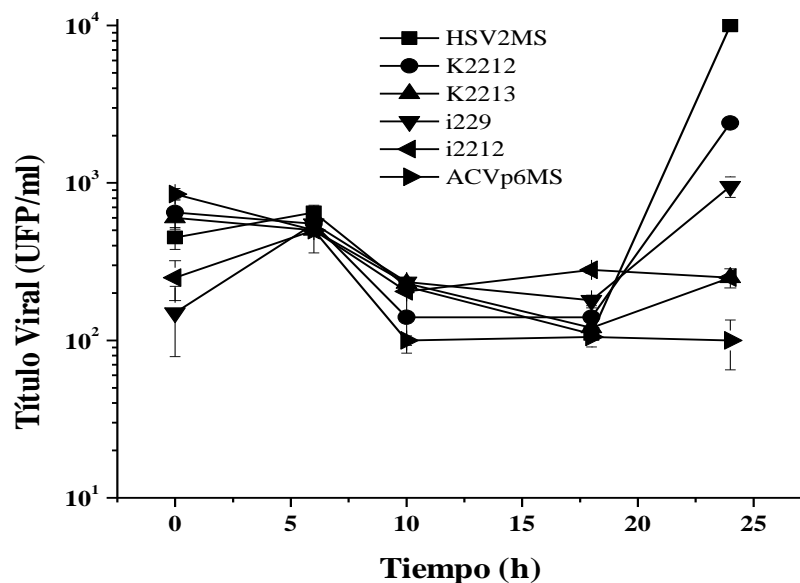


Figura 10: Cinética de replicación viral en Astrocitos Murinos. Cultivos de astrocitos murinos crecidos en placas de 24 pocillos se infectaron con las distintas variantes de HSV-2, utilizando una m.i.: 0,1. A distintos tiempos post-infección los cultivos se congelaron y descongelaron dos veces y luego se determinó el título viral de los sobrenadantes por plaqueo directo. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes \pm D.E.

8. Efecto de la Melitina y Ciclosporina A

Se realizó un estudio preliminar de las posibles mutaciones responsables del fenotipo syn en las variantes. Para ello se utilizaron dos inhibidores de la formación de syn inducidos por HSV. La Ciclosporina A inhibe los sincicios si la mutación responsable del fenotipo no se encuentra en la región citoplasmática de la glicoproteína B (gB), mientras que la Melitina bloquea la formación de sincicios si la mutación responsable se encuentra en la glicoproteína K (gK).

Como podemos observar en la Tabla 13, los clones presentaron variada susceptibilidad a los distintos inhibidores. Para el clon κ 22-12 el efecto syn fue inhibido por la Melitina pero no por la Ciclosporina A, lo que estaría indicando mutaciones en gB y gK. Para el clon κ 22-13 el fenotipo syn fue inhibido por ambos compuestos lo que indicaría mutaciones en gK. Mientras que para ι 22-9 y ι 22-12, el fenotipo syn fue inhibido por la Ciclosporina A pero no por la Melitina, indicando que las mutaciones responsables del efecto syn no estarían ni en gB ni en gK, y que podrían estar involucrados otros genes como UL20 ó UL24.

Virus	Efecto Citopático viral		
	Melitina	Ciclosporina A	Control
HSV-2 (MS)	R	R	R
κ 22-12	R	S	S
κ 22-13	R	R	S
ι 22-9	S	R	S
ι 22-12	S	R	S

Tabla 13. Efecto de la Ciclosporina A y la Melitina sobre la formación de sincicios. Monocapas de células Vero confluentes crecidas en placas de 6 pocillos se infectaron con 100 UFP/pocillo. Los ensayos se realizaron por duplicado. Luego de 1h a 37°C, se retiró el inóculo y se cubrió con MMmet conteniendo Ciclosporina A o Melitina, 100 y 1 μ M respectivamente. Luego de 48h de incubación a 37°C, se cuantificaron las placas virales y se determinó el porcentaje de placas no syn. R: redondeamiento celular, S: sincicios.

9. Replicación viral en macrófagos

Se definió la susceptibilidad de los macrófagos a la infección. Para ellos se infectaron macrófagos murinos RAW 264.7 con las variantes de HSV-2 (m.i.: 0,1). A las 24 y 48 h p.i. se titularon los sobrenadantes de cada virus. Como se puede observar en la Figura 11, la cepa patrón MS así como la variante ACVp6MS, replicaron en macrófagos alcanzando valores de título viral del orden de 10^6 UFP/ml a las 24 h y disminuyendo un orden de magnitud a las 48 h, conservando su característico efecto citopático de redondeamiento celular. Por el contrario, se observó que las variantes ι 22-12, κ 22-12 y κ 22-13, replicaron de forma similar entre sí, con pequeñas variaciones alcanzando a las 24h valores de título viral en el orden de 10^5 UFP/ml, y aumentando su título viral a las 48 h p.i., con valores cercanos a 10^6 UFP/ml. La variante ι 22-9 presentó valores ligeramente mayores a las otras variantes syn, en el orden de 10^6 y 10^7 UFP/ml, a las 24 y 48h respectivamente, todas las variantes mantuvieron su fenotipo syn. Estos resultados se asemejan a los observados anteriormente con las variantes de HSV-1 tanto en macrófagos peritoneales, como en células RAW 264.7.

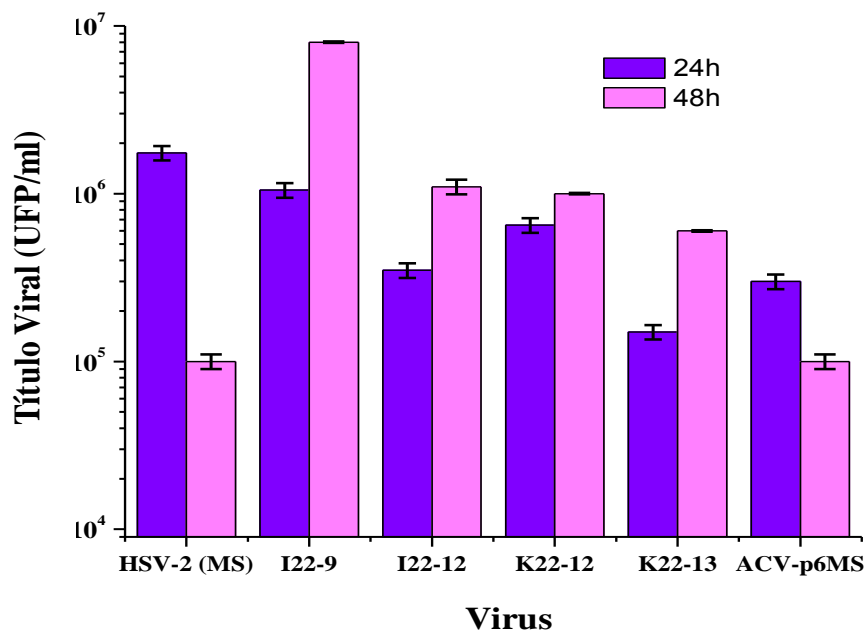


Figura 11. Replicación de las variantes en células RAW 264.7. Monocapas de células RAW 264.7 se infectaron con HSV-2 y sus variantes, utilizando una m.i. de 0,1. A las 24 y 48h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por plaqueo directo. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes \pm D.E.

10. Estudio patogénico de las variantes Virales de HSV-2

Al igual que para las variantes de HSV-1, se evaluó la virulencia de las variantes de HSV-2 en dos modelos experimentales infectando por distintas vías mucosa: intravaginal e intranasal, con el fin de reproducir las rutas naturales de entrada del virus. Para ello, se emplearon dos cepas de ratones hembras, BALB/c y C57BL/6. Luego de la infección se examinaron diariamente los signos de infección aguda y enfermedad neurológica. La virulencia de las variantes difirió notablemente de la cepa parental MS cuando se consideró la mortalidad y el tiempo de sobrevida. MS mostró ser virulenta en ratones BALB/c inoculados por vía intravaginal, con un 100% de mortalidad y un tiempo de sobrevida de 8 días p.i., (Tabla 14 y Figura 12). Sin embargo en el caso de las variantes derivadas del CGN ι , la mortalidad se redujo a 40 y 20 % para ι 22-9 y ι 22-12, respectivamente. Con respecto a los derivados del CGN κ , sólo κ 22-13 mostró una marcada diferencia con la cepa patrón con un 40 % de mortalidad, mientras que se observó una escasa diferencia de mortalidad con κ 22-12 (80%) en comparación con MS. La variante ACVp6MS también redujo su virulencia produciendo un 40% de mortalidad en estos animales; Resumiendo, todos los clones redujeron su virulencia y provocaron un retraso en el día de muerte de los ratones (Tabla 14, Figura 12).

Virus	Vía Intravaginal BALB/c		
	Morbilidad (%)	Mortalidad (%)	Tiempo de sobrevida (días)
HSV-2 (MS)	100	100	8±1
κ 22-12	80	80	13±1
κ 22-13	60	40	9±1
ι 22-9	80	40	11±1
ι 22-12	60	20	13±1
ACVp6MS	60	40	9±1

Tabla 14. Virulencia de variantes de HSV-2 en ratones BALB/c por vía intravaginal. Grupos de 6-10 hembras BALB/c de 7-8 semanas de edad se infectaron por vía intravaginal con 5×10^5 UFP/animal, (inóculo: 20 μ l). Los animales se monitorearon diariamente por dos semanas, se registró la morbilidad y mortalidad y se calcularon los porcentajes correspondientes en cada caso respecto al control MS.

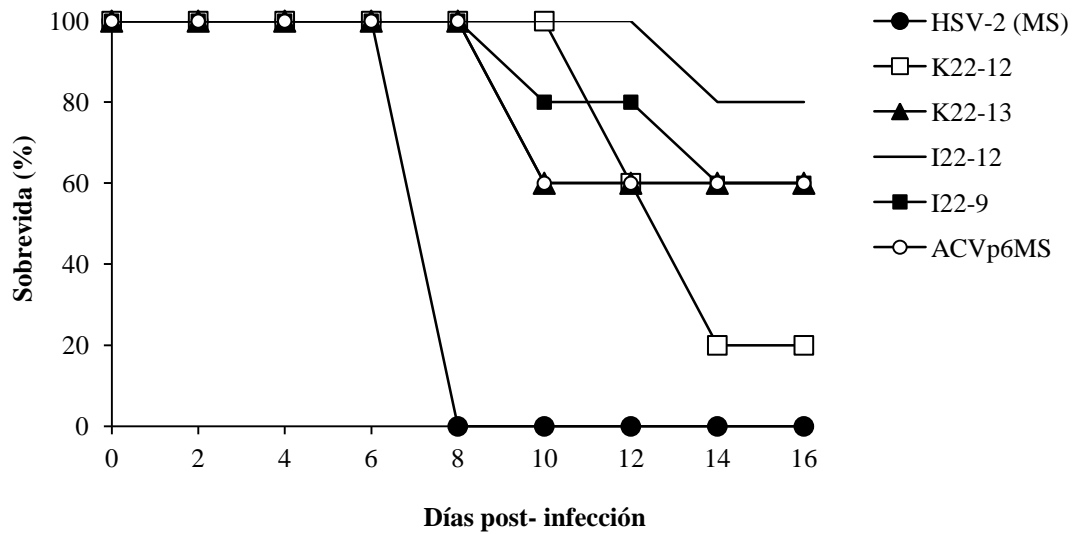


Figura 12. Supervivencia (%) de ratones BALB/c infectados por vía intravaginal. Los animales infectados se monitorearon diariamente durante dos semanas y se registró el día de muerte de cada animal. Los datos se graficaron siguiendo un modelo similar Kaplan-Meier.

Para los ratones C57BL/6 inoculados por vía intravaginal, con las cepas κ 22-13 y ι 22-12 no se registraron muertes, mientras las cepas κ 22-12 y ι 22-9 mostraron una disminución de la mortalidad de 40 y 20 %, respectivamente en comparación con la cepa parental (Tabla 15 y Figura 13). A pesar de estas diferencias, se detectó similar cantidad de virus infectivo se detectó en lavados vaginales en ambas cepas de animales infectadas con las variantes y con el control viral al día 2 p.i. (Figura 14).

Cuando la inoculación se realizó por vía intranasal, la mortalidad decreció a 20 % para κ 22-13 y ι 22-12, mientras que κ 22-12 resultó avirulenta por esta vía, alcanzando 100 % de supervivencia. Sorpresivamente, ι 22-9, mostró pocas diferencias en la mortalidad en comparación con el virus control por vía intranasal (Tabla 15 y Figura 15).

Virus	Intravaginal C57BL/6			Intranasal C57BL/6		
	Morbilidad (%)	Mortalidad (%)	Tiempo de sobrevida (días)	Morbilidad (%)	Mortalidad (%)	Tiempo de sobrevida (días)
HSV-2 MS	100	80	13±1	100	100	8±1
κ22-12	80	40	13±1	20	0	sobrevida
κ22-13	20	0	sobrevida	20	20	9±1
ι22-9	40	20	13±1	100	80	9±1
ι22-12	0	0	sobrevida	20	20	11±1
ACVp6MS	60	20	14±1	20	0	sobrevida

Tabla 15. Virulencia de variantes de HSV-2 en ratones C57BL/6. Grupos de 6-10 hembras BALB/c de 7-8 semanas de edad se infectaron por vía intravaginal e Intranasal con 5×10^5 UFP/animal, (inóculo: 20μl). Los animales se monitorearon diariamente por dos semanas. Se registró la morbilidad y mortalidad y se calcularon los porcentajes correspondientes en cada caso respecto al control.

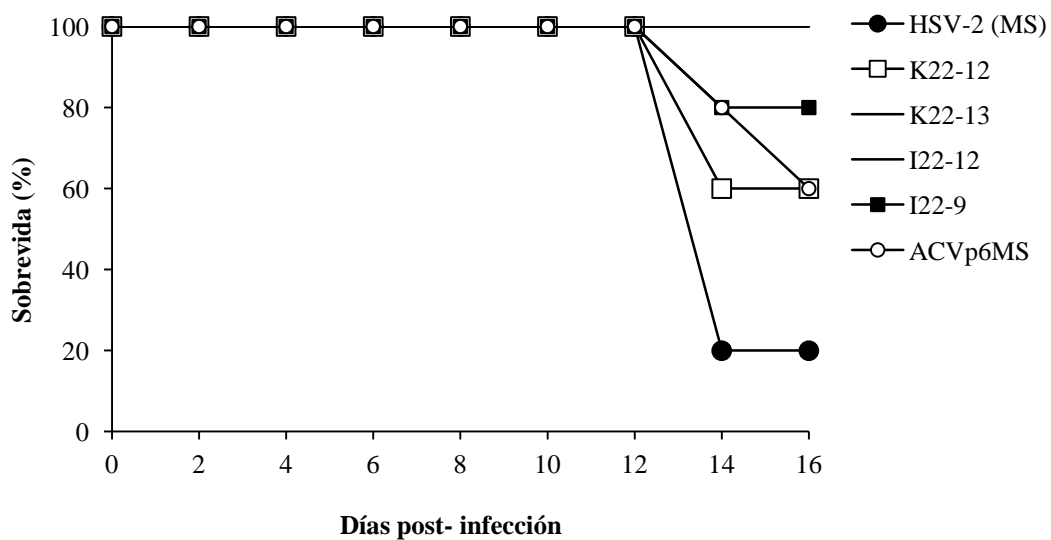


Figura 13. Sobrevida (%) de ratones C57BL/6 infectados por vía intravaginal. Los animales infectados se monitorearon diariamente por dos semanas y se registró el día de muerte de cada animal. Los datos se graficaron siguiendo un modelo similar Kaplan-Meier.

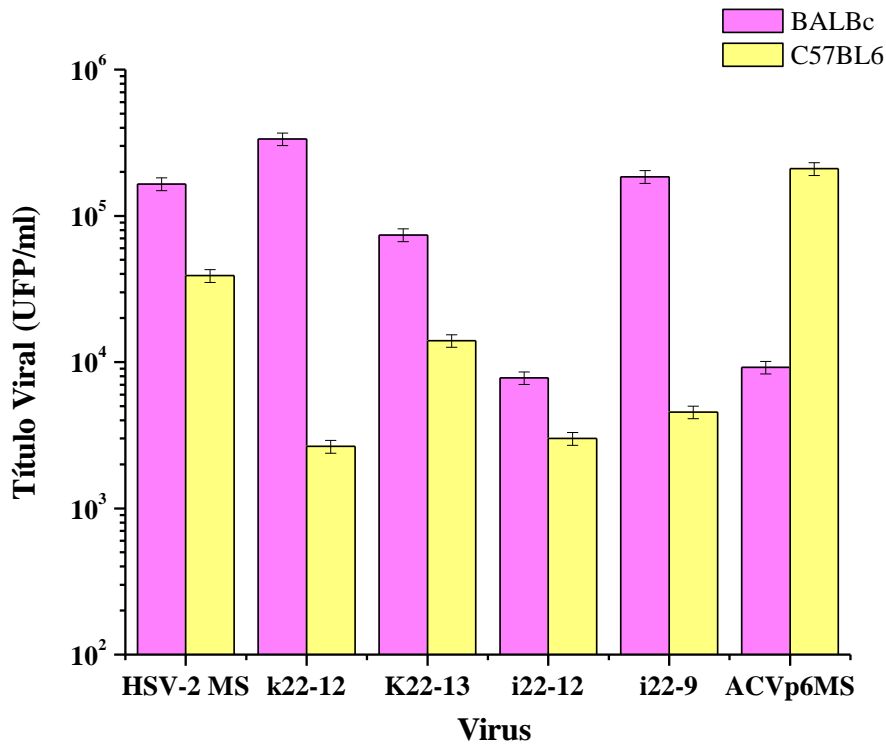


Figura 14. Carga viral en lavados vaginales. Los lavados vaginales se recolectaron de hembras BALB/c y C57BL/6 infectadas por vía intravaginal, a los 3 días p.i. El título viral se determinó por plaqueo directo. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes \pm D.E.

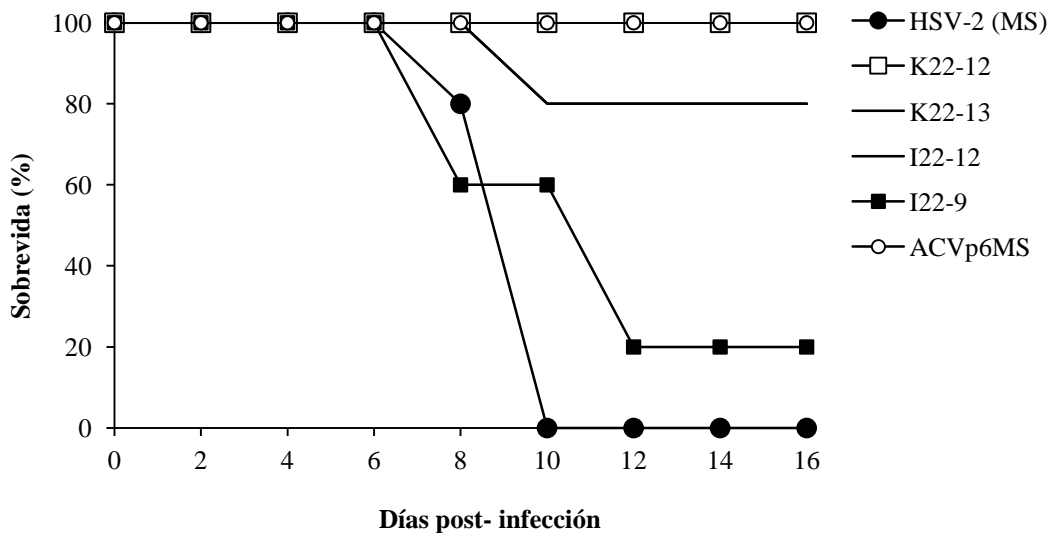


Figura 15. Sobrevida (%) de C57BL/6 infectados por vía intranasal. Los animales infectados se monitorearon diariamente durante dos semanas y se registró el día de muerte de cada animal. Los datos se graficaron siguiendo un modelo similar Kaplan-Meier.

HSV-2	Intranasal	Intravaginal	
	C57BL/6	C57BL/6	BALB/c
HSV-2 (MS)	3*	4-5	4-5
κ22-12	2	4	3
κ22-13	3	4	3
ι22-9	3	4	3
ι22-12	1	0	3
ACVp6MS	2	4	5

Tabla 16: Sintomatología de la infección en ratones BALB/c y C57BL/6. Los ratones infectados por las distintas vías se monitorearon durante dos semanas, se registraron los síntomas y se clasificaron de la siguiente manera: * nivel de sintomatología: **Infección Intravaginal:** 0) infección inaparente; 1) leve enrojecimiento perivaginal; 2) inflamación y enrojecimiento perivaginal; 3) eritema severo con caída de pelo en el área genital; 4) ulceración severa genital extendiéndose a otros tejidos (patas traseras); 5) enfermedad neurológica. **Infección Intranasal:** 0) infección inaparente; 1) pelos erizados; 2) ojos irritados; 3) lesiones y/o encorvado; 4) disfunciones neurológicas (parálisis patas traseras); 5) Insensibilidad (no responde). Para ambos casos los animales en nivel 5 se sacrificaron.

11. Cuantificación de citoquinas en lavados vaginales

Cuando se analizaron las citoquinas en los lavados vaginales de ratones BALB/c inoculados con las variantes al día 1 y 5 p.i., se observó que los animales presentaron, en general, niveles mayores de citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- α) que la cepa parental MS. Como dato complementario, se encontraron niveles similares de las mismas citoquinas empleando HSV-2 cepa G, con valores de 18,0 pg/ml para IL-6 y 381,5 pg/ml para TNF- α al día 1 p.i.

Todas las variantes virales llegaron a un nivel máximo de IL-6 al día 5 p.i., con valores que oscilaron entre 300 y 800 pg/ml a excepción de ι22-9 que registró un valor más bajo al día 5 p.i. (10 pg/ml). En general, la cepa MS mostró niveles más bajos de IL-6 que los hallados para las variantes virales (excepto para κ22-12 al día 1 p.i. y para ι22-9 al día 5 p.i., que presentaron valores similares a la cepa parental).

Los niveles de TNF- α oscilaron entre 100 y 1100 pg/ml para las variantes virales (Figura 17), alcanzando ι22-12 su nivel máximo el día 5 p.i. con un valor de 1105pg/ml, mientras

que la variante ACVp6MS mostró valores elevados con 1003,3 pg/ml el día 1p.i. y 2220 pg/ml el día 5p.i. Nuevamente, los niveles de esta citoquina, para la cepa patrón fueron inferiores a los de las variantes (10 pg/ml para los días 1 y 5 p.i.), a excepción de k22-12 al día 1 y t22-9 al día 5 p.i. para las que se registró un valor similar.

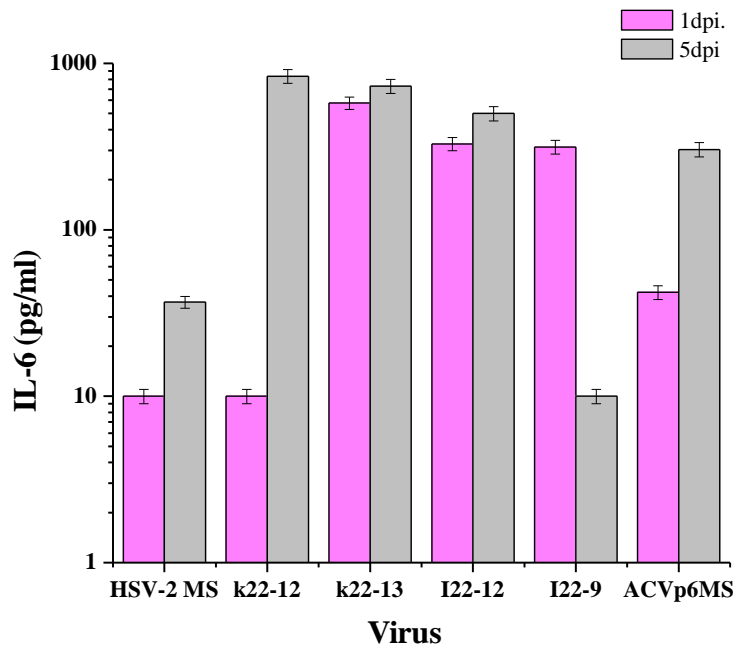


Figura 16. Nivel de IL-6 en lavados vaginales de ratones BALB/c. Los lavados vaginales se recolectaron los días 1 y 5 p.i. de ratones BALB/c infectados por vía intravaginal con las variantes de HSV-2. El valor de IL-6 se determinó por el método de ELISA. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes, \pm D.E.

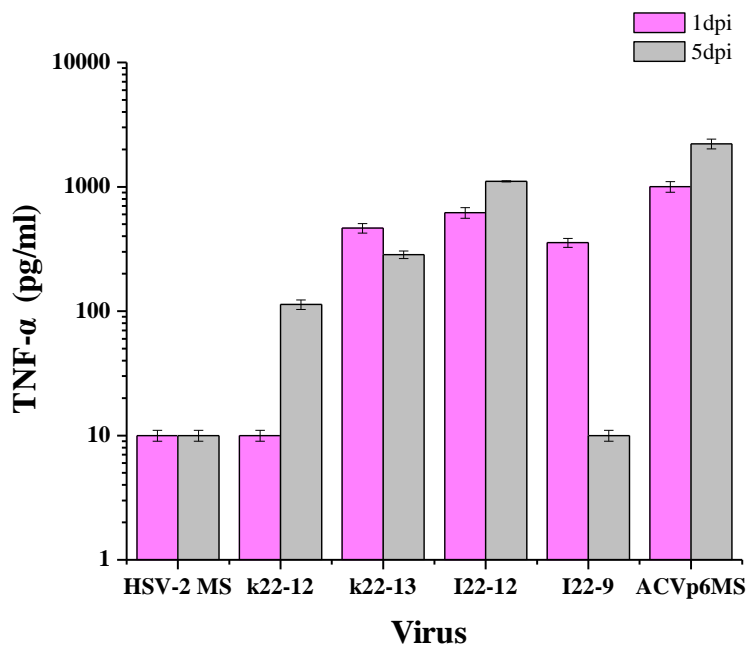


Figura 17. Nivel de TNF- α en lavados vaginales de ratones BALB/c. Los lavados vaginales se recolectaron los días 1 y 5 p.i. de ratones BALB/c infectados por vía intravaginal con las variantes de HSV-2. El valor de TNF- α se determinó por el método de ELISA. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes \pm D.E.

1. Infección Mixta (HSV-1 + HSV-2)

Para definir si la mezcla de las variantes de HSV-1 (1C314-1) y HSV-2 (ι 22-12) avirulentas por vía intravaginal en ratones BALB/c mantenían sus características de atenuación, se realizó una infección mixta empleando un total de 10^6 UFP/ratón. Transcurrido el tiempo de monitoreo, se registró un 60% de morbilidad para la mezcla (1C314-1 + ι 22-12), similar a lo observado por ι 22-12 cuando se la empleó sin 1C314-1 (Tabla 14) y con un 100% de sobrevida, recuperándose los animales enfermos. Mientras que la mezcla de las variantes parentales alcanzaron un 100% de morbilidad provocando un 60% de mortalidad. Estos resultados muestran que la mezcla de variantes syn es estable manteniendo las características de atenuación típicas de las variantes.

Los síntomas observados en los animales enfermos fueron los típicos para una infección con HSV-2, con severo eritema y caída de pelo en la zona perivaginal.

En cuanto al nivel de citoquinas pro-inflamatorias, se observó que los animales infectados con la mezcla de variantes syn presentaron en general valores de citoquinas (IL-6 y TNF- α) menores a los observados para los animales infectados con la mezcla de los virus parentales.

En particular para IL-6, los ratones infectados con las cepas parentales presentaron valores altos cercanos a 300 pg/ml tanto para el día 1 p.i. como el día 5 p.i. Mientras que, para la mezcla de variantes syn, el valor IL-6 del día 1 p.i. fue ligeramente menor al de la mezcla control, sin embargo para el día 5 p.i., IL-6 disminuyó notablemente con un valor cercano a los 10 pg/ml (Figura 18).

Para TNF- α , los ratones infectados con las cepas parentales presentaron valores altos cercanos a los 1000 pg/ml, para los dos tiempos ensayados. Mientras que los animales infectados con la mezcla de variantes syn presentaron valores ligeramente menores a los observados para la mezcla control con 850 pg/ml al día 1 p.i. y 400 pg/ml para el día 5 p.i. (Figura 19).

Teniendo en cuenta los resultados previos para infecciones intravaginales con las variantes de forma individual, pudimos notar que HSV-1 (F) mostró valores elevados de citoquinas pro-inflamatorias respecto a su variante 1C314-1 (Tabla 5). Mientras que HSV-2 (MS) mostró valores muy bajos de citoquinas pro-inflamatorias en relación con su variante ι 22-12 (Figura 16 y 17). Por lo tanto los valores altos de IL-6 y TNF- α presentados por la mezcla de cepas parentales en la infección mixta podrían deberse a la estimulación del sistema inmune innato por componentes de HSV-1(F), mientras que los valores de IL-6 y TNF- α presentados por la mezcla de variantes avirulentas que son menores a los observados en el control pero aún así altos (excepto para IL-6 el día 5 p.i.), podrían deberse a la estimulación del sistema inmune innato por influencia de ι 22-12.

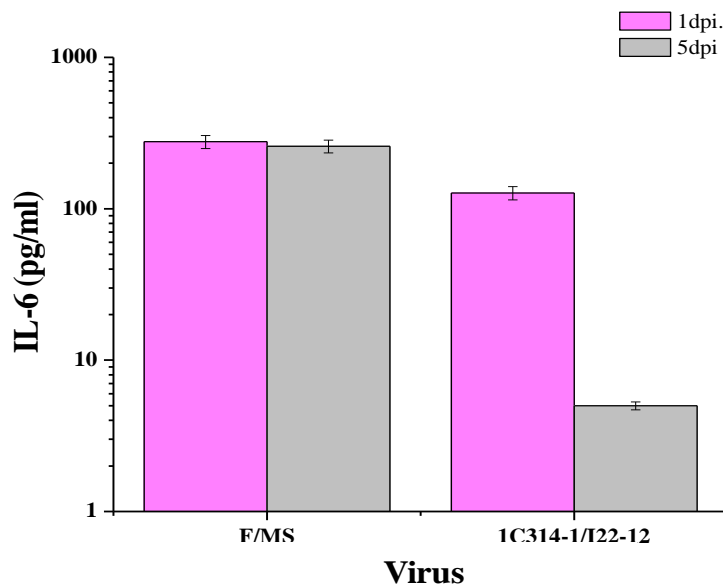


Figura 18. Nivel de IL-6 en lavados vaginales de ratones BALB/c. Los lavados vaginales se recolectaron los días 1 y 5 p.i. de ratones BALB/c infectados por vía intravaginal con la mezcla de variantes avirulentas (1C314-1 + t22-12) y la mezcla de cepas parentales (F + MS). El valor de IL-6 se determinó por el método de ELISA. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes \pm D.E.

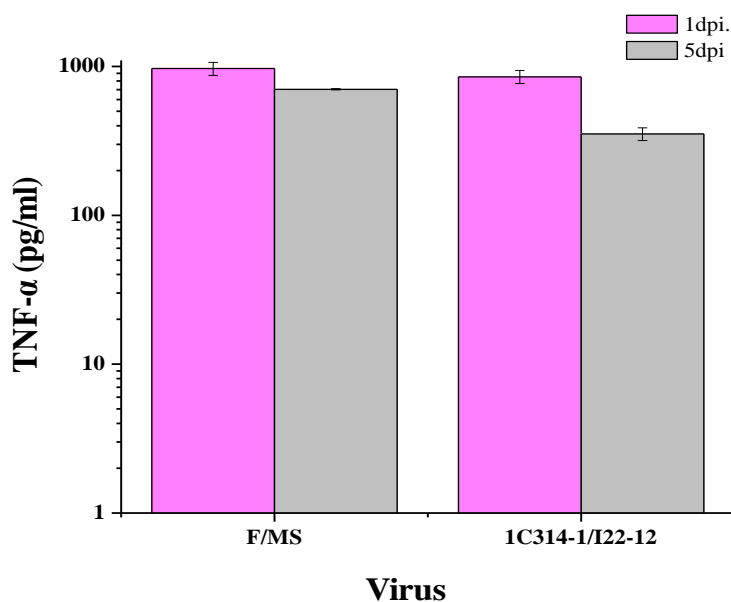


Figura 19. Nivel de TNF- α en lavados vaginales de ratones BALB/c. Los lavados vaginales se recolectaron los días 1 y 5 p.i. de ratones BALB/c infectados por vía intravaginal con la mezcla de variantes avirulentas (1C314-1 + t22-12) y la mezcla de cepas parentales (F + MS). El valor de TNF- α se determinó por el método de ELISA. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes \pm D.E.

Capítulo 3

Actividad inmunomoduladora de los CGNs ι y κ

Para estudiar el posible efecto inmunomodulador de los CGNs utilizados en la selección de las variantes de HSV-2, se realizaron distintos ensayos en células RAW 264.7 y células de bazo murino.

1. Ensayo de Citotoxicidad

El recuento de células viables se realizó empleando el método de MTS. Para ello, se trataron células RAW 264.7 y células de bazo confluentes con diferentes concentraciones de los CGNs (500-0.5 $\mu\text{g/ml}$) por 48 h. Como se observa en la Figura 20, para la línea celular RAW 264.7 y para ambos carragenanos, aunque se observan fluctuaciones, se mantuvo un 80 % de viabilidad celular hasta los 35 $\mu\text{g/ml}$ respecto al control sin compuesto. Respecto a las células de bazo las mismas fueron menos susceptibles, con una viabilidad del 80% hasta 125 $\mu\text{g/ml}$ de cada carragenano (Figura 21).

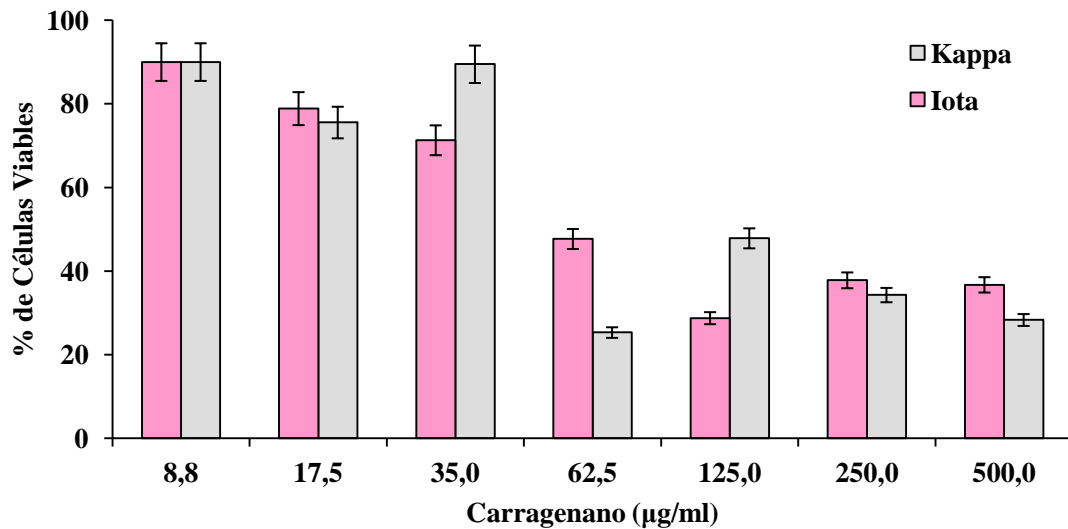


Figura 20. Viabilidad celular en presencia de los carragenanos. Células RAW 264.7 crecidas en placas de 96 pocillos se trataron con distintas concentraciones de cada CGN, κ o ι . A las 48h post tratamiento se midió la viabilidad celular utilizando MTS. La absorbancia se midió a 490 ref. 630nm. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes \pm D.E.

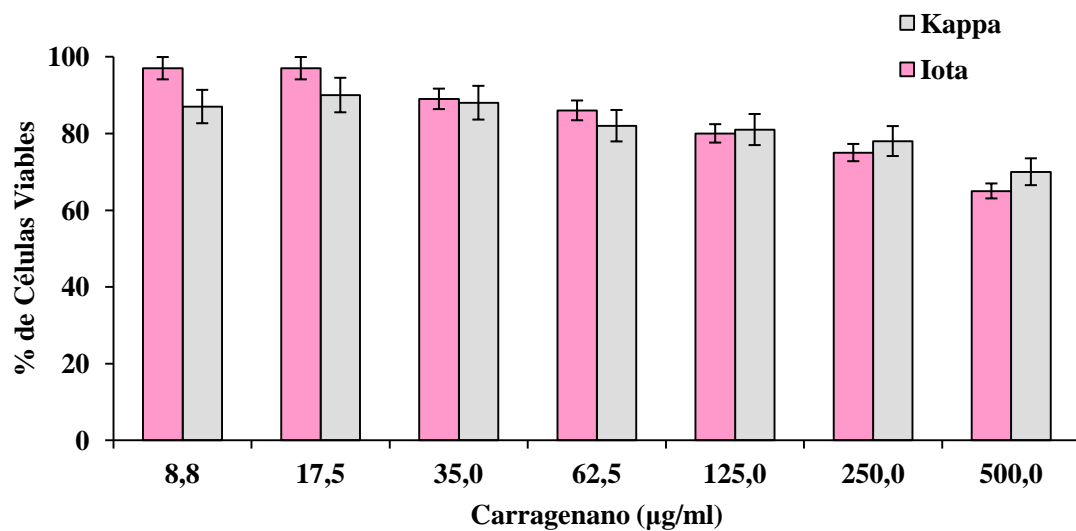


Figura 21. Viabilidad celular en presencia de los carragenanos. Células de Bazo murino crecidas en placas de 96 pocillos se trataron con distintas concentraciones de cada CGN, κ o ι . A las 48h post tratamiento se midió la viabilidad celular utilizando MTS. La absorbancia se midió a 490 ref. 630nm. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes \pm D.E.

2. Ensayo de proliferación

Para medir el efecto de los CGNs sobre la capacidad proliferativa de células RAW 264.7 y de células de bazo murino, se agregaron distintas concentraciones de los compuestos en simultáneo con las células y se midió la absorbancia por el método del MTS a distintos tiempos dependiendo del tipo celular. Se utilizó como control positivo el LPS y heparina como sustancia de referencia.

En las células RAW 264.7, ambos carragenanos mostraron ser activos respecto del control celular sin compuesto (Figura 22), aunque no lograron superar los valores obtenidos por el LPS. El CGN κ generó un mayor incremento en la proliferación celular en comparación con el CGN ι en todas las concentraciones utilizadas. Además, se pudo observar que la proliferación celular fue independiente de la concentración, siendo para el CGN κ , 5 $\mu\text{g/ml}$ y para el CGN ι de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ las concentraciones que generaron mayor proliferación en relación al control. El LPS y la heparina alcanzaron su valor máximo con 0,5 $\mu\text{g/ml}$. La proliferación fue máxima a las 48 h.

En las células de bazo murino, la proliferación estimulada con los CGNs fue marcadamente menor que en las células RAW 264.7, llegando a aumentar un 100% la replicación celular respecto del control a una concentración de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ con ambos CGNs (Figura 23). En este tipo de células los CGNs obtuvieron valores similares al LPS y a la heparina en todas las concentraciones ensayadas, con excepción de 0,005 $\mu\text{g/ml}$, donde LPS obtuvo su valor máximo. Al igual que en las células RAW 264.7, la proliferación fue máxima a las 48 h.

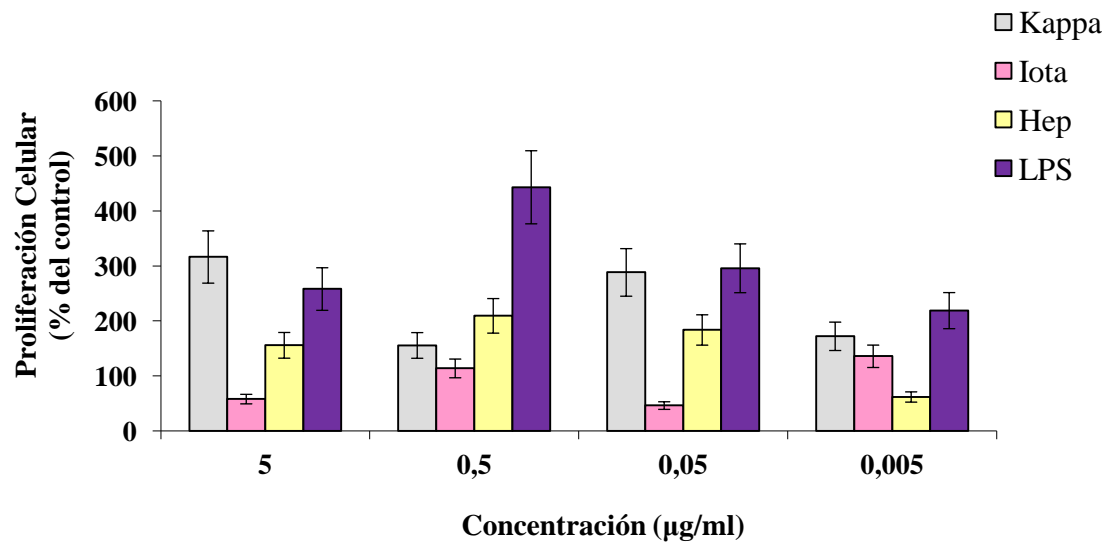


Figura 22. Proliferación de células RAW 264.7 en presencia de carragenanos. Células RAW 264.7 se sembraron en simultáneo en placas de 96 pocillos, junto a distintas concentraciones de cada CGN, κ o ι . Se utilizó como control positivo el LPS y como sustancia de referencia heparina. A las 48h post tratamiento se midió la viabilidad celular utilizando MTS, leyéndose la absorbancia a 490 ref. 630nm. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes \pm D.E.

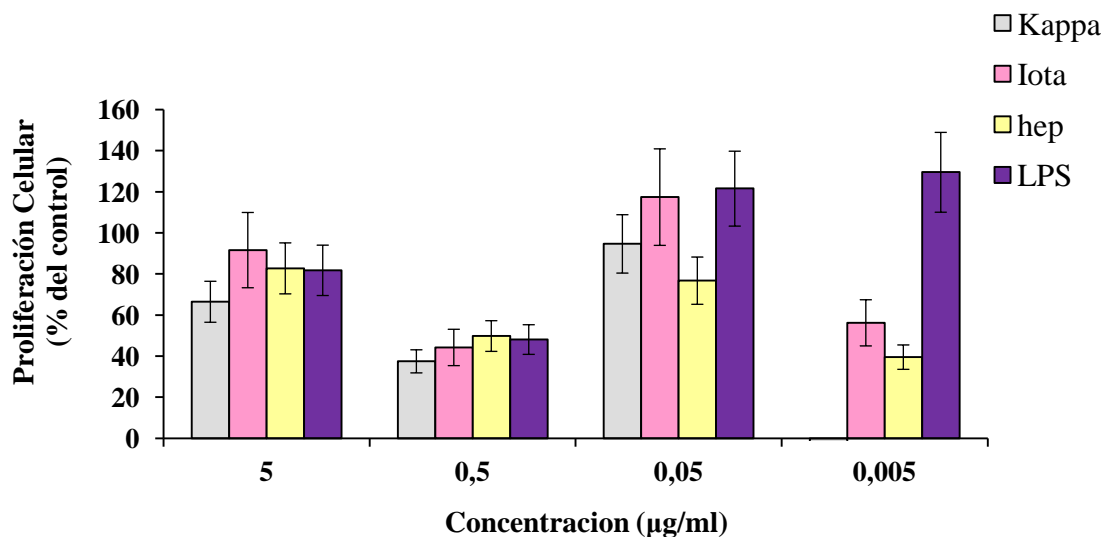


Figura 23. Proliferación de células de Bazo en presencia de carragenanos. Células de Bazo murino se sembraron en simultáneo en placas de 96 pocillos, con distintas concentraciones de cada CGN, κ o ι . Se utilizó como control positivo el LPS y como sustancia de referencia heparina. A las 48h post tratamiento se midió la viabilidad celular utilizando MTS, leyéndose la absorbancia a 490 ref. 630nm. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes \pm D.E.

3. Expresión de citoquinas

Se emplearon células RAW 256.7 estimuladas con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de los CGNs ι y κ con el fin de cuantificar las citoquinas pro-inflamatorias y el óxido nítrico (ON) *in vitro*. Como controles se emplearon células con MM sin compuesto, LPS y heparina. Se tomaron los sobrenadantes a distintos tiempos post estimulación y se realizó la medición de las citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF- α) por el método de ELISA y el nivel de ON empleando el Método de Griess.

Como se puede observar en la Figura 24, ambos CGNs activaron la expresión de IL-6 a tiempos tempranos de 6 y 8 h post-estimulación. En tiempos posteriores, 16 y 24 h, sólo el CGN ι fue capaz de mantener el nivel de expresión de IL-6. La heparina alcanzó su valor máximo a las 8hs post-estimulación, disminuyendo sus valores en tiempos posteriores, mientras que el LPS mostró valores altos y en aumento, alcanzando su máximo valor a las 24hs post-estimulación.

En la Figura 25, podemos observar que ambos carragenanos, activan la liberación de TNF- α a tiempos tempranos y que esta activación se mantiene en el tiempo hasta las 24h post-estimulación. A partir de las 8h y hasta las 24h el valor de TNF- α aumentó más de dos veces en los cultivos estimulados con ι en relación a los estimulados con κ .

La heparina aumentó la liberación de TNF- α a tiempos tempranos (6h), alcanzando valores similares al LPS y mientras que el LPS mostró su mayor expresión a las 16 h, los valores obtenidos con heparina fueron disminuyendo.

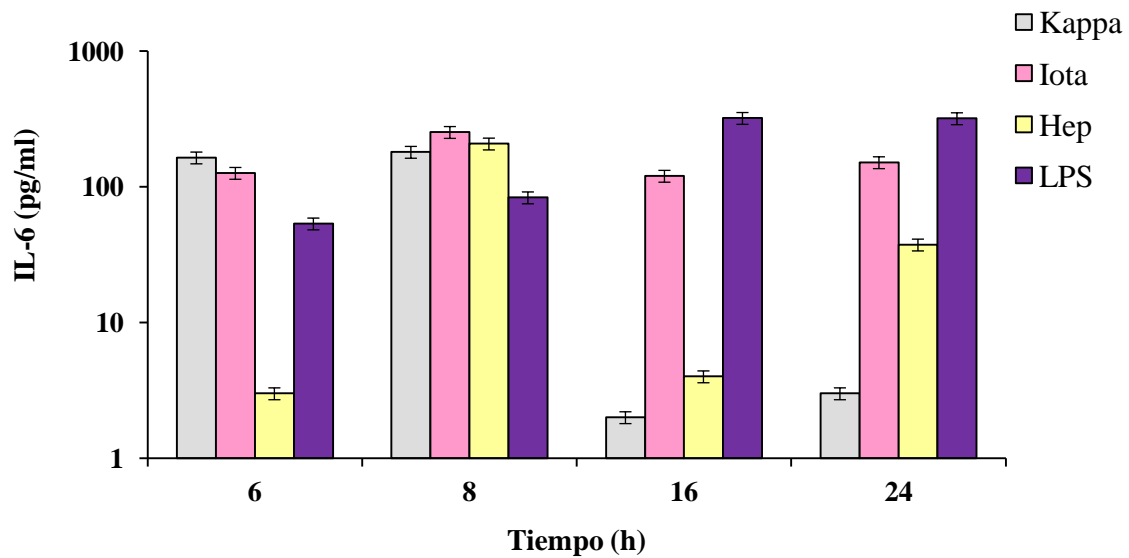


Figura 24. Liberación de IL-6 por células RAW 264.7, estimuladas con carragenano. Células RAW 264.7, crecidas en placas de 6 pocillos se estimularon con los distintos CGNs, κ o ι ($5\mu\text{g/ml}$). Se utilizó como control positivo el LPS y como sustancia de referencia heparina. A distintos tiempos post tratamiento se midió el nivel de IL-6 por el método de ELISA. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes \pm D.E.

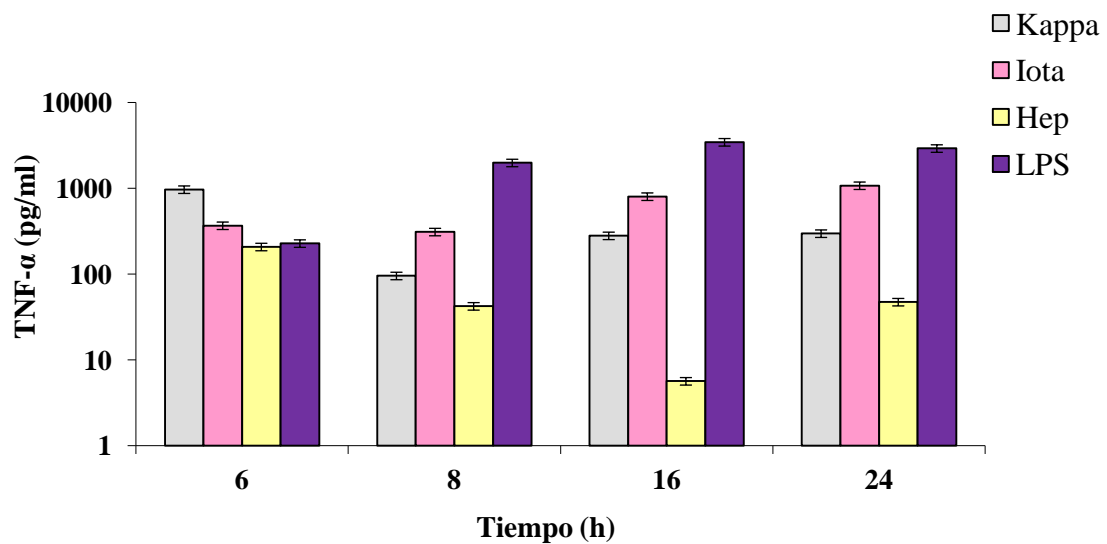


Figura 25. Liberación de TNF- α por células RAW 264.7, estimuladas con carragenano. Células RAW 264.7, crecidas en placas de 6 pocillos se estimularon con los distintos CGNs κ o ι ($5\mu\text{g/ml}$). Se utilizó como control positivo el LPS y como sustancia de referencia heparina. A distintos tiempos post tratamiento se midió el nivel de TNF- α por el método de ELISA. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes \pm D.E.

La cuantificación de NO en este sistema reveló niveles muy bajos, entre 1 y 2 μM para todos los compuestos en los distintos tiempos ensayados, mientras que el LPS alcanzó valores de 15,3 μM a las 24 h post-estimulación. Nuestros resultados coinciden con resultados similares previamente publicados (Abdala-Díaz y col., 2010).

4. Inmuno-estimulación In Vivo

Con el fin de definir si el efecto activador de TNF- α e IL-6 manifestado por los CGNs en células RAW 264.7, podría ser reproducido en un modelo murino, se procedió a estudiar el nivel de las citoquinas en suero en función del tiempo.

Para ello, se inyectaron ratones BALB/c por vía intravenosa con 30 mg/kg de los distintos CGNs κ e Iota y un xilomanano N4 (polisacárido sulfatado) como sustancia de referencia y LPS como control positivo (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), cada uno de ellos en un inoculo de 0,2ml. A distintos tiempos, 30, 60 y 90 min post-inoculación se sangraron los animales y se cuantificaron las citoquinas por ELISA. Para el CGN ι , la concentración de 30 mg/kg resultó ser una dosis fatal. Considerando los resultados obtenidos se procedió a realizar la prueba a 60 min con una dosis menor de 20 mg/kg. Como puede observarse en la Figura 26, los valores de IL-6 para el CGN κ fueron similares al obtenido por el PBS a los 30 y 90 minutos post-estimulación, mientras que a los 60 minutos el CGN κ obtuvo valores que duplican los valores del PBS. El CGN ι mostró a los 60 minutos post-estimulación valores de IL-6 similares al CGN κ . Sin embargo los valores obtenidos por el LPS y por el xilomanano N4, fueron mucho mayores a los obtenidos por los CGNs.

En cuanto a los valores de TNF- α para el CGN κ los mismos fueron similares al control (animales tratados con PBS) en todos los tiempos medidos (Figura 27). Mientras que el xilomanano N4 mostró un valor similar al CGN a los 30 minutos que fue aumentando hasta los 90 minutos post-estimulación. El CGN ι , presentó un valor de TNF- α a los 60 minutos menor al obtenido por el control (animales estimulados con PBS).

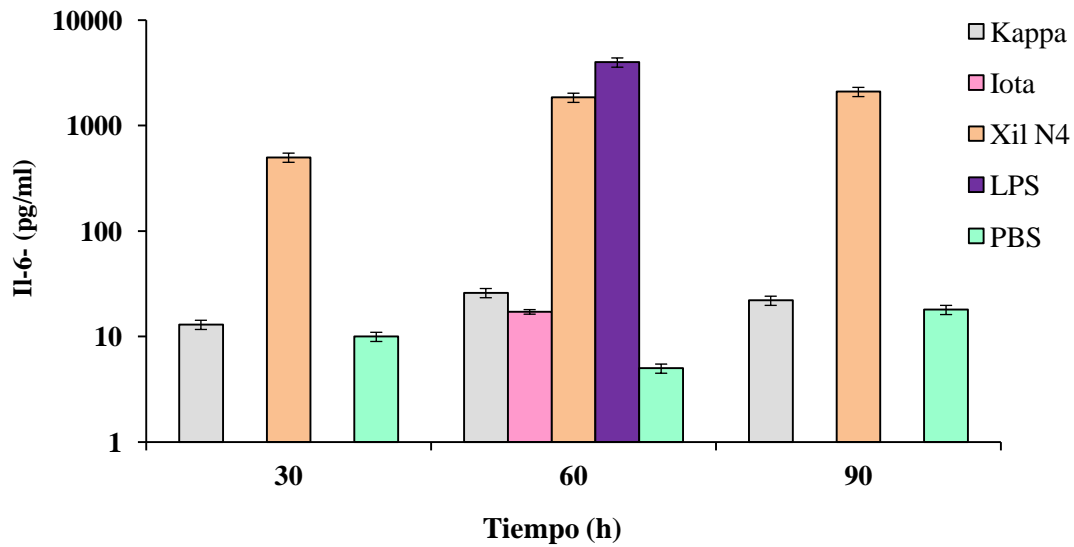


Figura 26. Nivel de IL-6 en suero de ratones estimulados con carragenanos. Hembras BALB/c de 6-8 semanas de vida se estimularon con los distintos compuestos: CGN κ , xilomanano N4 (ambos en 30 μ g/ml) y CGN ι (20mg/ml) por vía intravenosa. A distintos tiempos post tratamiento se midió el nivel de IL-6 en suero, por el método de ELISA. Como control se utilizó el LPS (10 μ g/ml), el mismo se midió a los 60 minutos. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes \pm D.E.

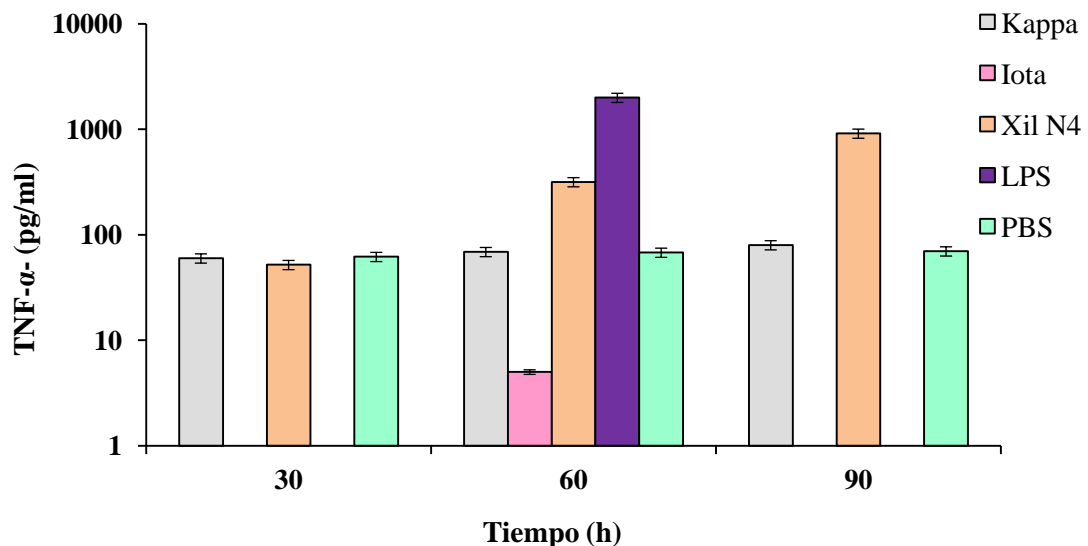


Figura 27. Nivel de TNF- α en suero de ratones estimulados con carragenanos. Hembras BALB/c de 6-8 semanas de vida fueron estimuladas con los distintos compuestos: CGN κ , xilomanano N4 (ambos en 30 μ g/ml) y CGN ι (20mg/ml) por vía intravenosa. A distintos tiempos post tratamiento se midió el nivel de TNF- α en suero, por el método de ELISA. Como control se utilizó el LPS (10 μ g/ml), el mismo se midió a los 60 minutos. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes \pm D.E.

En cuanto al NO en suero de animales estimulados con los distintos CGNs, los valores fueron en general bajos, para el CGN κ , donde la concentración de ON, fue de $15\mu\text{M}$, el doble de la observada en animales control sin estimular ($9\mu\text{M}$). Los animales estimulados con LPS, mostraron valores similares al control sin compuesto.

Las actividades biológicas del Xilomanano N4 están descritas en la tesis de la Lic. Mercedes Perez Recalde, trabajo conjunto del Dpto. de Química Orgánica y el Laboratorio de Virología, Dpto. de Química Biológica, FCEN, UBA, este polisacárido sulfatado extraído del alga *Nemalion Helminthoides* mostró proteger al ratón de la infección intranasal con HSV-2 (MS), cuando se lo utiliza previamente inyectándolo por vía intravenosa (datos no publicados). Debido a la baja estimulación de citoquinas pro-inflamatorias por los carragenanos κ e ι , no se realizó el experimento de protección in vivo, por vía intravenosa.

Discusión

Discusión

HSV-2 es el mayor causante de úlceras genitales y un importante co-factor en la adquisición y la trasmisión del virus de la inmunodeficiencia tipo 1 (Schacker., 2001).

A pesar de las terapias actuales, la incidencia y prevalencia de la infección con HSV continúa creciendo mundialmente (Lingappa y col., 2007; Tang y col., 2010).

Durante las últimas dos décadas, se realizaron numerosos esfuerzos para desarrollar vacunas para la infección herpética genital y varios candidatos llegaron hasta los ensayos clínicos (Koelle y col., 2006, Koelle y col., 2008). A pesar de los promisorios resultados en los estudios con animales y de los ensayos en humanos en fases tempranas la vacuna de HSV-2 falló en generar protección. Ensayos clínicos de vacunas basadas en gB y gD usando MF59 como adyuvante no mostraron ninguna protección (Corey y col., 1999). Más recientemente, la vacunación intramuscular con una vacuna recombinante gD de HSV-2, utilizando monofosforil lípido A (MPL) como adyuvante, indujo protección de la enfermedad, sobretodo en la transmisión del HSV-2 (Stanberry y col, 2002). Sin embargo, el efecto protector de la vacuna MPL se observó sólo en mujeres que manifestaron seronegatividad para HSV-1 y HSV-2, no mostrando protección en los hombres y las mujeres seropositivas para HSV-1 (Stamberry y col., 2002).

Con el objetivo de estudiar las modificaciones en la virulencia y patogenicidad en poblaciones de HSV-1 y HSV-2 expuestas a polisacáridos sulfatados por tiempo prolongado, se seleccionaron variantes virales luego de realizar pasajes seriados in vitro con concentraciones crecientes de CGNs. Los resultados presentados confirman la hipótesis de considerar a los polisacáridos sulfatados como lentos y débiles inductores de virus resistentes (Carlucci y col., 2002; Witvrouw y De Clercq., 1997). Notablemente, todos los clones aislados tanto de HSV-1 como de HSV-2 fueron estables, aun después de varios pasajes en cultivos celulares sin el compuesto. Las variantes de HSV-1 fueron obtenidas empleando 1C3, CGN híbrido μ/v parcialmente ciclado, mientras que para las variantes de HSV-2 se utilizaron los CGN ι y κ . Estos compuesto son estructuralmente similares al HS celular, receptor inicial de unión del HSV a la célula y actúan por competencia con los residuos HS de proteoglicanos para fijarse al anti-receptor viral (WuDunn D y col., 1989).

Las glicoproteínas gC, gB y gD de la envoltura del HSV son las primeras en interactuar con las cadenas de heparina/HS (Herold y col., 1991, Trybala y col., 2000) y por lo tanto estos componentes representan probablemente los blancos para la acción antiviral de los polisacáridos sulfatados. Estas observaciones se describieron para la gB (Diakidi-Kosta y col., 2003, Lingen y col., 1995) y la gH (Wilson y col., 1994).

Las células infectadas con la mayoría de los aislamientos de HSV producen redondeamiento celular, sin embargo, se conocen mutaciones en al menos seis loci *syn* del genoma viral, *syn* 1 al 6, que inducen fenotipos *syn*. Sólo se han identificado tres de los genes involucrados. La mutación *syn* 1 altera el gen que codifica para la gK (Hutchinson y col., 1992), la mutación *syn* 3 afecta el extremo C-terminal de la gB (Muggeridge., 2000), y la mutación *syn* 5 parece afectar el gen UL24 (Blakeney y col., 2005; Tognon y col., 1991). Aunque las variantes *syn* pueden ser aisladas *in vitro* causando fusiones extensas en cultivos de tejidos (Carlucci y col., 2002; Cassai y col., 1975; Hoggan y col., 1959), ellas son raramente encontradas en aislamientos clínicos, sugiriendo que las fusiones celulares extensas pueden ser perjudiciales para el virus en infecciones *in vivo* (Muggeridge y col., 2004). Esta posibilidad está parcialmente fundamentada por estudios de virulencia en modelos de animales, en los cuales se han encontrado que la mayoría de los virus *syn* ensayados son atenuados para el huésped (Mateu y col., 2011; Schneeweis y col., 1984; Wheeler Jr, 1964).

En trabajos previos, se demostró que el fenotipo *syn* de las variantes de HSV-1 no era inhibido por la acción de la Ciclosporina A, lo que muestra que la mutación que provoca los sincicios en esas variantes se encontraría en el gen de la gB (Carlucci y col., 2002). Sin embargo, las variantes de HSV-2 mostraron diferentes resultados, indicando que en estos clones además de la gB habría otros sitios responsables del fenotipo *syn* involucrados como los genes de gK y UL24.

Las características biológicas *in vitro* de las variantes de HSV-1 (1C314-1 y 1C317-2) como las de variantes de HSV-2 (ι 22-9, ι 22-12, κ 22-12 y κ 22-13) no difirieron significativamente de su cepa parental, F y MS, respectivamente. En particular, se observó una resistencia relativa (RR) moderada al ACV para las variantes de HSV-1 y HSV-2, la cual no sería atribuible a una mutación significativa en el gen de la TQ viral. En estudios preliminares se detectó un cambio en la secuencia de este gen correspondiente a una región polimórfica en la posición 192 (Ala→Val) para 1C317-2. Cabe destacar que se ha encontrado la misma mutación en aislamientos clínicos de

pacientes HSV-resistentes al ACV, sin embargo esta sustitución no ha sido asociada con la resistencia (Chibo y col., 2004). Por otra parte, sólo en los clones ACV-sensibles de las variantes de HSV-2 se detectó un único cambio en la posición 6 (Asp →Gly). Se ha publicado que la misma mutación no está asociada a aislamientos clínicos de HSV resistentes al ACV (Bestman-Smith y col., 2001; Morfin y col., 2003).

Analizando las características patogénicas, se observó que las variantes de HSV-1 exhibieron marcadas diferencias en la virulencia al ser inoculadas en ratones tanto por vía intravaginal como por vía intranasal en comparación con la cepa original F. A pesar de esto, no se pudo establecer ninguna correlación entre la virulencia y la resistencia a las drogas observada en los ensayos *in vitro*, estos resultados coinciden con trabajos previamente publicados (Tyler y col., 1991; Reading y col., 2006).

Las diferencias en la virulencia entre la cepa F y las variantes según la vía de entrada, podrían ser atribuidas a diferencias en la activación de la respuesta inmunológica. Tomando en cuenta que HSV defectivo en ICP47 (proteína viral que bloquea el CMH-1) disminuyó la capacidad de invadir órganos de ratones C57BL/6 inoculados por vía intravenosa (Burgos J y col., 2006), la incrementada virulencia observada para las variantes de HSV-1 cuando se inocularon por vía intranasal podría ser atribuida a un eficiente bloqueo en la presentación de antígenos virales al sistema inmune conduciendo probablemente a un incremento de la diseminación viral y consecuente mortalidad debido a una inhibición de la respuesta de las células T CD8+ (Früh y col., 1995; Hill y col., 1995).

Por otra parte, se ha descrito que IL-6 juega un importante rol en la susceptibilidad a la infección respiratoria de HSV-1 en ratones. En trabajos previos, ratones knock-out para IL-6 (IL-6^{-/-}) mostraron un rango de mortalidad de 94% comparada con un 10% de ratones normales inoculados (IL-6^{+/+}). Nuestros resultados mostraron una deficiencia en IL-6 y TNF- α en lavados vaginales de animales infectados con las variantes de HSV-1, que provocaría en una infección intranasal un incremento significativo de la severidad de los síntomas y la mortalidad, sugiriendo que esta deficiencia estaría, al menos en parte, afectando el sistema inmune innato (Murphy y col, 2008). Esta alteración puede deberse a la baja capacidad de las mutantes virales para activar linfocitos, en particular NK y células T presentes en las vías respiratorias durante la infección (Reading y col, 2006). También, se ha descrito que la patogenicidad de HSV en ratones depende de la cepa de ratón utilizada (Sarmiento M y col, 1988), siendo los

animales BALB/c más susceptibles a la infección por HSV que los ratones C57BL/6, debido a diferencias a nivel del haplotipo H-2, tipos b y d, respectivamente. Este fenómeno lo pudimos observar tanto para las variantes de HSV-1, como para variantes de HSV-2.

Por otro lado, se ha descrito la presencia de proteínas surfactantes PS-A y PS-D en mucosa vaginal de ratones y de humanos las cuales participan en la inmunidad innata (Oberley y col., 2007, Colin y col., 2004). Por lo tanto, la carencia de virulencia de las variantes para los ratones inoculados por vía intravaginal puede deberse a la rápida destrucción de las células infectadas por un proceso de opsonización mediada por la unión de la PS a las glicoproteínas virales expresadas sobre la membrana celular facilitando así la fagocitosis mediada por macrófagos. En trabajos previos se observó que la PS-A aislada del pulmón de rata, fue capaz de unirse específicamente a células HEp-2 infectadas con HSV-1 cepa F y que la unión fue inhibida por heparina, sugiriendo una interacción directa entre las glicoproteínas virales y PS-A (van Iwaarden y col, 1992). Tomando en cuenta que 1C314-1 alcanzó títulos mayores en cultivos celulares de vagina que la cepa F es tentador postular que un cambio molecular en las glicoproteínas expresadas sobre la membrana celular podría producir una exacerbación del proceso de opsonización in vivo.

Respecto a la patogenicidad de las variantes de HSV-2, aquellos clones que presentaron la mayor RR al ACV, fueron los mismos que resultaron avirulentos en ratones C57BL/6 por vía intravaginal, indicando que el gen de la TQ podría estar relacionado con la baja virulencia. Sin embargo, no se detectaron cambios en la secuenciación de dicho gen en estas variantes (Mateu y col., 2010).

Al igual que con HSV-1 y sus variantes, la carga viral recuperada de los lavados vaginales fue similar entre las variantes y la cepa patrón MS. Sorpresivamente aún cuando la vía de infección intranasal resultó más agresiva que la vía intravaginal, todos los clones de HSV-2 disminuyeron la virulencia respecto a la cepa patrón MS en ratones infectados por la vía intranasal, dato interesante ya que no se observó lo mismo con las variantes de HSV-1. Estos resultados se correlacionan con el hecho de que las variantes de HSV-2 presentaron un crecimiento viral restringido cuando se emplearon cultivos primarios de astrocitos de ratón y no presentaron síntomas de enfermedad neurológica como los observados para la cepa parental MS.

Otro dato a tener en cuenta, es que para las infecciones con HSV-2, las citoquinas parecen jugar un rol de protección, ya que un alto nivel de citoquinas pro-inflamatorias resultó beneficioso para el ratón infectado con las variantes. Sin embargo, las variantes de HSV-1 manifestaron un comportamiento opuesto, lo que nos confirma que la respuesta inmune innata es un factor clave en la determinación de diferencias en la virulencia entre las variantes en este modelo murino.

Paralelamente se obtuvieron variantes de HSV con ACV utilizando la misma estrategia empleada con los CGNs. Las variantes ACV-6 F y ACV-6 MS seleccionadas mostraron características similares a sus respectivas cepas parentales en cuanto a los efectos citopáticos, susceptibilidad a los CGNs y heparina, y replicación en células Vero. Sin embargo, manifestaron una alta RR al ACV (ACV-6F RR: 52; ACV-6MS RR: 160). En cuanto a la virulencia, ambas variantes resultaron 100% asintomáticas por vía intranasal. Por vía intravaginal, ACV-6F resultó avirulenta, mientras que ACV-6MS redujo la mortalidad a un 20 y 40% en ratones C57BL/6 y BALB/c, respectivamente.

En los lavados vaginales, ACV6F mostró un valor de TNF- α alto, similar a la cepa patrón mientras que el nivel de IL-6 fue bajo. Para ACV6MS tanto TNF- α como IL-6 mostraron valores mayores a la cepa parental, similares a las variantes syn de HSV-2.

Este tipo de variantes asintomáticas obtenidas nos permiten inferir la existencia en el virión de numerosos blancos responsables de la virulencia que pueden ser modificados en forma diferencial empleando compuestos de estructuras químicas y mecanismos de acción diferentes. Asimismo, la caracterización molecular de estas variantes permitirá confirmar si efectivamente los CGNs interactúan únicamente con las glicoproteínas o pueden afectar algún otro componente del virus responsable de cambios en la patogenicidad. Sin olvidar la influencia que ejerce el medio ambiente (bajo la presión continua de los CGNs ó ACV) en el cual se generaron las variantes, activando tal vez, mecanismos epigenéticos (alteraciones en los patrones de expresión de un gen, sin cambios en la secuencia del ADN). Este tipo de efectos se informaron para la hormona tiroidea como también modificaciones de histonas en genes inmediatos tempranos generados en el medio interno del huésped, regulando la actividad transcripcional del genoma de HSV-1 desde la latencia (Kubat y col., 2004; Bedadala y col., 2010).

En trabajos previos se ha reportado que el proteoglicano heparan sulfato, un polisacárido componente de las membranas celulares de los vertebrados y matrices extracelulares, se cliva a fragmentos de heparan sulfato solubles en el curso de una

inflamación, infección y daño tisular (Ihrcke y col., 1998). En tejidos sanos no se encuentran fracciones significativas de heparan sulfato soluble, hallándose en una concentración dentro de los rangos observados para estimular células dendríticas en los fluidos de tejidos lesionados (Kainulainen y col., 1998) y en orina de individuos infectados (Oragui y col., 2000).

Estos factores junto con el amplio uso de los CGNs en la industria alimenticia y la probable selección ejercida por ellos como microbicidas podría generar la aparición de variantes de relevancia para analizar la evolución del virus en la naturaleza.

En cuanto al comportamiento de los CGNs como inmunomoduladores, pudimos observar que los mismos activaron parcialmente la proliferación de distintos tipos celulares que participan en la inmunidad y la liberación de citoquinas en macrófagos *in vitro*. Sin embargo, no se detectó activación de citoquinas cuando se incorporaron los CGNs por vía intravenosa en ratones BALB/c. Estos resultados confirman que estas estructuras son conocidas y benignas para el huésped dando mayor énfasis a la posibilidad de la emergencia natural de este tipo de variantes.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son útiles para entender los factores que definen la virulencia del HSV, particularmente aquellos implicados en la selección de variantes ocasionadas por terapias antivirales con CGNs, considerando puntos fundamentales la interacción virus-huésped. Además, nos invitan a reflexionar sobre una posible alternativa para atenuar virus empleando compuestos naturales con estructuras químicas ya vistas por el patógeno y presentes en el huésped como componentes celulares esenciales ampliamente distribuidos en la naturaleza. Dichas variantes podrían ser empleadas para estudios en ciencia básica, como en aplicaciones terapéuticas, tanto como vector para terapias génicas y anti-cáncer, como inmunoestimulador o para uso profiláctico (Glorioso y col., 1995; Lachmann y col., 2004).

Asimismo, esta estrategia podría ser considerada como un proceso natural evolutivo donde el virus contribuye con una valiosa información “actualizada” acumulada de previas infecciones ancestrales y haciéndola disponible para un huésped “nuevo”, generando un beneficio recíproco entre el hospedador y el virus (Carlucci y col, 2011).

En resumen:

- Las variantes virales mostraron moderada resistencia al CGN que le dio origen (3-10 veces) respecto de la cepa control.

- Todas las variantes mostraron fenotipo sincicial *in vitro*.
- Las variantes seleccionadas mostraron menor virulencia que la cepa patrón inoculadas por distintas vías mucosas intactas, salvo las variantes de HSV-1 (C314-1 y C317-2) por vía intranasal en ratones BALB/c.
- No se encontró relación directa entre resistencia y virulencia.
- La patología del HSV fue dependiente de la activación temprana diferenciada del sistema inmune innato (TNF- α , IL-6), del tropismo, del serotipo viral empleado y de la cepa de ratones utilizada.
 - Variantes de HSV-1 atenuadas produjeron poca activación de citoquinas proinflamatorias respecto del control viral F en mucosa genital.
 - Variantes del HSV-2 atenuadas produjeron mayor respuesta de citoquinas proinflamatorias respecto del control viral MS en mucosa genital.
- A pesar de las diferencias observadas en la patología de las variantes de HSV respecto a su cepa parental, tanto las variantes de HSV-1 como las de HSV-2, mostraron similar nivel de replicación.
- Los CGN ι y κ fueron pobres inmunomoduladores por vía intravenosa en las concentraciones ensayadas, aunque lograron proteger cuando fueron inoculados inmediatamente después de la infección. Esta protección estaría ligada a la actividad antiviral-virucida de estos compuestos.

Bibliografia

Abdala RT-Díaz, Chabrillon M, Cabello A-Pasini, Lopez B-Soler, Figueroa FL. Effect of *Porphyridium cruentum* Polysaccharides on the activity of murine macrophage cell line RAW 264.7. 2010. *Ciencias Marinas*; 36(4):345-353.

Ankel H., Westra D. F, Welling-Wester S., Lebon P. Induction of interferon alpha by glycoprotein D of herpes simplex virus: a possible role of chemokine receptors. 1998. *Virology*; 251:317–326.

Bedadala GR, Pinnoji RC, Palem JR, Hsia SCH. Thyroid hormone controls the gene expression of HSV-1 LAT and ICP0 in neuronal cells. 2010. *Cell Research*, 20:587-598.

Bestman-Smith J, Schmit I, Papadopoulou B, Boivin G. Highly reliable heterologous system for evaluating resistance of clinical herpes simplex virus isolates to nucleoside analogues. 2001. *J Virol*; 75(7): 3105-311034.

Biron KK, Stenbuck PJ, Sorrell JB. Inhibition of the DNA polymerases of varicella-zoster virus and human cytomegalovirus by the nucleoside analogs ACV and BW795U. 1984. *J Cell Biochem*; 8B:207.

Blakeney S, Kowalski J, Tummolo D, DeStefano J, Cooper D, Guo M, gangolli S, Long D, Zamb T, Natuk R, Visalli guinea pig disease models. 2005. *J Virol*; 79 (16):10498-10506.

Bogges K. A., Watts D. H., Hobson A. C., Ashely R. L., Brown Z. A., Corey L. Herpes simplex virus type 2 detection by culture and polymerase chain reaction and relationship to genital symptoms and cervical antibody status during the third trimester of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1997;176:443–451.

Boonstra A., Asselin-Paturel C., Gilliet M., et al. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. 2003. *J. Exp. Med*; 197:101–109.

Bravanam S, Snider DP, Kaushic C. Intranasal and subcutaneous immunization under the effect of estradiol leads to better protection against genital HSV-2 challenge compared to progesterone. 2008. *Vaccine*; 26: 6165-6172

Burgos JS, Serrano-Saiz E, Sastre I, Valdivieso F. ICP47 mediates viral neuroinvasiveness by induction of TAP protein following intravenous inoculation of herpes simplex virus type 1 in mice. 2006. *J Neurovirol*;12 (6):420-7.

Carlucci MJ, Scolaro LA, Errea MI, Matulewicz MC, Damonte EB, Antiviral activity of natural sulphated galactans on herpes virus multiplication in cell culture. 1997. *Planta Med*; 63(5):429-32. PMID: 9342947.

Carlucci MJ, Scolaro LA, Damonte EB, Inhibitory action of natural carrageenans on Herpes simplex virus infection of mouse astrocytes. 1999a. *Chemotherapy*; 45(6):429-36.

Carlucci MJ, Ciancia M, Matulewicz MC, Cerezo A.S, Damonte E.B, Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. 1999b. *Antiviral. Res.* 43:93-102.

Carlucci MJ, Scolaro LA, Damonte EB, Herpes simplex virus type 1 variants arising after selection with an antiviral carrageenan: lack of correlation between drug susceptibility and syn phenotype. 2002. *J Med Virol*; 68:92-8.

Carlucci MJ, Scolaro LA, Nosedá MD, Cerezo AS, Damonte EB. Protective effect of a natural carrageenan on genital herpes simplex virus infection in mice. 2004. *Antiviral Res*; 64(2):137-41.

Carlucci MJ, Damonte EB, Scolaro LA. Virus driven evolution: a probable explanation for “*Similia Similibus Curantur*” philosophy. 2011. *Infect Genet Evol* 11(5):798-802.

Cassai E, Manservigi R, Corallini A, Terni M. Plaque dissociation of herpes simplex viruses: biochemical and biological characters of the viral variants. 1976. *Intervirol*; 6:212-223.

Cheshenko N, Harold BC, Glycoprotein B plays a predominant role in mediating herpes simplex virus type 2 attachment and is required for entry and cell to cells spread. 2002. *J Gen. Virol.* 83: 2247-2255.

Chibo D, Druce J, Sasadeusz J, Birch C. Molecular analysis of clinical isolates of acyclovir resistant herpes simplex virus. 2004. *Antiviral Research*; 61:83-91.

Christophers J, Clayton J, Craske J, Ward R, Collins P, Trowbridge M, Darby G. Survey of resistance of herpes simplex virus to acyclovir I Northwest England. *Antimicrob.* 1998. *Agents Chemother*; 42: 868-872.

Cocchi F, Menotti L, Mirandola P, Lopez M, Fiume G, Campadelli. The ectodomain of a novel member of the immunoglobulin superfamily related to the poliovirus receptor has the attributes of a bonafide receptor for herpes simplex viruses 1 and 2 in human cells. 1998b. *J. Virol.* 72:9992–10002.

Cocchi F, Menotti L, Dubreuil P, Lopez M, Campadelli-Fiume G. Cell-to-cell spread of wild-type herpes simplex virus type 1, but not of tolerance study in human deficiency virus (HIV) and cytomegalovirus (CMV) infected patients: Indication of anti-CMV activity with low toxicity. 2002. *J Med.* 28(1-2):108–128.

Colin MacNeill, Todd M Umstead, David S Phelps, Zhenwu Lin, Joanna Floros, Debra A Shearer, Judith Weisz. Surfactant protein A, an innate immune factor, is expressed in the vaginal mucosa and is present in vaginal lavages fluid. 2004. *Immunology*; 111(1): 91–99.

Connell E. V., Cerruti R. L., Trown P. W. Synergistic activity of combinations of recombinant human alpha interferon and acyclovir, administered concomitantly and in sequence, against a lethal herpes simplex type 1 infection in mice. *Antimicrob. Agents Chemother*; 28:1–4.

Connolly S. A., Landsburg D. J., Carfi A., Wiley D. C., Cohen G. H., Eisenberg R. J. Structure-based mutagenesis of herpes simplex virus glycoprotein D defines three critical regions at the gD-HveA/ HVEM binding interface. 2003. *J. Virol*; 77:8127–8140.

Corey L, Langenberg AG, Ashley R, Sekulovich RE, Izu AE, Douglas Jr JM, et al. Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection: two randomized controlled trials. Chiron HSV Vaccine Study Group. 1999. *JAMA*; 282(4):331-40.

Corey L, Wald A, Celum C.L, The effects of herpes simplex virus-2 on HIV-1 acquisition and transmission: a review of two overlapping epidemics. *J. Acquired. Immun.* 2004. *Deficien.Syndrom.* 35:435-45.

Damonte E, Neyts J, Pujol CA, Snoeck R, Andrei G, Ikeda S, Witvrouw M, Reymen D, Haines H, Matulewicz MC y col. Antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. 1994. *Biochem Pharmacol*; 47(12):2187-92.

Desai VR, Ramkrishnan R, Chintalwar GJ, Sainis KB. G1-4A, an immunomodulatory polysaccharide from *Tinospora cordifolia*, modulates macrophage responses and protects mice against lipopolysaccharide induced endotoxic shock. *Int Immunopharmacol.* 2007 Oct; 7(10):1375-86. Epub 2007 Jun 29.

Diakidi-Kosta A, Michailidou G, Kontogounis G, Sivropoulou A, Arsenakis M. A single amino acid substitution in the cytoplasmic tail of the glycoprotein B of herpes simplex virus 1 affect both syncytium formation and binding to intracellular heparan sulfate. 2003. *Virus Res* ; 93(1): 99-108.

Dorsky DI, Crumpacker CS. Drug five years later: Acyclovir. 1987. *Ann Intern Med*; 107:859.

Esté JA, De Vreese K, Witvrouw M, Schmit JC, Vandamme AM, Anné J, Desmyter J, Henson GW, Bridger G, De Clercq E. Antiviral activity of the bicyclam derivative JM3100 against drug-resistant strains of human immunodeficiency virus type 1. 1996. *Antiviral Res*; 29(2-3):297-307.

Fauquet, Mayo, Maniloff, Desselberger, BallDavison, A. J., Eberle, R., Hayward, G. S. y colaboradores. Family Herpesviridae. In *Virus Taxonomy*, 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2005. London: Academic Press/Elsevier; 193–212.

Fernández-Romero JA, Thorn M, Turville SG, Titchen K, Sudol K, Li J, Miller T, Robbiani M, Maguire RA, Buckheit RW Jr, Hartman TL, Phillips DM. Carrageenan/MIV-150 (PC-815), a combination microbicide. 2007. *Sex Transm Dis*; 34(1):9-14.

Finberg, R. W., Kurt-Jones, E. A., Zhu, J., Arnold, M., and Knipe, D. (2003). Presented at the 28th International Herpesvirus Workshop.

Fitzgerald-Bocarsly P., Howell D. M., Pettera L., Tehrani S., Lopez C. Immediate-early gene expression is sufficient for induction of natural killer cell-mediated lysis of herpes simplex virus type 1-infected fibroblasts. 1991. *J. Virol.* 65.

Fiume G., Cocchi F., Menotti L., Lopez M. Campadelli. The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells *Rev. 2000. Med. Virol.* 10:305-319.

Frenkel N. The history of the HSV amplicon: from naturally occurring defective genomes to engineered amplicon vectors. *Curr Gene Ther.* 2006 Jun;6(3):277-301. Review.

Friedman HM, Wang L, Panqburn M.R, Lambris J.D, Lubinski J. Novel mechanism of antibody-independent complement neutralization of herpes simplex virus type 1, 2000. *J. Immunol.* 15;165(8):4528-36.

Früh K, Ahn K, Djaballah H, Sempe P, van Endert PM, Tampe R, Peterson PA, Yang Y. A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. 1995. *Nature* 375:415.

Fujioka N., Akazawa R., Ohashi K., Fujii M., Ikeda M., Kurimoto M. Interleukin-18 protects mice against acute herpes simplex virus type 1 infection. 1999. *J. Virol.* 73: 2401–2409.

Geraghty R. J., Krummenacher C., Cohen G. H., Eisenberg R. J., Spear P. G. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. 1998. *Science*. 280:1618–1620.

Gerber SI, Belval BJ, Harols BC. Differences in the role of glycoprotein C of HSV-1 and HSV-2 in viral binding may contribute to serotype differences in cell tropism. 1995. *Virology* 214:29-39.

Ghosh T, Chattopadhyay K, Marschall M, Karmakar P, Mandal P, Ray B. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure-activity analysis to clinical evaluation. 2009. *Glycobiology*. (1):2-15

Ghosh P, Adhikari U, Ghosal PK, Pujol CA, Carlucci MJ, Damonte EB, Ray B. In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. 2004. *Phytochemistry*; 65(23):3151-7.

Glorioso JC, DeLuca NA, Fink DJ. Development and application of herpes simplex virus vectors for human gene therapy. 1995. *Annu Rev Microbiol*; 49:675-710. Review.

Gnam JW Jr, Barton NH, Whittley RJ. Acyclovir-mechanism of action, pharmacokinetics, safety and clinical applications. 1983. *Evaluations of new drugs. Pharmacotherapy*; 3:275.

Goldstein D, Lazzlo J. The role of interferon in cancer therapy: a current perspective. 1988. *Cáncer*; 38:259.

Gonzalez ME, Alarcón B, Carrasco L. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. 1987. *Antimicro Agents Chemother*; 31: 1388-1391.

Halterman MW, Giuliano RE, Bowers WJ, Federoff HJ. Improved HSV-1 amplicon packaging using virion host shutoff mutants lacking mRNAse activity. 2006. *J Gene Med.*; 8 (11):1320-8.

Hamasuna R, Eizuru Y, Shishime Y, Minamishima Y. Protective effect of carrageenan against murine cytomegalovirus infection in mice. 1993. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*;4(6): 353-360.

Harrow S, Papanastassiou V, Harland J, Mabbs R, Petty R, Fraser M, Hadley D, Patterson J, Brown SM, Rampling R. HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. 2004. *Gene Ther*;11(22):1648-58.

Herold BC, WuDunn D, Soltys N, Spear PG. Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. 1991. *J Virol*; 65:1090-1098.

Hill A, Jugovic P, York I, Russ G, Bennink J, Yewdell, Ploegh H, Johnson D. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. 1995. *Nature* 375:411.

Hoggan MD, Roizman B. The isolation and properties of a variant of herpes simplex producing multinucleated giant cells in monolayer cultures in the presence of antibody. 1959. *Am J Hyg*; 70:208-219.

Hutchinson L, Goldsmith K, Snoddy D, Ghosh H, Graham FL, Johnson DC. Identification and characterization of a novel herpes simplex glycoprotein, gK, involved in cell fusion. 1992. *J Virol*: 66:5603-5609.

Ihrcke NS, Parker W, Reissner K.J, Platt J.L. Regulation of platelet heparanase during inflammation: role of pH and proteinases. 1998. *J Cell Physiol*: 175: 255-60.

Jones CA, Taylor TJ, Knipe DM. Biological properties of herpes simplex virus 2 replication-defective mutant strains in a murine nasal infection model. *Virology*. 2000 Dec 5;278(1):137-50.

Kadowaki N., Ho S., Antonenko S., et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. 2001. *J. Exp. Med*; 194:863–869.

Kainulainen VH, Wang H, Schick C, Bernfield M, Syndecans, heparan sulfate proteoglycans, maintain the proteolytic balance of acute wound fluids. 1998. *J.Biol.Chem* 273:11563-68.

Kanangat S., Babu J. S., Knipe D. M., Rouse B. T. HSV-1-mediated modulation of cytokine gene expression in a permissive cell line: selective upregulation of IL-6 gene expression. 1996. *Virology*; 219(1):295–300.

Kanangat S., Thomas J., Gangappa S., Babu J. S., Rouse B. T. Herpes simplex virus type 1-mediated up-regulation of IL-12 (p40) mRNA expression. Implications in immunopathogenesis and protection. 1996. *J. Immunol*;156:1110–1116.

Kaushic C, Ashkar AA, Reid LA, Rosenthal KL. Progesterone increases susceptibility and decreases immune responses to genital herpes infection. 2003. *J Virol*;77: 4558-4565

Keadle T. L., Usui N., Laycock K. A., Miller J. K., Pepose J. S., Stuart P. M. IL-1 and TNF-alpha are important factors in the pathogenesis of murine recurrent herpetic stromal keratitis. 2000. *Invest. Ophthalmol. Visual. Sci*; 41:96–102.

Kim YS, Ryu JH, Han SJ, Choi KH, Nam KB, Jang IH. Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. 2000, *J. Biol. Chem.* 275:32721-7.

Knipe, Howley Roizman, B. and Pellett, P. E. Herpesviridae. In *Fields' Virology*. 2001. 4th edn. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2381–2397

Kodukula P., Liu T., Rooijen N. V., Jager M. J., Hendricks R. L. Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. 1999. *J. Immunol*; 162

Koelle DM, Wald A, Herpes simplex virus: the importance of asymptomatic shedding. 2000. *J. Antimicrob. Chemother*, 45:1-8.

Koelle D. M., Corey L. Recent progress in herpes simplex virus immunobiology and vaccine research. 2003. *Clin. Microbiol. Rev*; 16:96–113.

Koelle DM. Vaccines for herpes simplex virus infections. 2006. *Curr Opin Investig Drugs*; 7(2):136-41.

Koelle DM, Corey L. Herpes simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. 2008. *Annu Rev Med*; 59:381-95.

Kohl S. Role of antibody-dependent cellular cytotoxicity in defense against herpes simplex virus infections. 1991. *Rev. Infect. Dis*; 13:108–114.

Krummenacher C., Nicola A. V., Whitbeck J. C., et al. Herpes simplex virus glycoprotein D can bind to poliovirus receptor-related protein 1 or herpesvirus entry mediator, two structurally unrelated mediators of virus entry. 1998. *J. Virol*; 72:7064-7074.

Kubat NJ, Tran RK, McAnany P, Bloom DC. Specific histone tail modification and not DNA methylation is a determinant of herpes simplex virus type 1 latent gene expression. 2004. *J Virol* 78(3) 1139-1149.

Kurt-Jones E.A, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, Arnold M.M, Knipe D.M, Finberg R.W, Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:(5)1315-20.

- Kusche-Gullberg M, Kjellen L. Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. 2003. *Curr Opin Struct Biol.* 13(5):605–611.
- Lachmann R. Herpes simplex virus-based vectors. 2004. *Int J Exp Pathol* ;85(4):177-90. Review.
- Lebwohl M., Sacks S., Conant M., et al. Recombinant alpha-2 interferon gel treatment of recurrent herpes genitalis. 1992. *Antiviral. Res*;17:235–243.
- Lee S., Gierynska M., Eo S. K., Kuklin N., Rouse B. T. Influence of DNA encoding cytokines on systemic and mucosal immunity following genetic vaccination against herpes simplex virus. 2003. *Microbes Infect*; 5:571–578.
- Leung MY, Liu C, Koon J.C.M, Fung K.P, Polysaccharide biological response modifiers. 2006. *Immun.L.* 105:101-114.
- Lingappa J R, Celum C. Clinical and therapeutic issues for herpes simplex virus-2 and HIV co-infection. 2007. *Drugs*; 67:155-74.
- Lingen M, Seck T, Weise K, Kalke D. Single amino acid substitutions in the glycoprotein B carboxy terminus influence the fusion from without property of herpes simplex virus type 1. 1995. *J Gen Virol*; 76: 1843-9.
- Lu Z., Yuan L., Zhou X., Sotomayor E., Levitsky H. I., Pardoll D. M. CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 2000;191:541–550.
- Lubinski J. M., Jiang M., Hook L., et al. Herpes simplex virus type 1 evades the effects of antibody and complement in vivo. 2002. *J. Virol*; 76.
- Lycke E, Johanson M, Svennerholm B, Lindahj U. Binding of Herpes Simplex virus to cellular heparan sulfate, an initial step in the adsorption process. 1991. *J Gen Virol* 72: 1131-1137.
- MacKie RM, Stewart B, Brown SM. Intralesional injection of herpes simplex virus 1716 in metastatic melanoma. 2001. *Lancet*; 357(9255):525-6.
- Marchant J, Roe A. Genital Herpes: Recognizing and Addressing Patients' Needs. 1997. *Herpes J*; 4(2): 36-41.
- Marconi P, Argnani R, Epstein A, Manservigi R. HSV as a vector in vaccine development and gene therapy. 2007. *Pharmaceutical Biotechnology*.

Mateu CG, Artuso MC, Linero FN, Scolaro LA, Pujol CA, Carlucci MJ. 2010. Comparative study of herpes simplex virus type 1 and 2 variants obtained by selective pressure exerted by carrageenans. 35th Annual International Herpesvirus Workshop. Salt Lake City, Utah, USA

Mateu CG, Perez Recalde M, Artuso MC, Hermida G, Linero FN, Scolaro LA, Damonte EB, Pujol CA, Carlucci MJ. Emergence of HSV-1 syncytial variants with altered virulence for mice after selection with a natural carrageenan. 2011. Sexually transmitted diseases. 38 (6):555-561.

Meyers JD. Management of cytomegalovirus infection. 1988. Am J Med;10:S477

Mikloska Z., Sanna P. P., Cunningham A. L. Neutralizing antibodies inhibit axonal spread of herpes simplex virus type 1 to epidermal cells in vitro. 1999. J. Virol.;73:5934–5944.

Montgomery R. I, Warner M. S, Lum B. J, Spear P. G. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. 1996. Cell;87: 427–436.

Muggeridge MI, Grantham ML, Johnson FB. Identification of syncytial mutations in a clinical isolate of herpes simplex virus 2. 2004. Virology; 328: 244-253

Muggeridge MI. Characterization of cell-cell fusion mediated by herpes simplex virus 2 glycoproteins gB, gD, gH and gL in transfected cells. 2000. J Gen Virology; 81: 2017-2027.

Mullick J, Kadam A, Sahu A. Herpes and pox viral complement control proteins: ‘the mask of self’ Trends. 2003. Immunol; 24:500–507.

Nagashunmugam T, Lubinski J, Wang L y col. In vivo immune evasion mediated by the herpes simplex virus type 1 immunoglobulin G Fc receptor. 1998. J. Virol; 72:5351–5359.

Nakashima H, Kido Y, Kobayashi N, Motoki Y, Neushul M, Yamamoto N. Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae. 1987. Antimicrob Agents Chemother. 31(10):1524-8.

Neta R, Sayers T. J, Oppenheim J. J. Relationship of TNF to interleukins. 1992. Immunol; 56:499–566.

Neumann J, Eis-Hübinger A.M, Koch N. Herpes simplex virus type 1 targets the MHC class II processing pathway for immune evasion. 2003, J.Immunol 171:3075-83.

Neyts J, Reymen D, Letourneur D, Jozefonvicz J, Schols D, Este J, Andrei G, McKenna P, Witvrouw M, Ikeda S, et al. Differential antiviral activity of derivatized dextrans. 1995. *Biochem Pharmacol.* 7:50 (6):743-51.

Nicola A. V, McEvoy A. M, Straus S. E. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. 2003. *J. Virol*;77: 5324–5332.

Novak N y Peng WM. Dancing with the enemy: the interplay of herpes simplex virus with dendritic cells. 2005. *Clin.Exp.Immunol*,142:405-410.

Oberley RE, Goss KL, Hoffmann DS, Ault KA, Neff TL y col. Regulation of surfactant protein D in the mouse female reproductive tract in vivo. 2007. *Molecular Human Reproduction* Vol.13, No.12 pp. 863–868.

Oragui E, Nadel S, Kyd P, Levin M. Increased excretion of urinary glycosaminoglycans in meningococcal septicemia and their relationship to proteinuria. 2000. *Crit.Care.Med.*28:3002-08.

Oragui E, Nadel S, Kyd P, Levin M. Increased excretion of urinary glycosaminoglycans in meningococcal septicemia and their relationship to proteinuria. 2000. *Crit Care Med*; 28: 3002-8.

Paludan S. R., Ellerman-Eriksen S., Kruys V., Mogensen S. C. Expression of TNF-alpha by herpes simplex virus-infected macrophages is regulated by a dual mechanism: transcriptional regulation by NF-kappa-B and activating transcription factor 2/jun and translational regulation through the AU-rich region of the 3' untranslated region. *J. Immunol.* 2001; 167:2202–2208.

Pujol CA, Scolaro L.A, Ciancia M, Matulewicz M.C, Cerezo A.S, Damonte E.B. Antiviral activity of a carrageenan from *Gigartina skottsbergii* against intraperitoneal murine herpes simplex virus infection. 2005, *Plant.Med.* 72:121-125.

Reading PC, Whitney PG, Batt DP, Smyth MJ, Brooks AG. NK cells contribute to the early clearance of HSV-1 from the lung but cannot control replication in the central nervous system following intranasal infection. 2006. *Eur J Immunol*; 36: 897-905.

Sande M, Armstrong D, Corey L, et al. Perspectives on a switch of oral acyclovir from prescription to over-the-counter status: report of a consensus panel. 1998. *Clin Infect Dis*; 26: 659-663.

Sarmiento M, 1988. Intrinsic resistance to viral infection. Mouse macrophage restriction of herpes simplex virus replication. 1988. *J Immunol*; 141: 2740-2748.

Schacker T. The role of HSV in the transmission and progression of HIV. 2001. *Herpes*; 8: 46-49

Schacker T, Zeh J, Hu H, Shaughnessy M, Corey L. Changes in plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA associated with herpes simplex virus reactivation and suppression. 2002. *J. Infect. Diseases*, 186, 1718-25.

Schneweis KE, Forstbauer H, Olbrich M, Tag M. Pathogenesis of genital herpes simplex virus infection in mice: III. Comparison of the virulence of wild and mutant strains. 1984. *Med Microbiol Immunol*; 173:187-196.

Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. 2006. *Int Immunopharmacol*. Mar;6(3):317-33.

Shukla D., Liu J., Blaiklock P., et al. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. 1999. *Cell*; 99:13–22.

Shuller D. Lower respiratory tract reactivation of herpes simplex virus. Comparison of immunocompromised and immunocompetent hosts. 1994. *Chest*. Jul;106:3S-7S.

Sodeik B. Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. 2002. *Trends Microbiol*; 8:465-472.

Spear P. G., Eisenberg R. J., Cohen G. H. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. 2000. *Virology*;275: 1–8.

Stanberry LR, Spruance SL, Cunningham AL, Bernstein DL, Mindel A, Sacks S, et al. Glycoprotein -D- adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl. J Med*; 347(21):1652-61.

Svend Ellermann-Eriksen. Macrophages and cytokine in the early defence against herpes simplex virus. 2005. *Virol. Journal*;3;2-59.

Tang VA, Rosenthal KL. Intravaginal infection with herpes simplex virus type 2 (HSV-2) generates a functional effector memory T cell population that persists in the murine genital tract. 2010. *J Reprod Immunol*; 87 (1,2):39-44.

Tal-Singer R., Peng C, Ponce de Leon M, Abrams R, Banfield W, Tufaro F, Cohen H, Eisenberg RJ. Interaction of herpes simplex virus glycoprotein gC with mammalian cell surface molecules. 1995. *J Virol* 69: 4471-4483.

Thomas S. K., Lilley C. E., Latchman D. S., Coffin R. S. A protein encoded by the herpes simplex virus (HSV) type 1 2-kilobase latency-associated transcript is phosphorylated, localized to the nucleus, and overcomes the repression of expression from exogenous promoters when inserted into the quiescent HSV genome. 2002. *J. Virol*;76.

Tognon M, Guandalini R, Romanelli MG, Manservigi R, Trevisani B. Phenotypic and genotypic characterization of RJ. Herpes simplex virus type 2 UL24 gene is a virulence determinant in murine and locus syn 5 in Herpes simplex virus 1. 1991. *Virus Res*; 18:135-150.

Tran M. T., Dean D. A., Lausch R. N., Oakes J. E. Membranes of herpes simplex virus type-1-infected human corneal epithelial cells are not permeabilized to macromolecules and therefore do not release IL-1alpha. 1998. *Virology*; 244(1):74–48.

Trybala E, Liljeqvist J-A, Svennerholm B, Bergstrom T. Herpes simplex type 1 and 2 differ in their interaction with heparan sulfate. 2000. *J Virol*; 74: 9106-9114.

Tyler KL, Fields BN. Pathogenesis of Viral Infections. 1991. *Fundamental Virology*. 2nd ed. New York, NY: Raven Press: 191-239.

Van Lint AL, Torres-Lopez E, Knipe DM. Immunization with a replication-defective herpes simplex virus 2 mutant reduces herpes simplex virus 1 infection and prevents ocular disease. 2007. *Virology*. Nov 25; 368(2):227-31.

Voorhis, Barrett L. K., Koelle D. M., Nasio J. M., Plummer F. A., Lukehart S. A. Primary and secondary syphilis lesions contain mRNA for Th1 cytokines and activated cytolytic T cells. 1996. *J. Infect. Dis*;173:491–495.

Wakimoto H., Johnson P. R., Knipe D. M., Chiocca E. A. Effects of innate immunity on herpes simplex virus and its ability to kill tumor cells. 2003. *Gene Ther*;10:983–990.

Warner M. S., Geraghty R. J., Martinez W. M., et al. A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. 1998. *Virology*; 246:179-189

Wawer MJ, Sewankambo N.K, Serwadda D, Quinn TC, Paxton L.A, Kiwanuka N, Wabwire-Mangen F. Control of sexually transmitted diseases for AIDS prevention in Uganda: a randomised community trial. 1999. *Rakai.Project.Study.Group.Lancet* 353:525-35.

Wheeler Jr, CE. Biologic comparison of a syncytial and a small giant cell-forming strain of herpes simplex. 1964. *J Immunol*; 93:749-756

Wilson DW, Davis-Poynter N, Minson AC. Mutations in the cytoplasmic tail of herpes simplex virus glycoprotein H suppress cell fusion by a syncytial strain. 1994. *J Virol*; 68(11): 6985-93.

Witvrouw M, De Clercq E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. 1997. *Gen Pharmacol*; 29:497-511.

Whaley K. J., Zeitlin L., Barratt R. A., Hoen T. E., Cone R. A. Passive transfer of the vagina protects mice against vaginal transfer of genital herpes infections. 1994. *J. Infect. Dis*;144:142–146.

Wong G. H., Goeddel D. V. Tumour necrosis factors alpha and beta inhibit virus replication and synergize with interferons. 1986. *Nature*;323:819–822.

WuDunn D, Spear PG. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. 1989. *J. Virol*; 63: 52-58.

Yasukawa M., Zarling J. M. Human cytotoxic T cell clones directed against herpes simplex virus-infected cells. I. Lysis restricted by HLA Class II MB and DR antigens. 1984. *J. Immunol*;133:422–427.

Yasukawa M., Inatsuki A., Kobayashi Y. Helper activity in antigen-specific antibody production mediated by CD4+ human cytotoxic T cell clones directed against herpes simplex virus. 1988. *J. Immunol*;140:3419–3425.

Yoon M., Zago A., Shukla D., Spear P. G. Mutations in the N termini of herpes simplex virus type 1 and 2 gDs alter functional interactions with the entry/fusion receptors HVEM, nectin-2, and 3-O-sulfated heparan sulfate but not with nectin-1. 2003. *J. Virol*; 77.