

Tesis Doctoral

Rol de los polisacáridos sulfatados y variantes del virus Herpes simplex tipo 1 en la patogenia viral

Artuso, María Carolina

2013-05-28

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:

Artuso, María Carolina. (2013-05-28). Rol de los polisacáridos sulfatados y variantes del virus Herpes simplex tipo 1 en la patogenia viral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Artuso, María Carolina. "Rol de los polisacáridos sulfatados y variantes del virus Herpes simplex tipo 1 en la patogenia viral". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-05-28.

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

Rol de los polisacáridos sulfatados y variantes del virus Herpes simplex tipo 1 en la patogenia viral

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

Lic. María Carolina Artuso

Directoras de tesis: Dra. Ma. Josefina Carlucci
 Dra. Rosa Wainstok

Consejera de Estudios: Dra. Elsa Damonte

Buenos Aires, 2013.

“Hay grandiosidad en esta concepción de que la vida, con sus diferentes fuerzas, ha sido alentada por el Creador en un corto número de formas o en una sola, y que, mientras este planeta ha ido girando según la constante ley de gravitación, se han desarrollado y se están desarrollando, a partir de un principio tan sencillo, infinidad de formas, las más bellas y maravillosas.”

Charles Darwin

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a mi directora, la Dra. Josefina Carlucci, por haberme invitado a ser parte de su grupo y enseñarme con tanta pasión una nueva forma de hacer ciencia. Por incentivar siempre a buscar un camino innovador y lleno de desafíos. Gracias, Jose!

A la Dra. Rosa Wainstok, por apoyarnos y acompañarnos en nuestro proyecto durante su codirección.

A Charly, por ser un gran amigo y brindarme tanto cariño paternal. Por haberme enseñado tanto durante estos años de trabajo y por compartir nuestras experiencias de vida.

A la Dra. Siloína Gazzaniga, por estar siempre dispuesta a ayudar y por haber aportado con tanta generosidad, toda su sabiduría en este proyecto. Por ser una gran científica y una gran persona.

A Ceci y a Mer, con quien compartí estos años de trabajo juntas. A Ceci por su compañía de todos los días y a Mer por su gran solidaridad y amistad.

A Flor, por ser una GRAN AMIGA. Gracias por tu apoyo incondicional en todos estos años, por enseñarme tanto y por ponerle alegría a todos los días!

A la Dra. Elsa Damonte por demostrar tanto conocimiento y vocación científica; por acompañarme en el desarrollo del trabajo y haber podido contar siempre con su respaldo. Gracias por su amabilidad y su protección!

A la Dra. Cybele García, por ser no sólo una excelente científica sino también una excelente persona, por haberme regalado tanta confianza y por haber recibido siempre palabras de aliento y su apoyo constante.

A la Dra. Susana Mersich, por enseñar con sus actos el amor por la ciencia, por sus consejos y su generosidad.

A Clau, Eli, Ana, Luana, Euge, Belu, Juli, Maru, Flavia y Carlos por estar siempre disponibles para lo que necesite! Por su compañía y su buena onda.

A Luis, Vivi, Andre, Eri, Nelly, Isa, Guille, Mónica, Laura A. por sus palabras, sus saludos, sus sonrisas y su experiencia.

A todo el área de Virología, por ser un grupo que demuestra calidad científica y sobre todo calidad humana!!!

A Die por compartir conmigo su vida, por su apoyo incondicional y su corazón inmenso. Por cuidarme y quererme tanto, por tomarme de la mano y acompañarme siempre en todo momento. A mi hijo Franquito, por sus sonrisas y sus mimos, por hacernos tan felices e iluminar nuestras vidas!

A mis padres por quienes siento una inmensa admiración por haber construido tanto, con sacrificio y mucho amor, por ayudarme a ser la persona que soy y aceptarme de esa manera, con mis defectos y mis virtudes. Por haberme regalado la oportunidad de crecer con tanta libertad, por su apoyo constante y su confianza ciega! Un millón de gracias!!!!

A mi hermano Pabli por su paciencia y su cariño, por ser alguien de pocas palabras pero de mucho sentimiento y por enseñarme experiencias grandes siendo el más chico! A mi mellizo Jor, por compartir todos nuestros años, por su alegría y fortaleza, por dejarme aprender tanto en cada momento, por nuestras charlas, lágrimas y sonrisas. Gracias hermanitos!!! A Valen y a Dani por hacer tan felices a mis hermanos!!!

A mis abuelos, mis tíos y primos, por estar siempre presentes, por formar parte de mi vida y poder contar con su compañía en todo momento. A todos mis familiares que en algún momento estuvieron pero que ya no están, por haberme regalado la oportunidad de guardar tan lindos recuerdos.

A mis amigas Ari, Silvi, Ale y Ro por estar siempre a mi lado, por tantos momentos vividos en todos estos años de amistad, momentos lindos y otros no tanto pero todos los vivimos juntas!! A todos mis amigos que me acompañaron en este camino, a los que pasaron y a los que quedaron, a los que nos separa la distancia pero nos une el sentimiento.

A Silvia, Horacio, Clau, Anto, Silvana, Hugo, Cami, Pau, Valen, Cande, Fer, Ceci, Coni, Valentino, Susi y Dani, por su gran amor, por ser tan lindas personas y estar siempre a nuestro lado!!!!

A todos los que formaron parte de mi vida y los que aún hoy lo siguen haciendo...

MUCHISIMAS GRACIAS!!!!

Los resultados de esta Tesis fueron presentados en forma parcial en los siguientes trabajos:

HSV-1 syncytial variants modulates the expression of TNF- α and IL-6 in a mice model of respiratory infection. Artuso, M.C., Linero, F.N., Gazzaniga, S., Pujol, C.A., Wainstok, R., Carlucci, M.J. Enviado a Intervirology para su publicación.

En el mismo periodo, la autora participó en las siguientes publicaciones de temas relacionados:

Emergence of HSV-1 syncytial variants with altered virulence for mice after selection with a natural carrageenan. Mateu, C.G., Perez Recalde, M., Artuso, M.C., Hermida, G., Linero, F.N., Scolaro, L.A., Damonte, E.B., Pujol, C.A., Carlucci, M.J. Sexually Transmitted Diseases. June 2011. 38 (6):555-561.

Capítulo de libro: "Polysaccharides from Red Algae: Genesis of a Renaissance." Carlucci, M.J., Mateu, C.G., Artuso, M.C. and Scolaro, L.A. (2012). The Complex World of Polysaccharides, Desiree Nedra Karunaratne (Ed.), ISBN: 978-953-51-0819-1, InTech, Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/the-complex-world-of-polysaccharides/polysaccharides-from-red-algae-genesis-of-a-renaissance>.

8th Joint Meeting of the International Cytokine Society (ICS) and the International Society for Interferon and Cytokine Research (ISICR). Cytokines in Infectious Diseases, Autoimmune Disorders and Cancer. Hyatt Regency, Chicago, Estados Unidos, del 3 al 7 de Octubre. Título: Differential Inflammatory Response to HSV-1 Variants in a Murine Model. Artuso, M.C., Mateu, C.G., Gazzaniga, S., Pujol, C.A., Wainstok, R., Carlucci, M.J.

34th Annual International Herpesvirus Workshop. Cornell University, Ithaca, Nueva York, Estados Unidos, del 25 al 31 Julio. Título: "Characterization of viral variants of HSV-1 obtained under selective pressure of sulfated polysaccharides" Autores: Artuso, M.C., Mateu, C.G., Perez Recalde, M., Hermida, G., Pujol, C.A., Damonte, E., Carlucci, M.J.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN	11
1. INTRODUCCIÓN.....	16
1.1. Herpesvirus	16
1.1.1. <i>Alphaherpesvirinae</i>	17
1.1.2. <i>Betaherpesvirinae</i>	18
1.1.3. <i>Gammaherpesvirinae</i>	18
1.2. Virus Herpes simplex.....	18
1.3. Virus Herpes simplex Tipo 1	19
1.3.1. Estructura viral	19
1.3.2. Infección de HSV	22
1.3.3. Manifestaciones clínicas y patogénesis	30
1.3.4. Herpes y la inmunidad del huésped	31
1.4. Las algas y los carragenanos	34
1.5. Relación entre glicosaminoglicanos, carragenanos y virus.....	37
2. OBEJTIVOS.....	40
2.1. Objetivo General	40
2.2. Objetivos Específicos.....	40
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	42
4. MATERIALES Y MÉTODOS	44
4.1. Compuestos	44
4.2. Líneas celulares	44
4.3. Recuento en cámara de Neubauer	45
4.4. Obtención de macrófagos peritoneales	45

4.5. Virus	46
4.5.1. Cepas	46
4.5.2. Obtención de las suspensiones virales	46
4.5.3. Titulación viral.....	46
4.6. Determinación de actividad antiviral y virucida.....	47
4.6.1. Determinación de la actividad antiviral: reducción del número de placas	47
4.6.2. Determinación de la actividad virucida.....	47
4.7. Obtención de variantes y clonación	48
4.7.1. Obtención de variantes de HSV-1	48
4.7.2. Clonación de pasajes virales	49
4.7.3. Efecto citopático por tinción de Giemsa.....	49
4.8. Análisis de citoquinas por PCR y ELISA	50
4.8.1. Cuantificación de citoquinas.....	50
4.8.2. RT-PCR.....	50
4.8.2.1. Extracción de ARN	50
4.8.2.2. Síntesis de ADNc	51
4.8.2.3. Desarrollo de la PCR.....	51
4.9. Análisis de las poblaciones celulares en pulmón de ratones infectados	52
4.9.1. Obtención del homogenato de pulmón.....	52
4.9.2. Marcación de las muestras	52
4.10. Secuenciación de la Timidina Quinasa y de la ADN polimerasa.....	53
4.10.1. Extracción de ADN.....	53
4.10.2. Amplificación por PCR.....	54
4.10.3. Purificación de los fragmentos amplificados	55

4.10.4. A-tailing y ligación al vector pGEM-T easy.....	55
4.10.5. Transformación de células competentes JM109.....	55
4.10.6. Colony PCR y amplificación de bacterias transformadas	56
4.10.7. Minipreps.....	56
4.10.8. Secuenciación	57
4.11. Efecto de la ciclosporina A y melitina	57
4.12. Estudio de la virulencia de HSV-1 (F) y sus variantes virales	57
4.12.1. Lavados vaginales	58
4.12.2. Lavados bronquioalveolares.....	58
4.12.3. Extracción y titulación de órganos.....	59
4.13. Cortes histológicos.....	59
4.14. Detección de moléculas de adhesión por citometría de flujo.....	60
4.15. Estudio <i>in vivo</i> de la virulencia de HSV-1 (KOS) y sus variantes virales	60
4.15.1. Infección intravaginal	61
4.15.2. Infección intranasal	61
5. RESULTADOS	64
Capítulo 1: Selección y caracterización de variantes de HSV-1 cepa KOS.....	64
5.1. Selección de variantes virales de HSV-1 cepa KOS	65
5.2. Preselección de clones de HSV-1 KOS.....	70
5.3. Susceptibilidad de las variantes virales a distintos compuestos	73
5.4. Replicación y efecto citopático de HSV-1 KOS y sus variantes virales.....	74
5.5. Estudio patogénico de las variantes de HSV-1 cepa KOS	77
5.6. Cuantificación de citoquinas en lavados vaginales.....	79
Capítulo 2: Estudio de la patología pulmonar producida por HSV-1 F y sus variantes obtenidas con 1C3.....	83

5.7. Histopatología de pulmón de ratones infectados con HSV	85
5.8. Análisis de las poblaciones celulares en pulmón.....	87
5.9. Titulación viral en pulmón.....	90
5.10. Cuantificación de citoquinas en lavados bronquioalveolares.....	91
5.11. Cuantificación de citoquinas en macrófagos RAW 264.7	93
5.12. Expresión de las moléculas de adhesión ICAM y VCAM en células endoteliales	98
Capítulo 3: Estudio molecular comparativo de las variantes de HSV-1 F y HSV- 1 KOS.....	103
5.13. Estudio molecular de la secuencia de gD en HSV-1 F, HSV-1 KOS y sus respectivas variantes.	103
5.14. Susceptibilidad de las variantes syn a la ciclosporina A y melitina.....	108
5.15. Secuenciación de la Timidina Quinasa.....	109
5.16. Secuenciación de la ADN polimerasa.....	113
6. DISCUSIÓN.....	116
7. BIBLIOGRAFÍA	128

ABREVIATURAS

ACV	Aciclovir
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ADNdc	Ácido desoxirribonucleico doble cadena
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Lavados bronquioalveolares
CC	Control celular
CGNs	Carragenanos
CI50	Concentración inhibitoria 50
CV	Control viral
CV50	Concentración virucida 50
DE	Desvío Estándar
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle Medium
EBV	Virus Epstein-Barr
g	Glicoproteína
GAGs	Glicosaminocliganos
H ₂ O (d)	Agua destilada
HCMV	Citomegalovirus Humano
HHV-6	Virus Herpes humano 6
HHV-7	Virus Herpes humano 7
HHV-8	Virus Herpes humano 8
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
hs	horas
HS	Heparán sulfato
HSV-1	Virus Herpes simplex Tipo 1
HSV-2	Virus Herpes simplex Tipo 2
HVEM	Herpesvirus entry mediator
i.p.	Intraperitoneal
i.n.	Intranasal
i.v.	Intravaginal
ι	Carragenano Iota

ICAM	Molécula de adherencia intracelular
IL	Interleuquina
INF	Interferón
κ	Carragenano Kappa
kpb	Kilo pares de bases
LAT	Transcripto asociado a latencia
LPS	Lipopolisacárido
MEM	Medio esencial Eagle
min	Minutos
m.i.	Multiplicidad de infección
ml	Mililitros
MM	Medio de mantenimientos
NK	Natural Killer
nm	Nanómetro
ORF	Marco de lectura abierto
p.i.	Post-infección
PBS	Buffer Fosfato Salino
PFA	Foscarnet
RR	Resistencia Relativa
SFB	Suero Fetal Bovino
RTNF	Receptor de TNF
SNC	Sistema Nervioso Central
Syn	Sincicial
TGN	Red de Trans Golgi
Th	Linfocito T Helper
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TQ	Timidina Quinasa
UFP	Unidades Formadoras de Placas
UV	Ultravioleta
μg	Microgramo
VCAM	Molécula de Adherencia vascular
VZV	Virus Varicela Zoster

RESUMEN

RESUMEN

ROL DE LOS POLISACÁRIDOS SULFATADOS Y VARIANTES DEL VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 1 EN LA PATOGENIA VIRAL

El virus Herpes simplex (HSV) es responsable de una variedad de manifestaciones clínicas desde úlceras oro-faciales y genitales hasta encefalitis y alteraciones respiratorias. Los síntomas son usualmente autolimitantes pero pueden ser extensivos y prolongados en individuos inmunocomprometidos. En estos casos, puede requerirse una larga terapia antiviral, lo que resulta en la generación de virus resistentes a las drogas como el aciclovir (ACV).

El HSV ingresa a las células mediante una interacción primaria entre las glicoproteínas virales y el heparán sulfato (HS), molécula presente en la superficie celular y en la matriz celular. Los carragenanos (CGNs) son polisacáridos sulfatados derivados de algas rojas cuya estructura es similar a la del HS. Ellos actúan como inhibidores potentes y selectivos de HSV, al bloquear la interacción de virus con su receptor primario en la etapa de adsorción viral.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se seleccionaron y caracterizaron variantes virales de HSV-1 cepa F. Éstas fueron obtenidas bajo presión de selección con un CGN natural μ/v denominado 1C3 de estructura relacionada con los CGNs kappa (κ) e iota (ι)-(1C3syn14-1 y 1C3syn17-2). A fin de evaluar la reproducibilidad del método utilizado para generar las variantes virales se realizaron pasajes seriados de HSV-1 cepa KOS en células Vero en presencia de concentraciones crecientes de CGN ι o heparina (H). Se seleccionaron 4 clones, ι 16-6, ι 16-11, H17-5 y H17-16, los cuales exhibieron características similares en: resistencia relativa al compuesto usado durante el tratamiento selectivo y al ACV, al igual que su curva de replicación viral. Además, fueron menos virulentos que la cepa patrón en ratones BALB/c por inoculación intravaginal pero no por vía intranasal, a excepción de la variante ι 16-11 que fue atenuada por ambas vías.

Por otro lado, se profundizó el estudio de la caracterización citopática y patogénica de las variantes virales, derivadas de HSV-1 F, en mucosa respiratoria. Se demostró la activa participación de los macrófagos como protagonistas en la patología viral y se la correlacionó con la menor activación de citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-6) en relación con la cepa control.

Alteraciones puntuales detectadas en el gen de la glicoproteína D de las variantes virales podrían ser parte responsable de la liberación disminuida de citoquinas proinflamatorias. Mientras que las moléculas de adhesión VCAM e ICAM no se vieron afectadas. Por otro lado se mostró, que el procedimiento empleado usando CGNs permitió la selección y/o modificación de los genes de la Timidina Quinasa y la ADN polimerasa sin alterar la resistencia viral al ACV.

El conjunto de estos resultados indican que la regulación de los niveles de las citoquinas TNF- α e IL-6 juega un rol importante en la patología respiratoria de HSV y además que el método utilizado de obtención de las variantes permite la selección de virus con características estables. Estos resultados contribuyen a la caracterización de las variantes virales con el objetivo de profundizar los conocimientos de la respuesta inflamatoria en el tracto respiratorio luego de una infección por HSV.

Palabras Claves: virus Herpes simplex, Carragenanos, variantes virales, atenuación, inmunopatología.

ROLE OF SULFATED POLYSACCHARIDES AND HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1 VARIANTS IN VIRAL PATHOGENICITY

Herpes simplex virus (HSV) is responsible for a variety of clinic manifestations, from oro-facial and genital ulcers to encephalitis and respiratory disorders. Symptoms are usually self-limiting but they can be extensive and prolonged in immunocompromised patients. In these cases, it might be required a long antiviral therapy, resulting in the generation of drug-resistant viruses such as Acyclovir-resistant viruses.

HSV enters the cell by a primary interaction between viral glycoproteins and the heparan sulfate (HS), molecule present in the cell surface and cellular matrix. Carrageenans (CGN) are sulfated polysaccharides derived from red algae with a chemical structure similar to HS. CGN were identified as potent and selective inhibitors of HSV by blocking the interaction between the virus and HS during the adsorption.

In previous studies carried out in our laboratory, viral variants from HSV-1 strain F were selected and characterized. They were obtained under selective pressure of the μ/v -1C3 natural CGN with a chemical structure related to the kappa (κ) and iota (ι) CGNs (1C3syn14-1 and 1C3syn17-2). In order to evaluate the reproducibility of the method used to generate viral variants, serial passages were done with HSV-1 strain KOS in Vero cells in the presence of increasing concentrations of the ι CGN or heparine (H). Four clones were selected: ι 16-6, ι 16-11, H17-5 and H17-16, which exhibited similar characteristics such as relative resistance to the compound used for the selective treatment and ACV, as well as their viral replication curve. Furthermore, they were less virulent than the parental strain in BALB/c by intravaginal inoculation but not intranasally, except for the variant ι 16-11 which was attenuated by both routes.

On the other hand, the cytopathic and pathogenic effect of the viral variants, derived from HSV-1 F virus, were characterized in the respiratory mucosa. It was demonstrated that the active involvement of macrophages as

key players in the viral pathology correlated with the lower release of the inflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) in relation with the parental strain.

Punctual mutations detected in the gene of glycoprotein D of the viral variants could be partially responsible for the low concentration of the inflammatory cytokines. Moreover, the expression of adhesion molecules VCAM and ICAM was not altered. It was also shown that the use of the CGN allowed the selection and/or modification of the Thymidine Kinase and DNA polymerase genes without modifying resistance to ACV.

All these results indicate that the regulation of TNF- α and IL-6 play a key role in the respiratory pathology of HSV and that the method used to obtain the viral variants allows the selection of virus with stable and attenuated characteristics. Results obtained in the present study contribute to characterize viral variants in order to extend the knowledge about the cellular inflammatory response induced in the respiratory tract by HSV-1.

Keywords: virus Herpes simplex virus, Carrageenans, viral variants, attenuation, immunopathology

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Herpesvirus

Los herpesvirus se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y logran infectar distintas especies, desde las almejas y peces marinos hasta la mayoría de los vertebrados acuáticos y terrestres incluyendo humanos (Villarreal L.P., 2005).

De los más de cien tipos de Herpesvirus que fueron al menos parcialmente caracterizados, ocho fueron aislados a partir de humanos: virus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1), virus Herpes simplex tipo 2 (HSV-2), Citomegalovirus humano (HCMV), virus varicela zoster, (VZV), virus Epstein-Barr (EBV) y los herpesvirus 6, 7 y 8 humano (HHV-6, HHV-7, HHV-8, respectivamente).

La familia *Herpesviridae* se caracteriza por presentar un ADN lineal doble cadena, cápside icosaédrica de 100 a 110 nm aproximadamente, constituido por 162 capsómeros; un tegumento amorfo y asimétrico que rodea la cápside y una envoltura cuya superficie contiene espículas glicoproteicas.

Estos virus presentan genomas de gran tamaño (más de 100 kpb) lo cual refleja su larga historia evolutiva. El herpesvirus es filogenéticamente antiguo y ha logrado co-evolucionar con el hombre (Pellett P.E. y Roizman B., 2007). La adaptación a su huésped ha permitido no sólo infectar al hombre sin causar demasiado daño, sino también “escondarse” en el sistema nervioso por el resto de su vida.

Los herpesvirus conocidos comparten cuatro propiedades biológicas que son significativas:

- 1- Todos presentan enzimas para el metabolismo de ácidos nucleicos, síntesis de ADN y procesamiento de proteínas.
- 2- Tanto la síntesis de ADN viral como el ensamblaje de la cápside ocurren en el núcleo.

3- La producción de la progenie está acompañada por una destrucción irreversible de la célula infectada.

4- Los virus examinados hasta la fecha son capaces de mantener infecciones latentes en sus huéspedes naturales. Dentro de las células donde se encuentran latentes, los genomas virales mantienen un arreglo molecular de forma circular y sólo pueden expresarse un grupo reducido de genes.

Sin embargo, los herpesvirus también presentan gran variabilidad en otras propiedades biológicas. Por ejemplo, algunos virus como el HSV-1 y HSV-2 presentan un amplio rango de células-huésped, pueden multiplicar eficientemente y destruyen muy rápidamente las células que infectan. Por otro lado, otros virus como el EBV y el HHV-6 presentan un rango de células-huésped más acotado y el HCMV multiplica más lentamente. Mientras que todos los herpesvirus se mantienen latentes en células específicas, dichas células varían según el virus estudiado. Como ejemplos, en el caso de HSV, se recuperan viriones a partir de las neuronas sensoriales, sin embargo EBV hace latencia en linfocitos B. Otra característica en la que difieren entre sí es en las manifestaciones clínicas de las enfermedades que cada uno causa.

La diversidad en dichas características ha permitido clasificar a la familia *Herpesviridae* en tres subfamilias a través del Grupo de Estudio del Herpevirus perteneciente al ICTV (por sus siglas en inglés de *Internacional Committee on the Taxonomy of Viruses*): *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammapherpesvirinae* (Fauquet C.M. y Fargette D., 2005).

1.1.1. *Alphaherpesvirinae*

Los virus pertenecientes a esta familia se caracterizan por un rango de huéspedes variable, ciclo reproductivo corto, diseminación rápida en cultivos celulares, destrucción eficiente de células infectadas y capacidad de establecer latencia en el sistema nervioso periférico, ganglios trigémino o sacro, según la vía de entrada. Algunos ejemplos son HSV-1, HSV-2 y el VZV.

1.1.2. *Betaherpesvirinae*

Una característica, aunque no exclusiva, de esta subfamilia es el rango acotado de huéspedes. El ciclo reproductivo es largo y el progreso de la infección en cultivo celular es lento. En general, las células infectadas sufren de citomegalia (aumentan de tamaño) y pueden establecer latencia en glándulas secretorias, células linfocitocitales, riñones y otros tejidos. El HCMV, HHV-6 y HHV-7, son algunos Betaherpesvirus.

1.1.3. *Gammaherpesvirinae*

Todos los herpesvirus de esta subfamilia replican *in vitro* en células linfoblastoides y algunas causan infecciones líticas en algunos tipos de células epiteloides y fibroblásticas. Los gamaherpesvirus son específicos para linfocitos T o B. Dentro de los linfocitos, la infección suele ser pre-lítica o lítica pero sin producción de progenie infecciosa. La latencia en general se establece en el tejido linfocitario. Un ejemplo es el EBV.

1.2. Virus Herpes simplex

El HSV fue identificado por primera vez por Lowenstein en 1919. Cuarenta años más tarde, Schneweis los clasificó en dos grupos serológicos diferentes (Schneweis K.E., 1962) y finalmente fueron designados formalmente como HSV-1 y HSV-2 por el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (Roizman B. y col., 1981). HSV-1 y HSV-2 son muy similares entre sí, presentan un 83% de homología en las regiones codificantes para proteínas y un porcentaje menor en las no codificantes. Los tamaños de sus genomas tampoco varían significativamente (152 kpb para HSV-1 y 155 kpb para HSV-2) (McGeoch D.J. y col., 1988) y además codifican para genes correspondientes (Dolan A. y col., 1998). Las pequeñas diferencias en las secuencias generan sitios de restricción diferentes para las endonucleasas, los cuales permiten ser utilizados como herramientas epidemiológicas importantes (Sakaoka H. y col.,

1994). En general, el HSV-1 causa lesiones oro-faciales mientras que el HSV-2 lo hace en la zona genital. Sin embargo, se ha detectado la presencia de ambos virus en ambas zonas del cuerpo. En este contexto, cabe destacar que estudios epidemiológicos realizados en los últimos años en los Estados Unidos, han demostrado un importante incremento en la transmisión sexual de HSV-1 (Gupta R. y col., 2007) donde se observó que un 60% de la población estudiada con herpes genital fue producido por HSV-1. El área de infección depende del sitio de inoculación, es por ello que las regiones más comunes de aparición de vesículas son la boca o el área genital.

Además, tanto HSV-1 como HSV-2 pueden ser una seria amenaza para individuos inmunocomprometidos, como ser neonatos, pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) o aquellos que se encuentran bajo tratamientos inmunosupresivos.

1.3. Virus Herpes simplex Tipo 1

1.3.1. Estructura viral

Al igual que todos los Herpesvirus, el HSV-1 es un virus envuelto con cápside icosaédrica de aproximadamente 100nm. A través de la envoltura lipídica se encuentran ancladas las glicoproteínas. Hasta el momento se han descrito 12 glicoproteínas diferentes: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM, gN (Campadelli-Fiume G. y col., 2000; Diefenbach R.J. y col., 2008; Mettenleiter T.C., 2004). Su principal función se encuentra relacionada con la adhesión a las células a través de receptores y la fusión de membranas, en especial gB y gD, aunque algunas de ellas tienen diferentes efectos inmunorregulatorios.

En el espacio entre la envoltura y la cápside, la partícula viral posee una estructura amorfa denominada tegumento. Mediante análisis de proteómica se ha demostrado que el tegumento presenta 23 proteínas virales involucradas en las fases iniciales de la infección y replicación como el transporte del ADN viral fuera de la cápside (Loret S. y col., 2008; Zhou Z.H. y col., 1999), el

silenciamiento del mecanismo de síntesis celular (Read G.S. y Frenkel N., 1983) y la iniciación de la transcripción de genes virales (Batterson W. y Roizman B., 1983). En los últimos años se ha demostrado que las proteínas del tegumento cumplen roles multifuncionales. Participan tanto en todos los pasos del ciclo de replicación lítico como en la reactivación de la latencia a través de la manipulación del ambiente intracelular del huésped (Kelly B.J. y col., 2009).

La cápside está compuesta por una estructura compleja icosaédrica formada por 162 capsómeros, cada uno con un canal central que corre desde la parte externa hacia la interna de la cápside y formados por 6 proteínas virales diferentes presentes en la superficie (Diefenbach R.J. y col., 2008). Dentro de ésta, se encuentra empaquetado el genoma de ADN lineal doble cadena con sus extremos muy cercanos (Fig. 1).

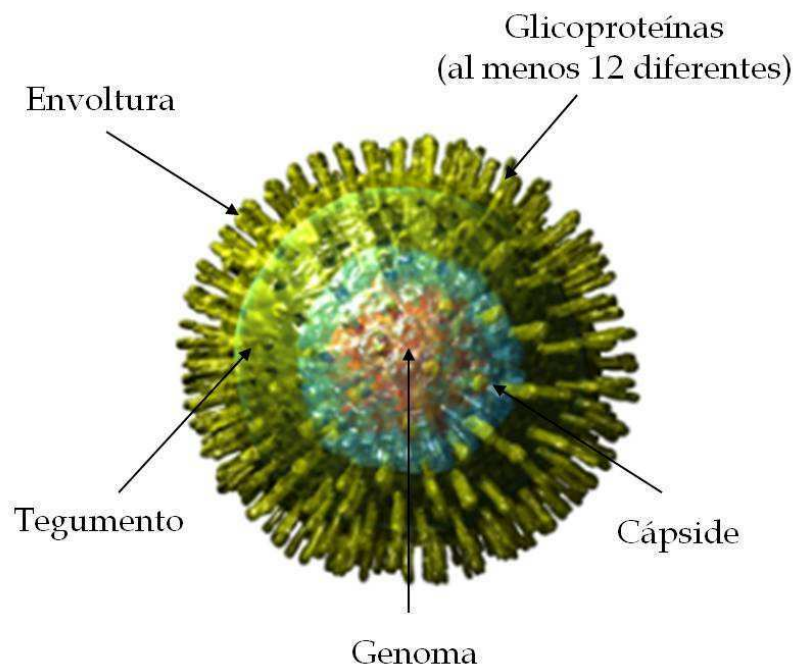


Figura 1: Estructura del virus Herpes simplex. Modelo de partícula viral donde se esquematizan los diferentes componentes virales. De adentro hacia fuera: genoma viral (ADNdc lineal de 152kb), cápside, tegumento y envoltura viral con espículas de glicoproteínas.

El genoma es una única molécula que se divide en dos segmentos denominados S y L (Short y Long, respectivamente) los cuales se encuentran

unidos en forma covalente y presentan secuencias invertidas repetidas en cada uno de sus respectivos extremos. El ADN contiene una gran densidad de información genética con 94 marcos de lectura abiertos (ORF), aproximadamente (Fig. 2). De estos, alrededor de 84 codifican para polipéptidos de los cuales sólo 37 son necesarios para la replicación del virus en células de cultivo (Read G.S. y Frenkel N., 1983).

Los genes virales se expresan en forma de cascada en grupos denominados inmediatamente tempranos (α), tempranos (β), tempranos tardíos (γ_1) y tardíos (γ_2). En general, los productos de los genes α son inductores de la transcripción, los de los genes β son enzimas virales como la Timidina Quinasa (TQ) y ADN polimerasa (ADN pol) y los productos de los genes γ son proteínas estructurales de las partículas virales (Whitley R.J. y Roizman B., 2001).

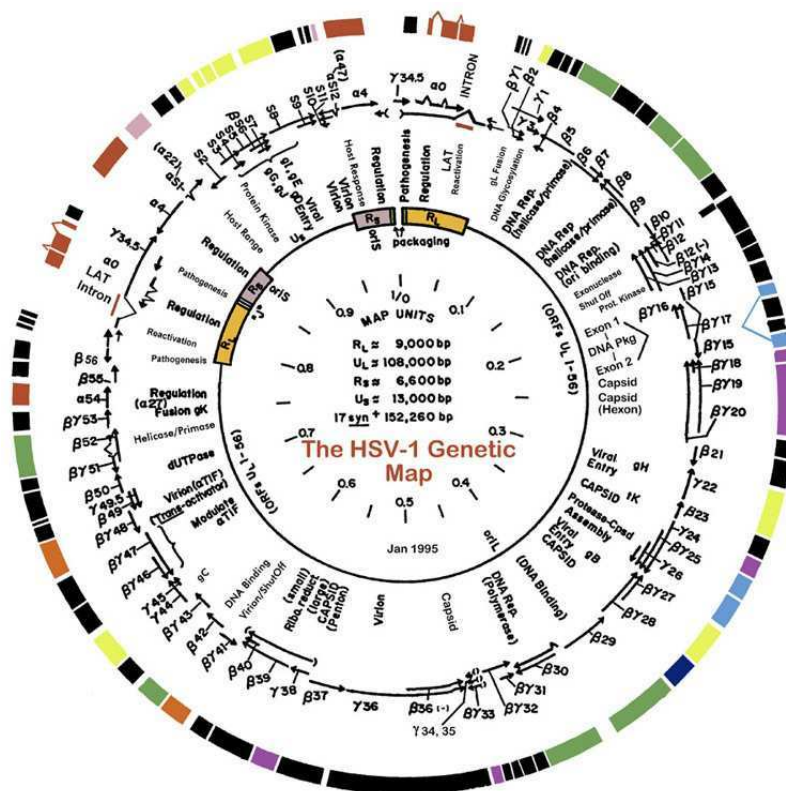


Figura 2: Organización funcional del genoma de HSV-1. El ADN viral de HSV contiene dos regiones únicas denominadas UL y US, cada una de ellas flanqueada por repeticiones invertidas (TRL/IRL y TRS/IRS). Cada región codifica para distintas proteínas, estructurales y no estructurales.

Este mapa genético tan complejo se lo puede dividir en seis regiones principales:

- 1- Los extremos de las moléculas lineales. Éstos son importantes tanto en la “circularización” del ADN viral como en el empaquetamiento del genoma en el virión.
- 2- La secuencia “*Long Repeat*” (R_L) de 9 kpb la cual codifica para una proteína regulatoria importante del grupo α (α_0) y el promotor del transcripto asociado a la latencia (LAT).
- 3- La región “*Long Unique*” (U_L) que consiste en 108 kpb y codifica para más de 56 proteínas diferentes. Contiene genes para enzimas de la replicación del ADN y proteínas de la cápside, entre otras.
- 4- R_S (*short repeat*), de 6,6 kpb que codifica para una proteína α muy importante que actúa como un potente activador transcripcional y junto con α_0 y α_{27} en la región U_L estimulan la expresión génica viral dentro de la célula infectada, permitiendo así la replicación del ADN viral.
- 5- El origen de la replicación. ori_L que se encuentra en el medio de la región U_L y ori_S en la R_S del cual existen dos copias. Por lo tanto las tres regiones operan en conjunto durante la infección dando como resultado un aparato de replicación complejo.
- 6- La región “*Short Unique*” (U_S) de 13 kpb codifica para 12 ORFs de los cuales una gran parte son glicoproteínas involucradas en el rango de hospedador y en la respuesta contra su defensa inmunológica.

1.3.2. Infección de HSV

Luego de la infección inicial, el HSV se mantiene latente en las neuronas sensoriales y replica en células epiteliales durante la infección primaria y reactivación (Heldwein E.E. y Krumpfenacher C., 2008). Durante este período, el huésped es capaz de diseminar la infección a otro humano esparciendo viriones en forma asintomática. La reactivación del virus puede deberse a una

variedad de estímulos ambientales, como estrés físico o emocional, y como consecuencia lleva a una replicación viral en células epiteliales que produce lesiones mucocutáneas intermitentes por el resto de la vida del huésped. La habilidad de HSV de evadir al sistema inmune y de establecer latencia en una proporción significativa de la población (80% HSV-1 y 40% HSV-2) es facilitado por su capacidad de entrar a las células del epitelio para la expresión de genes virales, replicación y eventualmente, diseminación de célula a célula hacia las terminales nerviosas y finalmente a los ganglios sensoriales para el establecimiento de la latencia. Por lo tanto la entrada del virus al huésped marca el paso más crítico para la patogenia viral.

La infección viral se puede describir en los siguientes pasos:

a. Adsorción y entrada

En esta primer etapa, el virus se adsorbe a la célula a través de la glicoproteína B o C (gB o gC) que interactúa con el receptor celular, una cadena de heparán sulfato (HS) de proteoglicano en la superficie celular (Fig. 3) (Shukla D. y Spear P.G., 2001; Spear P.G., 2004). Esta interacción permite que el virus se ancle a las células concentrándolo en la superficie celular (Connolly S.A. y col., 2011). Si bien el gC exagera la unión del HSV a través de su interacción con el HS, su presencia no es imprescindible para la entrada (Spear P.G. y Longnecker R., 2003).

El HS es un anclaje importante para la mayoría de los herpesvirus y facilita la interacción subsecuente con otros correceptores necesarios para la entrada. Dependiendo del tipo de interacción y del tamaño de la cadena de HS, una sola podría unir múltiples ligandos virales en un mismo virión (Shukla D. y Spear P.G., 2001).

El siguiente paso es crucial, donde gD interactúa con su receptor de entrada (Fig. 3) de los cuales se han descrito tres clases: el mediador de entrada de herpes virus (HVEM) que pertenece a la familia de receptores del Factor de Necrosis Tumoral; nectina-1, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Spear P.G. y col., 2000) y el heparán sulfato-3-O-sulfatado

(HS 3-O-S) que es una modificación del HS llevada a cabo por enzimas 3-O-sulfotransferasas (O'Donnell C.D. y Shukla D., 2008). El uso diferencial de estos receptores es importante para la entrada a los diferentes tipos celulares y la infección en células polarizadas. Por ejemplo, nectina-1 es importante para infecciones en mucosa vaginal, neuronas, keratinocitos, células epiteliales y endoteliales (Galen B. y col., 2006; Huber M.T. y col., 2001; Krummenacher C. y col., 2004; Linehan M.M. y col., 2004; Simpson S.A. y col., 2005). Este receptor se encuentra localizado principalmente en las uniones adherentes de las células y tejidos donde se expresa (Takahashi K. y col., 1999) y forman parte de las uniones célula-célula al interactuar con otras nectinas (Takai Y. y Nakanishi H., 2003).

Por otro lado, HVEM se expresa principalmente en células linfoides como células T y B y monocitos, en tejido pulmonar, hígado, riñón y tejido linfoide y también, aunque en menor medida, en fibroblastos y células endoteliales (Montgomery R.I. y col., 1996; Tiwari V. y col., 2005). Stiles y col. han propuesto que la interacción de HSV con dicho receptor tendría un rol importante en la modulación de la respuesta inmune (Stiles K.M. y col., 2010). Luego de la unión a uno de dichos receptores, se generan cambios conformacionales en gD que conllevan a la interacción con gB y el dímero gH-gL y resulta en una fusión de membrana mediante un mecanismo que aún no se conoce en detalle (Fig. 3) (Lazear E. y col., 2012; Perez-Romero P. y col., 2005; Spear P.G. y Longnecker R., 2003).

Según publicaron Atanasiu y col., gD activa gH/gL y permite la unión y activación de la actividad fusogénica de gB. Sus datos sugieren que gB es el único fusógeno de HSV y que gD y gH/gL actúan estimulando la fusión célula-célula y virus-célula permitiendo la entrada de HSV (Atanasiu D. y col., 2010).

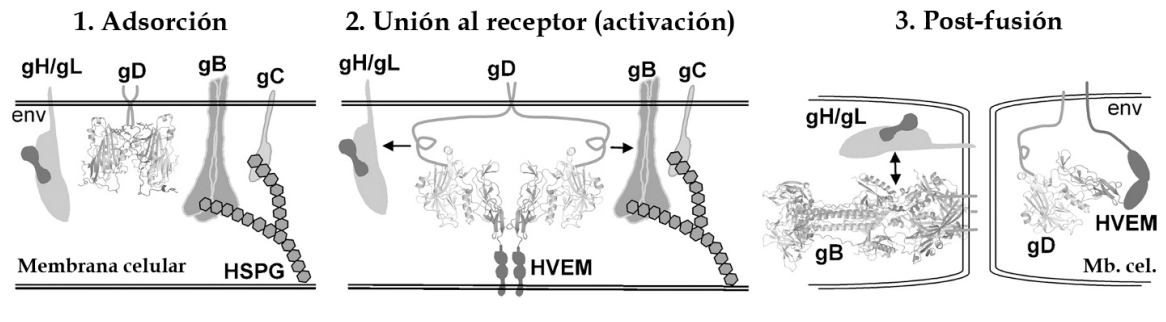


Figura 3: Ilustración de los pasos de la entrada de HSV-1. Las estructuras de gD y gB están ubicadas en el contexto de entrada del virus a fin de ilustrar los cambios moleculares y las interacciones durante la adsorción, unión al receptor y estado post-fusión. La posición relativa de cada proteína es hipotética. Las cristalografías de gB y gD se encuentran ilustradas a escala en relación de una con la otra.

Los virus envueltos entran a las células induciendo la fusión entre la envoltura viral y la membrana celular. Dicha fusión puede ser disparada, según el tipo de célula, de al menos dos maneras resultando en diferentes vías de entrada (Milne R.S. y col., 2005; Nicola A.V. y col., 2005). Por ejemplo, la unión del virus a la célula puede inducir endocitosis del virus seguido por la acidificación del endosoma, que a su vez puede disparar la fusión de la envoltura del virus con la membrana endosomal. En forma alternativa, la unión del virus a la célula puede generar múltiples interacciones ligando-receptor en la superficie celular que dispara la fusión. La mayoría de los herpesvirus entrarían a la célula a través de esta última vía. La fusión puede ocurrir también por endocitosis de la partícula viral en el endosoma, pero no es dependiente de la acidificación de éste (Shukla D. y Spear P.G., 2001). Cualquiera sea la vía de entrada que el virus utiliza, siempre son esenciales las glicoproteínas gD, gB, gH/gL y un receptor celular (Nicola A.V. y Straus S.E., 2004). Durante la diseminación viral ocurre un proceso similar al de la fusión de membrana, denominado fusión célula-célula y consiste en la fusión de la membrana plasmática de una célula infectada con la membrana de una célula vecina sin infectar. Se ha reportado que el receptor celular HS 3-O-S estaría involucrado en el evento de fusión célula-célula (O'Donnell C.D. y Shukla D., 2008). Una vez que el virus entra, las glicoproteínas virales se expresan en la superficie de las

células infectadas. Esto permite la unión y fusión de las glicoproteínas virales en la superficie celular de las células infectadas con las vecinas que no lo están, y se forma lo que se conoce como “sincicio” (Akhtar J. y Shukla D., 2009). La fusión célula-célula permite que el virus se disemine sin necesidad de salir al medio extracelular y así evita al sistema inmune del huésped. La diseminación del HSV-1 no está bien descrita y aún no se conoce con profundidad el rol del HS en este proceso. En el 2011, Karasneh y col. reportaron que el sindican-1, una cadena simple de HS transmembrana, contribuye a la formación de la fusión célula-célula de HSV-1 y a su diseminación lateral. El aumento del sindican-1 en células blanco incrementa dicha fusión mientras que su disminución reduce tanto la fusión celular como la diseminación (Karasneh G.A. y col., 2011).

b. Replicación y formación de la progenie viral

Luego de la fusión la nucleocápside de HSV es transportada por microtúbulos hasta el núcleo a través de la interacción con el motor molecular celular formado por el complejo dineína/dinactina (Dohner K. y col., 2002; Wolfstein A. y col., 2006). Este complejo lo lleva hacia un poro nuclear a través del cual el ADN viral es liberado dentro del núcleo (Ojala P.M. y col., 2000; Sodeik B. y col., 1997). Tanto los productos del tegumento del virus como las quinasas celulares son responsables de la iniciación de la transcripción de los genes virales α (Schang L.M. y col., 1998). Luego, según sea el tipo celular, la infección será lítica o latente (Kent J.R. y col., 2003; Steiner I. y col., 1990). Un evento clave en esta selección, sería la inducción temprana de transcriptos asociados a la latencia (LATs). En la fase inicial de un ciclo de replicación lítico, los productos de los genes α , además de ser factores de transcripción para la siguiente oleada de proteínas, regulan en forma íntima funciones celulares a favor de la replicación viral y la evasión del sistema inmune (Daikoku T., 2000). Una proteína denominada ICP0 (*Infected Cell Protein*) que cumple la función de transactivador promiscuo con gran capacidad de unión al ADN, fuerza a la

célula a alcanzar un estado de “pre-división” que es óptimo para la síntesis de proteínas virales (Hagglund R. y Roizman B., 2004; Roizman B., 1999). Además, ICP0 es activa en la inhibición de mecanismos inmunológicos como la producción de interferón y sus efectos antivirales (Harle P. y col., 2002; Melroe G.T. y col., 2004; Mossman K.L. y col., 2000) y la inducción de la degradación de proteínas celulares involucradas en el proteosoma (Boutell C. y Everett R.D., 2003). En la figura 4 se esquematiza el ciclo de replicación.

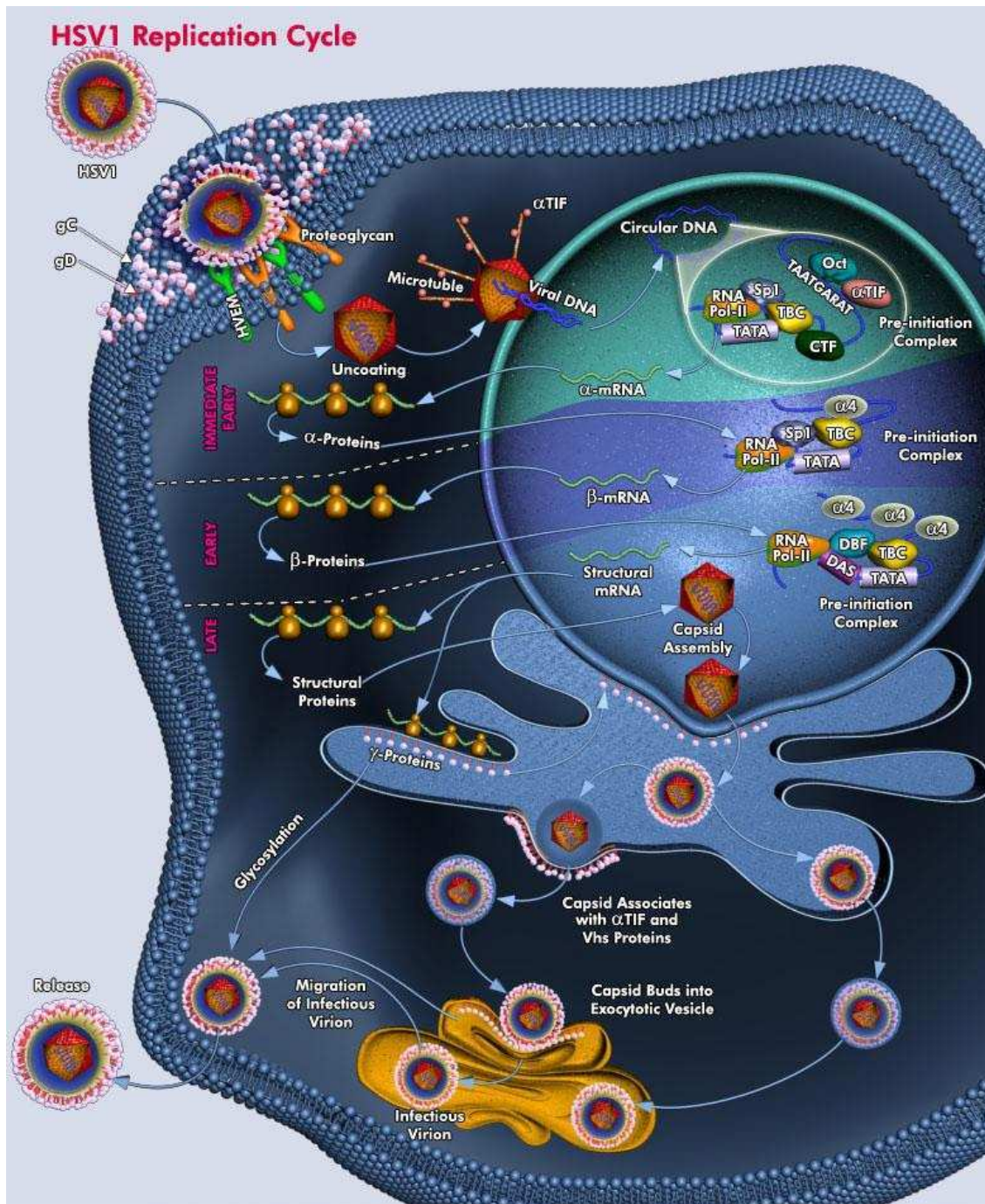


Figura 4: Ciclo de replicación del virus Herpes simplex. El ciclo comienza con la adsorción del virus a la célula mediante la interacción de las glicoproteínas virales con el receptor celular (HS) desencadenando la fusión de la envoltura viral y la membrana plasmática celular. Luego la cápside viral es transportada al núcleo celular a través de microtúbulos del citoesqueleto donde el ARNm es sintetizado. La traducción proteica se lleva a cabo en el citoplasma y luego la encapsidación del ADN y proteínas vuelve a generarse en el núcleo. En la membrana celular se generan “zonas parches” con tegumento y glicoproteínas virales donde las cápsides se adhieren. Finalmente, las partículas virales quedan acumuladas en el RE y son liberadas por exocitosis.

c. Formación de la progenie y brotación

La progenie de HSV se forma en el núcleo de las células infectadas donde el ADN viral es empaquetado en cápsides ya preformadas. Éstas son ensambladas junto con proteínas del tegumento y brotan desde la membrana nuclear interna hacia el espacio perinuclear (Roizman B. y Whitley R.J., 2001). Uno de los caminos de egreso propuestos es a través de vesículas y del aparato de Golgi, donde las proteínas de membrana son modificadas. Otra vía, es por fusión de la nueva envoltura adquirida con la membrana nuclear externa o de la membrana de las vesículas generando nucleocápsides desnudas en el citoplasma. Desde aquí se llevaría a cabo un nuevo evento de brotación, por ejemplo dentro del aparato del Golgi.

La nucleocápside de la progenie de HSV-1 adquiere la primer envoltura por brotación a través de la membrana nuclear interna hacia el espacio entre ésta y la membrana externa denominado espacio perinuclear (Mettenleiter T.C., 2002). Esta primer envoltura está bien estudiada, sin embargo el transporte desde el espacio perinuclear a través del citoplasma hasta el espacio extracelular aún no está claramente elucidado. Actualmente, la posibilidad que se acepta es que las nucleocápsides envueltas en el espacio perinuclear se fusionan con la membrana nuclear externa, pierden la envoltura y se liberan al citoplasma (Leuzinger H. y col., 2005; Mettenleiter T.C. y col., 2006; Mettenleiter T.C. y Minson T., 2006). Luego, las nucleocápsides adquieren una segunda envoltura en la membrana citoplasmática en el trans-Golgi (Harley C.A. y col., 2001; Sugimoto K. y col., 2008; Turcotte S. y col., 2005) y finalmente los viriones maduros son liberados de las células por exocitosis (Mettenleiter T.C., 2002). Recientemente, se ha descubierto la participación de una proteína celular denominada nucleolina que es necesaria para que se lleve a cabo la liberación nuclear de HSV-1 en forma efectiva aunque aún no se conoce el mecanismo (Sagou K. y col., 2010).

1.3.3. Manifestaciones clínicas y patogénesis

En general, las infecciones primarias con HSV-1 suelen ser asintomáticas especialmente en niños pequeños. Sin embargo, algunos individuos experimentan infecciones primarias sintomáticas con gingivostomatitis vesicular herpética, y en el caso de los adolescentes, pueden presentarse como faringitis.

La patología herpética es mayormente causada por un efecto citopático directo del virus que resulta en una lisis celular y necrosis localizada del área infectada. En aquellos tejidos capaces de regenerarse, este hecho no resulta devastador dado que las lesiones no destruyen totalmente el órgano ni resulta en una disfuncionalidad durante la infección. Sin embargo, en el caso del cerebro cuya capacidad de regeneración es mínima, una necrosis puede generar secuelas de por vida (Kimberlin D.W., 2004). Cuando se genera una infección, existe un balance entre la patología inducida por el HSV y la inmunopatología inducida por la reacción al virus y los efectos tóxicos y funcionales de dichas reacciones (Skoldenberg B., 1996). Si la respuesta inmunológica es débil, pueden generarse infecciones severas debido a la replicación viral masiva y diseminación. Por otro lado, una reacción inmunológica fuerte puede provocar una respuesta exacerbada generando reacciones locales tales como presión intracerebral, complicaciones pulmonares o síntomas generalizados (Adler H. y col., 1998; Kawada J. y col., 2004; Kurt-Jones E.A. y col., 2004; Skoldenberg B., 1996).

Por lo tanto, el control temprano de la replicación de HSV en la fase inicial de la infección es crucial para el huésped. La inhibición de la replicación viral temprana puede prevenir la diseminación de la infección y la reacción inmunológica no-específica evitando de esta manera, el desarrollo de una infección sintomática. Asimismo, el huésped se beneficiaría con una infección atenuada o asintomática, y a su vez el HSV, que mantiene la potencialidad de reactivarse desde su sitio de latencia, también sería beneficiado ya que el huésped logra sobrevivir y mantener una actividad social sin que sea

obstaculizado por la infección sintomática. Por ende, el HSV tiene grandes oportunidades de alcanzar un nuevo huésped susceptible lo que lleva a una situación de beneficio mutuo entre éste y el virus.

Además de la piel, el HSV-1 puede infectar una gran variedad de tejidos mucosas incluyendo el tracto respiratorio. Se han reportado casos de infecciones respiratorias herpéticas en pacientes inmunosuprimidos y neonatos (Hull H.F. y col., 1984; Smyth R.L. y col., 1990; Witt M.N. y col., 2009) pero también en pacientes inmunocompetentes (Canalejo Castrillero E. y col., 2010; Martínez E. y col., 1994). Estas infecciones pueden derivar en un amplio rango de patologías incluyendo traqueobronquitis y neumonía (Camazine B. y col., 1995; Schuller D. y col., 1993; Tuxen D.V., 1994; van den Brink J.W. y col., 2004). A pesar de que en la mayoría de los casos la infección es limitada, la diseminación viral puede llevar a complicaciones fatales esporádicas como la meningoencefalitis (Whitley R.J., 1990; Whitley R.J., 2002). A pesar del significado clínico relevante que representa la patogénesis de HSV-1 en el tracto respiratorio, aún no se conoce con profundidad y no suele ser tenido en cuenta a la hora de presentar un diagnóstico.

1.3.4. Herpes y la inmunidad del huésped

Los herpesvirus comenzaron su evolución antes del desarrollo de la inmunidad adquirida o adaptativa (Arzul I. y col., 2002). Por lo tanto, es probable que la evasión de la inmunidad innata sea una función ancestral de los alfa herpesvirus. Éstos han logrado desarrollar nuevas estrategias de evasión viral para adaptarse a los diversos repertorios de los receptores inmunológicos de células T y B que caracteriza a la inmunidad adquirida (Litman G.W. y col., 1999).

La protección inmune frente a HSV requiere de la respuesta coordinada tanto de la inmunidad innata como la adaptativa. La fase inicial de la infección por HSV-1 está influida por mecanismos de la inmunidad innata tales como la actividad de los interferones (INF) tipo I, macrófagos y células natural killer

(NK), los cuales son necesarios para limitar la replicación y diseminación temprana del virus (Reading P.C. y col., 2006). Mientras la respuesta adaptativa se desarrolla, las células T y B antígeno-específicas, juegan un rol crítico en la resolución de la infección, en particular las T, en el mantenimiento de la latencia (Khanna K.M. y col., 2004).

Los macrófagos y las células NK presentan roles importantes en la limitación de la diseminación y replicación temprana de diversos virus, incluyendo el HSV-1 (Kodukula P. y col., 1999; Roizman B. y Whitley R.J., 2001). Estas células son capaces de inactivar virus en el medio extracelular, inhibir la replicación dentro de ellas mismas y en células vecinas, y destruir aquellas que están infectadas (Biron C.A. y col., 1999; Kodukula P. y col., 1999; Mogensen S.C., 1979; Wu L. y Morahan P.S., 1992).

Los macrófagos son células fagocíticas que se originan en la médula ósea. En este tejido, promonocitos proliferadores dan lugar a monocitos que entran al torrente sanguíneo, y que al alcanzar finalmente los tejidos se diferencian en macrófagos y adquieren funciones especializadas dependiendo de los requerimientos del tejido donde se encuentran (Laskin D.L. y Laskin J.D., 2001). En general, los macrófagos se encuentran orquestando una multitud de acciones durante las primeras horas del ataque de HSV. En una primera oleada de respuesta se producen citoquinas, principalmente INF tipo I, TNF e IL-6 que generan un efecto antiviral directo y activan ellos mismos a los macrófagos. En una segunda oleada, IL-12 junto con las citoquinas recién mencionadas y otras más, inducen la producción de INF- γ en células NK, principalmente, promoviendo una respuesta inmunológica Th1 fuerte (Ellermann-Eriksen S., 2005). Muchos caminos de regulación positiva e interacciones sinérgicas intensifican estos sistemas y dan lugar al surgimiento de armas antivirales como las especies reactivas del oxígeno y el óxido nítrico. Asimismo, macrófagos y otras líneas celulares producen rápidamente la citoquina IL-6 en sitios de tejidos locales luego de la infección (Laskin D.L. y Laskin J.D., 2001; Laskin D.L. y col., 2011). El HSV dispara la producción de citoquinas y quimioquinas en dos momentos temporales diferentes. Una respuesta

temprana dependiente de la superficie viral y proteínas del tegumento y otra más tardía que involucra factores producidos durante el ciclo de replicación viral. El virus regula negativamente la producción de diversas citoquinas proinflamatorias en un número diferente de tipos células mediando la inestabilidad de los ARNm de citoquinas proinflamatorias (Mogensen T.H. y col., 2004)

Es sabido que la IL-6 puede afectar tanto la respuesta inmune innata como a la adaptativa ya que está involucrada también en la diferenciación de linfocitos B (Akira S. y col., 1993), crecimiento y diferenciación de precursores de células T citotóxicas (Sciortino M.T. y col., 2001), en la formación de colonias pluripotentes por células hematopoyéticas (Akira S. y col., 1993), en la secreción de anticuerpos IgA (Advani S.J. y col., 2001a), en la producción de múltiples proteínas de la fase aguda (Van Sant C. y col., 2001) y en la diferenciación de macrófagos (Broberg E. y col., 2001), entre otras actividades. Luego de una infección diversos tipos celulares la liberan en sitios localizados, entre los cuales se destacan los macrófagos como fuente principal (Murphy E.A. y col., 2008). Asimismo, en el 2008 se ha reportado que la presencia de IL-6 es crítica para sobrellevar la infección respiratoria por HSV ya que su depleción aumenta la susceptibilidad a la infección (Murphy E.A. y col., 2008).

Por otro lado, TNF- α es uno de los productos derivados de los macrófagos que contribuyen a la inhibición de la replicación de HSV-1 (Weichselbaum R.R. y col., 2001). Esta citoquina induce un alto número de mecanismos efectores antivirales, en particular la producción de óxido nítrico (Advani S.J. y col., 2001b; Khodarev N.N. y col., 2001). Se ha demostrado que el TNF- α es importante para la activación de muchas células del sistema inmune innato y por lo tanto es un factor relevante de la respuesta inmunológica temprana (Pfeffer K., 2003).

1.4. Las algas y los carragenanos

Las algas rojas (División: Rhodophyta) pertenecen a uno de los grupos más grandes y ancestrales de las algas eucariotas (Fig. 5) con más de 10000 especies descritas. Éstas se encuentran distribuidas mundialmente pero tienen un mejor crecimiento en aguas con temperaturas de 15°C. Las algas presentan las características típicas de todos los eucariotas, incluyendo un núcleo que en algunas algas es más pequeño que sus plástidos. Poseen sexos separados, sin embargo, dado que sus células carecen de flagelo necesitan del movimiento del agua para transportar las células masculinas hacia los ovocitos. Otra característica que presentan son cloroplastos desorganizados que carecen de retículo endoplásmico externo y contienen tilacoides no apilados. Su color rojo se debe a la presencia del pigmento ficoeritrina que refleja la luz roja y absorbe las azules y verdes. Dado que la luz azul penetra en el agua a mayores profundidades que la luz de mayor longitud de onda, las algas rojas pueden fotosintetizar y vivir en aguas de hasta 260m de profundidad, donde reciben sólo el 0,1% de radiación superficial, es decir 1000 veces menos luz que lo que se recibe en la superficie.

Aquellas Rodophytas que presentan pequeñas cantidades de ficoeritrina, tienen un aspecto color verdoso o azulado por la clorofila y otros pigmentos presentes en ellos.

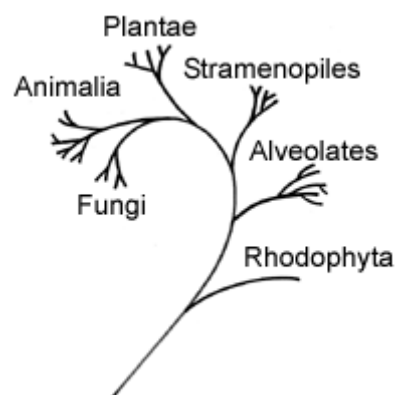


Figura 5: Árbol representativo de la divergencia temprana de las Rodophytas.

Las algas se han diversificado a fin de sobrevivir en nichos ecológicos competitivos (Rasmussen B. y col., 2008). Esta adaptación ha llevado a la evolución de una gran cantidad y diversidad de constituyentes bioquímicos presentes en las algas.

Las algas rojas contienen grandes cantidades de polisacáridos en su pared celular de los cuales la mayor parte son galactanos sulfatados. Estos galactanos son constituidos generalmente por unidades repetitivas de α -1,3-D-galactopiranososa y β -1,4-D-galactopiranososa y pueden diferir en el nivel y patrón de sulfatación, en la sustitución de grupos metoxi y/o piruvato y otros azúcares tales como manosa y xilosa. También pueden diferir en el contenido de 3,6-anhidrogalactosa y en la configuración de los residuos de α -1,3-galactopiranososa.

Entre los galactanos, se encuentran los carragenanos (CGNs) que presentan estructuras similares a los galactosaminoglicanos. Éstos comprenden un amplio grupo de estructuras que podrían dividirse en dos familias: la familia κ , definida por la presencia grupos sulfatos en C-4 en la unidad β -D que forman los CGNs- κ/ι y los μ/ν ; y la familia λ , que se caracteriza por grupos sulfatos en C-2 en todas sus variedades. Los CGNs de tipo λ y ι presentan mayor porcentaje de sulfatación que el HS derivado de los tejidos (Esko J.D. y Selleck S.B., 2002). En general, este tipo de CGNs exhiben un potencial de inhibición viral levemente mayor que los κ -CGNs.

Los polisacáridos están compuestos por bloques que, a pesar de no ser numerosos, su combinación casi infinita lleva a un arreglo de polisacáridos con una complejidad estructural importante (Stengel D.B. y col., 2011). La diversidad estructural de los polisacáridos puede estar aumentada por la metilación y en la mayoría de las algas marinas, por sulfatación (Usov A.I., 2011). Además, muchos polisacáridos de algas son activos metabólicamente, ya sea como una molécula de almacenamiento que pasa por cambios estructurales durante su ciclo de vida o como un componente estructural.

Los polisacáridos son compuestos muy abundantes y accesibles que pueden ser aislados de diversas fuentes naturales. Actualmente, los de las macro y microalgas se encuentran en investigación por sus aplicaciones en alimentos comerciales, en farmacéutica, cosmética y bioenergía entre otros (Ito M. y col., 2006; Misurcova L. y col., 2012; Plaza M. y col., 2009). Se ha probado que éstos son herramientas muy útiles por su actividad inmunomoduladora y antitumoral y su participación en procesos inflamatorios.

Asimismo, se ha demostrado que los polisacáridos logran también afectar el ciclo de replicación viral. Dependiendo del tipo de alga se pueden aislar polisacáridos sulfatados con estructuras similares a glicosaminoglicanos (GAGs) que presentan actividades antivirales (Pujol C.A. y col., 2002).

La actividad antiviral ha sido documentada para retrovirus: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y 2 (HIV-1 y HIV-2), herpesvirus: HSV-1 y HSV-2, citomegalovirus humano (HCMV); el virus de la pseudorabia, flavivirus, virus dengue tipo 2, virus de la viruela, hepadnavirus: hepatitis B (HBV), ortomixovirus: virus de la influenza A (inf A); paramixovirus: virus respiratorio sincicial (RSV) y parainfluenza; rhabdovirus: virus de la estomatitis vesicular (VSV); arenavirus: virus Junín y Tacaribe; y togavirus: virus Sindbis y Semliki. También se documentó actividad antiviral contra algunos virus desnudos como el de la encefalomiocarditis, Hepatitis A y virus papiloma (HPV) (Buck C.B. y col., 2006; Caceres P.J. y col., 2000; Carlucci M.J. y col., 1997; Damonte E. y col., 1994; De Clercq E., 2000; Duarte M.E. y col., 2001; Girond S. y col., 1991; Haslin C. y col., 2001; Huheihel M. y col., 2002; Kolender A.A. y col., 1997; Mazumder S. y col., 2002; Ponce N.M. y col., 2003; Pujol C.A. y col., 2002).

Para la mayoría de los virus, la unión inicial a las células es mediada principalmente por la interacción entre el virus y los GAGs de la superficie celular, principalmente el HS (Esko J.D. y Selleck S.B., 2002). En general los polisacáridos sulfatados presentan una estructura química muy similar al HS, por lo que podrían bloquear la infección viral por competir contra la adsorción del virión a la superficie celular.

Los GAGs son polisacáridos lineales constituidos por repeticiones sucesivas de una unidad de disacárido que suele estar sulfatada. Estos pueden dividirse en dos grupos: glucosaminoglicanos como el HS y galactosaminoglicanos como el condroitin sulfato. La incorporación inicial de la unidad del sacárido de *N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina, respectivamente, le da su nombre. Una diferencia importante entre estos grupos es que los glucosaminoglicanos se adhieren por uniones 1,4 mientras que los galactosaminoglicanos lo hacen por uniones 1,3 y 1,4. Los GAGs se encuentran principalmente en superficies celulares y en la mayor parte de la matriz intracelular del tejido del mesodermo. Frecuentemente, una o más cadenas de GAGs, unidos covalentemente, se encuentran unidos a proteínas del core y estas estructuras se denominan Proteoglicanos.

1.5. Relación entre glicosaminoglicanos, carragenanos y virus

El descubrimiento de que los virus son sumamente abundantes en la naturaleza y en particular en el agua, ha iniciado una renovación de investigaciones en el impacto de la infección viral y lisis en microorganismos acuáticos (Bergh O. y col., 1989). Se cree que los virus influenciaron la composición de las comunidades marinas. Cada infección tiene el potencial de introducir nueva información genética dentro de un organismo o progenie viral, llevando de esta manera a la evolución, tanto del huésped como del mismo virus (Carlucci M.J. y col., 2011).

Los motivos estructurales básicos y las modificaciones del GAG HS se encuentran conservados desde cientos de millones de años de evolución (Cassaro C.M. y Dietrich C.P., 1977; Dietrich C.P. y col., 1983).

El HS es altamente sulfatado y se piensa que es el GAG más activo biológicamente. La secuencia de monosacáridos sulfatados dentro del HS determinan la especificidad de la unión de proteínas y regulan funciones biológicas fundamentales incluyendo el control de crecimiento, señal de

transacción, adhesión celular, homeostasis, morfogénesis, metabolismo lipídico y patofisiología (Esko J.D. y Selleck S.B., 2002).

OBJETIVOS

2. OBEJTIIVOS

2.1. Objetivo General

Obtener y caracterizar variantes virales del virus Herpes simplex Tipo 1 (HSV-1) para el estudio de la patología herpética en infecciones mucosas.

2.2. Objetivos Específicos

- 1- Obtener variantes virales a partir de la cepa HSV-1 KOS utilizando heparina o el carragenano iota. Comprobar la reproducibilidad de la técnica de obtención de variantes virales comparando con las obtenidas a partir de HSV-1 F con el carragenano 1C3.
- 2- Realizar un estudio inmunopatológico de las variantes virales.
- 3- Analizar la respuesta inmunológica innata de las variantes virales derivadas del carragenano 1C3 en mucosas de vías respiratorias.
- 4- Secuenciar y estudiar la glicoproteína D, la enzima Timidina Quinasa y la ADN polimerasa viral.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- 1- Los polisacáridos sulfatados modifican la patogenicidad del HSV en infecciones por vías mucosas.
- 2- Las variantes virales obtenidas en presencia de polisacáridos sulfatados retrasan o evaden la respuesta temprana del sistema inmune innato atenuando procesos inflamatorios.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Compuestos

El CGN iota (t), heparina, Aciclovir (ACV) y Foscarnet (PFA) provienen de Sigma-Aldrich, USA.

4.2. Líneas celulares

La línea celular Vero (American Type Culture Collection (ATCC) CCL 81), proviene de células epiteliales de riñón de mono verde africano adulto *Cercopithecus aethiops*. Las mismas se cultivaron con medio mínimo esencial Eagle (MEM) (Gibco, USA) suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado (SFB) (Gibco, USA) y 50 µg/ml de gentamicina (Sigma, USA). Para el medio de mantenimiento (MM) la concentración de suero fue reducida a 1,5%. El medio de plaqueo consistió en MEM en doble concentración suplementado con 4% de SFB y 100 µg/ml de gentamicina, mezclado con volúmenes iguales de metilcelulosa 1,4% (Sigma, USA). Cuando los cultivos se incubaron en estufa a 37°C con 5% de CO₂, los medios se suplementaron con bicarbonato de sodio 1%.

La línea celular RAW 264.7 (ATCC TIB-71) de macrófagos adherentes, deriva de ratones BALB/c inducidos con el virus de leucemia de Abelson. Las células se cultivaron con MEM Dulbecco's (DMEM) con glucosa, piruvato y glutamina (Gibco, USA) suplementado con 10% SFB inactivado (Natocor, Argentina), 10% HEPES (Gibco, USA), estreptomycin 100 µg/ml y penicilina 100 UI/ml (Promega). El MM fue preparado con una concentración de SFB reducida al 5%.

Las células 1G11, derivadas del endotelio vascular de pulmón murino se mantuvieron en DMEM (alta glucosa, Gibco, USA) suplementado con 10% SFB, 1% de aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 2mM (Sigma),

estreptomycin 100 µg/ml, penicilina 100 UI/ml (Promega), heparina (100 µg/ml) y Hepes 20 mM.

4.3. Recuento en cámara de Neubauer

Para cuantificar el número de células, se resuspendieron las monocapas celulares mediante tratamiento con tripsina (Gibco, USA). A 10 µl del resuspendido celular se le agregó 10 µl de Azul Tripán al 0,4% y se sembraron los 20 µl en la cámara de Neubauer.

N° de Cél. Viables/ml: promedio de Cél. Viables en 1 cuadrante x 10^4 /ml x (1/dilución)

% de Cél. Viables: N° de Cél. Viables/(N° de Cél. Viables + N° de Cél. Muertas) x 100%

4.4. Obtención de macrófagos peritoneales

Se estimularon ratones BALB/c de 6 a 8 semanas con 2 ml de tioglicolato por vía intraperitoneal. Luego de 4 días, se sacrificaron los ratones y se expuso el peritoneo. Utilizando jeringas de 5 ml heparinizadas, se realizó la inyección de 5 ml de RPMI sin suero volviendo a recuperar la suspensión del exudado peritoneal. Estos lavados se repitieron 3 veces por ratón. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 2000 rpm y el pellet se resuspendió con 1 ml de Buffer de lisis (Tris HCL 0,17 M, Cloruro de amonio 0,16 M, pH 7,1). Se incubó durante 4 min a temperatura ambiente y se frenó la reacción en hielo agregando 2ml de medio. Luego, se realizaron dos centrifugaciones y resuspensión en medio. Con el fin de realizar infecciones sobre los macrófagos peritoneales, se realizó el recuento de células en cámara de Neubauer y se sembraron 1×10^6 células en placas de 6 pocillos. Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ por 24 hs y antes de ser infectadas se lavaron con PBS estéril a fin de eliminar las células no adherentes.

4.5. Virus

4.5.1. Cepas

Para los ensayos se utilizaron las cepas F (HSV-1 F) y KOS (HSV-1 KOS) de HSV-1, obtenidas de la ATCC. Las variantes de HSV-1 F: 1C3syn14-1, 1C3syn17-2, 1C3syn20-2 y 1C3syn21-2 se obtuvieron previamente por pasajes sucesivos del virus con concentraciones crecientes del CGN 1C3 (Carlucci y col., 2002).

4.5.2. Obtención de las suspensiones virales

Los stocks virales se prepararon infectando monocapas de células Vero con una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,1. Se dejó adsorber durante 1 h a 37°C, luego se retiró el inóculo y se cubrieron las células con MM fresco. 24 hs p.i., se lisaron las monocapas celulares mediante dos ciclos de congelamiento y descongelamiento a fin de liberar al medio las partículas virales intracelulares. Se eliminaron los restos celulares por centrifugación durante 15 min a 1000 rpm y se almacenó el sobrenadante a -70°C hasta su posterior uso.

4.5.3. Titulación viral

La titulación de los stocks virales se llevó a cabo empleando el método de unidades formadoras de placas (UFP). Para ello, se crecieron monocapas de células Vero en placas de 24 pocillos y se infectaron con 100 µl de diluciones seriadas al décimo del stock viral. Se dejó adsorber durante 1 h a 37°C, se retiró el inóculo y se cubrió cada pocillo con 0,5 ml de MEM 2X:metilcelulosa 1,4% (1:1). Luego de 48 hs de incubación en estufa a 37°C con 5% CO₂, se fijaron las células durante 20 min con formol 10% y finalmente se tiñeron con cristal violeta 1%. Para obtener la concentración del stock en UFP/ml se realizó la siguiente fórmula:

$$\text{UFP/ml} = \text{N}^\circ \text{ promedio de placas} / (\text{dilución} \times \text{volumen de inóculo})$$

4.6. Determinación de actividad antiviral y virucida

4.6.1. Determinación de la actividad antiviral: reducción del número de placas

Se infectaron monocapas de células Vero crecidas en 24 pocillos con 80 UFP/pocillo de HSV-1 en ausencia o presencia de diluciones seriadas al medio del CGN sulfatado u heparina. Cada dilución fue ensayada por duplicado. Luego, de 1 h de adsorción a 37°C, se descartó el inóculo, y se cubrieron las células con MEM 2X:metilcelulosa 1,4% (1:1). Luego de 2 días de incubación a 37°C, se procedió a contar las placas previa fijación con formol y tinción con cristal violeta. La concentración inhibitoria 50% (CI₅₀) se definió como la concentración del compuesto requerida para reducir el número de placas en un 50% respecto del control viral sin tratamiento.

Para calcular la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) a partir de los resultados obtenidos para la actividad antiviral, se seleccionaron las 2 concentraciones que contenían un número de placas cercano al 50% del control viral (la menor concentración y la mayor) y por extrapolación se obtuvo el valor final a través de la siguiente fórmula:

$$\log CI_{50} = [(50\% - m\%I) / (M\%I - m\%I)] \times (\log MC - \log mc) + \log mC$$

Donde: m%I corresponde al menor porcentaje de inhibición
 M%I corresponde al mayor porcentaje de inhibición
 MC corresponde a la mayor concentración
 mc corresponde a la menor concentración

4.6.2. Determinación de la actividad virucida

La actividad virucida fue expresada como concentración virucida 50 (CV₅₀). Para calcular la CV₅₀, una suspensión de HSV-1 KOS conteniendo aproximadamente 4x10⁶ UFP se incubó durante 1 h 30 min en baño a 37°C en presencia de igual volumen de diluciones seriadas al medio de los compuestos. Como control se incubó la suspensión viral, en las mismas condiciones, con igual volumen de MM. Luego se realizaron diluciones seriadas al décimo de las distintas mezclas hasta calcular 80 UFP totales, aprox. y se titularon por UFP en

células Vero. La concentración virucida 50% (CV₅₀) se definió como la concentración del compuesto requerida para bloquear el virus en suspensión en un 50% respecto del control viral sin tratamiento.

Para calcular la concentración virucida 50 (CV₅₀) a partir de los resultados obtenidos para la actividad virucida, se seleccionaron las 2 concentraciones que contenían un número de placas cercano al 50% del control viral (la menor concentración y la mayor) y por extrapolación se obtuvo el valor final a través de la siguiente fórmula:

$$\log CV_{50} = [(50\% - m\%I) / (M\%I - m\%I)] \times (\log MC - \log mc) + \log mC$$

Donde: m%I corresponde al menor porcentaje de inhibición
M%I corresponde al mayor porcentaje de inhibición
MC corresponde a la mayor concentración
mc corresponde a la menor concentración

4.7. Obtención de variantes y clonación

4.7.1. Obtención de variantes de HSV-1

Se realizaron pasajes sucesivos de HSV-1 KOS (m.i. 0,1) en monocapas de células Vero en presencia de concentraciones crecientes del CGN 1 o heparina, presentes durante y después de la infección. Se comenzó con una concentración inicial diez veces menor que su respectiva CI₅₀ y se superó dicho valor por más de 100 veces hacia los últimos pasajes. Las células se incubaron durante un período de 24 a 72 hs p.i., hasta que las monocapas manifestaban una acción citopática (ACP) de un 90% aproximadamente, momento en el que se procedió a lisar las células con dos ciclos de congelamiento y descongelamiento. Con el fin de eliminar los restos celulares, se centrifugó el lisado celular durante 15 min a 1000 rpm y se conservó el sobrenadante a -70°C. En cada pasaje se registraron las características del efecto citopático y el título utilizando el método de reducción de placas. En forma similar se realizaron pasajes sucesivos de HSV-1 en presencia de ACV. Como control se realizaron pasajes sucesivos de HSV-1 KOS en ausencia de compuesto.

4.7.2. Clonación de pasajes virales

A fin de obtener una población viral homogénea se clonaron los pasajes seleccionados infectando monocapas de células Vero en microplacas de 6 pocillos con 15 a 30 UFP en cada uno. Luego de 1 h de adsorción, se retiró el inóculo y se cubrió con agarosa 1,2% fundida: MEM 2X en partes iguales (1:1). Las microplacas se incubaron durante 2 a 4 días a 37°C en presencia de 5% CO₂ y se incorporó rojo neutro 2% mezclado con medio agarosa 1,2% y MEM 2X en partes iguales. Luego de una incubación de 2 hs a 37°C protegida de la luz con papel metálico, se procedió a picar los clones aislados y se diluyeron en MM. Finalmente se los sometió a una vigorosa agitación y a dos ciclos de congelamiento y descongelamiento.

Para la amplificación de los clones se infectaron células Vero con cada clon seleccionado, después de la adsorción de 1 h a 37°C, se descartó el inóculo y se cubrió con MM, y se incubó entre 24 a 48 hs, hasta desarrollo de ACP en 80% de la monocapa. Posteriormente se procedió a realizar dos ciclos congelamiento y descongelamiento, se retiraron los restos celulares por centrifugación durante 15 min a 1000 rpm y los sobrenadantes se conservaron a -70°C. Se determinó el título de cada clon amplificado por el método de formación de placas.

4.7.3. Efecto citopático por tinción de Giemsa

Se infectaron monocapas de las células en estudio 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 hs p.i. se hicieron 2 lavados con PBS, se fijaron las células con metanol frío y se tiñeron con una solución de Giemsa diluida en H₂O (d) 5% PBS. Luego de 15 minutos, se lavaron las monocapas con H₂O (d) 5% PBS y se montaron sobre portaobjetos.

4.8. Análisis de citoquinas por PCR y ELISA

Se crecieron monocapas de la línea celular RAW 267.4 y macrófagos peritoneales en presencia de RPMI 10% SFB. Estas fueron infectadas con HSV-1 F, 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2 a una m.i. de 10. Cumplida la hora de incubación, se retiró el inóculo y se agregó medio RPMI 10% SFB. Como control positivo de estimulación se utilizó LPS (1µg/ml). A las 2, 4, 6, 8 y 10 hs p.i., se cosecharon los sobrenadantes para ser analizados mediante la técnica de ELISA y luego de dos lavados con PBS y se cosecharon las monocapas con 0,5ml de Trizol (Invitrogen). Todas las muestras fueron conservadas a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

4.8.1. Cuantificación de citoquinas

Las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α , y anti-inflamatoria IL-10 se determinaron en los sobrenadantes por el método ELISA (BD Biosciences OptEIA™), según instrucciones provistas.

Se infectaron células (Macrófagos IP y células RAW 264.7) crecidas en placas de 6 pocillos con HSV-1 cepa F y sus dos variantes virales (m.i. 10) como se describió anteriormente. Como control negativo se utilizó un cultivo celular con MM y como control positivo un tratamiento con LPS. Cada ensayo se realizó por triplicado. Las placas fueron leídas en un lector de ELISA (Biotek ELX808IU) a 450 nm y la concentración de proteínas se determinó empleando una curva de calibración. La cuantificación de citoquinas se realizó por duplicado.

4.8.2. RT-PCR

4.8.2.1. Extracción de ARN

Se cosecharon las monocapas celulares con 0,5 ml de Trizol, luego de 3 lavados previos con PBS estéril. Se agregaron 250 µl de cloroformo y a la fase acuosa rescatada se le agregó 1 vol de isopropanol. Finalmente, el pellet

obtenido por centrifugación, fue lavado con alcohol 75%, secado en el condensador durante 10 min y luego fue resuspendido en 50 µl de agua bidestilada estéril.

4.8.2.2. Síntesis de ADNc

El ARN extraído fue utilizado para la síntesis de ADNc. Para ello, 2 µg de ARN fueron adicionados a 2 µg de *primers* aleatorios (Promega, USA) y se llevó a un volumen final de 10 µl con agua bidestilada. Se incubó la mezcla durante 5 min a 70° C y otros 5 min en hielo y se le agregó la mezcla de reacción que contenía: transcriptasa ImProm-II (Promega), buffer de reacción 5x, 1 µl de RNasin (Promega, USA) y los cuatro dNTP 10 mM. Esta mezcla final fue llevada a un volumen de 10 µl con agua libre de RNAsas y los 20 µl resultantes fueron incubados durante 5 min a temperatura ambiente (período de annealing), 1 h a 42°C, tiempo durante el cual se lleva a cabo la síntesis de ADNc y una incubación final a 70°C durante 15 min.

4.8.2.3. Desarrollo de la PCR

El ADNc fue amplificado por PCR utilizando los siguientes set de primers:

Primer	Sentido (5' → 3')	Antisentido (5' → 3')
IL-6	TTCTGGAGTACCATAGCTAC	AGTTCTTCGTAGAGAACAAC
TNF-α	TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC	GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG
β-Actina	GAGACCTTCAACACCCCAGCC	GAGACCTTCAACACCCCAGCC

La PCR se llevó a cabo con una incubación inicial a 94°C durante 10 min seguido por 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C y una incubación final durante 10 min a 72°C. Los productos fueron sembrados en gel de agarosa 1,5% conteniendo Bromuro de etidio. Las condiciones de corrida fueron a 100V durante 1 h. El análisis de la transcripción de citoquinas se realizó por duplicado.

4.9. Análisis de las poblaciones celulares en pulmón de ratones infectados

4.9.1. Obtención del homogenato de pulmón

Se infectaron ratones BALB/c de 6 a 8 semanas, por vía intranasal con 20 μ l de HSV-1 F o las variantes 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2 (1×10^5 UFP/ratón). Como control negativo se emplearon animales tratados con PBS. Al día 3 y 5 p.i. se extrajeron los pulmones para llevar a cabo el análisis por citometría de flujo. Para ello, se colocaron los pulmones en cajas de petri y se disgregaron en presencia de RPMI-colagenasa 2X (Sigma) y RPMI-Dnasa 2X (Sigma) en partes iguales. Luego, se trasvasó el homogenato a un tubo y se incubó a 37°C vortexeando con intervalos de 10 min. Al cabo de 30 min, se centrifugó durante 7 min a 1100 rpm y el pellet fue resuspendido en RPMI. La suspensión fue filtrada por malla de 40 μ m (BD Falcon) con 20 ml de RPMI y se centrifugó nuevamente durante 7 min a 1100 rpm. Luego del tratamiento con buffer de lisis (500 μ l de ClNH_4 1,66%) el pellet fue resuspendido en 5 ml de RPMI y se llevó a cabo otra centrifugación en las mismas condiciones. Las células se contaron en cámara de Neubauer obteniéndose aproximadamente 1×10^7 células totales. Finalmente, las muestras fueron fijadas en paraformaldehído 4% durante 15 min y luego en 0,5% a fin de conservarlas a 4°C hasta su marcación.

4.9.2. Marcación de las muestras

Con el fin de estudiar la población celular de los pulmones infectados se utilizaron los siguientes anticuerpos conjugados: Rata Anti-Ratón CD11b-FITC, control de isotipo κ Rata IgG2b-FITC, Ratón Anti-Ratón NK-1.1-APC, control de isotipo κ Ratón IgG2a-APC, Hamster Anti-Ratón CD28-PE, control de isotipo λ 1 Hamster- PE (BD Pharmingen).

Cada tratamiento fue marcado con los 3 anticuerpos y además con una combinación de los anticuerpos NK1.1-APC y CD28-PE. Como controles, se hicieron también células sin marcar, control de isotipo para cada anticuerpo y combinación de isotipos de NK1.1-APC y CD28-PE.

Para la marcación, se llevó a volumen con PBS cada tratamiento y se repartieron 100 µl a cada tubo. Las suspensiones fueron centrifugadas durante 7 min a 1100 rpm y se resuspendió el pellet en 50 µl de suero normal de ratón inactivado 10% en PBS. Luego de 45 min de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 1,5 µg del anticuerpo o isotipo correspondiente. Se incubó a temperatura ambiente resguardado de la luz. Una vez concluida la hora de incubación se hizo un lavado con 1ml de PBS, se centrifugó a las mismas condiciones y se fijaron en 100 µl de paraformaldehído 1%. Las muestras fueron leídas en citómetro de flujo (BD Biosciences) y analizadas con el programa winmdi 2.9.

4.10. Secuenciación de la Timidina Quinasa y de la ADN polimerasa

4.10.1. Extracción de ADN

Con el fin de secuenciar las enzimas virales TQ y ADN pol, se infectaron células Vero con la cepa parental F y sus variantes 1C3syn14-1, 1C3syn17-2, 1C3syn20-2 y 1C3syn21-2 a una m.i. de 1. Lo mismo se realizó con la cepa KOS y sus variantes H17-5, H17-16, I16-6 e I16-11. Al obtener entre un 80 y 90% de efecto citopático se cosechó la monocapa para llevar a cabo la extracción de ADN total utilizando el QIAMP DNA mini KIT (Qiagen) según las instrucciones indicadas. Brevemente, las células se cosecharon con tripsina y se lisaron con proteinasa K y buffer de lisis. Luego de la precipitación del ADN con etanol (96-100%), se procedió a extraer el ADN mediante el uso de distintos buffers de lavado y finalmente eluido con el buffer correspondiente. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso.

4.10.2. Amplificación por PCR

El ADN fue amplificado mediante la técnica de PCR con la enzima Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) ya que el fragmento de interés tiene un tamaño aproximado de 1000 pb y el genoma de HSV presenta un alto porcentaje de GC. Para ello, se agregó 5 µl de ADN en 45 µl de una mezcla conteniendo: Buffer 10X, Enhancer 10X, MgSO₄ 50mM, Primers 50 µM, ADN polimerasa Pfx y agua libre de nucleasas (Biodynamics) para llevar a volumen. La amplificación se realizó con una incubación inicial de 5 min a 90°C, seguido de 35 ciclos de 95°C 1 min, 61°C 30 seg, 72°C 1 min 30 seg y finalmente una última incubación a 72°C durante 10 min.

Los primers utilizados para las secuencias fueron:

Primers utilizados para la secuenciación de la TQ		
Primer	Sentido (5' → 3')	Antisentido (5' → 3')
TQ	TGG CGT GAA ACT CCC GCA CCT	TCT GTC TTT TTA TTG CCG TCA T
TQ02	GAT GAC TTA CTG GGC GGG TGC TGG	GTT GCT CTG GGG CTC GGC ACC
TQ03	AGG CCG TGC TGG CGT TCG TGG	TAG CAC AGG AGG GCG GCG ATG G
TQ04	GAC ACG TTA TTT ACC CTG TTT CG	AGG GCC ACC AGC AGT TGC GTG G

Primers utilizados para la secuenciación de la ADN polimerasa		
Primer	Sentido (5' → 3')	Antisentido (5' → 3')
HSV POL (N-terminal)	CAT TCC CCT CTT TAG GGG TTC G	CAG RAG CGT GAT GAC GGT CC
	CAC GTG TAC GAC ATC CTG G	CAG TTA AAC TCG ACG TCG
	GTC GAG TTT AAC TGY ACG	CGT ACA TGT CGA TGT TCA CC
HSV POL (Medio)	CGC AGC AAG ATM AAG GTG AAC G	GGT ACA GGC TGG CAA AGT C
	CCA GAA GGG CTT YAT YCT GC	GAG CGG ATC TGC TTT CGC ATG G
	GAC TAC CTG GAG ATC GAG G	GGT GAA CGT YTT TTC GCA CTC
	GAT GGG GAG CCA CAT CTC G	GGA CAA AGT CCT GGA TGT CCC TG
HSV POL (C-terminal)	CTG CTG TTT TAC GAC GAT ACC	CAT GCT GRTA CGT CAT CTT CC
	CAA GCT GCT GGT GTC CGA G	GTG SGA GAA GTA ATA GTC C

Primers utilizados para la secuenciación de la Glicoproteína D		
Primer	Sentido (5' → 3')	Antisentido (5' → 3')
gD	GGAGTTGTTTCGGTCATAAGCTTCAGC	TTAAGGTCCCATCCCAACCCTGCAGACC

4.10.3. Purificación de los fragmentos amplificados

Los productos amplificados fueron sembrados en gel de agarosa 1% con bromuro de etidio y se corrieron durante 1 h a 100 V. Dado que el ADN a purificar no puede ser irradiado con UV, ya que este sufriría alteraciones, se sembró un pequeño volumen (5 μ l) de cada muestra en calles paralelas y estas sí fueron irradiadas y utilizadas como guía para ubicar cada una de las bandas. Una vez marcadas, se recortaron del gel las bandas a purificar sin irradiar. Estos fragmentos fueron luego purificados utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). Este kit permitió disolver el gel de la banda y luego purificar el ADN por centrifugación de columnas. Finalmente el producto de amplificación fue eluído con 30 μ l de agua libre de nucleasas y se conservó a -20°C hasta su uso.

4.10.4. A-tailing y ligación al vector pGEM-T easy

Con el fin de ligar los productos purificados al vector utilizado para la clonación pGEM-T Easy Vector System I (Promega), se incubó el producto purificado durante 30 min a 70°C con Buffer 10X, ClMg 25mM, dATP 2mM y la enzima ADN polimerasa Gotaq (Promega). Una vez realizado el A-tailing se procedió a la ligación al vector en presencia de buffer de ligación 2X, vector pGEM (50ng), productos de PCR, ADN ligasa T4 y agua libre de nucleasas para llevar a volumen final. La incubación se realizó a 4°C durante toda la noche para obtener mayor eficiencia.

4.10.5. Transformación de células competentes JM109

Se descongelaron las células JM109 (Promega) en hielo, y a 100 μ l se le agregaron 10 μ l del producto de ligación. Se incubaron en hielo durante 30 min a fin de que los insertos puedan ingresar en las bacterias y luego se les dio un *heat-shock* de 42°C por 2 min y en hielo por 2 min para permitir que recuperen sus membranas. Se agregaron 800 μ l caldo LB y se incubaron en baño húmedo

con agitación durante 2 hs a 37°C. La suspensión fue finalmente sembrada en placas de agar LB que contenían ampicilina, IPTG (100mM) y X-gal (50mg/ml). Las placas sembradas se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C. Dichas células están preparadas para transformarse por inserción del ADN en el gen de la β -galactosidasa (β -gal). Por ello, las células no transformadas poseen el gen de β -gal intacto, metabolizan el X-gal y las colonias generadas son de color azul. Las colonias incapaces de metabolizar el X-gal (colonias de color blanco) fueron indicadoras de la posible presencia del inserto de interés en el vector.

4.10.6. Colony PCR y amplificación de bacterias transformadas

Con el fin de confirmar la presencia del inserto de interés en el vector presente en las bacterias transformadas, se seleccionaron diez colonias blancas por cada gen a analizar y fueron amplificadas por PCR. Como control negativo, se eligieron dos colonias azules. La PCR se realizó en presencia de ADN polimerasa Gotaq y siguiendo el mismo programa de ciclado detallado en el ítem 2. De las colonias que dieron positivas para el inserto, se eligieron 3, se inocularon en caldo LB conteniendo ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37°C en baño húmedo con agitación.

4.10.7. Minipreps

Con el objetivo de obtener los vectores transformados se llevaron a cabo las minipreps utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) de acuerdo a sus instrucciones. En una primera etapa se produjo el lisado utilizando buffer de lisis y proteínas alcalinas. Luego, se decantó el lisado por columna y se aisló el plásmido. Finalmente, se realizó el lavado del plásmido aislado y se eluyó de la columna con 70 μ l de agua libre de nucleasas.

4.10.8. Secuenciación

Las concentraciones de los plásmidos fueron medidas mediante el uso de un fluorómetro Qubit (Invitrogen) y se hicieron las diluciones correspondientes para alcanzar una concentración final de 100ng/μl para cada uno. Las muestras fueron secuenciadas por el Servicio de Secuenciación y Genotipificado ofrecido por el Departamento de Ecología, Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, por el Servicio del Hospital Ricardo Gutiérrez en colaboración con la Dra. Paola Barrero, y Macrogen (Korea). Los resultados obtenidos fueron analizados con los programas DNAbaser 3.5.4.2 y DNAMAN 4.15.

4.11. 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-1, se utilizaron dos inhibidores de la formación de syn inducidos por HSV, la ciclosporina A y la melitina (Walev I. y col., 1994). Para ello, se infectaron monocapas de células Vero confluentes crecidas en placas de 6 pocillos con 80-100 UFP/pocillo. Luego de 1 h a 37°C, se retiró el inóculo y se cubrió con MEM 2X:metilcelulosa en partes iguales conteniendo ciclosporina A o melitina, 25 μM y 1 μM respectivamente. Luego de 48 hs de incubación a 37°C, se cuantificaron las placas virales y se determinó el porcentaje de placas no syn. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

4.12. Estudio de la virulencia de HSV-1 (F) y sus variantes virales

Con el objetivo de esclarecer la patología diferenciada observada en una infección intranasal con HSV-1 F, 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2 se procedió a analizar la liberación de citoquinas y la replicación en los tejidos susceptibles. Para ello se infectaron ratones BALB/c de 6 a 8 semanas por vía intranasal con 1x10⁶ de UFP total y como control negativo se inocularon con PBS. Se utilizaron

8 ratones por grupo y 4 para control. A las 24 y 72 hs p.i. se realizaron lavados vaginales y bronquioalveolares en 2 animales y se sacrificaron otros dos para la extracción del pulmón y útero-vagina con el fin de realizar la titulación viral en dichos órganos.

4.12.1. Lavados vaginales

Los lavados vaginales se realizaron en los ratones BALB/c. Se utilizaron 100 µl de PBS por lavado, se recolectaron los lavados de 2 animales por grupo y se guardaron a -80°C. Se hizo un pool de los lavados recogidos, se centrifugó a 2700 rpm durante 5 min y se utilizó para la determinación del título viral por plaqueo directo.

4.12.2. Lavados bronquioalveolares

Luego de realizar los lavados vaginales, los ratones fueron anestesiados con 20 U de Ketamina/Xilacina (4:1). Una vez que hizo efecto la anestesia, se les abrió la piel desde el tórax y se ablacionó la tiroides. Luego, se expuso la tráquea, se evulsionó para separarla del esófago y se realizó una incisión entre los anillos traqueales apenas del diámetro del capilar de una micropipeta pasteur (1 ml) utilizada para llevar a cabo los lavados. Se hicieron 3 lavados con 1 ml cada uno de solución fisiológica. Cada lavado constó de 3 repeticiones de liberación y recuperación de la suspensión manteniéndose siempre en hielo. El volumen recuperado fue centrifugado durante 8 min a 2700 rpm y se guardó el sobrenadante a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

Posteriormente, se realizó una observación al microscopio de una muestra de la suspensión recuperada. En ella, se encontró un alto porcentaje de macrófagos alveolares (90% aproximadamente). También se observó la presencia de hematíes, unos pocos leucocitos y algunas células epiteliales. El alto número de macrófagos confirmó que el lavado obtenido era alveolar.

La concentración de IL-6, TNF- α e IL-10 en los BAL, se cuantificó a través de la técnica de ELISA.

4.12.3. Extracción y titulación de órganos

A los días 1 y 3 p.i. se sacrificaron dos ratones de cada grupo, a los que no se le realizaron los lavados, para la obtención de órganos (pulmón y el útero-vagina). Se colocaron los órganos en PBS (10% Peso/volumen con 5% SFB), se pesaron y prepararon homogenatos de cada órgano por disgregación mecánica. Se centrifugaron las muestras por 5 min a 10.000 g y los sobrenadantes fueron utilizados para calcular el título viral/gr de órgano por UFP.

4.13. Cortes histológicos

Se infectaron hembras BALB/c de 6 a 8 semanas de vida por vía intranasal con 1×10^6 UFP/animal de cada virus HSV-1 F, 1C3syn4-1 y 1C3syn17-2. 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 en proporción 15:5:1) durante 18 hs. 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 de alcohol 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 micrótomo 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.

4.14. Detección de moléculas de adhesión por citometría de flujo

Se prepararon monocapas de células endoteliales 1G11 y se infectaron con una m.i. de 1 y 0,1 con la cepa F y las variantes 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2. A las 18 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes para titular y las células fueron levantadas con EDTA y cuantificadas en cámara de Neubauer a fin de colocar 5×10^5 células por tubo. Posteriormente, se realizó un bloqueo con solución de suero normal de cabra 10% en PBS durante 30 min y se agregaron sobrenadantes condicionados de hibridomas como fuente de anticuerpos contra I-CAM (Molécula de Adhesión Intracelular) y V-CAM (Molécula de Adhesión Vascular Celular). La marcación se incubó durante 2 hs a temperatura ambiente y se lavó con PBS. Luego, se agregó el anticuerpo secundario Cabra-anti-Rata-Alexa 647 (Invitrogen) y se llevó a cabo una nueva incubación durante 2 hs a temperatura ambiente. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído 2% hasta su lectura por citometría de flujo.

4.15. Estudio *in vivo* de la virulencia de HSV-1 (KOS) y sus variantes virales

Con el objetivo de estudiar la patogenicidad en ratones de las variantes virales respecto de la cepa parental, se realizaron estudios mediante infecciones intravaginales e intranasales.

4.15.1. Infección intravaginal

Se trataron hembras BALB/c de 8 a 10 semanas de edad por vía subcutánea con 50 µl de acetato de medroxiprogesterona, 25mg/ml en PBS (Medrosterona, Gador, Argentina), para incrementar la susceptibilidad de los ratones a la infección con HSV sincronizando sus ciclos hormonales (Bourne N. y col., 1999; Zacharopoulos V.R. y Phillips D.M., 1997). A los 5 días post-tratamiento se infectaron por vía intravaginal con 20 µl de 1×10^6 UFP de las variantes y el control viral. Paralelamente se infectaron monocapas de células Vero para determinar el título de las cepas empleadas. Se emplearon grupos de 5 animales por tratamiento utilizando como control ratones inoculados con PBS estéril. Al día 1, 2 y 3 p.i. se cosecharon lavados vaginales con 100 µl de PBS estéril. Los lavados del día 1 y 3 p.i. se utilizaron para cuantificar citoquinas por ELISA y el del día 2 p.i. para titulación por método de formación de placas. Los animales fueron observados durante 21 días y se siguió la evolución de la morbilidad y mortalidad de los animales inoculados.

4.15.2. Infección intranasal

Ratones hembras BALB/c de 6 a 8 semanas de edad separadas en grupos de 5 animales fueron anestesiadas por inyección intraperitoneal con 2 mg de ketamina (Ketalar, Parke Davis, Argentina) y 0,04 mg Xilacina (Rompun, Mosby, Argentina) en 0,1 ml de PBS. Luego los animales se infectaron colocando 20 µl (10 µl en cada narina) de los virus (1×10^6 UFP). Como control negativo se empleó ratones tratados con PBS.

Se observó la morbilidad y mortalidad de los animales diariamente durante 2 semanas. Se utilizó la siguiente clasificación: 0) infección inaparente; 1) pelos erizados; 2) ojos irritados; 3) lesiones y/o encorvado; 4) disfunciones neurológicas (parálisis patas traseras); 5) insensible (no responde). Los animales que mostraron niveles 4-5 fueron sacrificados.

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).

RESULTADOS

Capítulo 1: Selección y caracterización de variantes de HSV-1 cepa KOS

5. RESULTADOS

Capítulo 1: Selección y caracterización de variantes de HSV-1 cepa KOS

En la actualidad, la aparición de poblaciones virales de HSV resistentes a los antivirales de uso común, como ACV o PFA, genera un problema para el tratamiento de la enfermedad. Las terapias antivirales basadas en polisacáridos sulfatados como los CGNs representan una nueva alternativa para el tratamiento de la infección herpética. Desde hace años en nuestro laboratorio se viene trabajando en la obtención de variantes virales del virus HSV bajo presión de selección con diferentes CGNs a fin de utilizarlas como herramientas para el estudio de las infecciones herpéticas.

La técnica de obtención de variantes se basa en la realización de pasajes sucesivos del virus en presencia de concentraciones crecientes del CGN en estudio (Fig. 6). Cada pasaje contiene una población modificada del virus ya que la presencia del polisacárido ejercería una presión de selección sobre las partículas virales.



Figura 6: Ilustración de la técnica de pasajes sucesivos del virus en presencia de concentraciones crecientes del polisacárido sulfatado.

El primer CGN empleado fue el 1C3, CGN μ - ν , obtenido a partir del alga roja *Gigartinia skottbergii* que se utilizó sobre la cepa F de HSV-1 (HSV-1 F) de la cual se aislaron dos clones denominados 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2.

En el presente trabajo se obtuvieron nuevas variantes virales, a partir de la cepa KOS de HSV-1 (HSV-1 KOS) en presencia del CGN- τ y de la heparina.

5.1. Selección de variantes virales de HSV-1 cepa KOS

Para continuar con el estudio del efecto del tratamiento prolongado con un CGN, se realizaron pasajes HSV-1 KOS sobre células Vero, en presencia de concentraciones crecientes del CGN- ι y de heparina como se describe en Materiales y Métodos. El CGN- ι forma parte de la estructura química de 1C3. Cuando este CGN ν/μ se cicla se obtienen las estructuras ι y κ (Fig. 7). Por otro lado, la heparina fue utilizada como polisacárido sulfatado control ya que su estructura es análoga a la del HS que se encuentra presente y ampliamente distribuida en el organismo del huésped. Se excluyó el empleo de HS por escasa cantidad disponible, variada estructura (macromoléculas muy heterogéneas) y el elevado costo de su adquisición.

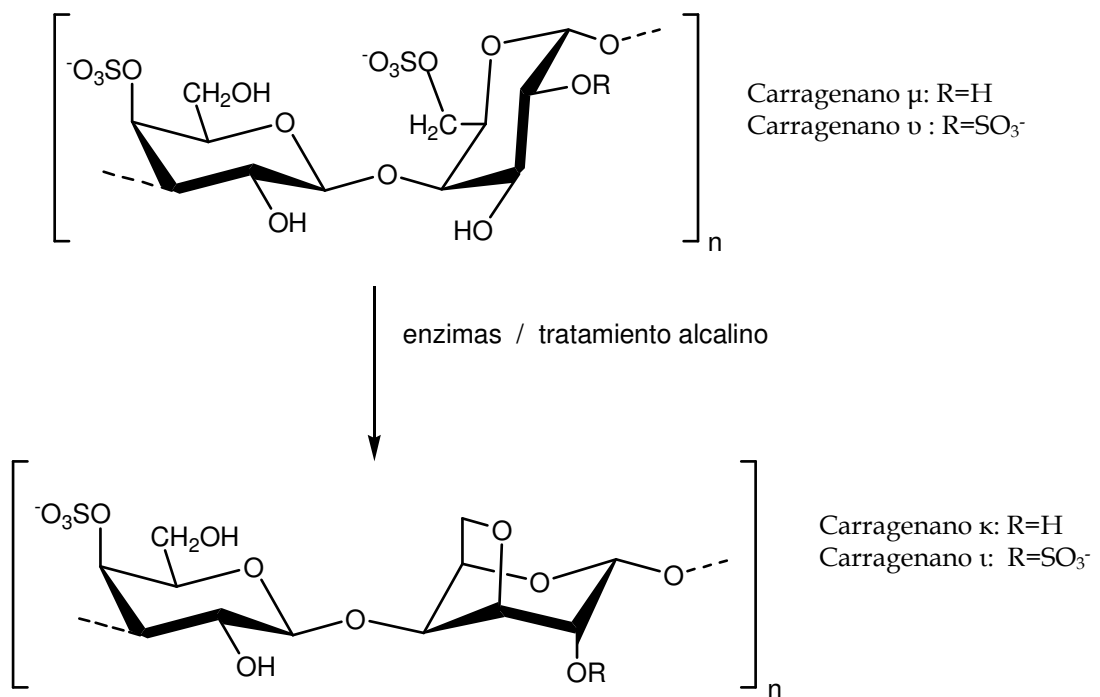


Figura 7. Estructura química de los CGN μ - ν / ι - κ . El CGN 1C3 es un híbrido μ / ν parcialmente ciclado. Las variantes μ / ν ante enzimas y/o tratamiento alcalinos se ciclan dando origen a las estructuras correspondientes a κ e ι .

Previo a la obtención de las variantes se determinó la CI₅₀ de HSV-1 KOS de cada una de las drogas. Para el caso del CGN- ι el valor de CI₅₀ obtenido fue de 0,33 μ g/ml mientras que el de heparina fue 1,70 μ g/ml. Una vez obtenido

este dato se hicieron pasajes sucesivos hasta alcanzar una concentración de los compuestos de hasta 200 veces mayor que las CI_{50} de la heparina y del CGN- τ .

Por otro lado, con el objetivo de descartar que los compuestos actúen inhibiendo directamente la partícula viral, se definió la actividad virucida a través de la CV_{50} . Dicho análisis demostró que la heparina no presenta actividad virucida y el CGN- τ presentó una CV_{50} cinco veces mayor respecto de la CI_{50} . Por lo tanto, se pudo confirmar que este CGN ejerce un efecto virucida moderado.

Durante el ensayo de obtención de variantes se observó que al aumentar el número de pasajes también fue aumentando el tiempo necesario para obtener efecto citopático (de 24 a 80 hs, aprox.). En aquellos pasajes que tardaban 72 hs o más en atacar la monocapa en un 90% o cuyo título había bajado a tres logaritmos, se realizó la amplificación de éstos en células Vero a fin de obtener un título mayor. Los pasajes en presencia del CGN- τ y la heparina fueron caracterizados según el título viral y el tipo de efecto citopático (Tablas 1 y 2, respectivamente).

CGN-1				
Pasaje #	CF (µg/ml)	Tpo. Cosecha (hs p.i.)	Título (UFP/ml)	Efecto Citopático
1	0,05	32	$3,60 \times 10^7$	RC
2	0,08	30	$3,80 \times 10^7$	RC
3	0,13	30	$4,15 \times 10^7$	RC
4	0,16	32	$4,65 \times 10^7$	RC
5	0,31	28	$6,70 \times 10^7$	RC
6	0,60	28	$1,10 \times 10^8$	RC
7	1,20	28	$1,60 \times 10^7$	RC
8	2,08	48	$5,20 \times 10^7$	RC, PG
9	4,16	48	$2,55 \times 10^8$	RC, PG
10	8,00	36	$7,10 \times 10^7$	RC, PG
11	12,50	72	$5,40 \times 10^7$	RC, PG
12	25,00	72	$4,75 \times 10^5$	RC, PG
13	35,70	72	$8,73 \times 10^6$	RC
14	50,00	72	$1,07 \times 10^8$	RC
15	62,50	72	$5,75 \times 10^8$	RC
16	71,43	72	$1,69 \times 10^8$	RC

Tabla 1: Caracterización de los pasajes sucesivos de HSV-1 KOS en presencia de concentraciones crecientes del CGN-1. En cada pasaje se definió el título viral y se registró el efecto citopático ejercido sobre las células Vero. CF: Concentración final de la droga. RC: Redondeamiento celular, PG: placas grandes.

HEPARINA				
Pasaje #	CF (µg/ml)	Tpo. Cosecha (hs p.i.)	Título (UFP/ml)	Efecto Citopático
1	0,50	28	$3,60 \times 10^7$	RC
2	1,00	24	$4,25 \times 10^7$	RC
3	1,20	24	$2,35 \times 10^7$	RC
4	1,25	28	$5,25 \times 10^7$	RC
5	1,47	28	$1,00 \times 10^8$	RC
6	1,66	28	$1,20 \times 10^8$	RC
7	2,77	28	$8,20 \times 10^7$	RC
8	5,00	30	$2,65 \times 10^7$	RC, CE
9	10,00	48	$1,70 \times 10^8$	RC, CE
10	20,00	48	$7,15 \times 10^8$	PG, CE
11	33,00	72	$8,90 \times 10^8$	PG, R
12	66,70	72	$9,55 \times 10^8$	PG, R
13	125,00	48	$6,86 \times 10^8$	PG, R
14	250,00	48	$8,95 \times 10^8$	PG, Syn
15	312,51	48	$8,11 \times 10^8$	PG, Syn
16	338,30	48	$7,15 \times 10^8$	PG, Syn
17	400,00	48	$7,15 \times 10^8$	PG, Syn

Tabla 2: Caracterización de los pasajes sucesivos de HSV-1 KOS en presencia de concentraciones crecientes de heparina. En cada pasaje se definió el título viral y se registró el efecto citopático ejercido sobre las células Vero. CF: Concentración final de la droga. RC: Redondeamiento celular, CE: células estrelladas, PG: placas grandes, Syn: sincicios, R: rosetas.

Como se observa en las Tablas 1 y 2, el virus fue cambiando su efecto citopático a medida que fue aumentando la concentración de los compuestos en cada pasaje. Este cambio resultó de forma gradual y variable, oscilando entre redondeamiento celular (efecto citopático característico de HSV), rosetas (agrupaciones celulares), placas de mayor tamaño y, en el caso de la heparina, se alcanzó la formación de sincicios (formación de células multinucleadas por fusión de células contiguas).

Como control interno se realizó el mismo número de pasajes sucesivos de HSV-1 KOS en ausencia de droga (Tabla 3). En general, entre el pasaje 8 y 10 se comenzaron a ver efectos citopáticos diferenciados respecto del control sin droga.

CONTROL VIRAL			
Pasaje #	Tpo. Cosecha (hs p.i.)	Título (UFP/ml)	Efecto Citopático
1	28	3,60x10 ⁷	RC
2	24	2,50x10 ⁷	RC
3	24	5,15x10 ⁷	RC
4	24	6,10x10 ⁷	RC
5	28	7,90x10 ⁷	RC
6	28	8,70x10 ⁷	RC
7	28	2,70x10 ⁷	RC
8	28	2,55x10 ⁷	RC
9	28	2,15x10 ⁸	RC
10	36	5,85x10 ⁸	RC
11	48	8,85x10 ⁸	RC
12	30	2,15x10 ⁸	RC
13	48	5,05x10 ⁸	RC
14	48	3,87x10 ⁸	RC
15	24	6,21x10 ⁸	RC
16	30	7,55x10 ⁸	RC
17	24	4,00x10 ⁸	RC

Tabla 3: Caracterización de los pasajes sucesivos de HSV-1 KOS. En cada pasaje se definió el título viral y se registró el efecto citopático ejercido sobre las células Vero. CF: Concentración final de la droga. RC: Redondeamiento celular, CE: células estrelladas, PG: placas grandes, Syn: sincicios, R: rosetas.

Con el fin de evaluar el patrón de resistencia generada por los compuestos seleccionados, se repitió el ensayo de selección de variantes utilizando ACV, el antiviral principal que se encuentra actualmente en uso para

las infecciones herpéticas. Para ello, se utilizó el mismo procedimiento de pasajes sucesivos de HSV-1 KOS en células Vero (Tabla 4). Al igual que los compuestos anteriores, se realizó en paralelo un control viral que corresponde a pasajes de HSV-1 KOS en ausencia del ACV, denominado KOSpc.

ACV			
Pasaje #	CF droga (µg/ml)	Título (UFP/ml)	Efecto Citopático
1	0,15	9,80x10 ⁷	RC
2	0,30	6,80x10 ⁷	RC
3	0,60	4,50x10 ⁷	PG
4	1,25	6,20x10 ⁷	PG
5	4,00	1,07x10 ⁷	PG, R
6	9,09	1,05x10 ⁷	PG, R

Tabla 4: Caracterización de los pasajes sucesivos de HSV-1 KOS en presencia de ACV. En cada pasaje se definió el título viral y se registró el efecto citopático ejercido sobre las células Vero. CF: concentración final del compuesto en µg/ml. RC: Redondeamiento celular, PG: placas grandes, R: rosetas.

En el caso del ACV, la CI₅₀ aumentó muy rápidamente ya en los primeros pasajes y la resistencia relativa (RR) se vio incrementada notablemente llegando a un valor de 126,5 veces mayor en el pasaje 6 respecto del pasaje inicial, pudiendo así apreciarse la aparición de resistencia en escasos pasajes.

5.2. Preselección de clones de HSV-1 KOS

En función de las características fenotípicas observadas en los pasajes y a la mayor concentración de droga sometida al virus, se seleccionó el pasaje 16 del CGN-1 (I16) y el pasaje 17 de heparina (H17). En ambos pasajes se observan diferencias significativas en el efecto citopático respecto al control; I16 generó placas de gran tamaño mientras que H17 mostró ser sincicial en un 40% (8 clones de 20). El control viral utilizado correspondió al pasaje 17 sin droga

denominado KOSpc17. A partir de dichos pasajes, se procedió al clonado a fin de trabajar con poblaciones virales homogéneas. En total se aislaron 20 clones de cada tratamiento con el CGN-t y con la heparina.

Cada clon fue amplificado en células Vero, los correspondientes stocks fueron titulados y se determinó el efecto citopático que producían. Por otro lado, se calculó la CI_{50} por el método de reducción del número de placas de los clones contra el compuesto que les dio origen y contra el ACV, y además se determinó la RR (Tablas 5 y 6). Se consideraron cepas resistentes a aquellas que aumentaron el valor de la CI_{50} de 3 a 5 veces con respecto de la cepa de HSV control susceptible a la droga.

Todos los clones del CGN-t mostraron un efecto citopático característico con formación de placas de mayor tamaño respecto del control viral sin droga.

CGN-1 pasaje 16				
Clon #	Efecto Citopático	Título (UFP/ml)	CI ₅₀ Iota (RR)	CI ₅₀ ACV (RR)
1	PG	1,15x10 ⁹	ND	ND
2	PG	2,40x10 ⁹	1,03 ± 0,04 (3,1)	0,73 ± 0,03 (2,20)
3	PG	1,45x10 ⁹	0,79 ± 0,01 (2,4)	0,91 ± 0,07 (2,75)
4	PG	2,40x10 ⁹	0,72 ± 0,3 (2,18)	0,83 ± 0,02 (2,52)
5	PG	2,07x10 ⁹	ND	ND
6	PG	1,85x10 ⁹	0,86 ± 0,01 (2,61)	0,47 ± 0,01 (1,42)
7	PG	4,35x10 ⁹	0,78 ± 0,02 (2,36)	1,00 ± 0,05 (3,03)
8	PG	1,25x10 ⁹	0,49 ± 0,01 (1,5)	0,53 ± 0,02 (1,60)
9	PG	1,30x10 ⁹	1,00 ± 0,02 (3,00)	0,72 ± 0,06 (2,18)
10	PG	2,35x10 ⁹	0,60 ± 0,01 (1,8)	0,87 ± 0,02 (2,60)
11	PG	2,70x10 ⁹	0,56 ± 0,01 (1,70)	0,65 ± 0,01 (1,97)
12	PG	2,00x10 ⁹	0,78 ± 0,01 (2,38)	1,04 ± 0,13 (3,15)
13	PG	2,33x10 ⁹	ND	ND
14	PG	1,95x10 ⁹	0,29 ± 0,01 (0,87)	1,06 ± 0,03 (3,20)
15	PG	2,96x10 ⁹	ND	ND
16	PG	3,20x10 ⁹	0,55 ± 0,02 (1,67)	0,44 ± 0,02 (1,33)
17	PG	1,78x10 ⁹	ND	ND
18	PG	3,01x10 ⁹	ND	ND
19	PG	2,80x10 ⁹	ND	ND
20	PG	2,31x10 ⁹	ND	ND

Tabla 5: Preselección de clones Iota. Se calculó el título viral de cada clon por UFP y se determinó la CI₅₀ de los clones contra el CGN de origen (Iota) y contra el ACV. La resistencia relativa (RR) se calculó como la relación CI₅₀clon/CI₅₀KOS. PG: Placas grandes. ND: No determinado.

HEPARINA pasaje 17				
Clon #	Efecto Citopático	Título (UFP/ml)	CI ₅₀ Hep. (RR)	CI ₅₀ ACV (RR)
1	Syn	2,38x10 ⁹	ND	ND
2	PG	1,06x10 ⁸	ND	ND
3	PG	1,20x10 ⁸	ND	ND
4	Syn	2,68x10 ⁹	ND	ND
5	PG	2,30x10 ⁹	2,21 ± 0,12 (1,30)	0,78 ± 0,01 (2,36)
6	Syn	1,87x10 ⁹	ND	ND
7	RC	1,47x10 ⁹	ND	ND
8	PG	2,15x10 ⁹	2,40 ± 0,09 (1,41)	1,00 ± 0,03 (3,03)
9	PG	1,04x10 ⁹	3,79 ± 0,17 (2,22)	0,75 ± 0,02 (2,27)
10	PG	3,20x10 ⁹	1,58 ± 0,83 (0,93)	0,75 ± 0,03 (2,27)
11	PG	2,15x10 ⁹	ND	ND
12	Syn	1,23x10 ⁹	1,36 ± 0,04 (0,80)	1,04 ± 0,07 (3,15)
13	PG	1,60x10 ⁹	2,76 ± 0,07 (1,53)	0,87 ± 0,03 (2,65)
14	PG	8,10x10 ⁹	2,97 ± 0,09 (1,74)	0,94 ± 0,08 (2,27)
15	Syn	2,85x10 ⁹	1,58 ± 0,03 (0,93)	0,82 ± 0,10 (2,48)
16	Syn	1,43x10 ⁹	2,72 ± 0,09 (1,60)	1,1 ± 0,05 (3,33)
17	PG	1,34x10 ⁹	ND	ND
18	Syn	2,83x10 ⁹	ND	ND
19	PG	3,45x10 ⁸	ND	ND
20	PG	8,97x10 ⁸	ND	ND

Tabla 6: Preselección de clones heparina. Se calculó el título viral de cada clon por UFP y se determinó la CI₅₀ de los clones contra la heparina y contra el ACV. La resistencia relativa (RR) se calculó como la relación CI₅₀clon/CI₅₀KOS. RC: redondeamiento celular, PG: grandes placas, Syn: sincicios

5.3. Susceptibilidad de las variantes virales a distintos compuestos

Se seleccionaron 2 clones del CGN-1 y 2 clones de heparina (Tabla 7), que mostraron características distintas de resistencia tanto al compuesto que le dio origen como al ACV, a fin de estudiar su susceptibilidad a otros compuestos.

Como control se analizó el control viral pasado 17 veces en ausencia de droga (KOSpc17).

Como se puede observar en la tabla 7, los clones obtenidos bajo presión de selección con el CGN y la heparina, generaron escasa resistencia contra la misma droga que le dio origen y contra los antivirales comerciales más utilizados para las infecciones por HSV, como el ACV y PFA. Sin embargo en sólo 6 pasajes con ACV se obtuvo una resistencia contra la misma droga de 126,52 veces más respecto de la cepa control.

Virus	CI ₅₀ (RR)			
	Iota	Heparina	ACV	PFA
HSV-1 KOS	0,33	1,7	0,33	9,79
KOSpc17	0,53 ± 0,01 (1,61)	1,87 ± 0,02 (1,10)	0,47 ± 0,01 (1,42)	10,08 ± 0,57 (1,03)
H17-5	0,43 ± 0,02 (1,30)	2,21 ± 0,08 (1,30)	0,78 ± 0,01 (2,36)	17,91 ± 1,23 (1,83)
H17-16	0,60 ± 0,01 (1,82)	2,72 ± 0,09 (1,60)	1,10 ± 0,05 (3,33)	18,40 ± 0,98 (1,88)
I16-6	0,86 ± 0,01 (2,61)	2,55 ± 0,10 (1,50)	0,47 ± 0,01 (1,42)	13,12 ± 1,00 (1,34)
I16-11	0,56 ± 0,01(1,70)	3,06 ± 0,12 (1,80)	0,65 ± 0,01 (1,97)	10,96 ± 0,91 (1,12)
ACVp6KOS	0,83 ± 0,01 (2,52)	1,87 ± 0,04 (1,10)	41,73 ± 10,65 (126,52)	16,64 ± 1,27 (1,70)

Tabla 7: Actividad antiviral de diferentes drogas frente a las variantes virales seleccionadas. ACV: aciclovir, PFA: Foscarnet. RR: Resistencia relativa CI₅₀clon/CI₅₀KOS. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes ± DE.

5.4. Replicación y efecto citopático de HSV-1 KOS y sus variantes virales

A fin de continuar con la caracterización de las variantes virales obtenidas, se estudió la cinética de replicación en las células Vero y sus efectos citopáticos. En la figura 8 se puede observar que la cinética de replicación de los clones seleccionados se mantiene igual a la cepa parental HSV-1 KOS. Por lo tanto, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la cinética de replicación viral entre las distintas variantes y la cepa parental.

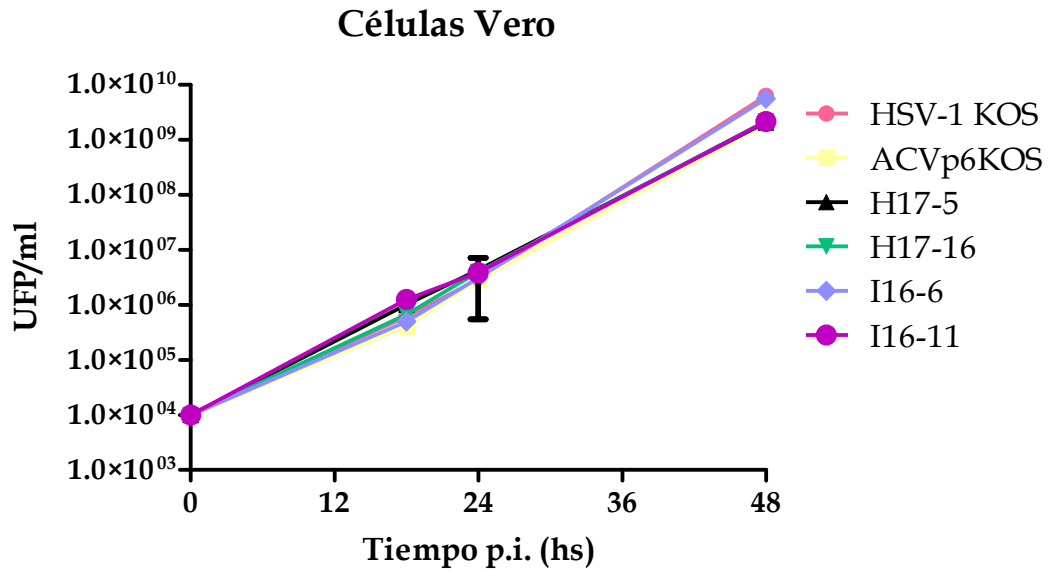


Figura 8. Estudio de la cinética de replicación de HSV-1 KOS y sus variantes virales en células Vero. Se infectaron monocapas de células Vero con una m.i. de 0,01. Se cosecharon los sobrenadantes a las 18, 24 y 48 h p.i. y se titularon mediante el método de unidades formadoras de placas.

Finalmente en la figura 9, se detallan los diferentes efectos citopáticos obtenidos en los clones seleccionados. Las fotos muestran el aumento de los tamaños de las placas generados por los clones respecto a HSV-1 KOS, cepa que le dio origen, y en particular, la formación de sincicios observada para el clon H17-16.

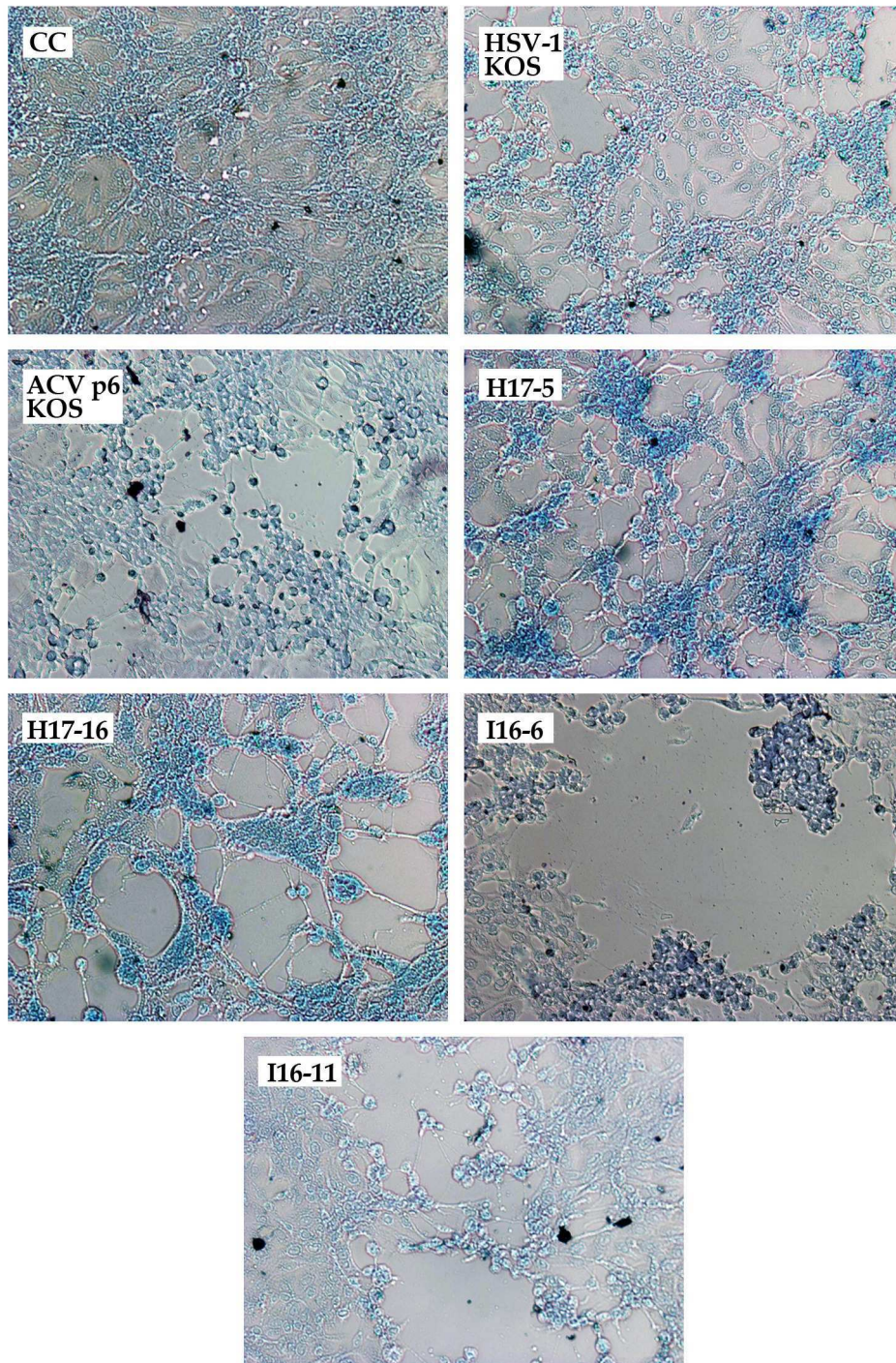


Figura 9: Efecto citopático de HSV-1 KOS y sus variantes en células Vero. Se infectaron monocapas de células Vero crecidas sobre vidrio con el virus correspondiente, a una m.i. de 1. 24 hs p.i, se fijaron con metanol frío y se tiñeron con una solución de Giemsa. El CC corresponde a la monocapa de células Vero sin infectar. Las fotos se observan con un aumento de 400X.

5.5. Estudio patogénico de las variantes de HSV-1 cepa KOS

Con el objetivo de profundizar la caracterización de los nuevos clones seleccionados, se evaluó la virulencia de las variantes de HSV-1 KOS en un modelo experimental murino. La infección se realizó por las vías mucosas intravaginal e intranasal, con el fin de reproducir las rutas naturales de entrada del virus. Para ello, se emplearon ratones hembras de la cepa BALB/c de 7-8 semanas de vida. Luego de la infección se examinaron los signos de infección aguda y enfermedad neurológica de los ratones diariamente durante 21 días.

Por vía intranasal, la mortalidad fue alta a excepción de I16-11 que generó sólo un 40% de mortalidad y ACVp6KOS con un 100% de sobrevivida. No obstante, todas las variantes alargaron levemente el tiempo de sobrevivida de los animales respecto de la cepa parental (Tabla 8).

Por otro lado, la virulencia de las variantes difirió notablemente de la cepa parental HSV-1 KOS cuando se consideró la mortalidad y el tiempo de sobrevivida al ser inoculadas por vía intravaginal. La infección con HSV-1 KOS provocó un 100% de mortalidad y un tiempo de sobrevivida de 7 días p.i. Sin embargo, H17-5 y H17-16 (variantes derivadas de heparina) redujeron la mortalidad a 0% y 40%, respectivamente. Con respecto a los derivados del CGN-1, la mortalidad se redujo a 60 y 40% para I16-11 y I16-6, respectivamente. Asimismo, la variante ACVp6KOS resultó asintomática al reducir su virulencia con un 0% de mortalidad (Tabla 8). En la Tabla 9, se detallan los niveles de síntomas alcanzados por los animales que enfermaron y mostraron diferentes porcentajes de morbilidad.

Virus	Intravaginal BALB/c			Intranasal BALB/c		
	Morbilidad (%)	Mortalidad (%)	Sobrevida (días)	Morbilidad (%)	Mortalidad (%)	Sobrevida (días)
HSV-1 KOS	100	100	7 ± 1	100	80	7 ± 1
H17-5	20	0	Sobrevida	80	80	10 ± 1
H17-16	40	40	8 ± 1	100	100	11 ± 1
I16-6	60	60	9 ± 1	100	100	8 ± 1
I16-11	40	40	9 ± 1	40	40	10 ± 1
ACVp6KOS	0	0	Sobrevida	0	0	Sobrevida

Tabla 8. Virulencia de variantes de HSV-1 en BALB/c. Grupo de 5 hembras BALB/c de 7-8 semanas de vida se infectaron por vía intravaginal e intranasal con 1×10^6 UFP/animal, (inóculo: 20µl). Se registró la morbilidad y mortalidad y se calcularon los porcentajes correspondientes en cada grupo. Los animales se monitorearon diariamente durante tres semanas.

Virus	BALB/c	
	Intravaginal	Intranasal
HSV-1 KOS	5	4-5
H17-5	2	4
H17-16	5	4
I16-6	4	3
I16-11	5	3
ACVp6KOS	0	0

Tabla 9: Sintomatología en BALB/c. Los ratones infectados por las distintas vías, fueron monitoreados y los síntomas registrados y clasificados de la siguiente manera, nivel de sintomatología: **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. **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.

En base a estos resultados, se pudo concluir que todos los clones infectados por vía intravaginal redujeron su virulencia y provocaron un retraso

en el día de muerte de los ratones al compararlos con la cepa parental HSV-1 KOS. A fin de analizar si estas diferencias se deben a una capacidad replicativa distinta, se llevó a cabo una titulación de lavados vaginales. Para ello, los lavados fueron cosechados a las 48 h y titulados. Como se puede observar en la figura 10, a pesar de las diferencias observadas en los porcentajes de mortalidad y morbilidad, se detectaron niveles similares de virus infectivo en los lavados vaginales de las variantes y el control viral.

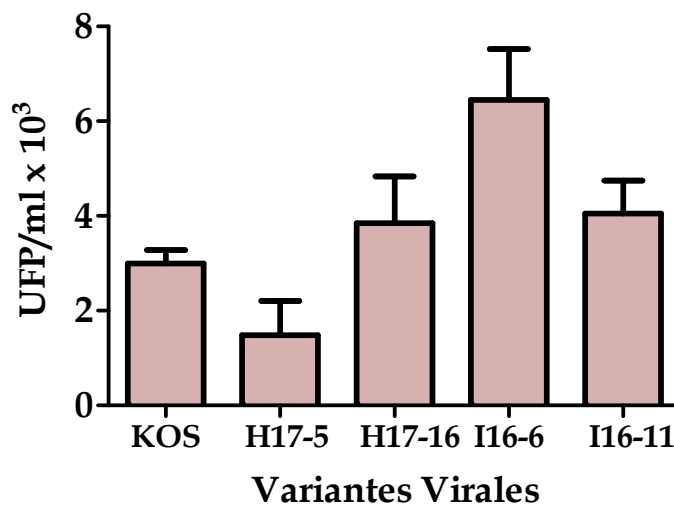


Figura 10. Título viral en lavados vaginales. Se recolectaron lavados vaginales de hembras BALB/c infectadas por vía intravaginal, a las 48 hs p.i. se determinó la carga viral por el método de UFP.

5.6. Cuantificación de citoquinas en lavados vaginales

Dado que la patogenicidad de las variantes fue diferente entre ellas y su cepa de origen HSV-1 KOS, a pesar de que su capacidad de replicación fue similar, se quiso estudiar la respuesta de las citoquinas proinflamatorias frente a las infecciones virales. Para ello, a las 24 y 72 hs p.i. se tomaron nuevas muestras de lavados vaginales de las hembras BALB/c infectadas por vía intravaginal, a fin de analizar la concentración de IL-6 y TNF- α mediante la técnica de ELISA. Como se puede observar en la figura 11, los grupos de animales inoculados con las variantes presentaron en general, niveles menores de citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α que la cepa parental KOS a las 24hs p.i.

En las muestras de animales inoculados con HSV-1 KOS se obtuvo una rápida respuesta de IL-6 a las 24 hs ($491,9 \pm 99,5$ pg/ml) mientras que a las 72 hs estos niveles se redujeron a $24,4 \pm 4,2$ pg/ml. Sin embargo, los animales infectados con las variantes virales no generaron una liberación significativa de IL-6 en ninguno de los tiempos estudios (Fig. 11). Por otro lado, la respuesta TNF- α fue inmediata en los animales infectados con la variante I16-11 (Fig. 11) que demostró un bajo porcentaje de mortalidad tanto por vía intravaginal como intranasal (Tabla 8).

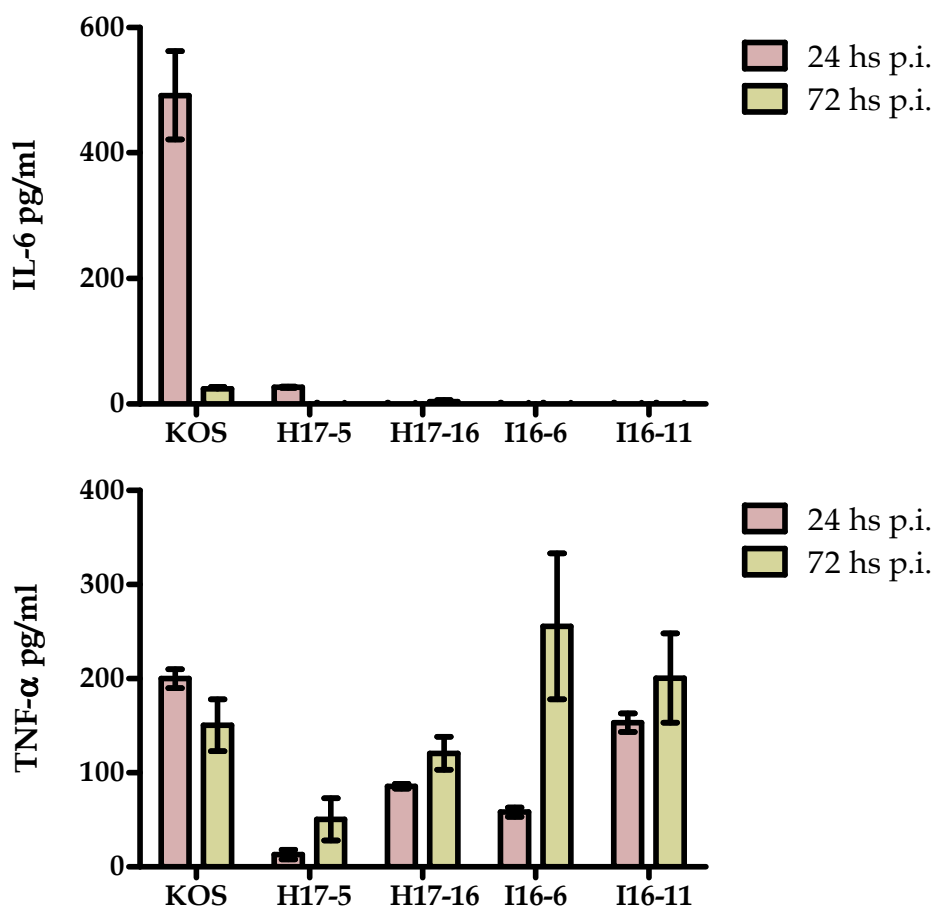


Figura 11: Cuantificación de citoquinas proinflamatorias en lavados vaginales. Se infectaron ratones BALB/c por vía intravaginal, a las 24 y 72 hs p.i. se cosecharon lavados vaginales a fin de cuantificar la concentración de citoquinas proinflamatorias por el método de ELISA.

En base a los resultados de este capítulo, se puede concluir que los pasajes sucesivos con los polisacáridos sulfatados no generan resistencia contra

ellos, disminuyen la liberación de citoquinas a las 24 hs p.i. y permite obtener variantes virales con efectos patogénicos menores que el control por vía intravaginal. Estas observaciones con HSV-1 KOS coinciden con las obtenidas en proyectos previos en nuestro laboratorio con las variantes de HSV-1 F.

RESULTADOS

Capítulo 2: *Estudio de la patología pulmonar producida por HSV-1 F y sus variantes obtenidas con 1C3*

Capítulo 2: Estudio de la patología pulmonar producida por HSV-1 F y sus variantes obtenidas con 1C3

En estudios previos en nuestro laboratorio se seleccionaron y caracterizaron variantes virales syn de HSV-1 F en presencia del CGN 1C3. Las variantes virales obtenidas se denominaron 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2 por su fenotipo syn. En la figura 12, se muestran fotografías que representan los efectos citopáticos sinciciales de las variantes, diferenciados de la cepa HSV-1 F que les dio origen.

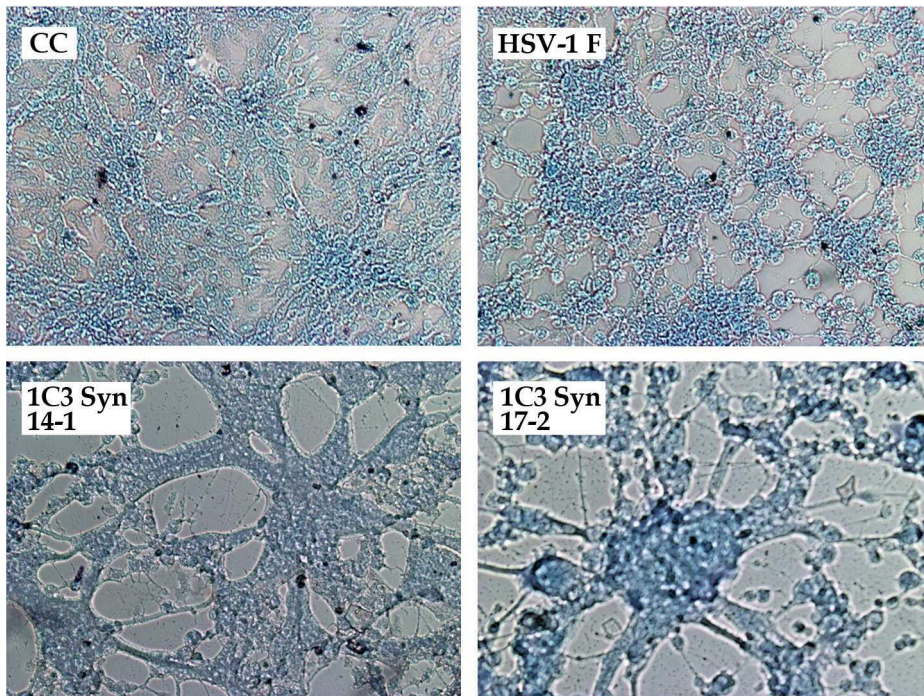


Figura 12: Efecto citopático de HSV-1 F y sus variantes syn en células Vero. Se infectaron monocapas de células crecidas sobre vidrio con el virus correspondiente, a una m.i. de 1. 24 hs p.i., se fijaron con metanol frío y se tiñeron con una solución de Giemsa. El CC corresponde a la monocapa de células Vero sin infectar. Las fotos se observaron con un aumento de 400X.

Luego se comparó la cinética de replicación de las variantes virales, en células Vero, respecto de la cepa parental HSV-1 F. En la figura 13, se observa que no hubo diferencias significativas en cuanto a la cinética de replicación viral entre las distintas variantes y la cepa parental.

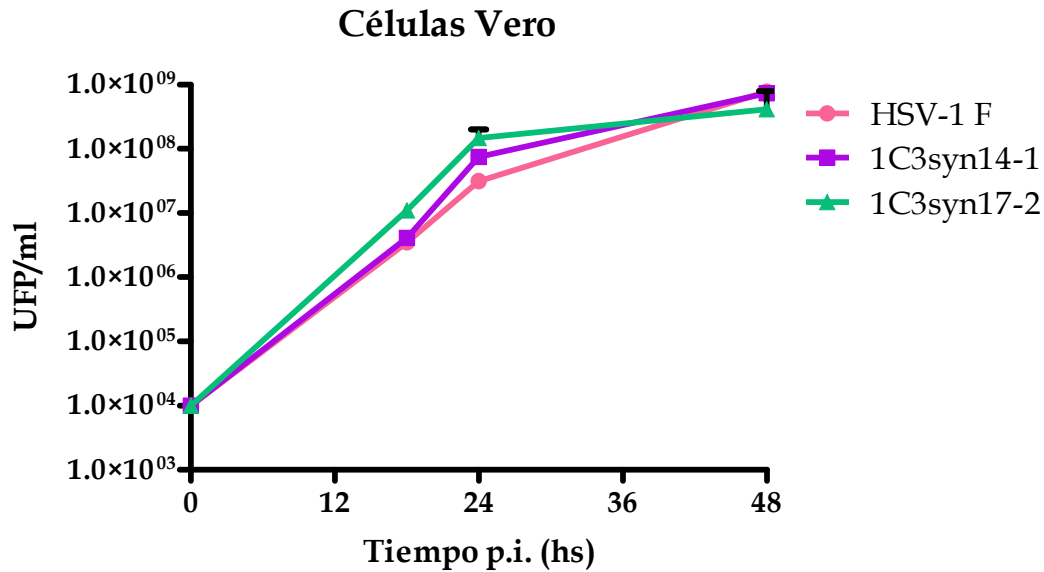


Figura 13. Estudio de la cinética de replicación de HSV-1 F y las variantes virales en células Vero. Se infectaron monocapas de células Vero con una m.i. de 0,01. Se cosecharon los sobrenadantes a las 18, 24 y 48 hs p.i. y se titularon mediante el método de unidades formadoras de placas.

Posteriormente, se profundizó el análisis citopático y patogénico de las variantes virales de HSV-1 F. 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 en lavados vaginales. Se obtuvo una concentración de TNF- α de $4040,3 \pm 69,2$ pg/ml para HSV-1 F y $512,7 \pm 24,8$ pg/ml para 1C3syn14-1. Para IL-6 se detectaron concentraciones de $37,1 \pm 2,0$ pg/ml en HSV-1 F y $7,5 \pm 0,4$ pg/ml en 1C3syn14-1. No obstante el título viral fue similar al obtenido con la cepa patrón (del orden de 1×10^3 UFP/ml) (Mateu C.G. y col., 2011).

Sin embargo, por vía intranasal las variantes mostraron una marcada virulencia en ratones BALB/c, conduciendo a una diseminación viral generalizada (Fig. 14).

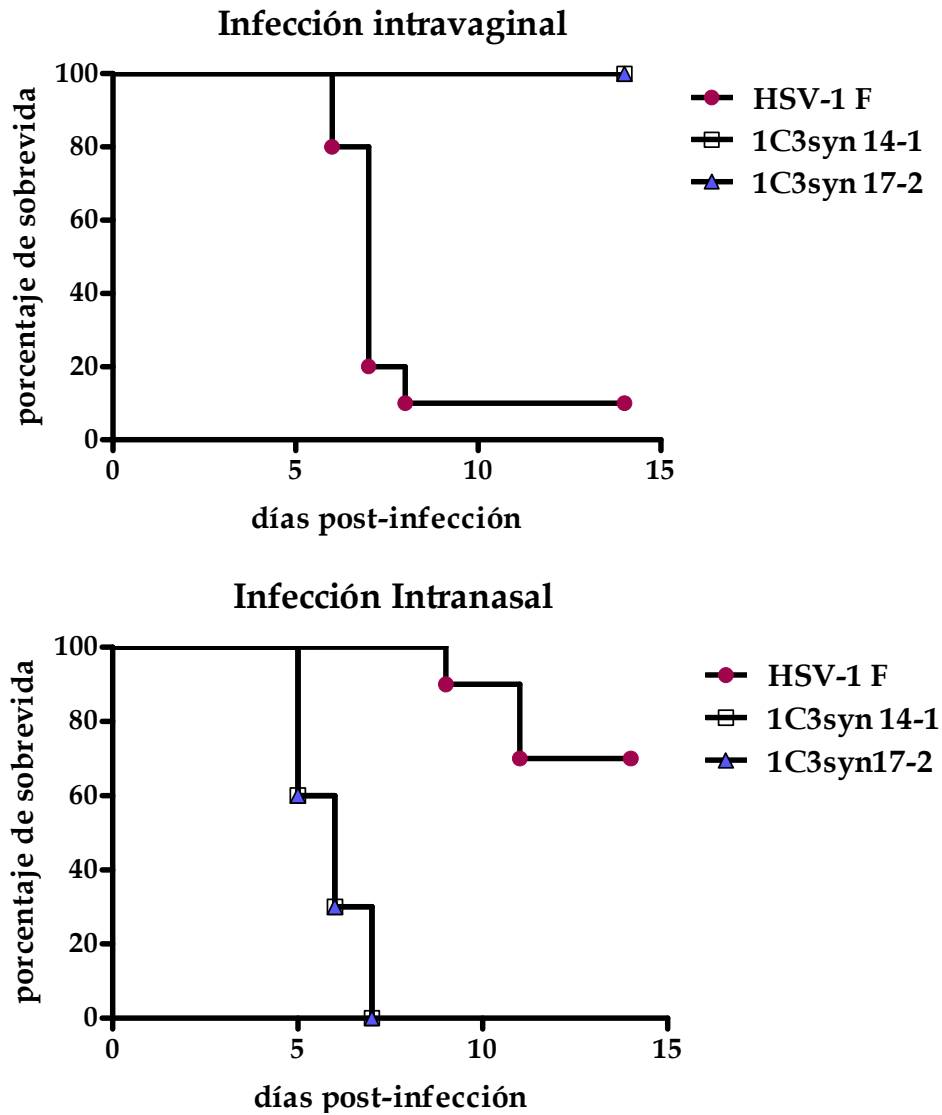


Figura 14: Curva de sobrevivida. Ratones BALB/c fueron inoculados con 1×10^6 UFP de F, 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2 por vía intranasal e intravaginal. Los ratones fueron observados durante 15 días.

Con estos antecedentes, fue de nuestro interés utilizar las variantes como herramientas para estudiar las posibles causas de la patología respiratoria ocasionada por una infección herpética.

5.7. Histopatología de pulmón de ratones infectados con HSV

En base a los resultados obtenidos en las infecciones intranasales, se decidió realizar histologías de pulmón a fin de analizar si habían diferencias entre los grupos de ratones infectados con HSV-1 F respecto de sus variantes

virales. El estudio se realizó en colaboración con la Dra. Cecilia Mateu (Tesis Doctoral QB, FCEN, UBA, 2011).

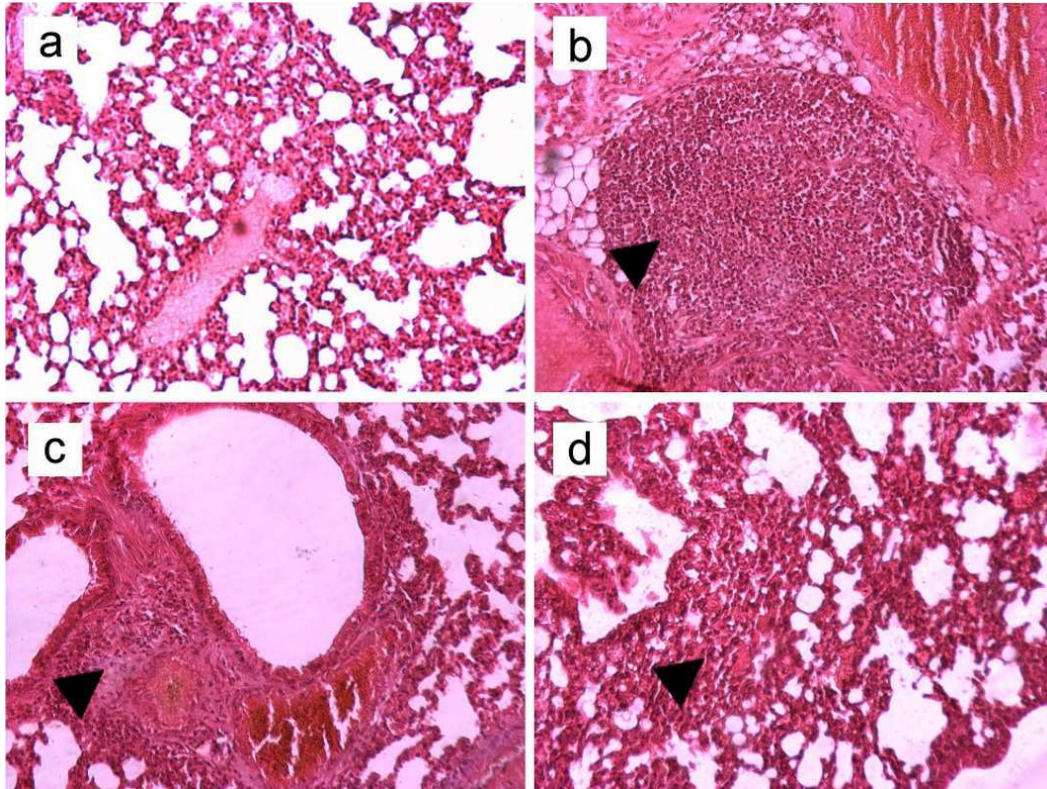


Figura 15: Estudio histopatológico en pulmón de ratones BALB/c sin infectar (a) e infectados por vía intranasal con HSV-1 F (b), 1C3syn14-1 (c) y 1C3syn17-2 (d). Los cortes corresponden a pulmones cosechados 5 días p.i. y observados en un aumento de 100X. Las flechas negras (▲) localizan los sitios de mayor efecto patogénico.

Mediante este estudio se pudo observar que, al día 5 p.i., tanto los pulmones infectados con HSV-1 F como con la variante 1C3syn14-1 (Fig. 15b y 15c, respectivamente) presentaron grandes infiltrados leucocitarios, en particular en las zonas próximas a los bronquiolos y vasos sanguíneos. Por otro lado, en los pulmones de los ratones infectados con la variante 1C3syn17-2 se observó pérdida de la morfología característica alveolar (Fig. 15d) con un engrosamiento de la pared alveolar (Mateu C.G. y col., 2011). Como control se realizó la histología del pulmón de un ratón sin infectar (Fig. 15a).

5.8. Análisis de las poblaciones celulares en pulmón

Dada las diferencias histopatológicas observadas, se procedió a analizar las distintas poblaciones celulares presentes en el foco de infección por citometría de flujo. Para ello, se infectaron ratones BALB/c por vía intranasal y a los 3 y 5 días p.i. se extrajeron los pulmones. Las poblaciones celulares estudiadas fueron monocitos marcados con CD11b, linfocitos activados marcados con CD28 y células Natural Killer (NK) que fueron marcados con anticuerpos anti NK 1.1. En la figura 16 se observan las regiones utilizadas para el estudio de las poblaciones correspondientes. La región R1 encierra a la población linfocítica mientras que la R2 agrupa a la monocítica.

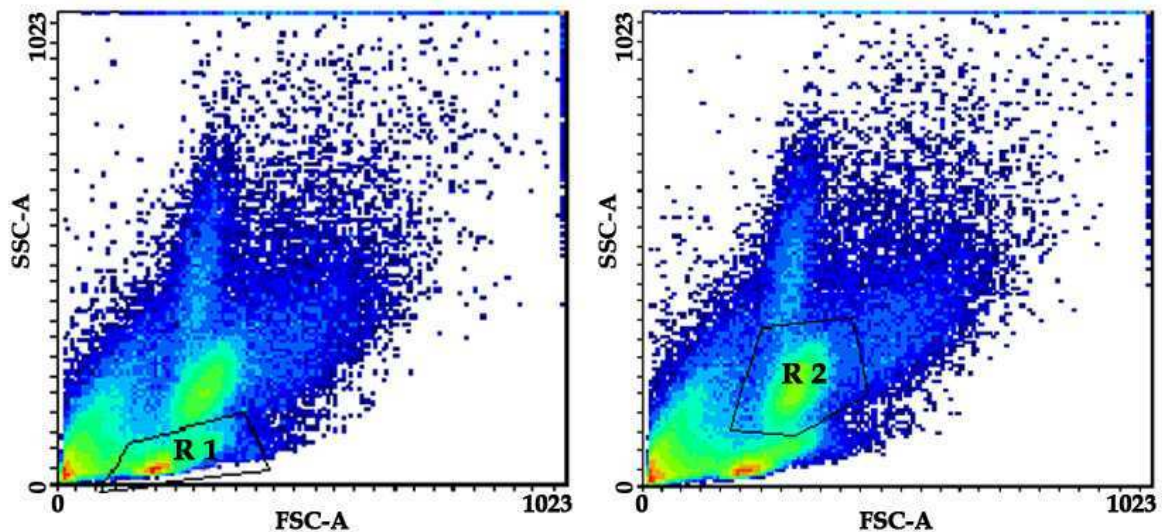


Figura 16: Gráfico de puntos para el análisis de las poblaciones celulares. Se analizaron las poblaciones celulares dentro de las regiones correspondientes. La región R1 recuadra la población linfocítica mientras que la R2 agrupa a la monocítica.

Los histogramas de la figura 17 muestran la presencia de diferentes poblaciones de células del sistema inmune en los distintos tiempos p.i. En la población monocítica no se obtuvieron diferencias significativas entre las distintas infecciones con respecto al control sin infectar, en ninguno de los dos días analizados. Sin embargo, las poblaciones de NK y linfocitos activados tuvieron una respuesta diferenciada al día 5 p.i. En ambos casos los pulmones

de los ratones infectados con 1C3syn14-1 generaron un mayor reclutamiento respecto de la cepa parental HSV-1 F y la variante 1C3syn17-2.

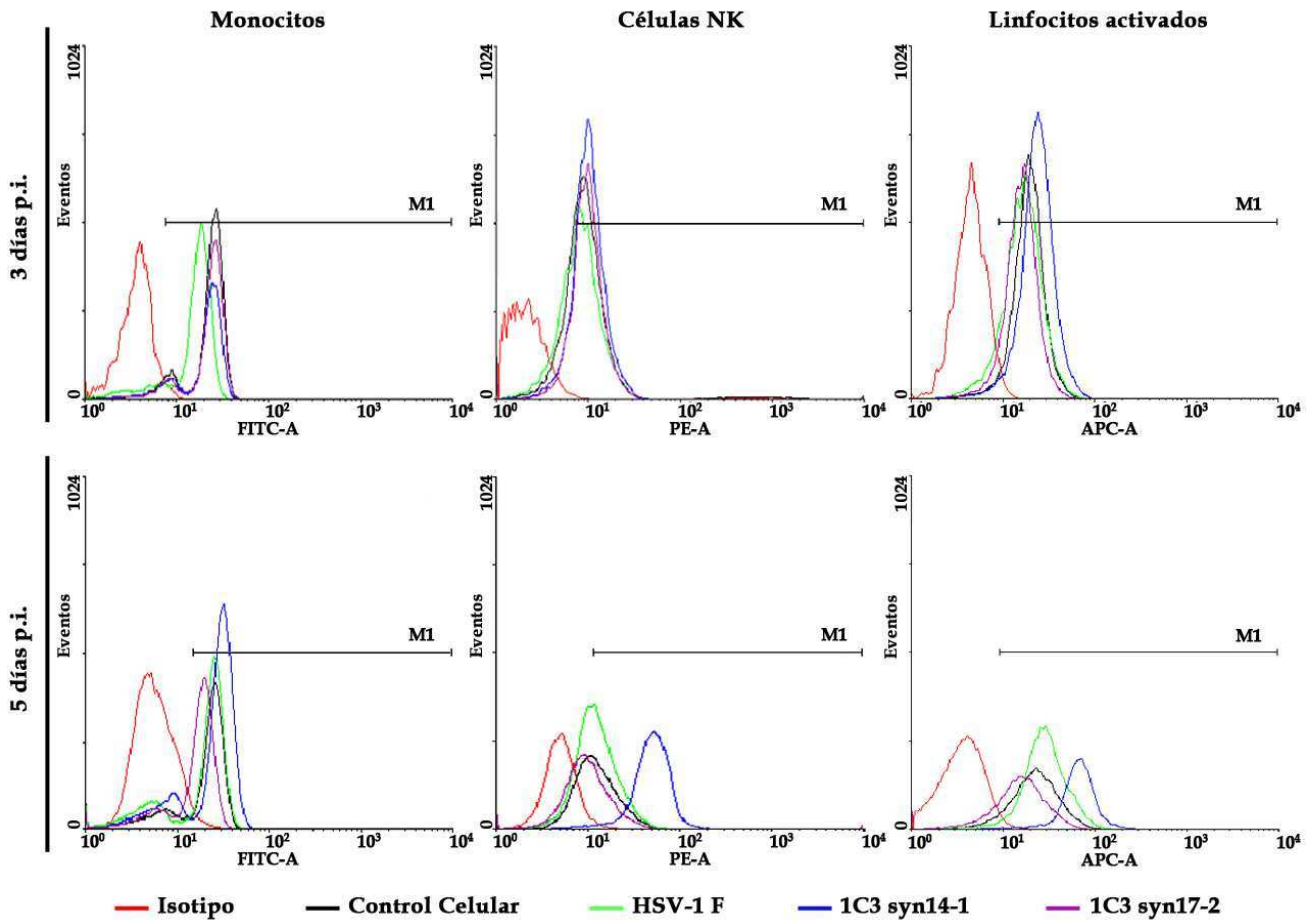


Figura 17: Estudio de poblaciones celulares en pulmón de ratones infectados con HSV-1 F y sus variantes 1C3. Se cosecharon los pulmones de los ratones infectados a los días 3 y 5 p.i. y se procedió al análisis de las poblaciones de células mediante citometría de flujo. La marcación simple se realizó con los anticuerpos CD11b para monocitos, NK 1.1 para la población de células NK y CD28 para marcar linfocitos activados. El análisis se realizó mediante histogramas.

Dado que el anticuerpo de NK 1.1 no distingue la proporción de la población de NK que se encuentra activada, se llevó a cabo una doble marcación con el marcador CD28. Aquellas células que fueron doblemente positivas (NK 1.1+/CD28+) representaron a la población de NK que fue activada.

Como se puede deducir de la figura 18, tanto al día 3 como 5 p.i. más del 90% de la población de NK estaba activada en los pulmones infectados con la variante 1C3syn14-1. Por otro lado, los ratones infectados con la cepa HSV-1 F presentaron un porcentaje de activación entre el 65 y 70% durante ambos días.

En lo que respecta a la variante 1C3syn17-2, se observó que si bien al día 3 p.i. se obtuvo un porcentaje de activación similar a HSV-1 F, durante el día 5 p.i. hubo una disminución significativa de la población de NK activados.

Dado que los NK cumplen un rol fundamental en el control de la replicación y diseminación del virus, el efecto severo observado en las infecciones llevadas a cabo con la variante 1C3syn17-2 podría estar asociado a niveles reducidos de NK activados.

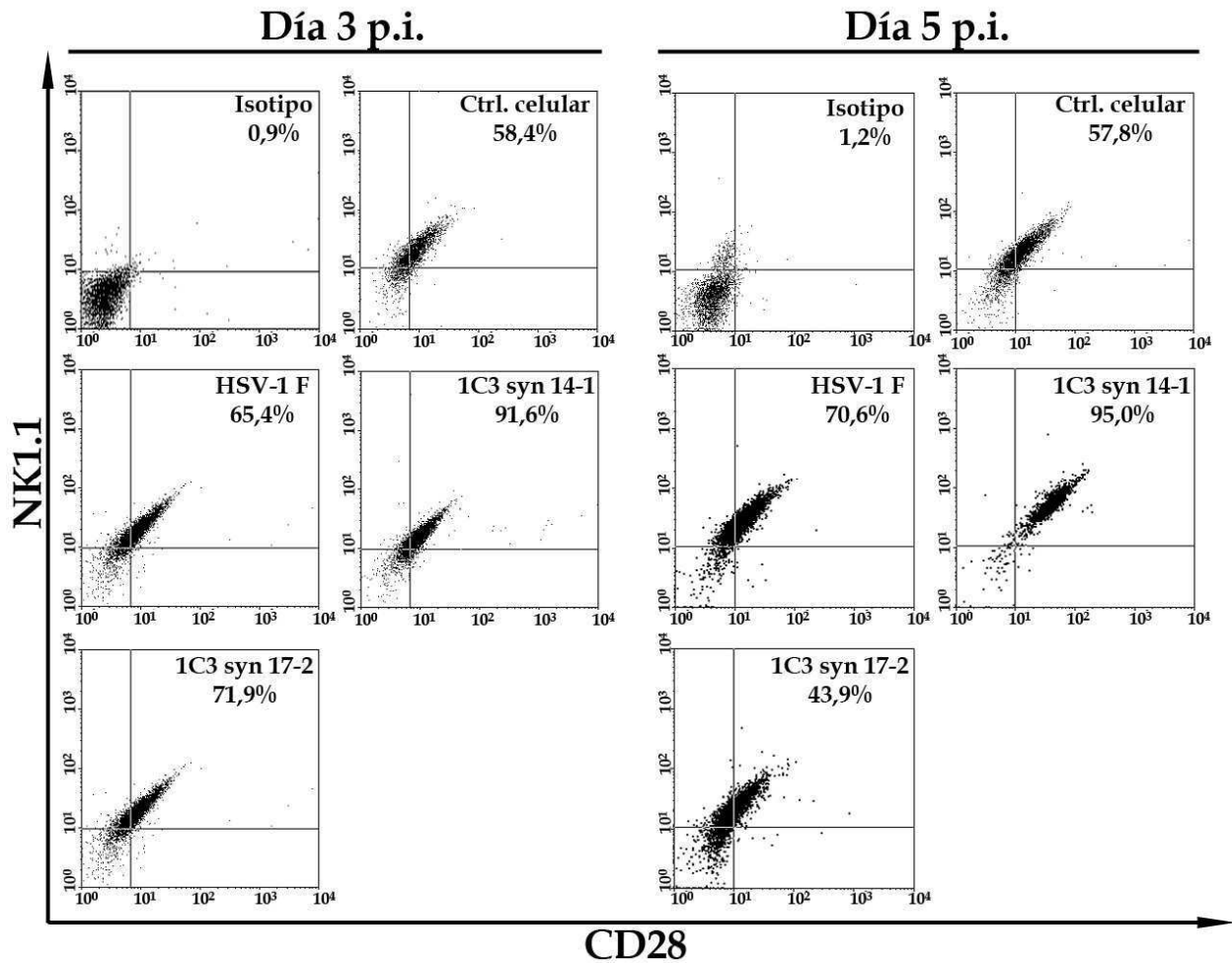


Figura 18: Estudio de la activación de células NK presentes en los pulmones de ratones infectados con HSV-1 F y las variantes 1C3. Se cosecharon los pulmones de los ratones infectados con HSV-1 F y sus variantes a los días 3 y 5 p.i. y se analizaron las poblaciones de células mediante citometría de flujo. El estudio de las poblaciones de NK activadas se realizó por una doble marcación combinando los anticuerpos CD28/NK1.1. Los resultados se obtuvieron a partir de cuadrantes de gráficos de puntos.

5.9. Titulación viral en pulmón

Con el fin de definir si el incremento en la mortalidad observada en ratones infectados con las variantes 1C3syn respecto de HSV-1 F presentaba una correlación con la replicación viral, se procedió a titular los pulmones de animales infectados. En la figura 19 se puede observar que a las 24 hs p.i., el título viral de los animales infectados con las variantes 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2 fueron, de 1 y 2 logaritmos más altos respectivamente, en comparación con aquellos registrados en ratones infectados con HSV-1 F. Sin embargo, a las 72 hs

p.i. los títulos obtenidos fueron cercanos a cero para los tres grupos de infección.

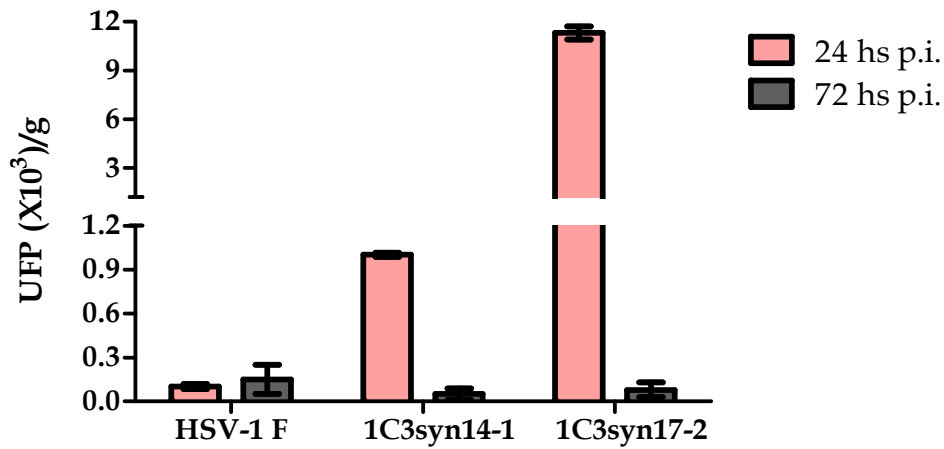


Figura 19: Titulación en pulmón infectados con HSV-1 y las variantes 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2. Los pulmones de ratones infectados se cosecharon a las 24 y 72 hs p.i. y se procesaron a fin de obtener el título de la replicación viral.

5.10. Cuantificación de citoquinas en lavados bronquioalveolares

Considerando que los títulos virales fueron mayores en los pulmones de los animales infectados con las variantes syn, se analizó si esto podría estar relacionado con una modulación diferencial de citoquinas. Para ello, se estudiaron los niveles de TNF- α , IL-6 e IL-10 en lavados bronquioalveolares (BAL).

Este estudio se realizó por infección de ratones BALB/c por vía intranasal con un título de 1×10^6 UFP tanto de HSV-1 F como de las variantes 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2. A las 24 y 72 hs p.i. se llevaron a cabo los BAL (Fig. 20) y se cuantificó la concentración de las citoquinas mediante la técnica de ELISA.

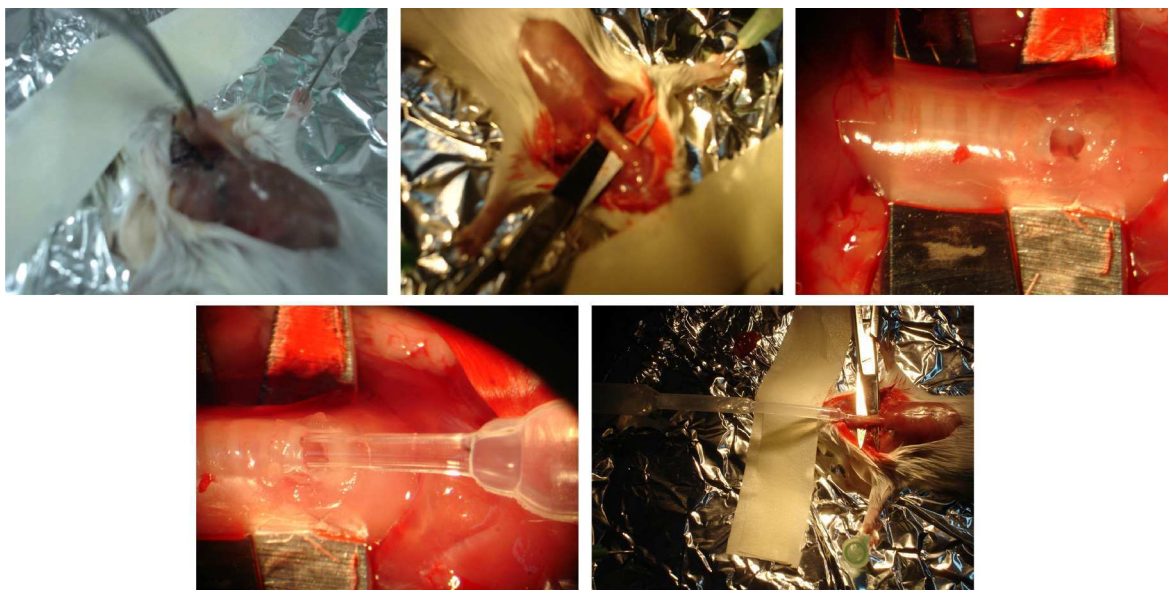


Figura 20: Fotos de la secuencia del procedimiento para la obtención de los lavados bronquioalveolares en ratones BALB/c. Las fotos demuestran la extracción de la tiroides que expone la tráquea para ser evulcionada y luego el orificio por donde se introduce la micropipeta que permite la realización del BAL.

Al realizar el análisis de los BAL se observó que las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α en ratones infectados HSV-1 F, fueron liberadas rápidamente a las 24 hs p.i (Fig. 21). Sin embargo, en los BAL de ratones infectados con las variantes 1C3syn se obtuvo una respuesta tardía en la liberación de TNF- α ya que, a pesar de que lograron alcanzar los mismos niveles de concentración de citoquinas que la cepa patrón (2000 pg/ml), éstos fueron alcanzados recién a las 72 hs p.i. En el caso de los BAL de ratones infectados con 1C3syn17-2, también se observó una liberación tardía de IL-6 a diferencia de 1C3syn14-1 y HSV-1 F en las cuales se detectó dicha citoquinas a partir de las 24 hs p.i.

Dado que TNF- α cumple un rol primordial en el control de la replicación y diseminación viral y la citoquina IL-6 en la respuesta aguda, la liberación tardía de ambas podría favorecer el aumento de la replicación de las variantes syn como se observa en la titulación de los pulmones (Fig. 19).

Por otro lado, se estudió también la presencia de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Fig. 21). Los picos de liberación de esta citoquina coinciden con los de las proinflamatorias estudiadas, por lo tanto la regulación de la respuesta inflamatoria no estaría alterada.

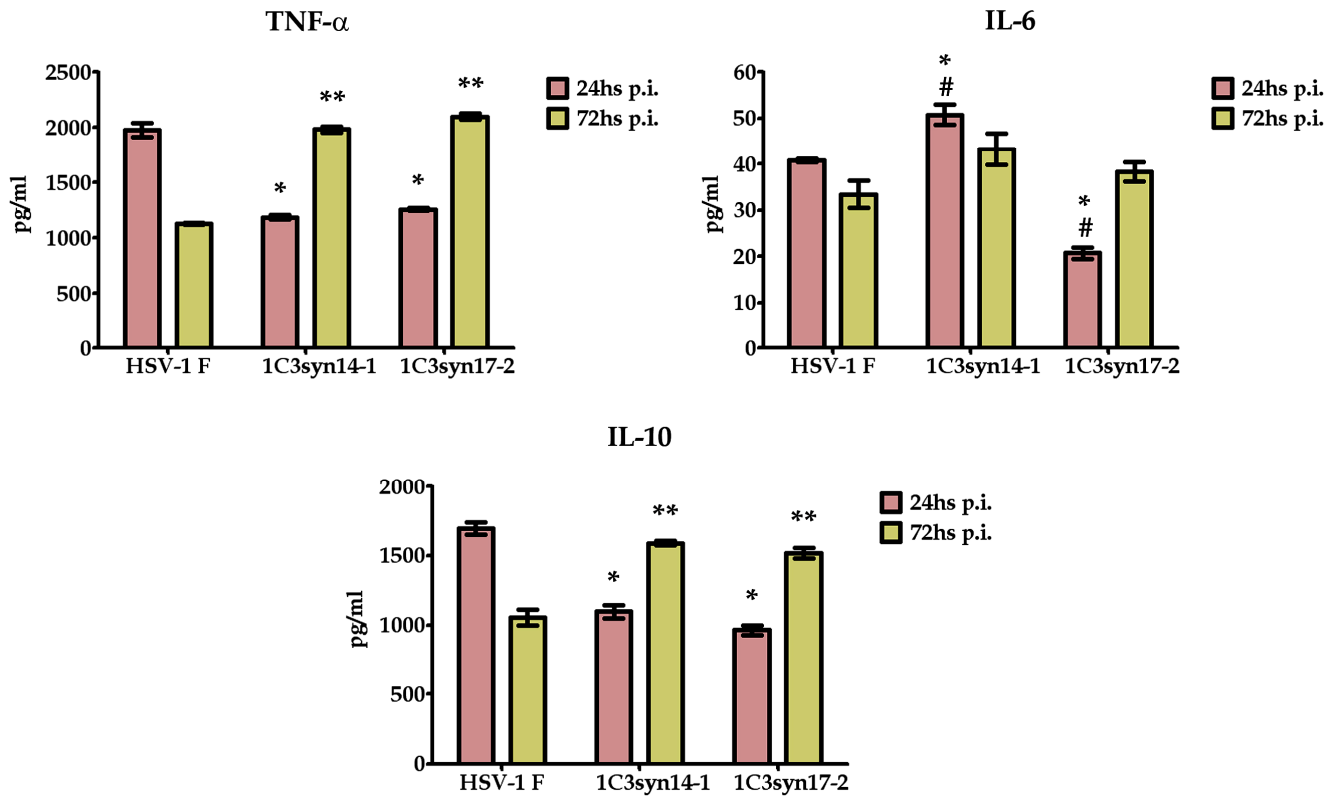


Figura 21: Análisis de la concentración de citoquinas por la técnica de ELISA. Se infectaron ratones BALB/c con HSV-1 F y las variante syn. A las 24 y 72 hs p.i. Se cosecharon los BAL y se analizaron por ELISA. Los signos * y ** representan un $p < 0,05$ respecto a HSV-1 F. El signo # representa un $p < 0,05$ entre las variantes 1C3syn.

5.11. Cuantificación de citoquinas en macrófagos RAW 264.7

Es sabido que los macrófagos alveolares constituyen la mayor parte de las células del sistema inmune presentes en el fluido de los BAL y que además son la fuente principal de liberación de TNF- α e IL-6. Con el fin de evaluar el efecto de la infección por HSV-F y sus variantes virales sobre la liberación de dichas citoquinas proinflamatorias, se iniciaron estudios *in vitro* utilizando la línea celular macrófaga murina RAW 264.7.

Como se puede observar en la figura 22a, los niveles de citoquinas proinflamatorias detectados en los sobrenadantes, mediante la técnica de ELISA fueron significativamente menores en células infectadas con 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2, en comparación con los obtenidos con HSV-1 F. La concentración de IL-6 y TNF- α medida entre las 2 y 10 hs p.i. disminuyó en un rango entre 84 y 100% en infecciones con las variantes syn respecto de HSV-1 F ($p < 0.05$). Como control se utilizaron células sin infectar a las que se las denominó control celular (CC). Por otro lado, células estimuladas con LPS se utilizaron como control positivo obteniéndose una alta liberación de citoquinas.

Con el objetivo de analizar si la disminución en la expresión de las citoquinas se debía a la modulación de la transcripción de las mismas, se extrajo el ARN total a partir de los macrófagos infectados para un posterior estudio por RT-PCR. Como era de esperar, la disminución de la concentración de las citoquinas analizadas por ELISA correlacionó con el análisis cualitativo realizado por RT-PCR. Dado que la intensidad de las bandas de la β -actina (control interno) fue equitativa entre HSV-1 F y las variantes, la menor intensidad observada en las infecciones con las variantes 1C3syn (Fig. 22b) fue atribuida a la modulación que éstas variantes virales ejercen sobre la liberación de dichas citoquinas proinflamatorias en la línea celular de macrófagos estudiada.

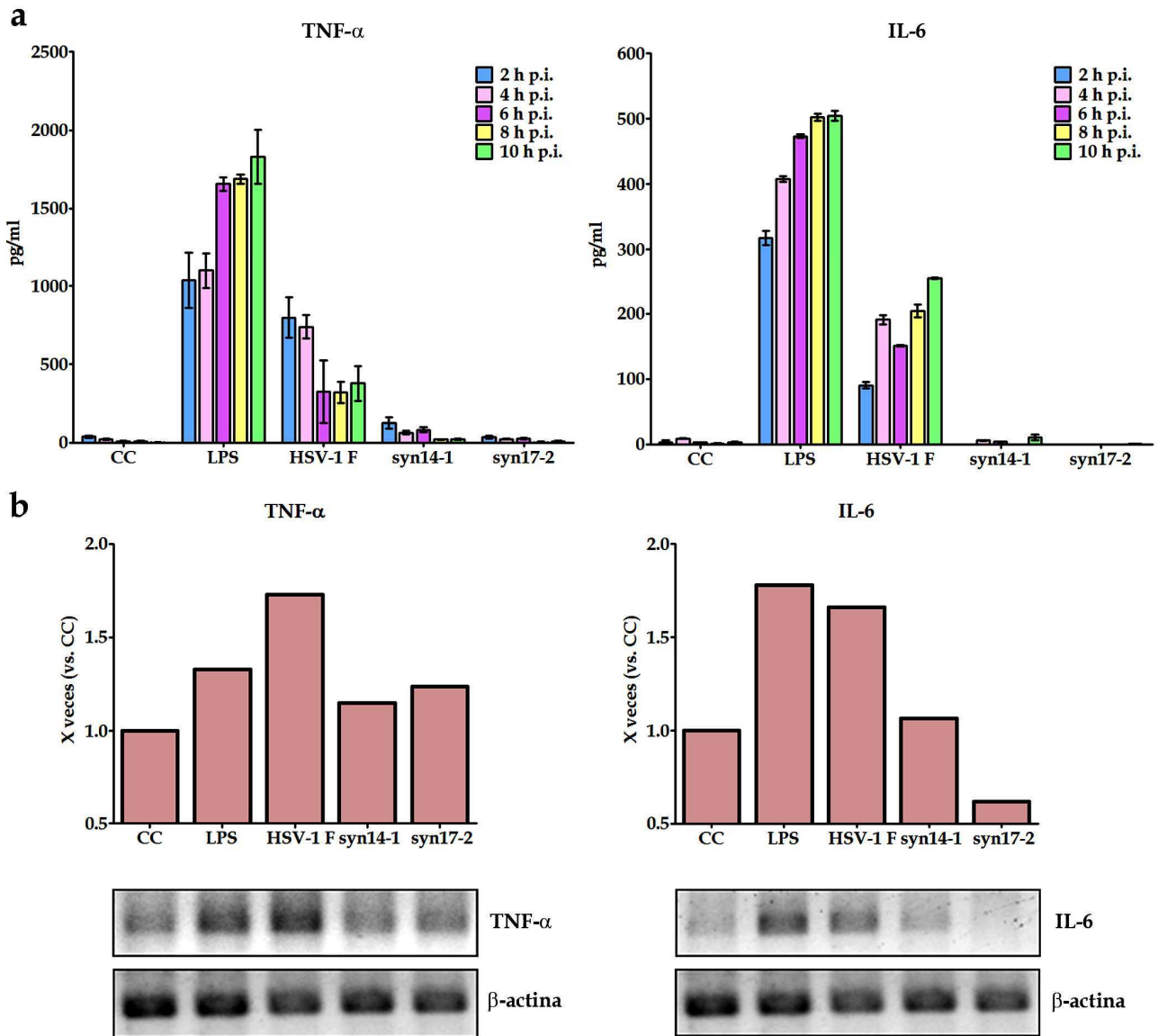


Figura 22: Estudio de la concentración de citoquinas mediante la técnica de ELISA (a) y de su transcripción por PCR (b) en células RAW 264.7. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes \pm DE. CC: Control de células. Syn14-1 y syn17-2 corresponde a 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2. La intensidad de la banda se representa en gráficos con número de veces respecto a las células sin infectar. Todos están relativizados al control interno de β -actina.

Para descartar que las diferencias observadas en la liberación de citoquinas se debieran a una menor capacidad de replicación de las variantes virales en la línea celular RAW 264.7, se analizó la cinética de replicación. Como se puede observar en la figura 23, las variantes 1C3syn generaron títulos

mayores respecto de HSV-1 F, a pesar de que generaron niveles menores en las citoquinas proinflamatorias. Por lo tanto, se puede descartar que la modulación observada se deba a una replicación defectiva en la línea celular estudiada.

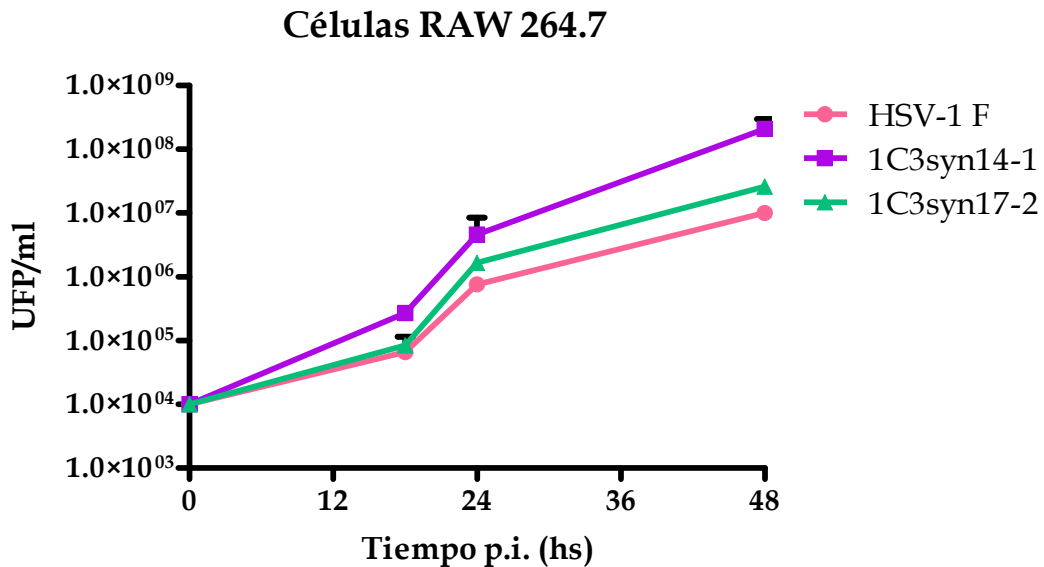


Figura 23. Estudio de la cinética de replicación de HSV-1 F y las variantes virales en células RAW 264.7. Se sembraron monocapas de células RAW 264.7 y fueron infectadas con una m.i. de 0,01. Se cosecharon los sobrenadantes a las 18, 24 y 48 hs p.i. y se titularon mediante el método de unidades formadoras de placas.

Si bien estos resultados obtenidos *in vitro* fueron coherentes con lo observado *in vivo*, se quiso analizar el perfil de citoquinas en ensayos *ex vivo* a fin de validar la línea celular utilizada. Para ello se cosecharon exudados peritoneales a partir de ratones BALB/c estimulados con tioglicolato a fin de obtener una alta proporción de macrófagos peritoneales.

Como muestra la figura 24, el perfil coincidió con lo observado con la línea celular RAW 264.7 ya que las células infectadas con la variante 1C3syn14-1 generaron una liberación de citoquinas proinflamatorias menor respecto de HSV-1 F. El LPS fue empleado como control positivo.

En este caso se decidió usar solo una de las variantes para reducir el número de animales sacrificados. Dado que la variante 1C3syn14-1 liberó una

concentración de citoquinas levemente mayor respecto de la 1C3syn17-2, se optó por realizar los ensayos con 1C3syn14-1.

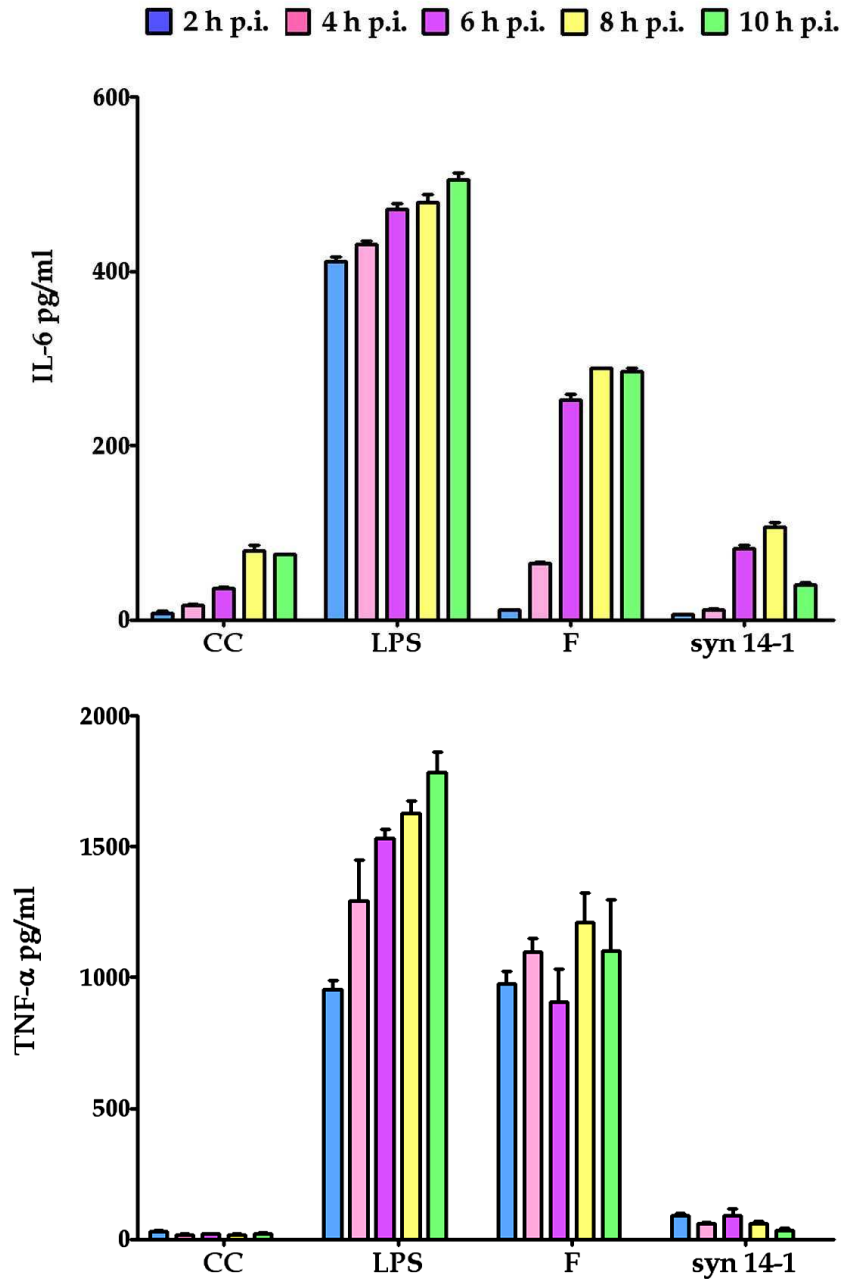


Figura 24. Estudio de la concentración de citoquinas mediante la técnica de ELISA en macrófagos peritoneales. Se prepararon monocapas de macrófagos extraídos del peritoneo de ratones BALB/c estimulados con tioglicolato. A las 24 hs, se infectaron las monocapas con HSV-1 y las variantes syn (m.i. 10) y a distintas horas p.i. se cosecharon los sobrenadantes a fin de analizar las concentraciones de citoquinas mediante la técnica de ELISA. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes \pm DE. CC: control de células.

5.12. Expresión de las moléculas de adhesión ICAM y VCAM en células endoteliales

El virus HSV presenta un gran tropismo por células del endotelio. Sobre la superficie de éstas células se encuentran diversas moléculas de adhesión que participan activamente en la migración leucocitaria durante la formación de un foco de infección. En particular, es sabido que TNF- α es una de las principales inductoras de la expresión de moléculas de adhesión, especialmente ICAM y VCAM. Con el fin de estudiar si las alteraciones observadas en la respuesta de citoquinas inflamatorias podrían afectar también el evento de migración leucocitaria, se propuso analizar el efecto de las infecciones con HSV-1 F y sus variantes en relación con la expresión de las moléculas de adhesión ICAM y VCAM. Para ello, se utilizó la línea celular 1G11 de endotelio de pulmón murino. Esta línea fue seleccionada a fin de continuar con el estudio de las variantes sobre el pulmón.

En primer lugar, se analizó la capacidad de replicación de HSV-1 F y las variantes 1C3syn en la línea celular en estudio. En base a la cinética, se pudo comprobar que las células 1G11 son aptas para ser utilizadas en infecciones con HSV-1 ya que la curva no presenta ninguna alteración (Fig. 25).

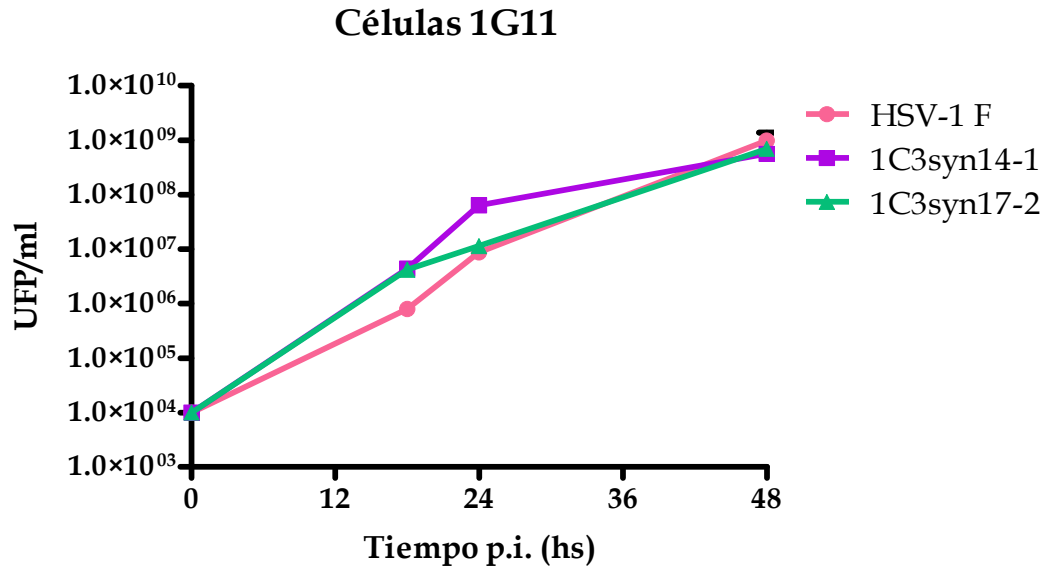


Figura 25. Estudio de la cinética de replicación de HSV-1 F y las variantes virales en células de endotelio de pulmón 1G11. Se sembraron monocapas de células 1G11 y fueron infectadas con una m.i. de 0,01. Se cosecharon los sobrenadantes a las 18, 24 y 48 h p.i. y se titularon mediante el método de unidades formadoras de placas.

Para analizar la expresión de las moléculas ICAM y VCAM se llevó a cabo un estudio por citometría de flujo. Como se puede observar en los histogramas de la figura 26, los niveles de expresión ambas moléculas son similares tanto en las células infectadas con HSV-1 F como en las infectadas con las variantes 1C3syn y las que no fueron infectadas (Control celular).

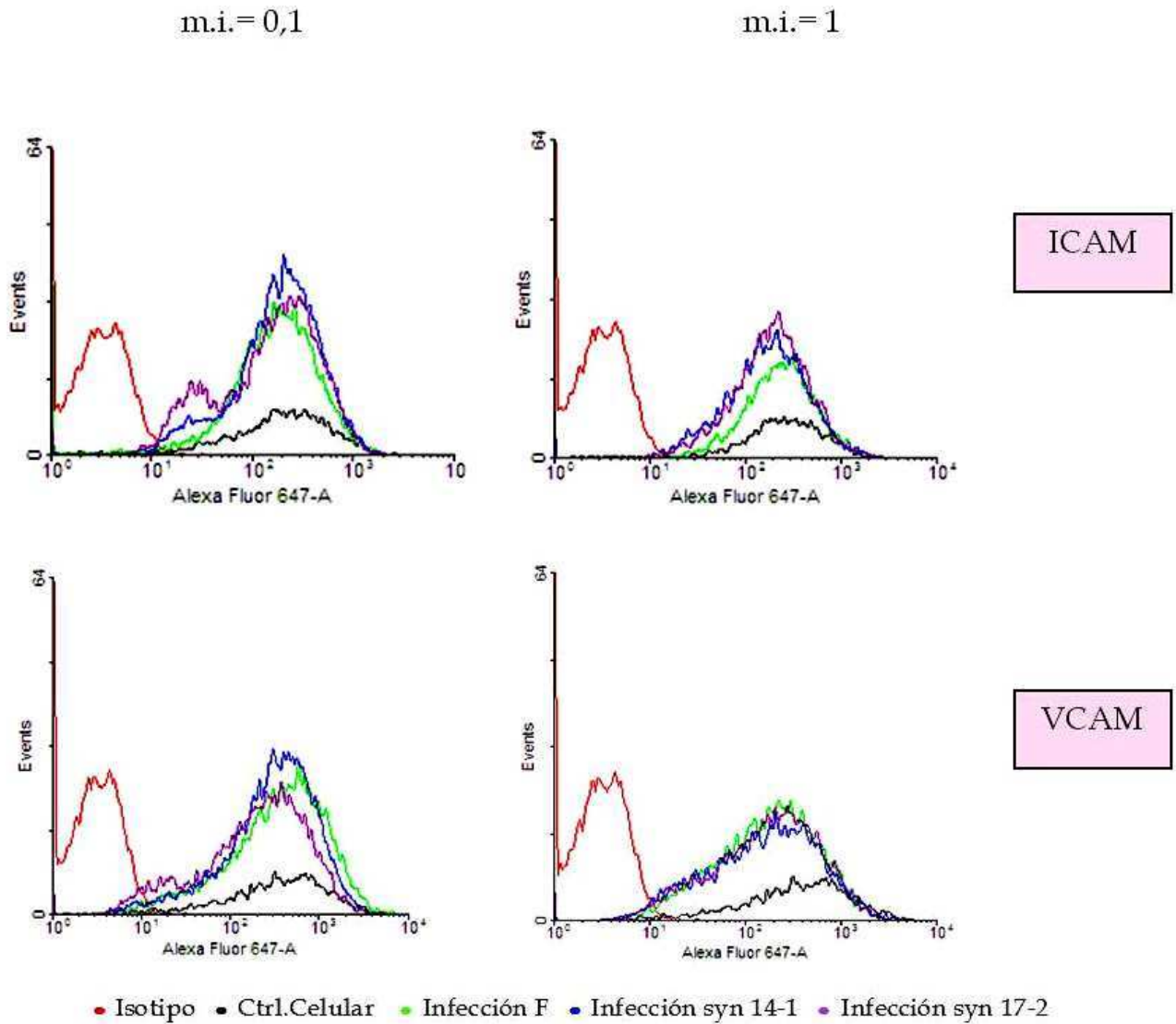


Figura 26: Expresión de las moléculas de Adhesión ICAM y VCAM en células endoteliales. Se infectaron células endoteliales 1G11 con m.i. de 1 y 0,1, con el virus HSV-1 F y las variantes 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2. A las 18 hs p.i. se cosecharon las monocapas y se procesaron para el análisis de la expresión de las moléculas de adhesión ICAM y VCAM por la técnica de citometría de flujo.

En base a los resultados obtenidos, se puede deducir que la expresión de las moléculas de adhesión VCAM e ICAM no se alteraría en infecciones con HSV-1. Además, si bien TNF- α provoca la expresión de las moléculas de adhesión en células endoteliales, sorpresivamente, su liberación tardía no influyó sobre dicha expresión.

En resumen, en el capítulo 2 se pudo comprobar que si bien las variantes virales 1C3syn tienen el mismo porcentaje de mortalidad, su interacción con el sistema inmunológico es diferente.

En infecciones con 1C3syn17-2, el efecto histopatológico observado fue más severo y al analizar la población celular en el pulmón, se detectaron bajos niveles de células NK. Asimismo, la capacidad del virus de replicar en dicho tejido fue mayor coincidiendo con una respuesta tardía de la liberación de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6.

Por otro lado, la variante 1C3syn14-1, provocó un efecto más leve en el pulmón y el reclutamiento de la población de células NK fue significativamente mayor. No obstante, esta variante también logró evadir el sistema inmune retrasando la liberación de TNF- α y logró replicar en el pulmón a diferencia de la cepa HSV-1 F, que les dio origen.

Finalmente, ninguna de las variantes alteró la expresión de las moléculas de adhesión ICAM y VCAM sobre células endoteliales de pulmón, a pesar de la baja concentración de TNF- α ante las infecciones.

RESULTADOS

Capítulo 3: Estudio molecular comparativo de las variantes de HSV-1 F y HSV-1 KOS

Capítulo 3: Estudio molecular comparativo de las variantes de HSV-1 F y HSV-1 KOS

5.13. Estudio molecular de la secuencia de gD en HSV-1 F, HSV-1 KOS y sus respectivas variantes.

El HSV codifica para 12 glicoproteínas de las cuales 5 estarían involucradas en el proceso de entrada (gC, gB, gD, gH y gL). Sin embargo, la gD cumple un rol fundamental y esencial en dicho proceso, y además, su interacción con los receptores celulares, en particular HVEM, regula la respuesta del sistema inmune. Es por ello que fue de nuestro interés estudiar la secuencia de la gD a fin de analizar si las alteraciones observadas en la respuesta inmune podrían asociarse a mutaciones en dicha glicoproteína. Este estudio se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Florencia Linero (Lab. Virología, FCEN, UBA). Las mutaciones fueron consideradas como tales de acuerdo al nivel del "Quality Value" (barra verde, Fig. 27), obtenido en el electroferograma correspondiente. En la figura 27a se ejemplifica una mutación obtenida con QV alto y en la figura 27b, el mínimo considerado. Dado que este estudio se realizó por primera vez en las mutantes, se decidió comenzar por las que presentaron patologías más relevantes. Por lo tanto, las variantes estudiadas fueron: 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2 de HSV-1 F y de HSV-1 KOS se seleccionaron H17-16 e I16-11.

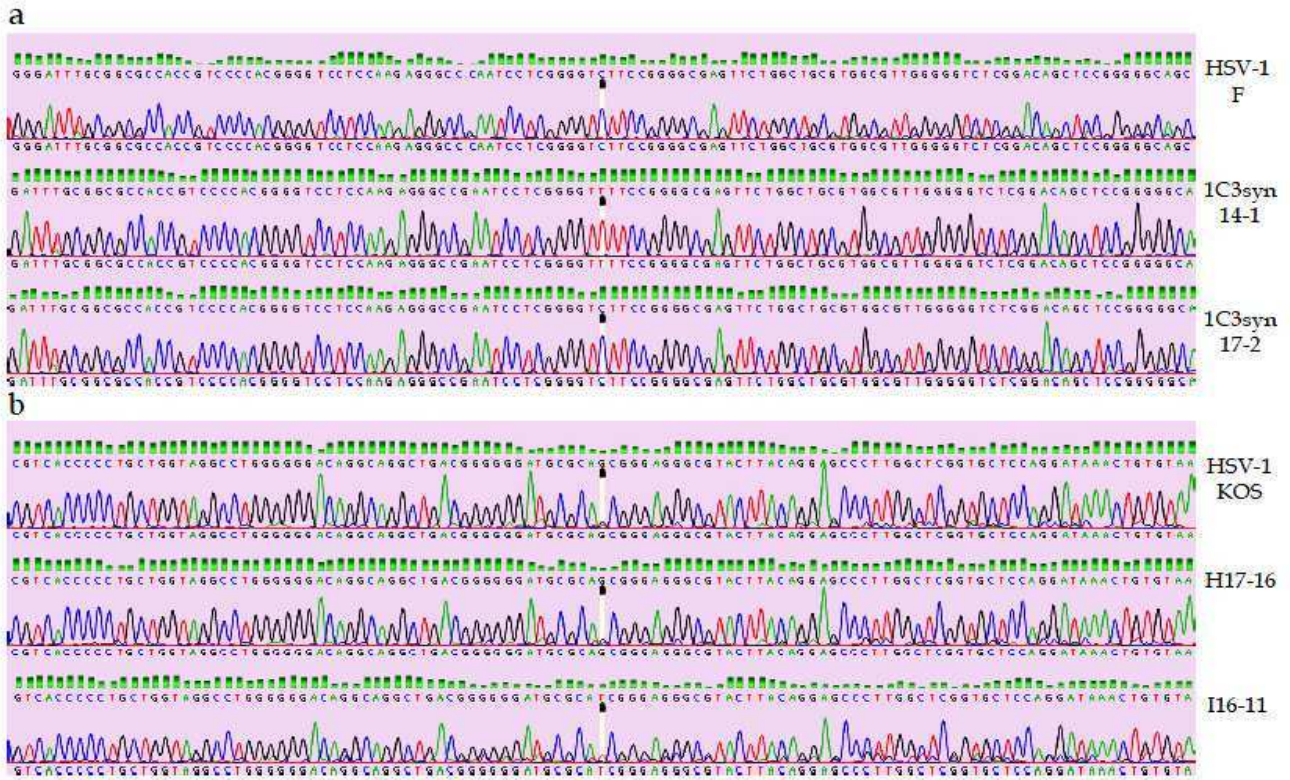


Figura 27. Electroferograma de la secuencia de gD. Se analizaron los electroferogramas a fin de comprobar si las alteraciones observadas en las secuencias correspondían a mutaciones con “Quality Value” (barra verde) aceptable. a) Mutación con QV alto, correspondiente a la variante 1C3syn14-1 de HSV-1 F, b) Mutación con valor de QV mínimo aceptable, correspondiente a la variante I16-11.

En base al análisis de las secuencias y sus electroferogramas correspondientes, se detectaron mutaciones puntuales en todos los casos. En la figura 28 se detallan las secuencias alteradas y en la Tabla 10 se resumen las mutaciones encontradas.

HSV-1 F:	CGGTTTGAGACCGCCGGCACGTACCTGCGGCTCGTGAAGATAAACGACTGGACGGAG
157	A F E T A G T Y L R L V K I N D W T E
1C3syn14-1:	CGGTTTGAGACCGCCGGCACGTACTTGCGGCTCGTGAAGATAAACGACTGGACGGAG
157	A F E T A G T Y L R L V K I N D W T
1C3syn17-2:	CGGTTTGAGACCGCCGGCACGTAC TCG CGGCTCGTGAAGATAAACGACTGGACGGAG
157	A F E T A G T Y L R L V K I N D W T E
HSV-1 F:	CTGTCCGAGACCCCCAACGCCACGCAGCCAGAACTCGCCCCGGAAGACCCCGAGGAT
257	L S E T P N A T Q P E L A P E D P E D
1C3syn14-1:	CTGTCCGAGACCCCCAACGCCACGCAGCCAGAACTCGCCCCGGA AAC CCCGAGGAT
257	L S E T P N A T Q P E L A P E N P E D
1C3syn17-2:	CTGTCCGAGACCCCCAACGCCACGCAGCCAGAACTCGCCCCGGAAGACCCCGAGGAT
257	L S E T P N A T Q P E L A P E D P E D
HSV-1 F:	TACTGGATGCACCGCCGCACTCGGAAAGCCCCAAAGCGCATAACGCCTCCCCACATC
337	Y W M H R R T R K A P K R I R L P H I
1C3syn14-1:	TACTGGATGCACCGCCGCACTCGGAAAGCCCCAAAGCGCATAACGCCTCCCCACATC
337	Y W M H R R T R K A P K R I R L P H I
1C3syn17-2:	TACTGGATGCACCGCCGCACTCGGAAAGCCCCA AAT CGCATAACGCCTCCCCACATC
337	Y W M H R R T R K A P N R I R L P H I
HSV-1 KOS:	TTTCGCGGCAAAGACCTTCCGGTCTGGACCAGCTGACCGACCCTCCGGGGGTCCGG
17	F R G K D L P V L D Q L T D P P G V R
H17-16:	TTTCGCGGCAAAGACCTTCCGGTCTGGAC CCG CTGACCGACCCTCCGGGGGTCCGG
17	F R G K D L P V L D P L T D P P G V R
I16-11	TTTCGCGGCAAAGACCTTCCGGTCTGGACCAGCTGACCGACCCTCCGGGGGTCCGG
17	F R G K D L P V L D Q L T D P P G V R
HSV-1 KOS:	GTTTACTACGCCGTGTTGGAGCGCGCCTGCCGCATCGTGCTCCTAAACGCACCGTGC
37	V Y Y A V L E R A C R I V L L N A P S
H17-16:	GTTTACTACGCCGTGTTGGAGCGCGCCTGCCGC AGC GTGCTCCTAAACGCACCGTGC
37	V Y Y A V L E R A C R S V L L N A P S
I16-11:	GTTTACTACGCCGTGTTGGAGCGCGCCTGCCGC AGC GTGCTCCTAAACGCACCGTGC
57	V Y Y A V L E R A C R S V L L N A P S
HSV-1 KOS:	GCCCCCATATTGTCCGCGGGGCCTCCGAAGACGTCCGGAAACAACCTACAACCTG
77	A P H I V R G A S E D V R K Q P Y N L
H17-16:	GCCCCCATATTGTCCGCGGGGCCTCCGAAGACGTCCGGAAACAACCTACAACCTG
77	A P H I V R G A S E D V R K Q P Y N L
I16-11:	GCCCC CAG ATTGTCCGCGGGGCCTCCGAAGACGTCCGGAAACAACCTACAACCTG
77	A P Q I V R G A S E D V R K Q P Y N L
HSV-1 KOS:	GAATGCTCCTACAACAAGTCTCTGGGGGCCTGTCCCATCCGAACGCAGCCCCGCTGG
117	E C S Y N K S L G A C P I R T Q P R W
H17-16:	GAATGCTCCTACAACAAGTCTCTGGGGGCCTGTCCCATCCGAACGC CAA CCCCGCTGG
117	E C S Y N K S L G A C P I R T Q P R W
I16-11:	GAATGCTCCTACAACAAGTCTCTGGGGGCCTGTCCCATCCGAACGCAGCCCCGCTGG
117	E C S Y N K S L G A C P I R T Q P R W
HSV-1 KOS:	ACACAGTTTATCCTGGAGCACCGAGCCAAGGGCTCCTGTAAGTACGCCCTCCCGCTG
177	T Q F I L E H R A K G S C K Y A L P L
H17-16:	ACACAGTTTATCCTGGAGCACCGAGCCAAGGGCTCCTGTAAGTACGCCCTCCCGCTG
177	T Q F I L E H R A K G S C K Y A L P L
I16-11:	ACACAGTTTATCCTGGAGCACCGAGCCAAGGGCTCCTGTAAGTACGCCCTCCCG ATG
177	T Q F I L E H R A K G S C K Y A L P M

Figura 28. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la gD de las variantes de HSV-1 F y HSV-1 KOS que presentan mutaciones puntuales. Se destacan los codones mutados junto con el aminoácido resultante.

Virus	Mutación
1C3syn17-2	L165L
1C3syn14-1	D272N
1C3syn17-2	K348N
H17-16	Q27P
H17-16	I68S
I16-11	I68S
I16-11	H79Q
H17-16	Q132Q
I16-11	L195M

Tabla 10. Mutaciones puntuales detectadas en la secuencia de gD de las variantes de HSV-1 F y HSV-1 KOS.

Ninguna de las mutaciones obtenidas con nuestras variantes han sido reportadas previamente en bibliografía. Es interesante destacar que estas mutaciones se seleccionaron naturalmente con los pasajes sucesivos, a diferencia de la mayoría de las mutantes reportadas que fueron por mutagénesis dirigida creadas en el laboratorio.

Según se publicó en el 2006 (Zhou G. y Roizman B., 2006), la secuencia de gD se puede dividir en distintas zonas (Fig. 29). En base a la figura 29, se puede observar que todas las mutaciones seleccionadas corresponden al ectodominio, excepto la alteración K348N de la variante 1C3syn17-2, que pertenece al dominio citoplasmático.

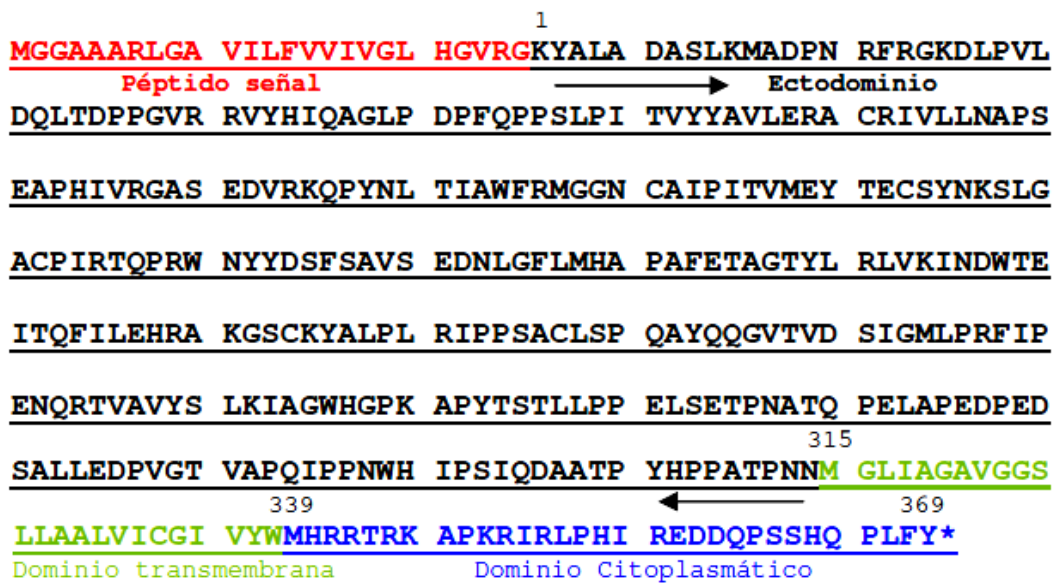


Figura 29. Caracterización de gD en su secuencia de aminoácidos. En rojo se resalta la zona de péptido señal. El primer aminoácido se lo considera a partir del inicio del ectodominio (negro). En verde se representa la zona del dominio transmembrana y en azul el citoplasmático.

Algunas de las interacciones de gD con sus receptores fueron mapeados en la zona N-terminal. Estas interacciones activarían otros residuos de la zona C-terminal del ectodominio (residuos 260-310) permitiendo la fusión de la membrana a través de las glicoproteínas B, H y L (Zhou G. y Roizman B., 2006). Al analizar la secuencia de la variante 1C3syn14-1, se observó una mutación puntual que resultó en un reemplazo del Ácido Aspártico (D) de la posición 272 por Asparagina (N) (Fig. 28, Tabla 10).

Si bien, se ha reportado en numerosas ocasiones que las zonas de unión a HVEM y a nectina-1 son diferentes, ambos utilizan un mismo mecanismo que consiste en el desplazamiento de la zona C-terminal del ectodominio. Sin embargo, de acuerdo a lo citado por Zhang y col., el aminoácido Q27 estaría involucrado tanto en la unión de gD con HVEM como con nectina-1 (Zhang N. y col., 2011). Para nuestra sorpresa, la variante H17-16 de HSV-1 KOS presenta una mutación puntual que generó el reemplazo de la glutamina presente en dicha posición por una prolina (Q27P). Es decir que la presión de selección

ejercida por la heparina seleccionó una mutación en un sitio esencial para la interacción con sus receptores. La misma variante presentó también una mutación puntual en el codón correspondiente al aminoácido 132, el cual está reportado como uno de los 21 aminoácidos involucrados en la unión con nectina-1 (Zhang N. y col., 2011). Sin embargo, en este caso, la mutación fue silenciosa ya que la alteración no modificó la presencia de la glutamina en dicha posición. A pesar de las mutaciones encontradas en la gD, las variantes no mostraron alteraciones en la cinética de replicación respecto del control viral (Fig. 8 y 13). Para profundizar estos datos están programados ensayos de la cinética viral en etapas tempranas del ciclo viral, adsorción y penetración, para su comparación con la cepa patrón.

5.14. Susceptibilidad de las variantes syn a la ciclosporina A y melitina

Para hacer un estudio preliminar sobre el efecto de los CGNs sobre otras glicoproteínas, se empleó el método de ciclosporina A/melitina que se utiliza sólo en el caso de obtener fenotipo sincicial ya que son dos inhibidores de la formación de sincicios. La ciclosporina A, **NO** inhibe los sincicios si la mutación responsable del fenotipo se encuentra en la región carboxi-terminal de la gB. Por otro lado, la melitina bloquea la formación de sincicios si la mutación responsable se encuentra en la gK.

De acuerdo a lo observado en la Tabla 11, se puede deducir que las variantes analizadas podrían presentar alteraciones en la porción carboxi-terminal de gB ya que en ningún caso la formación de sincicios se vio inhibida por la presencia de la ciclosporina A. Sin embargo, las variantes 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2 podrían además, presentar una mutación en la glicoproteína K ya que no se generaron sincicios en presencia de la melitina, mientras que H17-16 no presentaría dicha mutación.

Virus	Efecto Citopático viral		
	Control	Ciclosporina	Melitina
HSV-1 (F)	RC	RC	RC
1C3syn14-1	Syn	Syn	RC
1C3syn17-2	Syn	Syn	RC
HSV-1 KOS	RC	RC	RC
H17-16	Syn	Syn	Syn

Tabla 11: 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 MM conteniendo ciclosporina A o melitina, 25 µM y 1 µM respectivamente. Luego de 48 hs de incubación a 37°C, se cuantificaron las placas virales y se determinó el porcentaje de placas no syn. RC: redondeamiento celular. Syn: sincicios

Estos resultados preliminares nos permiten conjeturar que la presión de selección externa generada por los CGNs podría seleccionar alteraciones a nivel de estas glicoproteínas.

5.15. Secuenciación de la Timidina Quinasa

El uso de polisacáridos sulfatados como agentes de presión de selección sobre el virus HSV ha demostrado ser una técnica que permite la obtención de variantes virales con patogenicidad diferenciada.

Durante el estudio de HSV-1 F, HSV-1 KOS y sus respectivas variantes se analizó su resistencia al ACV, entre otras drogas. Se ha demostrado que la resistencia a dicho antiviral está relacionada con mutaciones a nivel de la enzima TQ y en menor medida con la ADN pol. Por este motivo se decidió estudiar la secuencia de esta enzima y analizar si la presión de selección ejercida externamente pudo seleccionar modificaciones a nivel de dicha enzima.

En primer lugar se decidió estudiar a HSV-1 F y sus variantes 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2 cuyas RR frente al ACV se detallan en la tabla 12.

Clon	RR al ACV
1C3syn14-1	3,5
1C3Syn17-2	10,0

Tabla 12: Valor de la resistencia relativa (RR) frente al ACV de las variantes 1C3syn derivadas de HSV-1 F. La RR se obtuvo mediante la relación de la CI₅₀ de la variante/la CI₅₀ de F. Los valores representan el promedio de dos experimentos diferentes.

Como se puede observar en la figura 30, los resultados obtenidos demostraron una mutación puntual en la variante 1C3syn17-2. La mutación consistió en el reemplazo de Alanina por Valina en el aminoácido 192 (A192V). Sin embargo esta zona ha sido informada como polimórfica (Chibo D. y col., 2004) por lo tanto no se puede atribuir completamente esta mutación a la resistencia observada.

```

HSV-1 F:      GTGTTGGCGTTCGTGGCCCTCATCCC GCCGACCTTGCCC GGCACAAACATCGTGTTG
187             V L A F V A L I P P T L P G T N I V L
1C3syn14-1:  GTGTTGGCGTTCGTGGCCCTCATCCC GCCGACCTTGCCC GGCACAAACATCGTGTTG
187             V L A F V A L I P P T L P G T N I V L
1C3syn17-2: GTGTTGGCGTTCGTGGTCCTCATCCC GCCGACCTTGCCC GGCACAAACATCGTGTTG
187             V L A F V V L I P P T L P G T N I V L
    
```

Figura 30: Análisis de la secuencia de la TQ de HSV-1 F y sus variantes 1C3syn. Se detalla la zona de la secuencia donde se detectó la mutación.

Con el objetivo de comprobar si la mutación detectada se mantuvo en pasajes posteriores se volvió a realizar la secuenciación de la TQ sobre otros dos clones de pasajes siguientes que también presentaban resistencia al ACV: los clones 1C3syn 20-1 y 1C3syn 21-2 (Tabla 13 y Fig. 31).

Clon	RR al ACV
1C3syn20-2	20,0
1C3syn 21-2	20,0

Tabla 13: Valor de la resistencia relativa (RR) frente al ACV de las variantes syn derivadas de HSV-1 F. La RR se obtuvo mediante la relación de la CI₅₀ de la variante/la CI₅₀ de F. Los valores representan el promedio de dos experimentos diferentes.

```

1C3syn20-1: GTGTTGGCGTTCGTGGTCCTCATCCCGCCGACCTTGCCCGGCACAAACATCGTGTTG
187      V L A F V V L I P P T L P G T N I V L
1C3syn21-2: GTGTTGGCGTTCGTGGTCCTCATCCCGCCGACCTTGCCCGGCACAAACATCGTGTTG
187      V L A F V V L I P P T L P G T N I V L
    
```

Figura 31: Análisis de la secuencia de la TQ de HSV-1 F y sus variantes syn. En rojo se detalla la zona de la secuencia donde se detectó la mutación.

Estos resultados demostraron que si bien sólo se detectó una mutación puntual en una zona reportada como polimórfica, es interesante destacar que la misma mutación se mantuvo durante los pasajes sucesivos.

Para continuar con el estudio de la enzima TQ, se evaluaron las secuencias de HSV-1 KOS y sus variantes virales, a pesar de que éstas no presentaron resistencias significativas frente al ACV (Tabla 14).

Clon	RR al ACV
I16-6	1,42
I16-11	1,97
H17-5	2,37
H17-16	3,32
ACVp6KOS	126,53

Tabla 14: Valor de la resistencia relativa (RR) frente al ACV de las variantes derivadas de HSV-1 KOS. La RR se obtuvo mediante la relación de la CI₅₀ de la variante/la CI₅₀ de HSV-1 KOS. Los valores representan el promedio de dos experimentos diferentes.

```

HSV-1 KOS:  CTTGCCAATACGGTGCGGTATCTGCAGGGCGGCGGGTCGTGGCGGGAGGATTGGGGA
242           L A N T V R Y L Q G G G S W R E D W G
I16-6:      CTTGCCAATACGGTGCGGTATCTGCAGGGCGGCGGGTCGTGGCGGGAGGATTGGGGA
242           L A N T V R Y L Q G G G S W R E D W G
I16-11     CTTGCCAATACGGTGCGGGGATCTGCAGGGCGGCGGGTCGTGGCGGGAGGATTGGGGA
242           L A N T V R D L Q G G G S W R E D W G
H17-5:    CTTGCCAATACGGTGCGGTATCTGCAGGGCGGCGGGTCGTGGCGGGAGGATTGGGGA
242           L A N T V R Y L Q G G G S W R E D W G
H17-16:   CTTGCCAATACGGTGCGGTATCTGCAGGGCGGCGGGTCGTGGCGGGAGGATTGGGGA
242           L A N T V R Y L Q G G G S W R E D W G
ACVp6KOS: CTTGCCAATACGGTGCGGTATCTGCAGGGCGGCGGGTCGTGGCGGGAGGATTGGGGA
242           L A N T V R Y L Q G G G S W R E D W G
    
```

Figura 32: Análisis de la secuencia aminoacídica de la TQ de HSV-1 KOS y sus variantes. Se detalla la zona de la secuencia donde se detectó dicha mutación.

En base a los resultados obtenidos en la figura 32, se pudo demostrar que no siempre las resistencias al ACV están relacionadas con alteraciones en la secuencia de la TQ. La variante ACVp6KOS, que generó una resistencia 126 veces mayor respecto a HSV-1 KOS, mantuvo su secuencia sin alteraciones mientras que la única que presentó una mutación puntual fue el clon I16-11 el cual presentaba la menor resistencia al ACV. La mutación observada fue un reemplazo de una Tirosina por Ácido Aspártico en la posición 248. Esta posición, si bien no fue reportada previamente, no corresponde a zonas conservadas (Fig. 33).



Figura 33. Sitios conservados de la TQ de HSV-1. Los seis sitios conservados se representan con recuadros negros. El sitio ATP corresponde al sitio de unión a ésta molécula y el NBS al sitio de unión de nucleósidos. El sitio 1 se ubica entre los AA 56 al 62, el sitio 2 entre el 83 y 88, el sitio 3 entre el 162 y 164, el sitio 4 entre 171 y 173, el sitio 5 entre el 216 y el 222 y el sitio 6 entre el 284 y 289 (Piret J. y Boivin G., 2011).

5.16. Secuenciación de la ADN polimerasa

Otra enzima esencial para el virus HSV es la ADN polimerasa (ADN pol). Esta enzima se encuentra involucrada en la patogenia del virus y se la asocia con resistencias a otro antiviral muy utilizado en la terapia contra HSV, el PFA y en menor medida con la resistencia al ACV. Este estudio de secuenciación y análisis de la ADN pol se lleva a cabo en colaboración con la Dra. Paola Barrero (Lab. Virología, Hospital de Pediatría Ricardo Gutiérrez). Debido a la complejidad y longitud (4200pb) de la ADN pol solo se incluye un estudio preliminar de aproximadamente, el 50% del gen de cada virus.

El análisis demostró alteraciones sólo en la variante 1C3syn17-2 derivada de HSV-1 F. Las mutaciones encontradas fueron: A405T, L448F, R500C y Q631K. Sin embargo, según la estructura génica conocida de la ADN pol viral (Fig. 34), estas posiciones no corresponden a sitios conservados ni de relevancia para su actividad (Piret J. y Boivin G., 2011). No obstante, se continuará con el estudio de esta secuencia.



Figura 34. Sitios conservados esenciales para la actividad de la ADN pol. Estos sitios se muestran como recuadros negros y las posiciones de aminoácidos, por debajo (Piret J. y Boivin G., 2011).

Todas las variantes virales analizadas a lo largo del trabajo presentaron modificada su virulencia en mucosas intactas respecto del control. Sin embargo, las mutaciones halladas en las secuencias de gD, y parcialmente en TQ (son las mismas a partir del pasaje 17 del CGN-1C3) son diferentes, dependiendo del CGN empleado para obtener las variantes. Estos resultados nos permiten suponer que la presión de selección con dichos compuestos nos posibilitará identificar nuevas mutaciones que generarían resistencia al ACV pero que podrían estar relacionados con la virulencia, replicación y reactivación viral.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El virus Herpes simplex es considerado de importancia en salud pública por la creciente prevalencia de la infección y de la enfermedad, la transmisión durante los períodos asintomáticos, el impacto en la sociedad con relación al manejo de las secuelas físicas y psicológicas en adultos y las serias amenazas de vida en la enfermedad neonatal resultante de la transmisión vertical (Robinson J.L. y col., 2012). Por ser la causa más común de úlceras genitales en países desarrollados, es también un importante co-factor en la transmisión de la infección por HIV (Corey L. y col., 2004; Koelle D.M. y Wald A., 2000). A pesar de las terapias actuales, la incidencia y prevalencia de la infección con HSV continúa creciendo mundialmente (Lingappa J.R. y Celum C., 2007). Asimismo, en las dos últimas décadas, se realizaron numerosos esfuerzos sin lograr desarrollar exitosamente vacunas que generen protección (Lou Y. y col., 2012; Stanberry L.R. y col., 2002).

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 establecer latencia en los ganglios (Novak N. y Peng W.M., 2005). 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 (Rasty S. y col., 1997). Así, la gran diversidad de sintomatología, tropismo y severidad de la enfermedad tiene estrecha relación con la complejidad y el tamaño del genoma del virus herpes. Por lo tanto, teniendo en cuenta que el virus del herpes ha co-evolucionado con el hombre (McGeoch D.J. y col., 2006), hace que un factor como la virulencia no dependa sólo de la expresión de un gen.

Con el objetivo de estudiar las modificaciones en la virulencia y patogenicidad en poblaciones de HSV-1 expuestas a polisacáridos sulfatados por tiempo prolongado, se seleccionaron nuevas variantes virales a partir de la cepa KOS de HSV-1, luego de realizar pasajes seriados *in vitro* con concentraciones crecientes del CGN τ y heparina. Estas variantes se compararon

con las variantes 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2 obtenidas previamente con el virus HSV-1 cepa F empleando 1C3, CGN híbrido μ/v parcialmente ciclado (Mateu C.G. y col., 2011). Los resultados presentados confirman la reproducibilidad de la estrategia empleada para la obtención de variantes. Asimismo, confirmaron que los polisacáridos sulfatados son lentos y débiles inductores de virus resistentes (Carlucci M.J. y col., 2002). Todos los clones aislados de HSV-1 fueron estables, aún después de varios pasajes en cultivos celulares sin el compuesto.

Como se describió en la introducción, a pesar de que el HSV-1 no es considerado un virus respiratorio común en humanos, causa diversas patologías relacionadas al tracto respiratorio. Además, Glorieux y col., han caracterizado la cinética de replicación del HSV-1 en la mucosa respiratoria humana, proponiendo dicho tejido como posible blanco de infección (Glorieux S. y col., 2011). En base a los resultados obtenidos en el estudio de la patogenia viral de las variantes derivadas de HSV-1 F, donde se obtuvo una respuesta atenuada por vía intravaginal pero no intranasal, fue de nuestro interés caracterizar la infección herpética a nivel pulmonar. Para ello se ha utilizado un modelo respiratorio de infección ya establecido (Murphy E.A. y col., 2008).

En primer lugar se realizaron estudios histopatológicos en cortes de pulmón de ratones BALB/c infectados con HSV-1 F y las variantes 1C3syn por vía intranasal. Como resultado se observó que tanto en los ratones infectados con HSV-1 F como con 1C3syn14-1, los pulmones presentaban infiltrados leucocitarios aunque aún más en los infectados con la variante (Fig. 15). Por otro lado, los que fueron infectados con 1C3syn17-2 presentaron engrosamiento de la pared alveolar junto con la pérdida de la morfología característica. En base a estas observaciones, se decidió analizar poblaciones celulares presentes en el pulmón de los animales infectados mediante la técnica de citometría de flujo.

Se ha reportado que las células NK son reclutadas a las vías áreas inmediatamente luego de una infección con HSV-1 y éstas restringen la replicación viral en el pulmón. Asimismo, se ha demostrado que la

citotoxicidad de las células NK de pulmón está influenciada tanto por el número de células como por su estado de activación (Reading P.C. y col., 2006). En el análisis por citometría de flujo del reclutamiento de células inmunes se pudo observar que las poblaciones de NK y linfocitos activados tuvieron una respuesta diferenciada al día 5 p.i (Fig. 17). En ambos casos los pulmones de los ratones infectados con 1C3syn14-1 generaron un mayor reclutamiento respecto de HSV-1 F y la variante 1C3syn17-2. Además, más del 90% de la población de células NK reclutadas luego de la infección con 1C3syn14-1, se encontraba activada (Fig. 18). Por lo contrario, los ratones infectados con la variante 1C3syn17-2 presentaron un bajo porcentaje de activación de esta población. Estos resultados coinciden con los infiltrados leucocitarios observados en la histopatología de los ratones infectados con 1C3syn14-1 (Fig. 15c). Por otro lado, los niveles reducidos de activación de las células NK de los ratones infectados con 1C3syn17-2, podría estar asociado al engrosamiento de la pared alveolar y la pérdida de la morfología normal alveolar observados en la figura 15d.

Nandakumar y col., han publicado que las células NK activadas por el virus contribuye a la reducción inicial de la carga viral y resalta la habilidad estimuladora de células dendríticas a través de un procesamiento antigénico y una presentación efectiva (Nandakumar S. y col., 2008). Por lo tanto, el alto título viral cuantificado en los pulmones de los animales infectados con la variante 1C3syn17-2, podría estar relacionado a la presencia de un bajo número de células de NK activadas (Fig. 19).

Teniendo en cuenta la relevancia que tiene la liberación inmediata de citoquinas proinflamatorias para contrarrestar la infección viral, se decidió analizar la modulación de las citoquinas en pulmones de ratones infectados por vía intranasal. El estudio de la concentración de las citoquinas en los BAL mostró una respuesta retrasada en la liberación del TNF- α en aquellos ratones infectados con las variantes 1C3syn (Fig. 21). A pesar de que los animales alcanzaron niveles similares a la cepa control, las infecciones con la cepa HSV-1 F activaron la respuesta inmunológica en forma más temprana (24 hs p.i.),

mientras que las variantes 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2 lo hicieron recién a las 72 hs p.i. Sin embargo, sólo los animales infectados con la variante 1C3syn17-2 mostraron el mismo retraso en la liberación de IL-6 mientras que 1C3syn14-1 generó una rápida respuesta de dicha citoquina. Esta diferencia podría estar relacionada, en parte, con el comportamiento patológico diferencial observado en las infecciones entre las 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2. El retraso en la producción de las citoquinas proinflamatorias coinciden con un aumento del título en el pulmón de la 1C3syn14-1 (1 log) y un aumento aún mayor en pulmones infectados con 1C3syn17-2 (2 log) respecto de la cepa control (Fig. 19). Esto sugiere que la presencia temprana de IL-6 y TNF- α es crucial para inhibir la replicación.

En los experimentos realizados *in vivo*, los ratones que fueron infectados por vía intranasal con HSV-1 F, generaron un 100% de morbilidad pero sólo un 25% de mortalidad mientras que en los infectados con las variantes syn, la mortalidad fue del 100%. Según los resultados obtenidos en los BAL, la respuesta temprana en la liberación de las citoquinas proinflamatorias en infecciones con HSV-1 F, podría estar relacionada con la recuperación de la enfermedad. Por lo tanto, la habilidad de prevenir la replicación viral podría ser decisiva para la recuperación de los animales.

Dado que la fuente principal de TNF- α e IL-6 en pulmón son macrófagos, se decidió investigar en un sistema *in vitro* y *ex vivo* si el perfil de producción de citoquinas era el mismo que el registrado en los BAL de ratones infectados. Fue interesante observar que los resultados obtenidos mediante las técnicas de PCR y ELISA demostraron niveles de citoquinas proinflamatorias significativamente menores en aquellos macrófagos infectados con las variantes syn, en comparación con HSV-1 F (Fig. 22). Los mismos resultados se vieron tanto para la línea de macrófagos RAW como para los macrófagos peritoneales extraídos de ratones BALB/c (Fig. 22 y 24).

En general, estas diferencias podrían influir en el desarrollo de la infección obstaculizando la recuperación de la enfermedad (mayor daño tisular

y carga viral) por la evasión de la respuesta inmune temprana alterando la activación de poblaciones celulares involucradas en el control de la replicación y la diseminación viral.

Los resultados presentados hasta el momento sugieren que las variantes 1C3syn han desarrollado una estrategia para retrasar la activación de macrófagos y en consecuencia, la liberación de las citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, es importante destacar que la morbilidad y mortalidad registradas en infecciones por vía intravaginal e intranasal, fueron opuestas. Por lo tanto, la respuesta inmune frente a una infección por herpes se manifiesta de manera diferente entre ambas mucosas.

En base a las diferencias en la producción de citoquinas observadas durante todo el desarrollo del capítulo 2, se quiso analizar si ellas podrían estar relacionadas con alteraciones a nivel de la expresión de las moléculas de adhesión VCAM e ICAM. Se conoce que TNF- α es una de las principales inductoras de la expresión de dichas moléculas. Tanto VCAM como ICAM se encuentran sobre la superficie de células endoteliales y son expresadas ante estímulos de infección a fin de permitir la migración leucocitaria y trasvasación celular hacia el sitio de foco de infección. Mediante el análisis de citometría de flujo pudimos determinar que la menor liberación de TNF- α observada en infecciones con las variantes 1C3syn (Fig. 21) no afectó la expresión de dichas moléculas en células endoteliales del pulmón en comparación con HSV-1 F (Fig. 26). No obstante, estos resultados coinciden con bibliografía donde postulan que el virus HSV no influye sobre la expresión de las moléculas de VCAM e ICAM (Jung H.W. y col., 2004; Scheglovitova O.N. y col., 2001).

Finalmente, quisimos evaluar si el uso de los CGNs podrían seleccionar modificaciones a nivel de la secuencia de gD y en enzimas esenciales para la virulencia del HSV. Nuestro interés principal fue la gD ya que se conoce que dicha glicoproteína es responsable por si misma de inducir numerosas citoquinas durante la infección por HSV-1, entre las cuales se encuentran TNF- α (Ankel H. y col., 1998; Paludan S.R. y Mogensen S.C., 2001) e IL-6 (Teng Y.C. y

col., 2005), además de participar en la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) y de dar protección contra la apoptosis en la fase temprana de la infección asegurándose una suficiente replicación viral (Novak N. y Peng W.M., 2005).

Ésta glicoproteína interactúa con HVEM, receptor involucrado en la activación de la respuesta por linfocitos T y proliferación de citoquinas (Cheung T.C. y col., 2005; Stiles K.M. y col., 2010; Tamada K. y col., 2000). HVEM presenta dos ligandos celulares, entre otros, denominados LIGHT y BTLA (por sus siglas en inglés de *B and T lymphocyte attenuator*) (Cai G. y col., 2008; Gonzalez L.C. y col., 2005; Mauri D.N. y col., 1998; Sedy J.R. y col., 2005). El primero se expresa en la superficie de linfocitos T, células NK y células dendríticas inmaduras (Harrop J.A. y col., 1998; Mauri D.N. y col., 1998) mientras que BTLA se expresa en linfocitos maduros, macrófagos y células dendríticas (Watanabe N. y col., 2003). Cuando HVEM interactúa con LIGHT, se inicia una cascada de señalización que promueve la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. Éstos permiten la activación y proliferación de células T y la producción de citoquinas (Marsters S.A. y col., 1997; Tamada K. y col., 2000). Por el contrario, BTLA genera señales inhibitorias por lo tanto la combinación de la expresión de ambos ligandos a partir de las células inmunológicas provee un mecanismo bidireccional regulado de sobrevivencia de las células, activación o atenuación de la respuesta inmune (del Rio M.L. y col., 2010; Murphy K.M. y col., 2006; Murphy T.L. y Murphy K.M., 2010). Se ha reportado que la interacción de gD de HSV con HVEM afecta la unión de los ligandos naturales y modula la respuesta inmune durante la infección (Cheung T.C. y col., 2005; Stiles K.M. y col., 2010). Además, Stiles y col. demostraron que gD compite directamente con BTLA por HVEM lo cual indicaría la posibilidad de que gD controle las señales de HVEM en forma selectiva (Stiles K.M. y col., 2010). Esta competencia genera la anulación de la interacción de HVEM con LIGHT y de esta forma silencia la respuesta inmunológica.

Otro receptor celular utilizado por HSV-1 es la nectina-1 que se encuentra involucrada en las adhesiones célula-célula y su localización en las uniones adherentes permite la interacción con otras nectinas. Según lo

reportado por Krummenacher y col., la unión de gD de HSV a nectina-1 modifica la ubicación de ésta en forma dependiente de la expresión de gD y la nueva proteína reemplaza la nectina-1 de las células infectadas en las uniones de las no infectadas. De esta manera gD logra atraer y mantener al receptor en las uniones donde puede utilizarla para su diseminación (Krummenacher C. y col., 2003). Asimismo, las nectinas se unen en *trans*, por lo tanto la unión de gD podría también evitar que se dispare alguna respuesta celular adversa para su replicación.

El análisis de las secuencias de las variantes de HSV-1 F y HSV-1 KOS demostró la presencia de mutaciones puntuales en todos los casos analizados. Sin embargo, cabe destacar principalmente las halladas en H17-16. Esta variante presentó una mutación de Q27P, aminoácido reportado como involucrado en la unión tanto de HVEM como de nectina-1 (Zhang N. y col., 2011). Este cambio podría generar alguna modificación importante ya que la Glutamina es un aminoácido polar sin carga, mientras que la Prolina no sólo es hidrófoba sino que también podría alterar la estructura del plegamiento del sitio de unión al receptor por diferencias estéricas. Lazear y col. sugirieron que la fusión de HSV a la membrana se llevaría a cabo mediante pasos secuenciales, comenzando por la unión de gD a su receptor lo que genera un cambio conformacional en gD y que permite activar a gH/gL. Ésta activación, a su vez conlleva a gB a su estado fusogénico (Lazear E. y col., 2012). Si esta mutación desfavorece la unión a los receptores, H17-16 podría estar ingresando a la célula mediante endocitosis, ya que al estudiar la cinética de replicación no se observó ninguna diferencia significativa respecto a las otras variantes (Fig. 8 y 13). Otra mutación puntual detectada en esta variante fue en el nucleótido 471 pero en este caso se obtuvo una mutación silenciosa ya que el aminoácido se mantuvo (Q132Q). De acuerdo a Lazear y col., este aminoácido también estaría involucrado en la unión al receptor nectina-1 (Lazear E. y col., 2012).

Por otro lado, en la variante 1C3syn14-1 se detectó una mutación puntual donde se reemplazó el Ácido Aspártico por Asparagina (D272N). En este caso un aminoácido con carga negativa fue reemplazado por otro sin carga. Se sabe

que los residuos 260 a 310, pertenecen al extremo C-terminal del ectodominio de gD, que estaría involucrado en la fusión de la membrana luego de la interacción del extremo N-terminal con el receptor correspondiente (Cocchi F. y col., 2004; Connolly S.A. y col., 2005; Fusco D. y col., 2005; Krummenacher C. y col., 2005; Manoj S. y col., 2004). A pesar de que esta mutación está dentro de una zona de importancia, se necesitarían estudios complementarios para atribuirle las diferencias observadas en la respuesta inmunológica.

Asimismo, no se descartan posibles mutaciones en otros genes involucrados en la modulación de la respuesta inmune, tal como ICP0. Esta proteína es activa en la inhibición de mecanismos inmunológicos como la producción de interferón y sus efectos antivirales (Harle P. y col., 2002; Melroe G.T. y col., 2004; Mossman K.L. y col., 2000) y la inducción de la degradación de proteínas celulares involucradas en el proteosoma (Boutell C. y Everett R.D., 2003). Otras proteínas tempranas que podrían estar involucradas en la evasión de la respuesta inmune son ICP4 e ICP27 (Mogensen T.H. y col., 2004). En este sentido, Meckes y Wills mostraron las primeras evidencias que la interacción de la heparina con la glicoproteína C y probablemente gB y gD, por su estrecha relación, transmiten una señal desde el exterior hacia el interior del virión induciendo un rápido y eficiente cambio estructural en el tegumento (región del virión situada entre la membrana y la cápside) (Chi J.H. y col., 2005; Meckes D.G., Jr. y Wills J.W., 2008). El tegumento es en parte responsable de numerosas funciones, entre ellas la transcripción de los genes ICP0, ICP4 e ICP27 (Batterson W. y Roizman B., 1983; Kelly B.J. y col., 2009), Lo cual hace suponer que el virus podría anticipar ciertas estrategias de evasión inmune antes de iniciar su ciclo de replicación dentro de la célula.

Además, se realizó un estudio preliminar con ciclosporina A y melitina en aquellas variantes que fueron sinciciales (Walev I. y col., 1994). Según los resultados obtenidos, la gB presentaría alteraciones en su porción carboxi-terminal en todos los casos ya que ninguna de las variantes sinciciales modificaron su fenotipo en presencia de ciclosporina. Por otro lado, el

tratamiento con melitina indicaría la presencia de mutaciones en gK en las variantes 1C3syn14-1 y 1C3syn17-2.

Por otro lado, estudios realizados en distintas etapas del ciclo de replicación viral con distintos CGNs mostraron que dichos compuestos no interfieren en la internalización ni en la síntesis de proteínas tempranas y tardías de HSV (Carlucci M.J., 2001). Sin embargo, hay trabajos de otros grupos que han demostrado que polisacáridos sulfatados pueden actuar en etapas posteriores a la unión a la célula (Callahan L.N. y col., 1991; De Vreese K. y col., 1996; Gonzalez M.E. y col., 1987). Por lo tanto, también sospechamos que habría modificaciones genéticas a nivel de la TQ viral que darían como consecuencia una disminución ó anulación de la reactivación viral desde la latencia (Efstathiou S. y col., 1989; Evans J.S. y col., 1998), además de que el gen de la TQ y el gen de la ADN polimerasa viral están involucrados en la virulencia y la patogenicidad (Andrei G. y col., 2005). Dichas sospechas se revelan por las variantes HSV resistentes al ACV y/o PFA obtenidas con los CGNs. Se pudo descartar que los polisacáridos sulfatados tuvieran influencia en la resistencia al ACV por alteraciones a nivel de la TQ. Esto se debe a que sólo se han observado en los clones 1C3yn17-2, 1C3syn20-2 y 1C3syn21-2 una mutación puntual de Alanina por Valina en la posición 192 y en la variante I16-11 un reemplazo de Tirosina por Ácido Aspártico en la posición 248. Estas posiciones fueron reportadas como polimórficas en varias oportunidades, fuera de las posiciones de resistencia al ACV (Chibo D. y col., 2003; Griffiths A., 2011; Piret J. y Boivin G., 2011; Shiota T. y col., 2011). En general, las mutaciones asociadas a resistencias al ACV corresponden a mutaciones que generan deficiencias en la actividad de la TQ, principalmente por corrimientos en el marco de lectura o por sustituciones nucleotídicas o aminoacídicas que resultan en codones stop prematuros. También son frecuentes mutaciones que alteran la actividad de la TQ debido a una disminución en la fosforilación (Shiota T. y col., 2011). A pesar de que la incidencia es baja (5%), también se han reportado mutaciones a nivel de la ADN pol, como causa de resistencia al ACV (Saijo M. y col., 2002). Por este motivo, se decidió evaluar también la secuencia de dicha enzima. Si bien aún

son resultados preliminares, según lo observado sólo la variante 1C3syn17-2 derivada de HSV-1 F presentó alteraciones a nivel de la secuencia. Ninguna de las posiciones que sufrieron mutaciones corresponden a sitios relevantes para la actividad de la ADN pol (Piret J. y Boivin G., 2011).

No obstante, la ausencia de cambios o cambios de “escasa importancia” en los genes de la gD, TQ y ADN pol, no descartan posibles modificaciones a nivel de las proteínas que podrían alterar ciertas características como la virulencia o evasión viral. Numerosos estudios han revelado que en respuesta al medio ambiente, las proteínas reguladoras (“sintonizadores” epigenéticos) pueden crear más de dos mil variantes de proteínas a partir de un mismo molde génico cambiando su funcionalidad. Esto quedó parcialmente evidenciado con ACVp6KOS que no manifestó cambios en la secuencia de la TQ a pesar de su elevada RR al ACV (Fig. 32). Dicho gen es responsable en un 95% de los casos de resistencia al ACV (Andrei G. y col., 2005).

Asimismo, no se encontró relación entre la RR de las variantes al ACV con la virulencia. Las variantes virales derivadas de HSV-1 KOS no mostraron resistencia al ACV mientras que ACVp6KOS presentó una RR:126,53. Sin embargo, todas fueron asintomáticas por vía intravaginal. Por otro lado, por vía intranasal sólo ACVp6KOS y I16-11 mostraron ser avirulentas (Tabla 8 y Fig. 14).

Los resultados contenidos en el presente estudio son útiles para el entendimiento de los factores que definen la virulencia de HSV-1. Además, estas variantes son herramientas apreciadas para interrogar el sistema inmune e investigar la contribución de componentes específicos de la inmunidad en mucosas. Las variantes podrían tener usos promisorios en biotecnología y aportar mayores conocimientos para el diseño de nuevas terapias antivirales.

Tomando en cuenta que los cambios de comportamiento viral (biológico) podría estar proporcionado tanto por la contribución de los genes (herencia) como por la contribución del medio (mecanismos epigenéticos) o ambos, se planifica realizar estudios fenotípicos-genotípicos de un mayor número de

clones para definir una proyección estadística. Así, este proyecto marcaría el inicio de un camino para demostrar si la estrategia de obtención de variantes virales podría tener alguna relación con un proceso evolutivo natural del virus, comprobándose con bases de datos para la exploración global evolutiva virus-huésped.

En resumen:

- a) Las nuevas variantes obtenidas de HSV-1 KOS, empleando la misma estrategia de generación, presentaron características similares a las generadas con HSV-1 F, independientemente del polisacárido sulfatado empleado (CGN-1C3, CGN-ι, H) y de las mutaciones halladas en los genes de gD, TQ y ADN pol.
- b) Las variantes virales mostraron menor virulencia que la cepa patrón por vía intravaginal, pero no intranasal.
- c) La patología del HSV fue dependiente de la activación temprana del sistema inmune innato y del tropismo tal como se demostró en infecciones pulmonares.
- d) La patología del HSV fue independiente de la replicación viral por vía intravaginal.
- e) No se encontró relación directa entre resistencia al ACV y la virulencia.
- f) Las moléculas de adhesión VCAM e ICAM no se vieron afectadas y las citoquinas TNF- α e IL-6 disminuyeron en las variantes atenuadas.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Adler H., Beland J.L., Kozlow W., Del-Pan N.C., Kobzik L. y col. (1998). "A role for transforming growth factor-beta1 in the increased pneumonitis in murine allogeneic bone marrow transplant recipients with graft-versus-host disease after pulmonary herpes simplex virus type 1 infection." Blood 92(7): 2581-2589.

Advani S.J., Hagglund R., Weichselbaum R.R. y Roizman B. (2001a). "Posttranslational processing of infected cell proteins 0 and 4 of herpes simplex virus 1 is sequential and reflects the subcellular compartment in which the proteins localize." J Virol 75(17): 7904-7912.

Advani S.J., Weichselbaum R.R. y Roizman B. (2001b). "cdc2 cyclin-dependent kinase binds and phosphorylates herpes simplex virus 1 U(L)42 DNA synthesis processivity factor." J Virol 75(21): 10326-10333.

Akhtar J. y Shukla D. (2009). "Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry." FEBS J 276(24): 7228-7236.

Akira S., Taga T. y Kishimoto T. (1993). "Interleukin-6 in biology and medicine." Adv Immunol 54: 1-78.

Andrei G., Balzarini J., Fiten P., De Clercq E., Opdenakker G. y col. (2005). "Characterization of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase mutants selected under a single round of high-dose brivudin." J Virol 79(9): 5863-5869.

Ankel H., Westra D.F., Welling-Wester S. y Lebon P. (1998). "Induction of interferon-alpha by glycoprotein D of herpes simplex virus: a possible role of chemokine receptors." Virology 251(2): 317-326.

Arzul I., Renault T., Thebault A. y Gerard A. (2002). "Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults." Virus Res 84(1-2): 151-160.

Atanasiu D., Saw W.T., Cohen G.H. y Eisenberg R.J. (2010). "Cascade of events governing cell-cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH/gL, and gB." J Virol 84(23): 12292-12299.

Batterson W. y Roizman B. (1983). "Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes." J Virol 46(2): 371-377.

Bergh O., Borsheim K.Y., Bratbak G. y Heldal M. (1989). "High abundance of viruses found in aquatic environments." Nature 340(6233): 467-468.

Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C., Cousens L.P. y Salazar-Mather T.P. (1999). "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines." Annu Rev Immunol 17: 189-220.

Bourne N., Ireland J., Stanberry L.R. y Bernstein D.I. (1999). "Effect of undecylenic acid as a topical microbicide against genital herpes infection in mice and guinea pigs." Antiviral Res 40(3): 139-144.

- Boutell C. y Everett R.D. (2003).** "The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) regulatory protein ICP0 interacts with and Ubiquitinates p53." J Biol Chem 278(38): 36596-36602.
- Broberg E., Setälä N., Roytta M., Salmi A., Eralinna J.P. y col. (2001).** "Expression of interleukin-4 but not of interleukin-10 from a replicative herpes simplex virus type 1 viral vector precludes experimental allergic encephalomyelitis." Gene Ther 8(10): 769-777.
- Buck C.B., Thompson C.D., Roberts J.N., Muller M., Lowy D.R. y col. (2006).** "Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection." PLoS Pathog 2(7): e69.
- Caceres P.J., Carlucci M.J., Damonte E.B., Matsuhira B. y Zuniga E.A. (2000).** "Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phyllophoraceae): structural analysis and biological activity." Phytochemistry 53(1): 81-86.
- Cai G., Anumanthan A., Brown J.A., Greenfield E.A., Zhu B. y col. (2008).** "CD160 inhibits activation of human CD4+ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator." Nat Immunol 9(2): 176-185.
- Callahan L.N., Phelan M., Mallinson M. y Norcross M.A. (1991).** "Dextran sulfate blocks antibody binding to the principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 without interfering with gp120-CD4 interactions." J Virol 65(3): 1543-1550.
- Camazine B., Antkowiak J.G., Nava M.E., Lipman B.J. y Takita H. (1995).** "Herpes simplex viral pneumonia in the postthoracotomy patient." Chest 108(3): 876-879.
- Campadelli-Fiume G., Cocchi F., Menotti L. y Lopez M. (2000).** "The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells." Rev Med Virol 10(5): 305-319.
- Canalejo Castrillero E., García Duran F., Cabello N. y García Martínez J. (2010).** "Herpes esophagitis in healthy adults and adolescents: report of 3 cases and review of the literature." Medicine (Baltimore) 89(4): 204-210.
- Carlucci M.J. (2001).** Modo de acción antiherpética de distintas clases de carragenanos aislados del alga roja *Gigartina skottsbergii*. Depto. Química Biológica. Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires. Tesis doctoral.
- Carlucci M.J., Damonte E.B. y Scolaro L.A. (2011).** "Virus driven evolution: a probable explanation for "Similia Similibus Curantur" philosophy." Infect Genet Evol 11(5): 798-802.
- Carlucci M.J., Scolaro L.A. y Damonte E.B. (2002).** "Herpes simplex virus type 1 variants arising after selection with an antiviral carrageenan: lack of correlation between drug susceptibility and syn phenotype." J Med Virol 68(1): 92-98.

Carlucci M.J., Scolaro L.A., Errea M.I., Matulewicz M.C. y Damonte E.B. (1997). "Antiviral activity of natural sulphated galactans on herpes virus multiplication in cell culture." Planta Med 63(5): 429-432.

Cassaro C.M. y Dietrich C.P. (1977). "Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates." J Biol Chem 252(7): 2254-2261.

Cocchi F., Fusco D., Menotti L., Gianni T., Eisenberg R.J. y col. (2004). "The soluble ectodomain of herpes simplex virus gD contains a membrane-proximal pro-fusion domain and suffices to mediate virus entry." Proc Natl Acad Sci U S A 101(19): 7445-7450.

Connolly S.A., Jackson J.O., Jardetzky T.S. y Longnecker R. (2011). "Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery." Nat Rev Microbiol 9(5): 369-381.

Connolly S.A., Landsburg D.J., Carfi A., Whitbeck J.C., Zuo Y. y col. (2005). "Potential nectin-1 binding site on herpes simplex virus glycoprotein d." J Virol 79(2): 1282-1295.

Corey L., Wald A., Celum C.L. y Quinn T.C. (2004). "The effects of herpes simplex virus-2 on HIV-1 acquisition and transmission: a review of two overlapping epidemics." J Acquir Immune Defic Syndr 35(5): 435-445.

Cheung T.C., Humphreys I.R., Potter K.G., Norris P.S., Shumway H.M. y col. (2005). "Evolutionarily divergent herpesviruses modulate T cell activation by targeting the herpesvirus entry mediator cosignaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A 102(37): 13218-13223.

Chi J.H., Harley C.A., Mukhopadhyay A. y Wilson D.W. (2005). "The cytoplasmic tail of herpes simplex virus envelope glycoprotein D binds to the tegument protein VP22 and to capsids." J Gen Virol 86(Pt 2): 253-261.

Chibo D., Druce J., Sasadeusz J. y Birch C. (2004). "Molecular analysis of clinical isolates of acyclovir resistant herpes simplex virus." Antiviral Res 61(2): 83-91.

Chibo D., Riddell M., Catton M., Lyon M., Lum G. y col. (2003). "Studies of measles viruses circulating in Australia between 1999 and 2001 reveals a new genotype." Virus Res 91(2): 213-221.

Daikoku T. (2000). "[The functions of alpha herpesvirus gene products]." Nihon Rinsho 58(4): 787-793.

Damonte E., Neyts J., Pujol C.A., Snoeck R., Andrei G. y col. (1994). "Antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*." Biochem Pharmacol 47(12): 2187-2192.

De Clercq E. (2000). "Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection." Med Res Rev 20(5): 323-349.

De Vreese K., Reymen D., Griffin P., Steinkasserer A., Werner G. y col. (1996). "The bicyclams, a new class of potent human immunodeficiency virus inhibitors, block viral entry after binding." Antiviral Res 29(2-3): 209-219.

- del Rio M.L., Lucas C.L., Buhler L., Rayat G. y Rodriguez-Barbosa J.I. (2010).** "HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation." J Leukoc Biol 87(2): 223-235.
- Diefenbach R.J., Miranda-Saksena M., Douglas M.W. y Cunningham A.L. (2008).** "Transport and egress of herpes simplex virus in neurons." Rev Med Virol 18(1): 35-51.
- Dietrich C.P., Nader H.B. y Straus A.H. (1983).** "Structural differences of heparan sulfates according to the tissue and species of origin." Biochem Biophys Res Commun 111(3): 865-871.
- Dohner K., Wolfstein A., Prank U., Echeverri C., Dujardin D. y col. (2002).** "Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport." Mol Biol Cell 13(8): 2795-2809.
- Dolan A., Jamieson F.E., Cunningham C., Barnett B.C. y McGeoch D.J. (1998).** "The genome sequence of herpes simplex virus type 2." J Virol 72(3): 2010-2021.
- Duarte M.E., Nosedá D.G., Nosedá M.D., Tulio S., Pujol C.A. y col. (2001).** "Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro." Phytomedicine 8(1): 53-58.
- Efstathiou S., Kemp S., Darby G. y Minson A.C. (1989).** "The role of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase in pathogenesis." J Gen Virol 70 (Pt 4): 869-879.
- Ellermann-Eriksen S. (2005).** "Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus." Virol J 2: 59.
- Esko J.D. y Selleck S.B. (2002).** "Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate." Annu Rev Biochem 71: 435-471.
- Evans J.S., Lock K.P., Levine B.A., Champness J.N., Sanderson M.R. y col. (1998).** "Herpesviral thymidine kinases: laxity and resistance by design." J Gen Virol 79 (Pt 9): 2083-2092.
- Fauquet C.M. y Fargette D. (2005).** "International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species." Virol J 2: 64.
- Fusco D., Forghieri C. y Campadelli-Fiume G. (2005).** "The pro-fusion domain of herpes simplex virus glycoprotein D (gD) interacts with the gD N terminus and is displaced by soluble forms of viral receptors." Proc Natl Acad Sci U S A 102(26): 9323-9328.
- Galen B., Cheshenko N., Tuyama A., Ramratnam B. y Herold B.C. (2006).** "Access to nectin favors herpes simplex virus infection at the apical surface of polarized human epithelial cells." J Virol 80(24): 12209-12218.
- Girond S., Crance J.M., Van Cuyck-Gandre H., Renaudet J. y Deloince R. (1991).** "Antiviral activity of carrageenan on hepatitis A virus replication in cell culture." Res Virol 142(4): 261-270.

- Glorieux S., Bachert C., Favoreel H.W., Vandekerckhove A.P., Steukers L. y col. (2011).** "Herpes simplex virus type 1 penetrates the basement membrane in human nasal respiratory mucosa." *PLoS One* 6(7): e22160.
- Gonzalez L.C., Loyet K.M., Calemine-Fenaux J., Chauhan V., Wranik B. y col. (2005).** "A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(4): 1116-1121.
- Gonzalez M.E., Alarcon B. y Carrasco L. (1987).** "Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan." *Antimicrob Agents Chemother* 31(9): 1388-1393.
- Griffiths A. (2011).** "Slipping and sliding: frameshift mutations in herpes simplex virus thymidine kinase and drug-resistance." *Drug Resist Updat* 14(6): 251-259.
- Gupta R., Warren T. y Wald A. (2007).** "Genital herpes." *Lancet* 370(9605): 2127-2137.
- Hagglund R. y Roizman B. (2004).** "Role of ICP0 in the strategy of conquest of the host cell by herpes simplex virus 1." *J Virol* 78(5): 2169-2178.
- Harle P., Sainz B., Jr., Carr D.J. y Halford W.P. (2002).** "The immediate-early protein, ICP0, is essential for the resistance of herpes simplex virus to interferon-alpha/beta." *Virology* 293(2): 295-304.
- Harley C.A., Dasgupta A. y Wilson D.W. (2001).** "Characterization of herpes simplex virus-containing organelles by subcellular fractionation: role for organelle acidification in assembly of infectious particles." *J Virol* 75(3): 1236-1251.
- Harrop J.A., McDonnell P.C., Brigham-Burke M., Lyn S.D., Minton J. y col. (1998).** "Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth." *J Biol Chem* 273(42): 27548-27556.
- Haslin C., Lahaye M., Pellegrini M. y Chermann J.C. (2001).** "In vitro anti-HIV activity of sulfated cell-wall polysaccharides from gametic, carposporic and tetrasporic stages of the Mediterranean red alga *Asparagopsis armata*." *Planta Med* 67(4): 301-305.
- Heldwein E.E. y Krummenacher C. (2008).** "Entry of herpesviruses into mammalian cells." *Cell Mol Life Sci* 65(11): 1653-1668.
- Huber M.T., Wisner T.W., Hegde N.R., Goldsmith K.A., Rauch D.A. y col. (2001).** "Herpes simplex virus with highly reduced gD levels can efficiently enter and spread between human keratinocytes." *J Virol* 75(21): 10309-10318.
- Huheihel M., Ishanu V., Tal J. y Arad S.M. (2002).** "Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo." *J Biochem Biophys Methods* 50(2-3): 189-200.

- Hull H.F., Blumhagen J.D., Benjamin D. y Corey L. (1984). "Herpes simplex viral pneumonitis in childhood." J Pediatr 104(2): 211-215.
- Ito M., Nagai T., Kamei H., Nakamichi N., Nabeshima T. y col. (2006). "Involvement of tissue plasminogen activator-plasmin system in depolarization-evoked dopamine release in the nucleus accumbens of mice." Mol Pharmacol 70(5): 1720-1725.
- Jung H.W., Jung C.R., Choi B.K., Vinay D.S., Hill J.M. y col. (2004). "Herpesvirus infection of ICAM-1-deficient mice." Curr Eye Res 29(2-3): 201-208.
- Karasneh G.A., Ali M. y Shukla D. (2011). "An important role for syndecan-1 in herpes simplex virus type-1 induced cell-to-cell fusion and virus spread." PLoS One 6(9): e25252.
- Kawada J., Kimura H., Ito Y., Ando Y., Tanaka-Kitajima N. y col. (2004). "Evaluation of systemic inflammatory responses in neonates with herpes simplex virus infection." J Infect Dis 190(3): 494-498.
- Kelly B.J., Fraefel C., Cunningham A.L. y Diefenbach R.J. (2009). "Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1." Virus Res 145(2): 173-186.
- Kent J.R., Kang W., Miller C.G. y Fraser N.W. (2003). "Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function." J Neurovirol 9(3): 285-290.
- Khanna K.M., Lepisto A.J., Decman V. y Hendricks R.L. (2004). "Immune control of herpes simplex virus during latency." Curr Opin Immunol 16(4): 463-469.
- Khodarev N.N., Park J.O., Yu J., Gupta N., Nodzenski E. y col. (2001). "Dose-dependent and independent temporal patterns of gene responses to ionizing radiation in normal and tumor cells and tumor xenografts." Proc Natl Acad Sci U S A 98(22): 12665-12670.
- Kimberlin D.W. (2004). "Neonatal HSV infections: the global picture." Herpes 11(2): 31-32.
- Kodukula P., Liu T., Rooijen N.V., Jager M.J. y Hendricks R.L. (1999). "Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system." J Immunol 162(5): 2895-2905.
- Koelle D.M. y Wald A. (2000). "Herpes simplex virus: the importance of asymptomatic shedding." J Antimicrob Chemother 45 Suppl T3: 1-8.
- Kolender A.A., Pujol C.A., Damonte E.B., Matulewicz M.C. y Cerezo A.S. (1997). "The system of sulfated alpha-(1-->3)-linked D-mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: structures, antiherpetic and anticoagulant properties." Carbohydr Res 304(1): 53-60.
- Krummenacher C., Baribaud F., Ponce de Leon M., Baribaud I., Whitbeck J.C. y col. (2004). "Comparative usage of herpesvirus entry mediator A and nectin-1

by laboratory strains and clinical isolates of herpes simplex virus." *Virology* 322(2): 286-299.

Krummenacher C., Baribaud I., Eisenberg R.J. y Cohen G.H. (2003). "Cellular localization of nectin-1 and glycoprotein D during herpes simplex virus infection." *J Virol* 77(16): 8985-8999.

Krummenacher C., Supekar V.M., Whitbeck J.C., Lazear E., Connolly S.A. y col. (2005). "Structure of unliganded HSV gD reveals a mechanism for receptor-mediated activation of virus entry." *EMBO J* 24(23): 4144-4153.

Kurt-Jones E.A., Chan M., Zhou S., Wang J., Reed G. y col. (2004). "Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(5): 1315-1320.

Laskin D.L. y Laskin J.D. (2001). "Role of macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity." *Toxicology* 160(1-3): 111-118.

Laskin D.L., Sunil V.R., Gardner C.R. y Laskin J.D. (2011). "Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction?" *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 51: 267-288.

Lazear E., Whitbeck J.C., Ponce-de-Leon M., Cairns T.M., Willis S.H. y col. (2012). "Antibody-induced conformational changes in herpes simplex virus glycoprotein gD reveal new targets for virus neutralization." *J Virol* 86(3): 1563-1576.

Leuzinger H., Ziegler U., Schraner E.M., Fraefel C., Glauser D.L. y col. (2005). "Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways." *J Virol* 79(20): 13047-13059.

Linehan M.M., Richman S., Krummenacher C., Eisenberg R.J., Cohen G.H. y col. (2004). "In vivo role of nectin-1 in entry of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and HSV-2 through the vaginal mucosa." *J Virol* 78(5): 2530-2536.

Lingappa J.R. y Celum C. (2007). "Clinical and therapeutic issues for herpes simplex virus-2 and HIV co-infection." *Drugs* 67(2): 155-174.

Litman G.W., Anderson M.K. y Rast J.P. (1999). "Evolution of antigen binding receptors." *Annu Rev Immunol* 17: 109-147.

Loret S., Guay G. y Lippe R. (2008). "Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions." *J Virol* 82(17): 8605-8618.

Lou Y., Qesmi R., Wang Q., Steben M., Wu J. y col. (2012). "Epidemiological impact of a genital herpes type 2 vaccine for young females." *PLoS One* 7(10): e46027.

Manoj S., Jogger C.R., Myscofski D., Yoon M. y Spear P.G. (2004). "Mutations in herpes simplex virus glycoprotein D that prevent cell entry via nectins and alter cell tropism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(34): 12414-12421.

Marsters S.A., Ayres T.M., Skubatch M., Gray C.L., Rothe M. y col. (1997). "Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family

and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1." J Biol Chem 272(22): 14029-14032.

Martinez E., de Diego A., Paradis A., Perpina M. y Hernandez M. (1994). "Herpes simplex pneumonia in a young immunocompetent man." Eur Respir J 7(6): 1185-1188.

Mateu C.G., Recalde M.P., Artuso M.C., Hermida G., Linero F.N. y col. (2011). "Emergence of herpes simplex virus-1 syncytial variants with altered virulence for mice after selection with a natural carrageenan." Sex Transm Dis 38(6): 555-561.

Mauri D.N., Ebner R., Montgomery R.I., Kochel K.D., Cheung T.C. y col. (1998). "LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator." Immunity 8(1): 21-30.

Mazumder S., Ghosal P.K., Pujol C.A., Carlucci M.J., Damonte E.B. y col. (2002). "Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta)." Int J Biol Macromol 31(1-3): 87-95.

McGeoch D.J., Dalrymple M.A., Davison A.J., Dolan A., Frame M.C. y col. (1988). "The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1." J Gen Virol 69 (Pt 7): 1531-1574.

McGeoch D.J., Rixon F.J. y Davison A.J. (2006). "Topics in herpesvirus genomics and evolution." Virus Res 117(1): 90-104.

Meckes D.G., Jr. y Wills J.W. (2008). "Structural rearrangement within an enveloped virus upon binding to the host cell." J Virol 82(21): 10429-10435.

Melroe G.T., DeLuca N.A. y Knipe D.M. (2004). "Herpes simplex virus 1 has multiple mechanisms for blocking virus-induced interferon production." J Virol 78(16): 8411-8420.

Mettenleiter T.C. (2002). "Herpesvirus assembly and egress." J Virol 76(4): 1537-1547.

Mettenleiter T.C. (2004). "Budding events in herpesvirus morphogenesis." Virus Res 106(2): 167-180.

Mettenleiter T.C., Klupp B.G. y Granzow H. (2006). "Herpesvirus assembly: a tale of two membranes." Curr Opin Microbiol 9(4): 423-429.

Mettenleiter T.C. y Minson T. (2006). "Egress of alphaherpesviruses." J Virol 80(3): 1610-1611; author reply 1611-1612.

Milne R.S., Nicola A.V., Whitbeck J.C., Eisenberg R.J. y Cohen G.H. (2005). "Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1." J Virol 79(11): 6655-6663.

Misurcova L., Skrovankova S., Samek D., Ambrozova J. y Machu L. (2012). "Health benefits of algal polysaccharides in human nutrition." Adv Food Nutr Res 66: 75-145.

- Mogensen S.C. (1979).** "Role of macrophages in natural resistance to virus infections." *Microbiol Rev* 43(1): 1-26.
- Mogensen T.H., Melchjorsen J., Malmgaard L., Casola A. y Paludan S.R. (2004).** "Suppression of proinflammatory cytokine expression by herpes simplex virus type 1." *J Virol* 78(11): 5883-5890.
- Montgomery R.I., Warner M.S., Lum B.J. y Spear P.G. (1996).** "Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family." *Cell* 87(3): 427-436.
- Mossman K.L., Saffran H.A. y Smiley J.R. (2000).** "Herpes simplex virus ICP0 mutants are hypersensitive to interferon." *J Virol* 74(4): 2052-2056.
- Murphy E.A., Davis J.M., Brown A.S., Carmichael M.D., Ghaffar A. y col. (2008).** "Effect of IL-6 deficiency on susceptibility to HSV-1 respiratory infection and intrinsic macrophage antiviral resistance." *J Interferon Cytokine Res* 28(10): 589-595.
- Murphy K.M., Nelson C.A. y Sedy J.R. (2006).** "Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM." *Nat Rev Immunol* 6(9): 671-681.
- Murphy T.L. y Murphy K.M. (2010).** "Slow down and survive: Enigmatic immunoregulation by BTLA and HVEM." *Annu Rev Immunol* 28: 389-411.
- Nandakumar S., Woolard S.N., Yuan D., Rouse B.T. y Kumaraguru U. (2008).** "Natural killer cells as novel helpers in anti-herpes simplex virus immune response." *J Virol* 82(21): 10820-10831.
- Nicola A.V., Hou J., Major E.O. y Straus S.E. (2005).** "Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway." *J Virol* 79(12): 7609-7616.
- Nicola A.V. y Straus S.E. (2004).** "Cellular and viral requirements for rapid endocytic entry of herpes simplex virus." *J Virol* 78(14): 7508-7517.
- Novak N. y Peng W.M. (2005).** "Dancing with the enemy: the interplay of herpes simplex virus with dendritic cells." *Clin Exp Immunol* 142(3): 405-410.
- O'Donnell C.D. y Shukla D. (2008).** "The Importance of Heparan Sulfate in Herpesvirus Infection." *Virology* 23(6): 383-393.
- Ojala P.M., Sodeik B., Ebersold M.W., Kutay U. y Helenius A. (2000).** "Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro." *Mol Cell Biol* 20(13): 4922-4931.
- Paludan S.R. y Mogensen S.C. (2001).** "Virus-cell interactions regulating induction of tumor necrosis factor alpha production in macrophages infected with herpes simplex virus." *J Virol* 75(21): 10170-10178.
- Pellett P.E. y Roizman B. (2007).** The Family Herpesviridae: A brief introduction. *Fields virology*. Knipe D.M. H.P., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin M.A., Roizman B. y Straus S.E. New York, Lippincott Williams & Wilkins. 1: 2479-2499.

- Perez-Romero P., Perez A., Capul A., Montgomery R. y Fuller A.O. (2005).** "Herpes simplex virus entry mediator associates in infected cells in a complex with viral proteins gD and at least gH." J Virol 79(7): 4540-4544.
- Pfeffer K. (2003).** "Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors." Cytokine Growth Factor Rev 14(3-4): 185-191.
- Piret J. y Boivin G. (2011).** "Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management." Antimicrob Agents Chemother 55(2): 459-472.
- Plaza M., Herrero M., Cifuentes A. y Ibanez E. (2009).** "Innovative natural functional ingredients from microalgae." J Agric Food Chem 57(16): 7159-7170.
- Ponce N.M., Pujol C.A., Damonte E.B., Flores M.L. y Stortz C.A. (2003).** "Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies." Carbohydr Res 338(2): 153-165.
- Pujol C.A., Estevez J.M., Carlucci M.J., Ciancia M., Cerezo A.S. y col. (2002).** "Novel DL-galactan hybrids from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* are potent inhibitors of herpes simplex virus and dengue virus." Antivir Chem Chemother 13(2): 83-89.
- Rasmussen B., Fletcher I.R., Brocks J.J. y Kilburn M.R. (2008).** "Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria." Nature 455(7216): 1101-1104.
- Rasty S., Poliani P.L., Fink D.J. y Glorioso J.C. (1997).** "Deletion of the S component inverted repeat sequence c' and the nonessential genes U(S)1 through U(S)5 from the herpes simplex virus type 1 genome substantially impairs productive viral infection in cell culture and pathogenesis in the rat central nervous system." J Neurovirol 3(4): 247-264.
- Read G.S. y Frenkel N. (1983).** "Herpes simplex virus mutants defective in the virion-associated shutoff of host polypeptide synthesis and exhibiting abnormal synthesis of alpha (immediate early) viral polypeptides." J Virol 46(2): 498-512.
- Reading P.C., Whitney P.G., Barr D.P., Smyth M.J. y Brooks A.G. (2006).** "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." Eur J Immunol 36(4): 897-905.
- Robinson J.L., Vaudry W.L., Forgie S.E. y Lee B.E. (2012).** "Prevention, recognition and management of neonatal HSV infections." Expert Rev Anti Infect Ther 10(6): 675-685.
- Roizman B. (1999).** "HSV gene functions: what have we learned that could be generally applicable to its near and distant cousins?" Acta Virol 43(2-3): 75-80.
- Roizman B., Carmichael L.E., Deinhardt F., de-The G., Nahmias A.J. y col. (1981).** "Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses." Intervirology 16(4): 201-217.

- Roizman B. y Whitley R.J. (2001).** "The nine ages of herpes simplex virus." Herpes 8(1): 23-27.
- Sagou K., Uema M. y Kawaguchi Y. (2010).** "Nucleolin is required for efficient nuclear egress of herpes simplex virus type 1 nucleocapsids." J Virol 84(4): 2110-2121.
- Saijo M., Yasuda Y., Yabe H., Kato S., Suzutani T. y col. (2002).** "Bone marrow transplantation in a child with Wiskott-Aldrich syndrome latently infected with acyclovir-resistant (ACV(r)) herpes simplex virus type 1: emergence of foscarnet-resistant virus originating from the ACV(r) virus." J Med Virol 68(1): 99-104.
- Sakaoka H., Kurita K., Iida Y., Takada S., Umene K. y col. (1994).** "Quantitative analysis of genomic polymorphism of herpes simplex virus type 1 strains from six countries: studies of molecular evolution and molecular epidemiology of the virus." J Gen Virol 75 (Pt 3): 513-527.
- Sciortino M.T., Suzuki M., Taddeo B. y Roizman B. (2001).** "RNAs extracted from herpes simplex virus 1 virions: apparent selectivity of viral but not cellular RNAs packaged in virions." J Virol 75(17): 8105-8116.
- Schang L.M., Phillips J. y Schaffer P.A. (1998).** "Requirement for cellular cyclin-dependent kinases in herpes simplex virus replication and transcription." J Virol 72(7): 5626-5637.
- Scheglovitova O.N., Romanov Y.A., Maksianina E.V., Kabaeva N.V. y Pronin A.G. (2001).** "Herpes Simplex Type I Virus Infection of Cultured Human Vascular Endothelial Cells: Expression of Cell Adhesion Molecules and Induction of Interferon and Cytokine Production by Blood Mononuclear Cells." Russ J Immunol 6(4): 367-376.
- Schneweis K.E. (1962).** "[Serological studies on the type differentiation of Herpesvirus hominis]." Z Immun exp ther 124: 24-48.
- Schuller D., Spessert C., Fraser V.J. y Goodenberger D.M. (1993).** "Herpes simplex virus from respiratory tract secretions: epidemiology, clinical characteristics, and outcome in immunocompromised and nonimmunocompromised hosts." Am J Med 94(1): 29-33.
- Sedy J.R., Gavrieli M., Potter K.G., Hurchla M.A., Lindsley R.C. y col. (2005).** "B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator." Nat Immunol 6(1): 90-98.
- Shiota T., Lixin W., Takayama-Ito M., Iizuka I., Ogata M. y col. (2011).** "Expression of herpes simplex virus type 1 recombinant thymidine kinase and its application to a rapid antiviral sensitivity assay." Antiviral Res 91(2): 142-149.
- Shukla D. y Spear P.G. (2001).** "Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry." J Clin Invest 108(4): 503-510.

- Simpson S.A., Manchak M.D., Hager E.J., Krummenacher C., Whitbeck J.C. y col. (2005).** "Nectin-1/HveC Mediates herpes simplex virus type 1 entry into primary human sensory neurons and fibroblasts." J Neurovirol 11(2): 208-218.
- Skoldenberg B. (1996).** "Herpes simplex encephalitis." Scand J Infect Dis Suppl 100: 8-13.
- Smyth R.L., Higenbottam T.W., Scott J.P., Wreghitt T.G., Stewart S. y col. (1990).** "Herpes simplex virus infection in heart-lung transplant recipients." Transplantation 49(4): 735-739.
- Sodeik B., Ebersold M.W. y Helenius A. (1997).** "Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus." J Cell Biol 136(5): 1007-1021.
- Spear P.G. (2004).** "Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry." Cell Microbiol 6(5): 401-410.
- Spear P.G., Eisenberg R.J. y Cohen G.H. (2000).** "Three classes of cell surface receptors for alpha herpesvirus entry." Virology 275(1): 1-8.
- Spear P.G. y Longnecker R. (2003).** "Herpesvirus entry: an update." J Virol 77(19): 10179-10185.
- Stanberry L.R., Spruance S.L., Cunningham A.L., Bernstein D.I., Mindel A. y col. (2002).** "Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes." N Engl J Med 347(21): 1652-1661.
- Steiner I., Spivack J.G., Deshmane S.L., Ace C.I., Preston C.M. y col. (1990).** "A herpes simplex virus type 1 mutant containing a nontransducing Vmw65 protein establishes latent infection in vivo in the absence of viral replication and reactivates efficiently from explanted trigeminal ganglia." J Virol 64(4): 1630-1638.
- Stengel D.B., Connan S. y Popper Z.A. (2011).** "Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application." Biotechnol Adv 29(5): 483-501.
- Stiles K.M., Whitbeck J.C., Lou H., Cohen G.H., Eisenberg R.J. y col. (2010).** "Herpes simplex virus glycoprotein D interferes with binding of herpesvirus entry mediator to its ligands through downregulation and direct competition." J Virol 84(22): 11646-11660.
- Sugimoto K., Uema M., Sagara H., Tanaka M., Sata T. y col. (2008).** "Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus 1." J Virol 82(11): 5198-5211.
- Takahashi K., Nakanishi H., Miyahara M., Mandai K., Satoh K. y col. (1999).** "Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein." J Cell Biol 145(3): 539-549.

Takai Y. y Nakanishi H. (2003). "Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions." J Cell Sci 116(Pt 1): 17-27.

Tamada K., Shimozaki K., Chapoval A.I., Zhai Y., Su J. y col. (2000). "LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response." J Immunol 164(8): 4105-4110.

Teng Y.C., Chen Y.T., Cheng Y.Y. y Hung S.L. (2005). "Requirements for the upregulation of interleukin-6 by herpes simplex virus-infected gingival fibroblasts." Viral Immunol 18(1): 170-178.

Tiwari V., Clement C., Scanlan P.M., Kowlessur D., Yue B.Y. y col. (2005). "A role for herpesvirus entry mediator as the receptor for herpes simplex virus 1 entry into primary human trabecular meshwork cells." J Virol 79(20): 13173-13179.

Turcotte S., Letellier J. y Lippe R. (2005). "Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress." J Virol 79(14): 8847-8860.

Tuxen D.V. (1994). "Prevention of lower respiratory herpes simplex virus infection with acyclovir in patients with adult respiratory distress syndrome." Chest 106(1 Suppl): 28S-33S.

Usov A.I. (2011). "Polysaccharides of the red algae." Adv Carbohydr Chem Biochem 65: 115-217.

van den Brink J.W., Simoons-Smit A.M., Beishuizen A., Girbes A.R., Strack van Schijndel R.J. y col. (2004). "Respiratory herpes simplex virus type 1 infection/colonisation in the critically ill: marker or mediator?" J Clin Virol 30(1): 68-72.

Van Sant C., Hagglund R., Lopez P. y Roizman B. (2001). "The infected cell protein 0 of herpes simplex virus 1 dynamically interacts with proteasomes, binds and activates the cdc34 E2 ubiquitin-conjugating enzyme, and possesses in vitro E3 ubiquitin ligase activity." Proc Natl Acad Sci U S A 98(15): 8815-8820.

Villarreal L.P. (2005). Evolution of terrestrial animal and their viruses. Viruses and the evolution of life, American Society for Microbiology Press. 1: 341-344.

Walev I., Lingen M., Lazzaro M., Weise K. y Falke D. (1994). "Cyclosporin A resistance of herpes simplex virus-induced "fusion from within" as a phenotypical marker of mutations in the Syn 3 locus of the glycoprotein B gene." Virus Genes 8(1): 83-86.

Watanabe N., Gavrieli M., Sedy J.R., Yang J., Fallarino F. y col. (2003). "BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1." Nat Immunol 4(7): 670-679.

Weichselbaum R.R., Kufe D.W., Advani S.J. y Roizman B. (2001). "Molecular targeting of gene therapy and radiotherapy." Acta Oncol 40(6): 735-738.

Whitley R.J. (1990). "Viral encephalitis." N Engl J Med 323(4): 242-250.

- Whitley R.J. (2002).** "Herpes simplex virus infection." Semin Pediatr Infect Dis 13(1): 6-11.
- Whitley R.J. y Roizman B. (2001).** "Herpes simplex virus infections." Lancet 357(9267): 1513-1518.
- Witt M.N., Braun G.S., Ihrler S. y Schmid H. (2009).** "Occurrence of HSV-1-induced pneumonitis in patients under standard immunosuppressive therapy for rheumatic, vasculitic, and connective tissue disease." BMC Pulm Med 9: 22.
- Wolfstein A., Nagel C.H., Radtke K., Dohner K., Allan V.J. y col. (2006).** "The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro." Traffic 7(2): 227-237.
- Wu L. y Morahan P.S. (1992).** "Macrophages and other nonspecific defenses: role in modulating resistance against herpes simplex virus." Curr Top Microbiol Immunol 179: 89-110.
- Zacharopoulos V.R. y Phillips D.M. (1997).** "Vaginal formulations of carrageenan protect mice from herpes simplex virus infection." Clin Diagn Lab Immunol 4(4): 465-468.
- Zhang N., Yan J., Lu G., Guo Z., Fan Z. y col. (2011).** "Binding of herpes simplex virus glycoprotein D to nectin-1 exploits host cell adhesion." Nat Commun 2: 577.
- Zhou G. y Roizman B. (2006).** "Construction and properties of a herpes simplex virus 1 designed to enter cells solely via the IL-13alpha2 receptor." Proc Natl Acad Sci U S A 103(14): 5508-5513.
- Zhou Z.H., Chen D.H., Jakana J., Rixon F.J. y Chiu W. (1999).** "Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions." J Virol 73(4): 3210-3218.