

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

1  
2ej

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MULTIPLICACION Y PERSISTENCIA DEL  
VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO I EN  
UNA LINEA CELULAR SIMILAR A  
MACROFAGOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A:

M. en C. Jaime Amadeo Bustos Martínez

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. BEATRIZ GOMEZ GARCIA



MEXICO, D. F.

273383

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1999



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Este trabajo fue posible gracias al apoyo del:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) al proyecto 0476-M9108

Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS) al proyecto 2212

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Beatríz Gómez García por la acertada dirección y apoyo brindado en la realización de esta Tesis.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Beatríz Gómez García, Dra. Emma Melendro Lozano, Dra. Blanca Lilia Barrón Romero y Dr. Guillermo Alfaro Martínez, por sus importantes sugerencias y comentarios a través de todo el trabajo experimental.

A los miembros del jurado: Dr. Alejandro García Carranca, Dra. Susana López Charretón, Dra. Beatríz Gómez García, Dra. Blanca Hayde Ruíz Ordaz, Dra. Blanca Lilia Barrón Romero, Dr. Lius Padilla Noriega y Dr. Jaime Berumen Campos, por los valiosos comentarios al trabajo presentado.

A la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X), por la beca otorgada para la realización de estudios de Doctorado.

Al Programa Universitario de Investigación en Salud por la beca otorgada para la realización de estudios de Doctorado.

## **DEDICATORIAS**

A Karime y Anaíd con todo mi amor por todo lo que significan en mi vida, a quienes les brindo de manera muy especial este trabajo para que les sirva de ejemplo en su camino

A mi madre y hermanos

A la memoria de mi padre

A Aída con todo el amor que se merece por su apoyo, cariño y comprensión

## INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
HIPOTESIS	16
OBJETIVOS	16
MATERIAL Y METODOS	17
RESULTADOS	21
DISCUSION	41
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFIA	47

## ABREVIATURAS

Acm	Anticuerpo monoclonal
ASB	Albúmina sérica bovina
$\alpha$ -TIF	Factor activador en <i>trans</i>
D.O.	Densidad óptica
ECP	Efecto citopático
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
HSV	Virus herpes simplex
HSV-1	Virus herpes simplex tipo 1
HSV <sub>A</sub>	Virus aislado del pase 47 del cultivo persistente
HSV <sub>B</sub>	Virus aislado del pase 60 del cultivo persistente
ICP	Proteínas de células infectadas
IF	Inmunofluorescencia
IFN	Interferón
kDa	KiloDaltones
kbp	Pares de kilobases
M $\phi$	Macrófago
MEM	Medio mínimo esencial de Eagle
MOI	Multiplicidad de infección
P388D1	Línea de células similares a macrófagos
P388D1per	Células P388D1 infectadas persistentemente
PM	Peso molecular
SFB	Suero fetal bovino
Syn	Fenotipo del virus que inducen fusión celular
Syn <sup>+</sup>	Fenotipo del virus que no inducen fusión celular
TCID <sub>50</sub>	Dosis que infecta el 50% de un cultivo de tejido
ufp	Unidades formadoras de placa
vDNA	DNA viral
vRNA	RNA viral
VP	Polipéptidos estructurales del virión
VHS	Proteína que apaga la expresión de genes del huésped

## RESUMEN

Las infecciones por el virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), fueron las primeras infecciones persistentes reconocidas en el humano (30) y hasta la fecha el mecanismo de acción por medio del cual logra persistir en el huésped no ha sido elucidado del todo. Por lo tanto, el contar con modelos *in vitro* sigue siendo una herramienta útil para su estudio.

En el presente trabajo se estableció un modelo de persistencia para el HSV-1 en una línea de células similares a macrófagos (P388D1). Se encontró que los macrófagos fueron moderadamente permisivos a la infección por el HSV-1, ya que la producción viral fue aproximadamente 1000 veces menor a la que se obtiene en una línea celular permisiva (Vero).

La persistencia se obtuvo infectando las células a una baja multiplicidad (0.001) y propagando las células que sobrevivieron a la infección. El cultivo persistente así obtenido, se mantuvo por más de 75 pases. La persistencia viral se confirmó determinando: el título del virus extracelular; la presencia de antígenos virales en las células; el número de células productoras de virus infectivo y la presencia de proteínas virales en las células persistentemente infectadas. Los cultivos persistentes presentaron una producción cíclica de virus desde no detectables hasta  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml. Las células que expresaron antígenos virales comprendían del 1 al 15% del cultivo. Los macrófagos que liberaban virus infectivo variaron del 0.008% al 12.5%. Los ensayos de inmunoblot y marcaje con metionina-[<sup>35</sup>S], revelaron la presencia de proteínas virales en el cultivo persistentemente infectado. Sin embargo, se observó un menor número de proteínas con respecto a las encontradas en una infección lítica. Así mismo, en el cultivo persistente no se observó una marcada disminución en la interferencia en la síntesis de las proteínas de la célula huésped, que es algo que normalmente produce el HSV-1 en las células permisivas.

También se encontraron cambios fenotípicos en virus obtenidos durante dos diferentes pases de los cultivos persistentes (HSV<sub>A</sub>, pase 47 y HSV<sub>B</sub>, pase 60). Los cambios observados fueron: diferencias en la formación de sincitios; una disminución en el tamaño de las placas virales; una reducción en el título viral que se obtiene cuando infectan células permisivas y diferencias en la intensidad y el número de proteínas virales que se producen cuando infectan de manera lítica.

El modelo aquí establecido, podría utilizarse para un estudio a nivel molecular del mecanismo de persistencia del HSV-1 en células que no forman parte del sistema nervioso pero que son importantes en el proceso de la infección viral.



## INTRODUCCION

### La familia *Herpesviridae*.

La familia *Herpesviridae* contiene más de 100 virus que están ampliamente diseminados en la naturaleza. Se han encontrado en una gran variedad de especies animales; en el humano se han aislado ocho diferentes herpesvirus (3,63-66,83).

Los virus incluidos en esta familia tienen varias propiedades en común: contienen un genoma de DNA, un virión con una arquitectura similar y se pueden mantener en un estado latente durante todo el ciclo vital del huésped. Sin embargo, entre los virus de esta familia se presentan diferencias con respecto a: las propiedades en el contenido genético y al arreglo lineal de los genes en el genoma; la amplitud de huéspedes y la duración del ciclo replicativo; y el mecanismo por el cual los virus mantienen el estado latente en el huésped.

La inclusión de los virus en la familia *Herpesviridae* se basa en la arquitectura del virión. Un herpesvirión típico consiste de: 1) un "core" o centro que contiene un DNA lineal de doble hebra; 2) una cápside icosadeltahédrica de aproximadamente 100 a 110 nm de diámetro con 12 capsómeros pentaméricos y 150 hexaméricos; 3) un material amorfo algunas veces asimétrico el cual rodea la cápside y que se le ha denominado tegumento; y 4) una envoltura membranosa que contiene espículas de glicoproteínas virales insertadas y proyectadas sobre la superficie (3,63-66). En la Figura 1 se observa un esquema del virión.

El tamaño reportado del virión varía de 120 a cerca de los 300nm, esta variación se debe posiblemente al grosor del tegumento. El número preciso de polipéptidos que contiene el virión varía de un tipo de virus a otro y se estima que contiene de 30 a 35 polipéptidos (3,63-66).

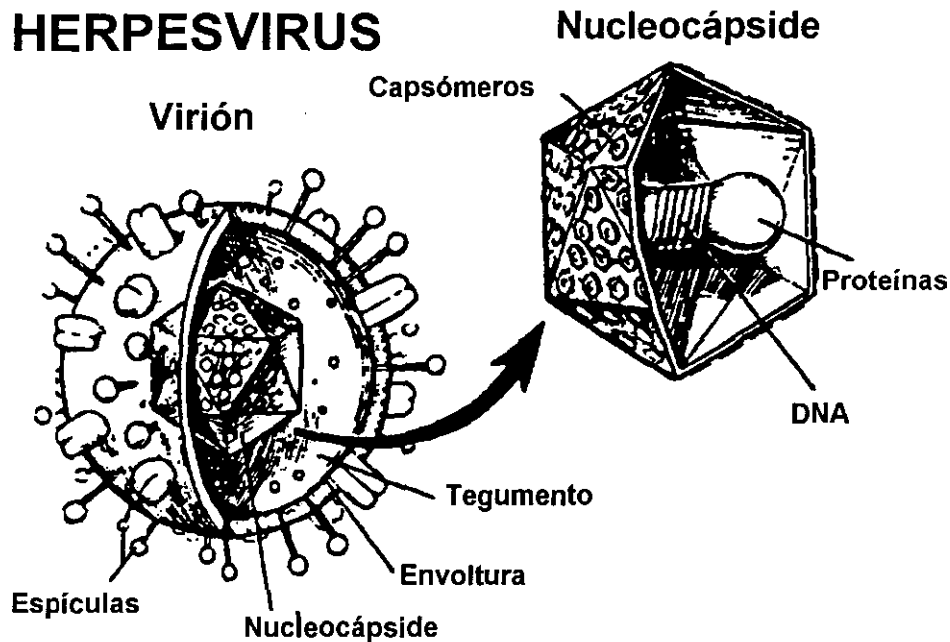
La mayoría de los DNAs extraídos de los viriones son moléculas lineales y de doble hebra, pero pueden circularizarse inmediatamente después de liberarse dentro del núcleo de la célula infectada (65).

El peso molecular de los DNAs de los herpesvirus varía de 80 a 150 kDa y contienen aproximadamente de 124 a 235 pares de kilobases (kbp), dependiendo de cada género. Así mismo, se pueden encontrar diferencias de hasta 10kbp en el tamaño del genoma de cepas del mismo género, que casi siempre se deben a reiteraciones de secuencias terminales y/o internas, o por deleciones espontáneas. La composición de bases del DNA de los herpesvirus varía de 32 a 75 G+C moles por ciento (3,63-66).

Una característica particular del DNA de los herpesvirus es el rearrreglo de sus secuencias ya que pueden presentar secuencias terminales o repetidas a lo largo del genoma o en los extremos (3,63-66).

Todos los herpesvirus conocidos han mostrado tener cuatro propiedades significativas:

a) Todos especifican enzimas y otros factores involucrados en la síntesis de ácidos nucleicos (p. ej. DNA polimerasa, helicasa, primasa, etc.), así como un número variable de enzimas involucradas en el metabolismo del DNA (p. ej. timidina cinasa, timidilato sintetasa, dUTPasa, etc.). También especifican al menos una proteasa y un número variable de proteínas cinasa.



**Figura 1. Esquema de un Herpesvirus.** Se puede observar la estructura típica de un herpesvirus formada por la nucleocápside, el tegumento y la envoltura. (Tomado de Liesegang, 1992)

b) La síntesis del DNA viral y el ensamble de las cápsides se lleva a cabo en el núcleo.  
 c) La producción de virus infeccioso está acompañada por la destrucción de las células infectadas.

d) Todos los herpesvirus examinados a la fecha son capaces de permanecer en estado latente en sus huéspedes naturales. En las células que contienen el virus latente, el genoma viral adopta una forma circular cerrada y sólo se expresa un pequeño número de genes virales (3,63-66).

La familia *Herpesviridae* se ha clasificado en tres subfamilias en base a sus propiedades biológicas.

1) *Alphaherpesvirinae*: los virus incluidos en esta subfamilia tienen una gama variable de huéspedes, son considerados neurotrópicos, tienen un ciclo reproductivo relativamente corto, una diseminación rápida en cultivos, destruyen eficientemente a las células infectadas y tienen la capacidad de establecer infecciones latentes principalmente pero no exclusivamente en ganglios sensoriales. Esta subfamilia contiene al género *Simplexvirus* (HSV-1, HSV-2, etc.) y *Varicellovirus* (varicela-zoster (VZV), pseudorabia, etc.).

2) *Betaherpesvirinae*: los virus de esta subfamilia tienen una restringida amplitud de huéspedes, su ciclo reproductivo es largo y la infección en cultivos progresa lentamente. Las células infectadas frecuentemente se hacen alargadas (citomegalia) y establecen cultivos acarreadores rápidamente. Los virus pueden mantenerse en forma latente en monocitos, linfocitos T, glándulas secretoras, riñón y otros tejidos. Esta subfamilia contiene al género *Cytomegalovirus*, citomegalovirus humano (HCMV); herpesvirus humanos 6 y 7 (HHV-6 y HHV-7) y *Muromegalovirus* (citomegalovirus murino).

3) *Gammaherpesvirinae*: la diversidad de huéspedes de los miembros de esta subfamilia está limitada a la familia u orden del cual proviene el huésped natural. *In vitro* todos los miembros se replican en células linfoblastoides y algunos también causan infecciones líticas en algunos tipos de células epiteliales o fibroblastos. Los virus de este grupo son específicos para los linfocitos T o B. Frecuentemente se encuentran virus latentes en linfocitos B. Esta subfamilia contiene al género *Lymphocryptovirus*, virus Epstein-Barr (EBV); herpesvirus humano 8 (HHV-8) y *Rhadinovirus* (herpesvirus saimiri, etc.) (3,63-66).

### Los virus herpes simplex.

Los virus herpes simplex (HSV), fueron los primeros herpesvirus humanos en ser descubiertos, se tienen reportes desde la época de la Grecia antigua. Se han descrito dos serotipos: el virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) y el herpes simplex tipo 2 (HSV-2), son diferentes pero antigénicamente relacionados, entre ellos el grado de homología de la secuencia de nucleótidos es de aproximadamente el 50%. Sin embargo, existe una considerable reactividad cruzada entre las glicoproteínas de los dos tipos de virus. El HSV-1 se involucra generalmente en infección ocular o facial, mientras que el HSV-2 se encuentra principalmente en las infecciones genitales (41,83).

Estos virus tienen un diámetro aproximado de 150 a 200nm y tienen la composición característica de los herpesvirus: un centro de ácidos nucleicos y proteínas, cápside, tegumento y envoltura membranosa. El ácido nucleico es lineal de doble hebra y se encuentra rodeado de proteínas, constituyendo un complejo nucleoproteico que está rodeado por la cápside. Los viriones del HSV-1 contienen en la cápside aproximadamente 33 proteínas designadas como polipéptidos estructurales del virión (VP), once de estas proteínas se encuentran glicosiladas y se incorporan en la envoltura proyectándose hacia afuera de la superficie (27,67,73).

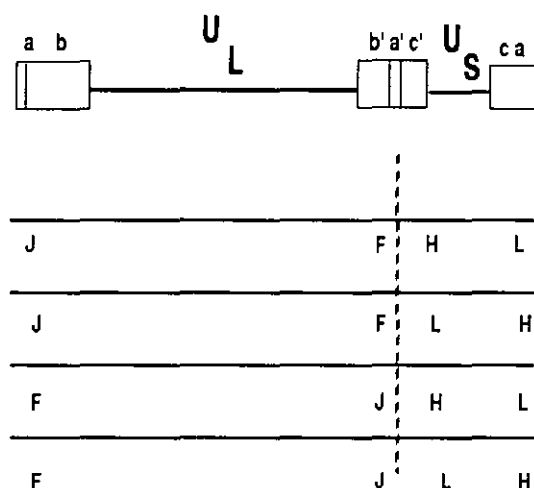
La envoltura es una estructura compleja de fosfolipoproteínas derivada de la membrana nuclear de la célula huésped que es modificada por las proteínas virales. Sólo los viriones que cuentan con esta envoltura son capaces de entrar en las células e iniciar la replicación. Entre la cápside y la envoltura se encuentra el tegumento que es una estructura protéica amorfa, que contiene proteínas involucradas en inducir la transcripción viral en el núcleo e inhibir la producción de las proteínas celulares (27,85).

El genoma del HSV contiene aproximadamente 152 kpb con un peso molecular aproximado de 100 kDa y contiene al menos 75 genes, de estos sólo 37 son requeridos para que el virus se multiplique en cultivos celulares. Estos genes esenciales codifican funciones relacionadas con la entrada del virus en la célula, regulación de la expresión genética, replicación y empaquetamiento del DNA viral en los viriones (67,82).

El genoma del HSV está compuesto de dos porciones: una única región larga ( $U_L$ , de 126 kbp) y otra corta ( $U_S$ , de 26 kbp), que se encuentran flanqueadas por secuencias repetidas invertidas en los extremos y en la parte interna del genoma, los elementos repetidos de la región L son *ab* en el extremo y *b'a'* en la unión interna; para la región S son *a'c'* en la unión interna y *ca* en el extremo. Esta estructura permite que se puedan formar cuatro isómeros de la molécula del DNA (Figura 2). La función biológica de las secuencias repetidas invertidas es desconocida pero hacen posible que el genoma se circularize por

recombinación, lo cual puede ser esencial para la síntesis del DNA (3,67,85).

La replicación del HSV en células susceptibles se inicia con la adsorción del virus a los receptores celulares, esto es seguido por la fusión de la envoltura con la membrana plasmática. La cápside desnuda es transportada a través de los poros nucleares hasta el núcleo, donde el DNA es liberado. En este sitio tiene lugar la transcripción, replicación del DNA viral y ensamble de las cápsides nuevas.



**Figura 2. Representación esquemática del genoma del HSV.**

El genoma del HSV contiene una región larga (U<sub>L</sub>) y una región corta (U<sub>S</sub>), las cuales se encuentran rodeadas por secuencias repetidas invertidas (abc y a'b'c'). Por recombinación entre las secuencias repetidas se pueden formar los cuatro isómeros que se muestran en la parte inferior.

El DNA viral es transcrito por la RNA polimerasa II del huésped, pero con la participación de factores virales en todas las etapas de la infección. La expresión de los genes virales está muy bien regulado y en un orden secuencial a manera de cascada dividida en tres tipos de genes: los inmediatamente tempranos (IE o alfa,  $\alpha$ ), los tempranos (E o beta,  $\beta$ ) y los tardíos (L o gamma,  $\gamma$ ). La síntesis de los polipéptidos alfa no requiere de la síntesis de proteínas anteriores. Dentro de las proteínas alfa están las llamadas proteínas de células infectadas (ICP): 0, 4, 22, 27 y 47 (3,41,67,82).

La síntesis de las proteínas beta depende de la síntesis de las proteínas alfa, dentro de estas proteínas se encuentran la timidina cinasa (TK) y la DNA polimerasa. A su vez la síntesis de las proteínas gamma requiere de la síntesis del vDNA y de las proteínas beta. Dentro de las proteínas gamma se encuentran las glicoproteínas de la superficie del virión.

Una vez que se sintetizan las proteínas beta se inicia la síntesis del DNA viral mediante el mecanismo del círculo rodante, produciéndose concatenameros que son cortados en

monómeros y empacados dentro de las cápsides.

Las glicoproteínas de superficie y las proteínas del tegumento se acumulan y forman parches en las membranas celulares, principalmente en la membrana nuclear, el virus madura al adquirir su envoltura al atravesar dicha membrana. El virus envuelto se acumula en el retículo endoplásmico y es transportado hasta el espacio extracelular (41,67,82).

En cultivos de células permisivas, todo el proceso de replicación viral tarda de 18 a 20 horas.

La infección primaria natural por el HSV-1 en los humanos, generalmente se produce durante la niñez como una infección no específica de las vías respiratorias superiores o bien puede presentarse en forma asintomática. La infección primaria define la vía de la diseminación viral y el sitio de la infección latente. En los humanos ocurre comúnmente sobre la región inervada por el nervio trigémino, es decir, las áreas mucosas de la cara, ojos y boca. Después de la replicación en las mucosas, la progenie viral se disemina hasta los nervios sensoriales, en donde los virus desnudos son transportados por el flujo axonal retrogrado hasta la neurona (41,85). Una vez dentro de la neurona la forma inactiva debe sufrir al menos un ciclo de replicación para producir virus infectivo (envuelto), el cual puede viajar de regreso a las mucosas causando la lesión clínica (hipótesis del "viaje redondo"). Existe también la teoría de "la puerta trasera", donde el virus se establece de manera latente en el ganglio trigémino y al momento de la infección inicial o por reactivación, el virus se disemina a la porción ocular o mandibular del ganglio trigémino y de aquí causar la infección sobre la piel o mucosas (41).

Una de las propiedades más interesantes de estos virus es su capacidad para establecer infecciones latentes. Esto es, la persistencia del virus por largos periodos en los individuos infectados sin que se presente sintomatología. Las características básicas de la latencia son que el DNA viral se mantiene dentro del núcleo de algunas células, en forma extracromosomal y se produce una limitada transcripción del genoma viral. A intervalos, un pequeño número de estas células con infección latente entran en una fase de infección productiva y el virus infectivo reaparece causando enfermedad clínica o también una infección asintomática.

Las células donde se produce principalmente este proceso son las neuronas aunque otras estirpes celulares pueden estar involucradas. Sólo del 10-20% de las neuronas que se encuentran en los ganglios sensoriales mantienen latente al virus. El genoma viral se establece con 10-20 copias por neurona y las evidencias indican que se encuentra en forma circular o un concatamero lineal, no integrado al cromosoma (30,62,67,75).

La infección latente ocurre cuando se previene la expresión eficiente de los genes alfa y los pasos subsecuentes del ciclo lítico. Esto es debido tal vez a la presencia de un represor o la ausencia de un regulador positivo de la expresión de los genes alfa (62,75).

El mecanismo exacto para el establecimiento de la latencia no se ha elucidado completamente, se sabe que sólo un grupo de genes virales se expresan eficientemente: los genes LAT (latency-associated transcript), que codifican dos RNAs poli A<sup>-</sup>. Uno de estos es más abundantes y tiene de 1.2 a 2.0 kb. El otro es menos abundante pero más largo ya que mide 8.5 kb (83). Se ha visto que los más cortos sobrelapan de manera antiparalela con el gen RL2 el cual codifica para la proteína reguladora alfa ICP0, por lo que pueden modular su expresión por un mecanismo de antisentido (30,62). También se ha visto que estos RNAs no codifican proteínas (30,62). Sin embargo, las funciones de LAT no se han

definido, además de que se ha observado que no se requieren de manera absoluta en el establecimiento o mantenimiento de la latencia en los modelos experimentales de conejo o ratón (30,75).

Para el proceso de reactivación del HSV-1, se ha encontrado que la proteína ICP0 está implicada en el cambio de fase latente a lítica, por lo que el virus necesita expresar los genes RL2 que codifican a la ICP0 (30,62). Sin embargo, deben intervenir otra serie de factores entre las cuales pueden estar genes celulares.

### **Proteínas del HSV-1.**

El HSV-1 a pesar de no ser uno de los virus más grandes que infectan a las células eucariontes, codifica más de 75 proteínas. A las proteínas se les han dado diversos nombres, algunas se nombran en base al número de fase de lectura abierta que las codifica (por ejemplo, proteína U<sub>L</sub>3); otras en base a su función (por ejemplo, glicoproteína C o gC) y otra nomenclatura es en base a la migración electroforética relativa de la proteína (por ejemplo, proteína de célula-infectada 4 o ICP 4) (27,67,82).

Los estudios con viriones purificados de HSV-1 sugieren que estos contienen 30 o más proteínas designadas como polipéptidos estructurales del virión (VP) y se les asigno un número seriado (29,33). De las 30 conocidas (ya que hay otras 10 que se sospecha son VP), al menos 9 están en la superficie del virión y 11 son glicosiladas. Las cápsides vacías contienen de cuatro a siete proteínas. El resto de las proteínas se encuentra en el tegumento, de estas las importantes para la actividad viral son las proteínas:  $\alpha$ -TIF (*trans*-inducing factor), la cual activa genes en forma *trans*; VHS (virion host shut off protein), que apaga la expresión de genes del huésped; el producto del gen U<sub>s</sub>11, que es un factor anti-atenuación y otras más (27,67,82).

Las proteínas que no forman parte del virión se han encontrado en las células infectadas y participan principalmente en dos tipos de funciones: i) en la síntesis del DNA viral y el ensamblaje de virus infectivo y ii) en funciones diseñadas para permitir que el virus se replique en una gran variedad de células en diferentes condiciones (82). A este grupo de proteínas que no forman parte estructural del virión se les ha nombrado proteínas de células infectadas (infected-cell protein o ICP), y se les ha asignado un número consecutivo en función de su movilidad electroforética. Sin embargo, algunas proteínas del virión también tienen una nomenclatura como ICP (por ejemplo, ICP18 corresponde a VP10 o la ICP39 es VP22)(33).

A pesar de que esta clasificación está hecha en base a la movilidad electroforética y por ende al peso molecular aparente de la proteína, es muy difícil identificarlas ya que su migración está influenciada por factores tales como la cepa viral, la célula huésped, las rondas de replicación y las condiciones del ensayo. En la Tabla 1 se muestra una recopilación de las proteínas del HSV-1 a las que se les ha determinado el peso molecular, así como su función (27,67,82).

**Tabla 1.** Proteínas del HSV-1

Proteína	P.M.	Función	Indispensable *	Tipo de gen
VP1/2	270,000	Fosfoproteína, forma complejo con VP5		
ICP4: ICP4a ICP4b ICP4c	175,000 160,000 163,000 170,000	Regulador positivo de genes $\beta$ y $\gamma$ .	Sí	$\alpha$
ICP5, VP5	155,000	Proteína mayor de la cápside.	Sí	$\gamma$
U <sub>L</sub> 30	140,000	DNA polimerasa.	Sí	$\beta$
ICP6	140,000-138,000	Ribonucleótido reductasa.	No	$\beta$
gC, VP8	128,000	Glicoproteína involucrada en la unión a la célula.	No	$\gamma$
ICP8	127,000	Proteína de unión al DNA.	Sí	$\beta$
gB, VP7/VP8.5	125,000/ 120,000	Glicoproteína entrada y fusión.	Sí	$\gamma$
gH	115,000	Forma complejo con gL, juega un papel en la entrada, salida y diseminación célula-célula de los viriones.	Sí	$\gamma$
U <sub>L</sub> 52	114,000	Componente del complejo helicasa- primasa.	Sí	$\beta$
ICP0	110,000	Transactivador de genes.	No	$\alpha$
U <sub>L</sub> 5	99,000	Componente del complejo helicasa- primasa.	Sí	$\beta$
ICP18.5	95,500	Requerido para rompimiento o empaquetamiento del DNA.	Sí	$\gamma$
U <sub>L</sub> 9	94,000	Proteína de unión al DNA.	Sí	$\gamma$
VP11	93,000	Fosfoproteína		
U <sub>L</sub> 8	90,000	Componente del complejo helicasa- primasa.	Sí	$\beta$
gE, VP12.3	87,000	Forma complejo con gI, involucrada en la diseminación del virus.	No	$\gamma$
U <sub>L</sub> 12	85,000- 80,000	DNAsa alcalina.	No	$\beta$
VP13/14	82,000-81,000	Fosfoproteína en células infectadas.		
ICP18	82,000	Exonucleasa alcalina	Sí	$\beta$
gI	70,000	Forma complejos con gE para el transporte a la membrana y también es un receptor de alta afinidad para Fc.	No	$\gamma$
ICP22	68,000	Proteína reguladora.	No	$\alpha$
$\alpha$ -TIF, ICP25, VP16	65,000	Proteína del tegumento. Fosfoproteína. Transactivador de la transcripción.	Sí	$\gamma$
ICP27	64,000	Proteína reguladora para genes tardíos.	Sí	$\alpha$
gM	63,000-53,000			

gG	60,000			
gD, VP17-18	59,000	Glicoproteína para entrada del virus en la célula.	Sí	γ
UL41, VHS	58,000 y 59,500	Fosfoproteína, shut off de la síntesis de proteínas del huésped, degradación no específica de mRNA.	No	γ
Proteína-cinasa	57,000	Cinasa del núcleo de células infectadas. Fosforilada. Su principal sustrato es la proteína α-22. (ICP22)		
VP19C	53,000	Proteína de ensamble de la cápside.	Sí	γ
gK	40,000	Glicoproteína requerida para una eficiente exocitosis viral.	Sí	γ
ICP36	43,000	Timidina cinasa.	No	β
VP21	42,000	Proteína de cápside.	Sí	γ
gL	40,000-30,000	Forma complejos con gH, se requiere para el transporte de ambas proteínas a la membrana y para la entrada del virus mediada por gH; contiene el locus <i>Syn</i> .	Sí	γ
UL2	39,000	Uracil DNA glicosilasa.	No	β
VP22a	37,000	Proteína de cápside		γ
VP23	33,000	Proteína de cápside	Sí	γ
UL34	30,000	Actúa en la replicación viral		
VP24	26,000	Proteína de cápside		γ
UL4	25,000	Proteína de Tegumento.		
UL20	22,000	Proteína de membrana		
US11	21,000	Abundante proteína del tegumento que se une al mRNA UL34 en una secuencia y conformación específica, actúa como un factor anti-atenuación, se une a la subunidad 60S y se localiza en el nucleólo.	No	γ
UL45	18,000	Proteína de membrana		
Proteína Miristilada	16,000-13,000	Miristilar	No	
VP26	12,000	Proteína de cápside	Sí	γ
ICP47	12,000	Bloquea presentación de antígenos a linfocitos CD8 <sup>+</sup> .	No	α
Proteína 10KD	10,000	Fosfoproteína		

\*Indispensable para crecer en cultivos celulares.

Debe mencionarse que de las 75 proteínas que se pueden codificar, sólo 37 se requieren para que el virus se replique en cultivos celulares. Estos genes esenciales codifican funciones relacionadas a la entrada del virus a la célula, la regulación de la expresión genética, la replicación y empaquetamiento del DNA viral en los viriones. Los genes que no son esenciales para la replicación en cultivos son proteínas particularmente del tegumento y la envoltura. Tienen un papel en la multiplicación del virus y su transferencia de célula a



célula, exocitosis y complementan funciones celulares perdidas a consecuencia de la replicación viral. Además eventualmente pueden realizar funciones celulares requeridas para la replicación viral en tejidos o células específicas (27,67,82). Un ejemplo de estos genes es el  $\alpha 22$  que codifica a la ICP22. Así los virus que no expresan esta proteína pueden crecer bien en células Vero y HEp-2 pero no en fibroblastos humanos ni en líneas celulares de ratones (71). Otro ejemplo es el gen  $\gamma 34.5$  que codifica a la ICP34.5, el cual necesita el virus para multiplicarse en células humanas pero que no se requiere en células Vero o de riñón de hamster (8).

Se ha sugerido que genes virales que especifican productos cuyas funciones son idénticas e intercambiables con genes celulares, pueden ser no esenciales al menos en las células que expresan esta función (67).

### **Propiedades de fusión del HSV-1.**

Las cepas de HSV-1 aisladas en la naturaleza producen varios efectos citopáticos (ECP) en cultivos celulares. Entre estos se encuentra el redondeamiento de células sin adhesión o fusión, el redondeamiento celular con ligera adhesión y la fusión de las células en policariocitos (sincitios) (17).

El ECP está relacionado con el tipo de placa que produce el virus. La capacidad para producir un determinado efecto citopático radica en el genoma del HSV, pero la célula huésped puede alterar o regular la expresión fenotípica (47).

Los aislados clínicos de HSV generalmente no exhiben la capacidad de fusionar los cultivos celulares aunque se han reportado ocasionalmente cepas aisladas de pacientes que inducen fusión celular (72). Sin embargo variantes de HSV-1 que inducen fusión pueden ser aisladas durante la propagación del virus *in vitro*, tal es el caso de las cepas aisladas por Roizman y colaboradores (17,31), quienes obtuvieron virus que inducen fusión a partir de virus que no lo hacen.

También se ha visto que las cepas que producen fusión pueden mutar espontáneamente y dejar de fusionar como resultado de la interacción entre el fenotipo viral y las propiedades genéticas y fisiológicas de la célula huésped (47).

La capacidad de inducir fusión celular es debido a una mutación no letal del HSV, el fenotipo resultante de tal mutación se le ha designado como Syn, mientras que Syn<sup>+</sup> denota el fenotipo silvestre de no fusionar. La expresión del fenotipo mutante puede ser célula-dependiente ya que virus que son Syn en unas células, son Syn<sup>+</sup> en otras (72).

Se ha reportado que el fenotipo Syn de la cepa MP del HSV-1 es el resultado de un mínimo de dos mutaciones segregables: el locus *syn1* permite fusionar células Vero pero no HEp-2 y el locus *syn2* permite fusionar muchos tipos de células. Ambos locus se han mapeado en la región de 0.68 a 0.82 del genoma de HSV-1. La cepa MP de HSV-1 es gC<sup>-</sup>, por lo que se sugiere que la ausencia de la glicoproteína gC es en parte responsable del fenotipo Syn (72).

Aunque la penetración y la fusión celular implican la fusión de membranas, estos son procesos que se llevan a cabo y se regulan de manera diferente. Para entrar a la célula el virus requiere de las proteínas gC, gG y gB, mientras que para la formación de sincitios requiere de las proteínas gD, gE, gI, gK, gM y el dímero gHgL (7,11,49,72,73). Al parecer

gK tiene un papel en controlar la fusión celular inducida por el virus, ya que la sustitución de un sólo par de bases en su gen es responsable del fenotipo Syn de la cepa MP del HSV-1 (73).

### **Interacciones del HSV-1 con los macrófagos.**

Los fagocitos mononucleares que incluyen a los monocitos circulantes y a los macrófagos (M $\phi$ s) tisulares, parecen tener un papel central en la resistencia inespecífica del huésped contra los virus.

Se han definido dos mecanismos generales de resistencia mediada por M $\phi$ s: 1) La *resistencia extrínseca*, definida como la capacidad de los M $\phi$ s para inactivar virus extracelular, inhibir la replicación viral en las células cercanas que son permisivas a la infección viral o destruir a las células infectadas. 2) La *resistencia intrínseca*, que es la capacidad del macrófago (M $\phi$ ) para inhibir la replicación viral dentro del M $\phi$  mismo (51,86).

La resistencia extrínseca contra las infecciones de HSV-1 se lleva a cabo a diferentes niveles, pero para que esto suceda primero deben activarse los M $\phi$ s. Tanto en humanos como en ratones, los M $\phi$ s de organismos jóvenes son menos resistentes a la infección que los M $\phi$ s de adultos (79,86). Una vez activados pueden inhibir la diseminación del virus; producir aberraciones en la síntesis de DNA, RNA y proteínas de la célula blanco, afectando la replicación del HSV-1 que requiere de proteínas celulares. El mecanismo de inhibición de la replicación no es muy claro, sin embargo se ha involucrado la secreción de interferón (IFN)  $\alpha$  y  $\beta$  (86).

La resistencia intrínseca de los macrófagos se manifiesta en células no permisivas a la infección de los virus, uno de los procesos de resistencia intrínseca de importancia es el de los M $\phi$ s humanos, de ratón y de conejo contra el HSV-1 (34,51,70,86).

Los M $\phi$ s peritoneales de ratones son virtualmente no permisivos a la replicación del HSV-1, a pesar de que la entrada del HSV-1 es tan eficiente como en las células permisivas. El mecanismo por el cual se lleva a cabo esta inhibición no se ha elucidado completamente pero se sabe que el bloqueo se presenta antes de la síntesis del DNA del HSV-1. Sin embargo, se ha observado la expresión de algunos genes. La mayor inhibición en la expresión de proteínas se presenta en los genes tempranos  $\beta$ , donde se ha reportado una mínima expresión de las proteínas de estos genes (43,74,86). Al no expresarse correctamente los genes  $\beta$ , la expresión de las proteínas de los genes tardíos no se detecta (52). La disfunción de algunas de las proteínas  $\alpha$  inmediatas tempranas también parece jugar un papel en la no permisividad de los M $\phi$ s peritoneales. Tal es el caso de la ICP0 que funciona ineficientemente y no activa adecuadamente a los promotores de los genes tempranos, aunque se ha demostrado que ICP0 no es esencial para la replicación del virus en cultivos celulares (86). Otro factor que puede influir en la no permisividad de los M $\phi$ s al HSV-1 es el IFN, ya que los M $\phi$ s son continuamente activados por el IFN  $\alpha$  y  $\beta$  (51).

Al igual que en los ratones, se ha observado que cultivos primarios de monocitos humanos pueden ingerir y degradar al HSV-1 y no ser permisivos a la replicación del virus. Los M $\phi$ s alveolares de humanos son extremadamente resistentes a la infección por el HSV-1 y al parecer el bloqueo ocurre en la fase temprana de la replicación como en los ratones

(86). También se ha estudiado el efecto del IFN  $\alpha$  y  $\beta$  en M $\phi$ s humanos. Se ha observado que al tratar las células con IFN hay una inhibición de proteínas  $\beta$  y  $\gamma$ , así como de la proteína ICP4 (14). Sin embargo el papel del IFN en la resistencia intrínseca de los M $\phi$ s varía dependiendo del tipo de M $\phi$ s analizados ya que se ha observado que la restricción en la síntesis de las proteínas virales depende del tejido del cual los M $\phi$ s son aislados (70,86).

La activación, maduración o diferenciación de los monocitos tiene un profundo efecto sobre la resistencia intrínseca contra el HSV-1, ya que existe una mayor permisividad a la infección cuando el monocito es activado o diferenciado (6,86).

El término maduración es utilizado de varias maneras, una es la que describe los cambios que tiene lugar el M $\phi$  cuando es cultivado *in vitro*, o el proceso que se presenta cuando el M $\phi$  inmaduro pierde su potencialidad para la división celular. Así tenemos que monocitos o M $\phi$ s que son cultivados *in vitro* por espacio de varios días se vuelven susceptibles a la infección por HSV-1 (2,74,86).

Algunos de los cambios estudiados durante la propagación *in vitro* de los M $\phi$ s es la expresión de antígenos celulares. Se ha observado que el 1% de M $\phi$ s humanos cultivados *in vitro* por 24 horas no expresan el antígeno Ia, mientras que al ser propagados por varios días, más del 80% expresan Ia y las células son permisivas a la infección por el HSV-1. Esto mismo sucede con leucocitos, lo que podría indicar que el HSV-1 es capaz de replicarse en diferentes células de la sangre y que la expresión del antígeno Ia es un marcador para que el virus sea capaz de replicarse (5). Otra proteína estudiada es la ICP4 ya que el tratamiento de ratones con inmunomoduladores (vacuna de *S. typhimurium* o *C. parvum*) o agentes inflamatorios (caldo de tioglicolato), producen M $\phi$ s activados que muestran un aumento en la permisividad a la infección debido a que se eleva la expresión de la proteína ICP4 (23,51).

La variabilidad en la resistencia intrínseca de los M $\phi$ s es un obstáculo para su estudio, ya que se tienen ejemplos donde en la misma población de M $\phi$ s sólo el 15% expresa ICP4 y sintetizan mRNAs virales, mientras que el resto de los M $\phi$ s no la expresa y no son permisivos (52).

La heterogeneidad de los M $\phi$ s y la dificultad para obtener suficientes células de un aislamiento primario ha propiciado el desarrollo de líneas celulares similares a macrófagos (28,36). Tanto en líneas celulares similares a macrófagos humanas como de ratón, se ha estudiado el efecto de la diferenciación/activación sobre la resistencia intrínseca contra HSV-1. En general, la diferenciación aumenta la permisividad de los M $\phi$ s a la infección con HSV-1 (6). Por ejemplo, las células similares a macrófagos U937 son muy resistentes a la infección de HSV-1. Sin embargo, después de ser diferenciadas por la exposición a acetato mirístico de forbol (PMA) o vitamina D<sub>3</sub>, aumenta la síntesis de proteínas virales y la producción de virus infeccioso. También, se han encontrado bajos niveles de vRNA en las células no diferenciadas, lo que sugiere que el bloqueo en la replicación del HSV-1 ocurre después del transporte del vDNA al núcleo pero antes de la acumulación de los vRNA que codifican a los genes  $\alpha$  (79,80).

El HSV-1 puede quedar en forma persistente en células U937 no diferenciadas hasta que el bloqueo en la replicación es removido por la diferenciación de las células (76,80). Por lo que existe la posibilidad de que los M $\phi$ s puedan hospedar al HSV-1 y después transmitirlo cuando son activados o diferenciados, lo cual sería de gran importancia en una infección latente o persistente del HSV-1 *in vivo*.

## Persistencia del HSV-1.

La infección a largo plazo (long-term infection), es la capacidad que tienen algunos virus para permanecer dentro de la célula huésped por tiempo prolongado. Se ha dividido en dos categorías: a) aquella en donde el virus infectivo está presente y puede aislarse del cultivo, llamada infección persistente o crónica; b) infecciones donde el genoma viral está presente pero normalmente no se producen virus infectivos excepto durante periodos intermitentes de reactivación, estas son llamadas infecciones latentes (1).

La persistencia puede ser a nivel de individuos o de células, ésta última es el establecimiento de infecciones persistentes en cultivos celulares, las cuales se pueden utilizar como modelos en el estudio de la persistencia.

Cuatro tipos de infecciones persistentes se han distinguido para los estudios *in vitro*. El primero llamado *cultivo acarreador*, en donde sólo una pequeña proporción de las células está infectada, estas células liberan virus y mueren, pero el virus liberado infecta un pequeño número de otras células. Un cultivo acarreador puede ser "curado" de la infección viral.

El segundo tipo es la *infección del estado constante* (steady-state), aquí el virus y las células se multiplican sin que se presente destrucción celular, en estos cultivos muchas o todas las células están infectadas, el virus se libera continuamente y la infección no puede ser curada.

El tercer tipo es la *persistencia intracitoplásmica*, en este caso no se detectan virus infectivos en el medio y la infectividad está asociada con estructuras intracitoplásmicas llevándose a cabo la diseminación por contacto de célula a célula.

Finalmente el cuarto tipo, el genoma viral es transportado en el núcleo celular de manera integrada por lo que es parecido a una *infección latente*(46).

Para que los virus puedan establecer una infección a largo plazo, deben cumplir tres condiciones: 1) regular su potencial lítico; 2) contar con un mecanismo para que el genoma viral se mantenga por largos períodos y 3) evadir la detección y eliminación por el sistema inmune del huésped. Para evadir el sistema inmune los virus cuentan con varios mecanismos entre los que destacan la variación antigénica y el establecimiento de la infección en células del sistema nervioso o del propio sistema inmune (1,46).

Algunos de los mecanismos que los virus citopáticos utilizan para establecer infecciones persistentes son: la producción de partículas defectivas interferentes (DI), generación de mutantes sensibles a temperatura, integración del genoma viral en el genoma celular y la participación del interferón (20).

Una gran cantidad de virus tanto de RNA como de DNA son capaces de establecer infecciones a largo plazo *in vivo*, así como en un gran número de cultivos celulares *in vitro* (1,46).

*In vivo* HSV-1 produce principalmente una infección latente en células neuronales de los ganglios sensoriales que inervan los sitios periféricos de la infección primaria (83). Sin embargo, también se ha observado que puede persistir en otros tejidos. Tal es el caso de las córneas de pacientes y animales con un historial de queratitis herpética (45,50,58); en linfocitos de pacientes con tumores urogenitales (37) y en células mononucleares de pacientes con infección recurrente de HSV-1 (38).

*In vitro* para el HSV-1 se han descrito varios cultivos celulares en donde la infección con

el virus da como resultado la supervivencia celular y el establecimiento de infecciones persistentes.

Los primeros reportes del establecimiento de una infección persistente *in vitro* por el HSV-1 se remontan al año de 1960 (84) y a la fecha se han obtenido infecciones persistentes con diferentes características.

Las infecciones persistentes por HSV-1 se han establecido en líneas de diversos tipos de células de mamíferos: fibroblastos (9,16,24,25,50,55,84), derivadas de linfomas (26,35,57,61), neuronales (12,13), y del sistema inmune (10,15,60,68,76).

Algunas de las características encontradas en las infecciones persistentes por HSV-1 establecidas *in vitro*, se describen a continuación.

El establecimiento de una infección persistente por HSV-1 puede obtenerse de manera espontánea (9,10,16,18,24,55,61) o con la ayuda de diversos factores como el interferón  $\alpha$  y  $\beta$ , la hidrocortisona o los anticuerpos (15,57,84).

Generalmente se obtiene un estado dinámico, es decir hay una constante producción de virus, lo cual en algunos sistemas tiene un patrón cíclico y en otros no (24,48,55). Se pueden presentar períodos de crisis celular, con un aumento de la replicación viral y del efecto citopático, el cual en casos muy severos puede ocasionar la pérdida del cultivo (10,16,26,48).

Durante la persistencia se puede llegar a perder la producción de virus y esto puede ocurrir de manera espontánea (16,55) o inducida (26,56). La ausencia de virus determina el estado estático y este puede ser a veces permanente sin poder revertir al estado dinámico (10,56).

También suele ocurrir la "curación" de los cultivos persistentemente infectados con HSV-1, esto es, la eliminación del virus del cultivo y por consiguiente de la infección persistente, este proceso se ve favorecido por el uso de anticuerpos contra HSV-1 (10,56), aunque otras veces esto no sucede (24). Otra sustancia con la cual se puede curar un cultivo persistente es el IFN  $\alpha$  (48).

Como se puede ver no existe un patrón definido en una infección persistente con el HSV-1, características que se presentan en un modelo pueden o no presentarse en otro o encontrarse de manera diferente o contraria.

El mecanismo por el cual HSV-1 establece y mantiene una infección persistente no se ha elucidado completamente. Al contrario de los mecanismos encontrados con otros virus, en general no existe la producción de partículas defectivas interferentes (10,26,48,55). Tampoco se ha visto que el interferón tenga un papel importante en el establecimiento de la infección persistente (10,26,61). La generación de mutantes sensibles a temperatura ( $t_s$ ) puede o no producirse (10,26,48).

En los cultivos persistentes de virus generalmente se establece un equilibrio dinámico virus-célula (1,87), el HSV-1 no es la excepción y también se presenta este equilibrio, el cual se encuentra influenciado por el estado fisiológico de las células (16,56) y por el grado de permisividad a la infección viral (57,80). En esta adaptación existe una evolución tanto de la célula como del virus. Las células pueden presentar cambios como una disminución en la velocidad del crecimiento celular (9) o volverse menos susceptibles a la infección (16,24,25). Así mismo los virus pueden o no alterar su virulencia (10,25,68).

Como se ve en la infección persistente por el HSV-1 intervienen muchos factores, mecanismos e interacciones que no se han aclarado completamente, es por esto, que el

estudio de las infecciones persistentes por HSV-1 es de gran interés ya que todavía se pueden generar conocimientos que nos ayuden a entender los procesos patológicos del virus.

### **Cambios del HSV-1 durante la persistencia.**

Muchos investigadores han reportado que los virus aislados a partir de infecciones persistentes difieren en sus propiedades biológicas con respecto al virus que se utilizó originalmente para establecer la infección persistente. La evolución de la población viral es un fenómeno bien estudiado (1,87).

En el caso del HSV-1 se han reportado cambios en los virus aislados a partir de varios cultivos persistentes, estos cambios pueden estar involucrados en el establecimiento de la persistencia o ser una consecuencia de ella. Dentro de estos cambios se ha observado un aumento en la virulencia de los virus obtenidos de infecciones persistentes en las células: Raji, BJAB, linfoblastoides T humanas y de hamster chino (10,25,35). Además en las células Raji, BJAB y de hamster chino, los virus aislados presentan un aumento en el tamaño de la placa (25,35). Sin embargo, en virus obtenidos de células linfoblastoides se encontró una disminución en el tamaño de la placa (10,68). La generación de mutantes virales sensibles a temperatura sólo se ha descrito en un cultivo persistente de linfoblastos (10).

Otra característica que presenta cambios en los virus aislados de infecciones persistentes es su capacidad de producir sincitios. La mayoría de las cepas de HSV-1 no inducen la fusión celular (Syn<sup>+</sup>), pero durante una infección persistente a partir de estos virus se han aislado virus que inducen la fusión (Syn) (35,78). Aunque también se ha encontrado el efecto contrario, cepas Syn que se convierten en Syn<sup>+</sup> (48).

Estos cambios en el fenotipo viral deben estar acompañados por cambios en el genotipo, aunque solo dos autores lo han investigado, quienes encontraron que los virus aislados de infecciones persistentes presentan cambios en la secuencia del ADN (35,78). Al variar la estructura primaria del ADN es posible encontrar cambios en el patrón electroforético de las proteínas virales, este hecho se ha observado en los virus aislados de una infección persistente en células MDBK (48). Sin embargo, los virus obtenidos en células linfoides no presentan cambios en el patrón electroforético a pesar de presentar variaciones en el fenotipo (68).

Como se puede ver no hay un patrón establecido para la variación en las propiedades de los virus de HSV-1 obtenidos durante una infección persistente y esto tal vez depende de la cepa viral utilizada y la línea celular donde se estableció la infección persistente.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para profundizar en el estudio de las infecciones persistentes mediadas por el virus herpes simplex tipo 1, se planteo la siguiente pregunta:

¿Es posible obtener un cultivo celular persistentemente infectado por el HSV-1 en células que no forman parte del sistema nervioso pero que sean importantes en el proceso de la infección viral?

## HIPOTESIS

El HSV-1 puede establecer una infección persistente en células similares a macrófagos.

## OBJETIVOS

Para el estudio se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estudiar la permisividad al HSV-1 de una línea murina de células similares a macrófagos (P388D1).
2. Establecer una infección persistente por el HSV-1 en las células P388D1.
3. Estudiar las siguientes características del cultivo persistente:
  - a) Producción de virus extracelular.
  - b) Presencia de antígenos virales en las células.
  - c) Número de células productoras de virus infectivo.
  - d) Expresión de proteínas virales en las células persistentemente infectadas.
4. Aislar virus producidos durante la infección persistente y estudiar las siguientes propiedades biológicas:
  - a) El efecto citopático producido.
  - b) El tamaño de la placa.
  - c) El patrón electroforético de las proteínas virales.

Con estos objetivos se pretende investigar si el HSV-1 puede infectar persistentemente células que participan en la respuesta inmune y si al hacerlo sufre algún cambio.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Para profundizar en el estudio de las infecciones persistentes mediadas por el virus herpes simplex tipo 1, se planteo la siguiente pregunta:

¿Es posible obtener un cultivo celular persistentemente infectado por el HSV-1 en células que no forman parte del sistema nervioso pero que sean importantes en el proceso de la infección viral?

## **HIPOTESIS**

El HSV-1 puede establecer una infección persistente en células similares a macrófagos.

## **OBJETIVOS**

Para el estudio se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estudiar la permisividad al HSV-1 de una línea murina de células similares a macrófagos (P388D1).
2. Establecer una infección persistente por el HSV-1 en las células P388D1.
3. Estudiar las siguientes características del cultivo persistente:
  - a) Producción de virus extracelular.
  - b) Presencia de antígenos virales en las células.
  - c) Número de células productoras de virus infectivo.
  - d) Expresión de proteínas virales en las células persistentemente infectadas.
4. Aislar virus producidos durante la infección persistente y estudiar las siguientes propiedades biológicas:
  - a) El efecto citopático producido.
  - b) El tamaño de la placa.
  - c) El patrón electroforético de las proteínas virales.

Con estos objetivos se pretende investigar si el HSV-1 puede infectar persistentemente células que participan en la respuesta inmune y si al hacerlo sufre algún cambio.



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Para profundizar en el estudio de las infecciones persistentes mediadas por el virus herpes simplex tipo 1, se planteo la siguiente pregunta:

¿Es posible obtener un cultivo celular persistentemente infectado por el HSV-1 en células que no forman parte del sistema nervioso pero que sean importantes en el proceso de la infección viral?

## **HIPOTESIS**

El HSV-1 puede establecer una infección persistente en células similares a macrófagos.

## **OBJETIVOS**

Para el estudio se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estudiar la permisividad al HSV-1 de una línea murina de células similares a macrófagos (P388D1).
2. Establecer una infección persistente por el HSV-1 en las células P388D1.
3. Estudiar las siguientes características del cultivo persistente:
  - a) Producción de virus extracelular.
  - b) Presencia de antígenos virales en las células.
  - c) Número de células productoras de virus infectivo.
  - d) Expresión de proteínas virales en las células persistentemente infectadas.
4. Aislar virus producidos durante la infección persistente y estudiar las siguientes propiedades biológicas:
  - a) El efecto citopático producido.
  - b) El tamaño de la placa.
  - c) El patrón electroforético de las proteínas virales.

Con estos objetivos se pretende investigar si el HSV-1 puede infectar persistentemente células que participan en la respuesta inmune y si al hacerlo sufre algún cambio.

## MATERIAL Y METODOS

**Virus.** Se trabajó con el HSV-1 cepa Macroplaque (MP) (31), donada por el Dr. Bernard Roizman. El virus se propagó en células Vero (37°C/5% de CO<sub>2</sub>) con medio mínimo esencial de Eagle (MEM) (Gibco BRL), suplementado con: 2% de suero fetal de bovino (SFB), previamente inactivado con calor (30 min/56°C); antibióticos (penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100mg/ml) y 10mg/ml de anfotericina B (Sigma Chemical Co.).

Se obtuvieron virus del pase 47 y 60 de los cultivos persistentemente infectados, que se nombraron como HSV<sub>A</sub> y HSV<sub>B</sub> respectivamente, ver en Resultados.

**Células.** La línea celular utilizada fue la P388D1, una línea continua de células similares a macrófagos obtenida a partir de ratones DBA/2 (ATCC TIB63) (36), cortesía del Dr. A. Tingle, Universidad de Columbia Británica, Vancouver, Canadá. Las células se crecieron a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> en medio RPMI 1640 (Gibco BRL), suplementado con: 10% de SFB inactivado con calor; antibióticos (penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100 mg/ml) y 0.00001% de β-mercaptoetanol.

Células Vero originarias del ATCC (CCL 81), se propagaron a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> en medio MEM suplementado con 10% de SFB y antibióticos.

**Anticuerpos.** Se obtuvieron anticuerpos policlonales anti-HSV-1 en conejo. Conejos Nueva Zelanda se inyectaron intradérmicamente con 0.5ml de una suspensión viral purificada en gradiente de sacarosa 20-60%, que tenía un título de 2X10<sup>4</sup> unidades formadoras de placa (ufp)/ml y un contenido proteico de 300µg. La suspensión viral se mezcló con un volumen igual de adyuvante completo de Freund. Se dieron dos refuerzos intramusculares de 200µg de la misma suspensión viral con adyuvante incompleto después de la tercera y sexta semanas. El suero se colectó ocho días después de la última inyección y se inactivó con calor. Los anticuerpos se titularon por microneutralización en monocapas de células Vero como lo describe García-Barreno y col. (21), el título del suero obtenido fue de 1X10<sup>5</sup> ufp/ml neutralizadas.

También se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo anti-HSV-1 cepa F, específicos para proteínas de células infectadas (ICP) y antígenos estructurales tardíos de Chemicon International, Inc. Temecula, CA.

**Establecimiento de la persistencia.** Monocapas de células P388D1 con aproximadamente 10<sup>6</sup> células, se lavaron tres veces con PBS y posteriormente se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) de 0.001 ó 0.01. Después de 1h de incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, el virus no adsorbido se retiró y se agregó medio RPMI 1640 sin suero y con antibióticos, el cultivo se mantuvo con un cambio de medio diario durante cinco días. Posteriormente, las células que sobrevivieron a la infección se subcultivaron cada 2 ó 3 días a una relación de 1:2, haciendo diario un cambio de medio con 10% de suero. En cada pase se recolectó el sobrenadante para titular el virus extracelular. A las células que sobrevivieron se les denominó P388D1per, ver Resultados.

**Clonación de virus.** Antes de su propagación el HSV-1 fue clonado por dos aislamientos sucesivos a partir de una placa obtenida en células Vero. Monocapas de células Vero se infectaron con diluciones de la suspensión viral, el inoculó se retiró a los 30 min y se agregó medio con 0.7% de agar (Difco), las placas se obtuvieron a las 72 h después de la infección.

**Titulación de virus.** La titulación de las suspensiones virales o de los sobrenadantes recuperados se realizó mediante un ensayo de TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infectious dose: dosis que infecta el 50% de un cultivo de tejido) o por ensayo en placa. Para el TCID<sub>50</sub> se hicieron diluciones seriadas 1:3 de los sobrenadantes y se agregaron a placas de 96 pozos (Costar Co., Cambridge MA.), que contenían monocapas de células Vero. Después de 1h de adsorción a 37°C/5% de CO<sub>2</sub>, se retiró el inoculo y se agregó medio sin suero. Las placas se incubaron por 3 días y se fijaron con formaldehído al 10% en PBS y se tiñeron con cristal violeta al 0.1% en metanol al 20%. El título viral se calculó por el método de Reed y Muench (59) y se expresó como TCID<sub>50</sub>/ml.

El ensayo en placa se llevó a cabo sobre monocapas de células Vero en placas de 6 pozos (Costar Co., Cambridge MA.), se hicieron diluciones seriadas 1:5 o 1:10 de las suspensiones virales y se agregaron 200µl de cada dilución en los pozos, se dejaron adsorber por 1h, después de este tiempo cual se retiró el inoculo y se agregó medio con 0.7% de agar. A los cinco días de incubación se agregó una solución fresca de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro: Azul Tiazolil) (Sigma Chemical Co.) 3mg/ml y se contaron las placas. El título viral se expresó como ufp/ml.

**Clonación de células.** Las células P388D1 persistentemente infectadas se clonaron utilizando el método de dilución límite. Diluciones seriadas 1:3 de las células se agregaron a placas de 96 pozos hasta que se tuvieron de 2-10 células por pozo. Después de tres semanas se tenía un cultivo confluyente de aproximadamente 10<sup>6</sup> células.

**ELISA.** El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), se llevó a cabo en placas de 96 pozos donde se agregaron 10<sup>5</sup> células P388D1 persistentemente infectadas por pozo y se incubaron por 24h en medio con suero. Posteriormente se lavaron con PBS y se fijaron por 15 min con formaldehído al 3%, para inactivar la peroxidasa endógena se agregó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.5% en metanol por 15min. Los pozos se lavaron y saturaron con albúmina sérica bovina (ASB) al 1% o suero de cabra sin diluir, durante 2h a 37°C o toda la noche a 4°C. A continuación se agregaron 200µl de una dilución 1:100 de los anticuerpos policlonales de conejo anti-HSV-1 producidos en el laboratorio y se incubó por 1h a 37°C, después de lo cual se adicionaron 100µl de una dilución 1:1000 de anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, UK.) y se incubó por 1h a temperatura ambiente. Cuando el ensayo se midió espectrofotométricamente, se adicionó como sustrato 100µl de o-fenilendiamina al 0.04% con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.05% en amortiguador de fosfato-citrato 0.15 M, pH 5.5, la mezcla de reacción se incubó de 5 a 10 min a temperatura ambiente y se detuvo la con 50µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M. La absorbancia a 490nm se determinó en un espectrofotómetro de Bio-Tek Instruments (California, EUA), se calculó la absorbancia neta restando la densidad óptica (D.O.) de las células no infectadas a la D.O. de las células persistentemente infectadas. Los valores obtenidos son un promedio de tres determinaciones.

La visualización del antígeno viral se realizó agregando como sustrato 100µl de 3-3 diaminobenzidina al 0.05% con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.02% en Tris-HCl 0.2 M pH 7.6, la mezcla de reacción se incubó de 5 a 10 min a temperatura ambiente y se paró lavando con PBS, posteriormente se observó al microscopio.

**Inmunofluorescencia (IF).** Se examinaron las células persistentemente infectadas para detectar antígenos mediante IF indirecta y directa. Para la IF indirecta 10<sup>5</sup> células se crecieron en portaobjetos de 8 pozos para cultivos de tejidos (Costar Co., Cambridge MA.),

por 24h. Los cultivos se lavaron de manera extensa con PBS y se fijaron por 5 min con metanol frío seguido por 30 seg con acetona fría, después de secarse las células se incubaron con ASB al 1% en PBS por 1h a 4°C o suero de caballo sin diluir por toda la noche. Las preparaciones se incubaron con anticuerpos policlonales anti-HSV-1 de conejo diluidos 1:10 con ASB al 2.5% por 1h a temperatura ambiente. A continuación se agregaron anticuerpos anti-Ig de conejo conjugados con fluoresceína (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, UK.), por 30 min a temperatura ambiente, finalmente se lavaron con PBS y agua y se examinaron en un microscopio Nikon equipado con luz UV.

Para la IF directa se utilizó el kit "Syva Microtrak HSV1/HSV2 Culture Identification/Typing Test" de Syva Company, Palo Alto, CA., y se utilizó bajo las condiciones recomendadas por el fabricante. La prueba contiene anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente contra el HSV-1 y que están marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC). El anticuerpo que se utilizó contra el HSV-1 es un anticuerpo monoclonal (Acm) obtenido a partir de la cepa F humana y que es específico contra el complejo de la glicoproteína gC. El porcentaje de células fluorescentes se determinó en tres preparaciones diferentes del mismo pase y se obtuvo un promedio.

**Ensayo de centros de infección.** En este ensayo las células persistentemente infectadas se resiembran sobre monocapas de células permisivas para detectar si están produciendo virus infeccioso. El ensayo se realizó sobre monocapas de células Vero crecidas en placas de 24 pozos. Las células persistentemente infectadas se lavaron 40 veces con PBS para eliminar el virus extracelular. Después del lavado las células se desprendieron de la caja de petri con una pipeta y se realizaron diluciones seriadas 1:3 en medio RPMI 1640 con 1% de SFB. A cada pozo se le agregaron 100µl de una dilución determinada. La mezcla se incubó por 1h y se cubrió con 200µl de medio MEM con 1% de SFB y 0.7% de agar, se dejó incubar por 5 días. Los cultivos se tiñeron con MTT o se fijaron con formaldehído y se tiñeron con cristal violeta. El porcentaje de células que liberan virus infeccioso se calculó haciendo un promedio de tres determinaciones del mismo pase.

**Reinfección de cultivos persistentes.** Cultivos persistentes se re infectaron con el virus original a una MOI de 40, después de 1h de adsorción el inóculo se retiró y se agregó medio nuevo sin suero. Los cultivos se siguieron subcultivando por varios pases.

**Determinación del tamaño de placa.** Placas de 6 pozos (Costar Co., Cambridge MA.) con monocapas de células Vero se infectaron con diluciones seriadas 1:10 del virus original o virus aislados de la infección persistente, se dejaron adsorber por 1h y después de retirar el inóculo se cubrieron con medio con 0.7% de agar y se incubaron por 5 días. Se determinó el tamaño de 30 placas teñidas con MTT.

**Estudio del efecto citopático.** El efecto citopático (ECP), originado por el HSV-1 o los virus recuperados de la infección persistente se examinaron sobre monocapas de células Vero o P388D1 después de 48h de infección con una MOI de 1.0.

**Infectividad de las cepas virales.** Las cepas virales se propagaron en monocapas de las líneas celulares Vero y P388D1 a una MOI de 1.0. Las infecciones se siguieron hasta 96 horas post-infección y se tituló el virus extracelular mediante el ensayo de placa. La reducción en el título se calculó restando el logaritmo del título del virus original menos el logaritmo del título de las otras cepas virales. Los resultados obtenidos son un promedio de tres experimentos.

**Preparación de extractos celulares.** Monocapas de células Vero o P388D1 se infectaron con el HSV-1 o virus aislados de la infección persistente con una MOI de 1.0, 48h después de la infección las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en amortiguador de lisis (Tris-HCl 10mM pH 7.5; NaCl 140mM; EDTA 5mM; Tritón X-100 al 1% y deoxicolato de sodio al 1%), después de agitar en vortex se centrifugaron a 12,000xg por 5min, se separaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C hasta su uso. El contenido proteico se calculó por el método de Lowry (44).

**Western blot.** 40mg de extractos proteicos de células infectadas de forma lítica o persistente se separaron en un gel de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% a 100V. Las proteínas se transfirieron a una membrana Inmobilon (Millipore Co., Bedford, MA.) en un Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc.) a 4°C/300mA durante toda la noche (69). La membrana se saturó con leche en polvo sin grasa al 5% en PBS por 1h a temperatura ambiente, después de lo cual se agregaron los anticuerpos policlonales anti-HSV-1 de Chemicon International y se incubaron por 1h a temperatura ambiente. El complejo antígeno-anticuerpo se desarrolló utilizando anticuerpos anti-Ig de conejo biotilados, estreptavidina-peroxidasa y 4 cloro-naftol (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, UK.) (69).

**Electroforesis de extractos celulares radioactivamente marcados.** Monocapas de células P388D1 sin infectar, P388D1 infectadas líticamente (MOI 1.0/24h post-infección) y persistentemente infectadas se incubaron con medio MEM libre de metionina (Gibco BRL) por 2h, posteriormente se agregó medio sin metionina con 100µCi/ml de Tran<sup>35</sup>SLabel (ICN Cat. 5100605) y se incubaron por 4h. Las células se lavaron con PBS y se obtuvo el paquete de células a partir del cual se obtuvieron extractos celulares. Los extractos celulares se separaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%/150V, se pusieron 500,000 cpm de cada extracto. Después de teñir (azul Coomassie 0.05%; metanol 45%; ácido acético 7%) y desteñir (metanol 25%; ácido acético 7%) los geles, se incubaron 30 min en solución amplificadora Amplify (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, UK.), se secaron y finalmente se dejaron exponiendo en placas para rayos X (Kodak Co.) para obtener una autorradiografía.

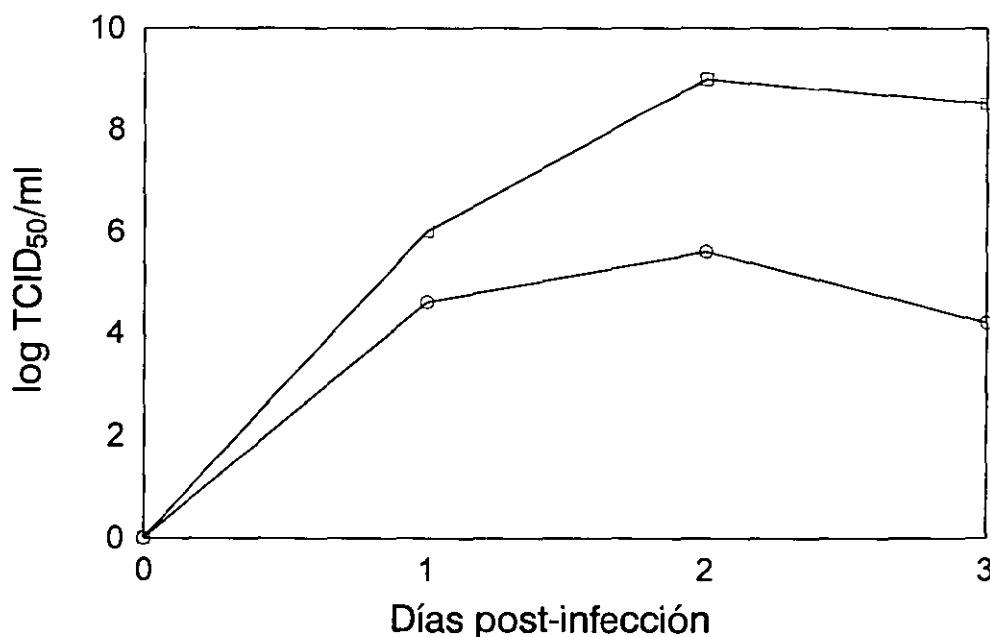
**Determinación de pesos moleculares (PM).** Para la determinación de los PM aparentes de las proteínas detectadas por Western blot y por las autorradiografías, estas se escanearon en un densitómetro Bio-Rad Mod. GS-670. Los datos se analizaron con ayuda del programa para computadora "Molecular Analyst" (Bio-Rad Laboratories).

## RESULTADOS

### I. Establecimiento y caracterización de los cultivos persistentes.

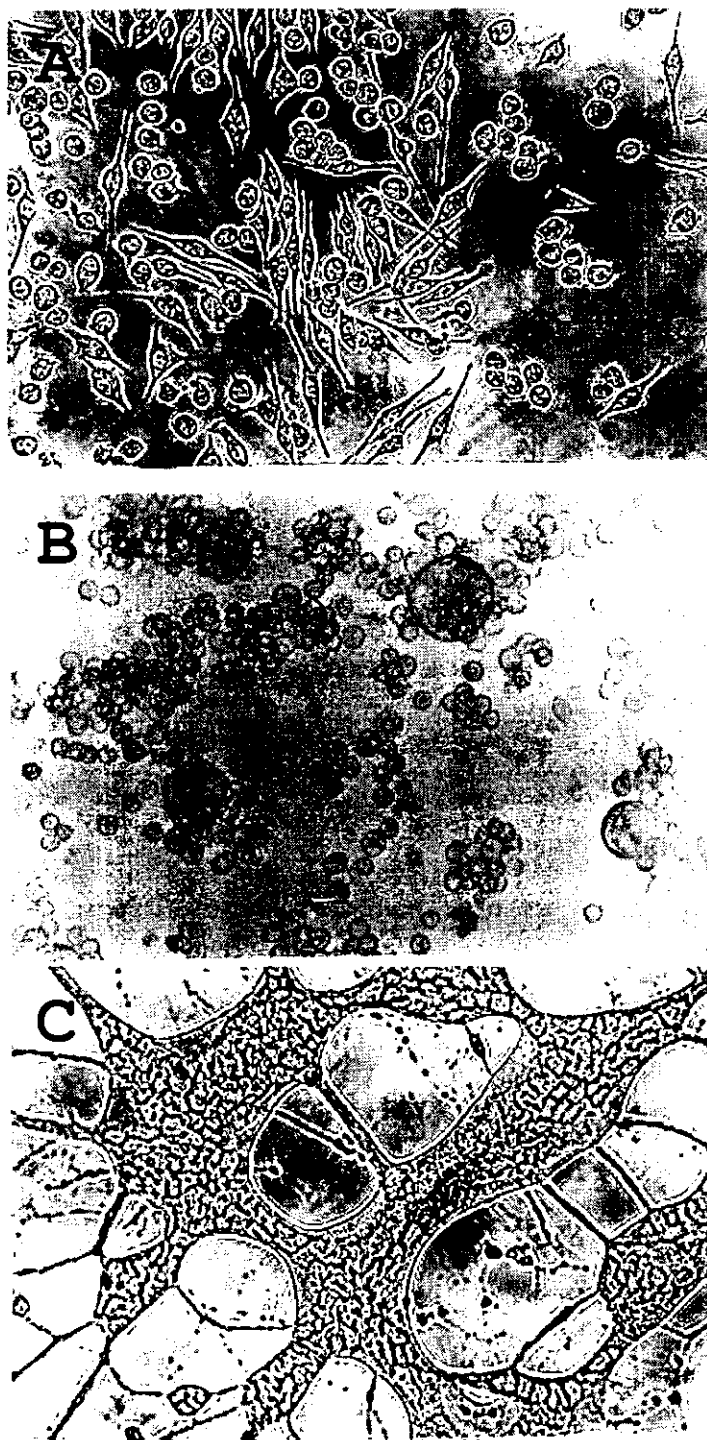
#### 1. Susceptibilidad de la línea celular P388D1 a la infección por HSV-1.

Cultivos semiconfluentes de células P388D1 y células Vero se infectaron con HSV-1 a una MOI de 1.0 y se determinó el título del virus extracelular. En la Figura 3 se muestra la cinética de replicación del HSV-1 en las células P388D1 y Vero. Se encontró que el HSV-1 replica en la línea P388D1 y se obtuvo un título máximo de producción de virus extracelular de  $10^{5.6}$  TCID<sub>50</sub>/ml a las 48h post-infección (p.i.). Sin embargo, este título es limitado si se compara con el que se produce en las células Vero, donde se llegó a tener un título máximo de  $10^{9.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml en el mismo tiempo. En ambos casos los cultivos sobrevivieron a la infección sólo por tres días.



**Figura 3. Cinética de replicación del HSV-1 en células P388D1 y Vero.** Células P388D1 (●) y Vero(□) se infectaron con la cepa MP del HSV-1 con una MOI de 1.0. Se determinó el título viral cada 24 horas por TCID<sub>50</sub>/ml.

La mayor producción viral en las dos líneas celulares se obtuvo a las 48 horas después de la infección, en este tiempo el virus causó un extenso efecto citopático, acompañado de destrucción celular.



**Figura 4. Efecto citopático del HSV-1 en células P388D1 y Vero.**(A) Células P388D1 sin infectar; (B) células P388D1+HSV-1, 48h p.i.; (C) células Vero+HSV-1, 48h p.i. (Aumento 40X). El efecto citopático observado en las células P388D1 y Vero es la formación de sincitios.

El ECP que se observó fue la formación de sincitios (Figura 4), este efecto es característico de la cepa MP del HSV-1. La fusión celular se notó claramente en las células Vero (Figura 4C), mientras que en las células P388D1 (cuya morfología normal se observa en la Figura 4A), aparte de la fusión también se observó el redondeamiento de las células (Figura 4B).

La susceptibilidad de los macrófagos a la infección por el HSV-1 se estudio de una manera más amplia al infectar las células con varias MOI, de 0.001 a 0.1 (Tabla 2). Conforme disminuyó la MOI, el título de virus extracelular también disminuyó, pero el porcentaje de células viables aumentó. Con una MOI de 0.1 el título máximo alcanzado fue de  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml al tercer día después de la infección (Tabla 2), además el cultivo sólo sobrevivió por cuatro días.

Al utilizar una MOI de 0.01 se observó al cuarto día un título máximo de  $10^{4.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml y el cultivo sobrevivió por ocho días.

Con una MOI de 0.001 el virus extracelular se empezó a detectar hasta las 72 horas post-infección, el título máximo que se obtuvo hasta el sexto día fue de  $10^{3.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml. El porcentaje de células viables permaneció elevado durante todo el tiempo, llegándose a tener un 89% de células viables al sexto día después de la infección. Los cultivos infectados con esta MOI sobrevivieron por largo tiempo.

También se observó que al disminuir la MOI utilizado, el ECP se fue haciendo menos evidente.

**Tabla 2. Replicación del HSV-1 en células P388D1 a diferentes MOI**

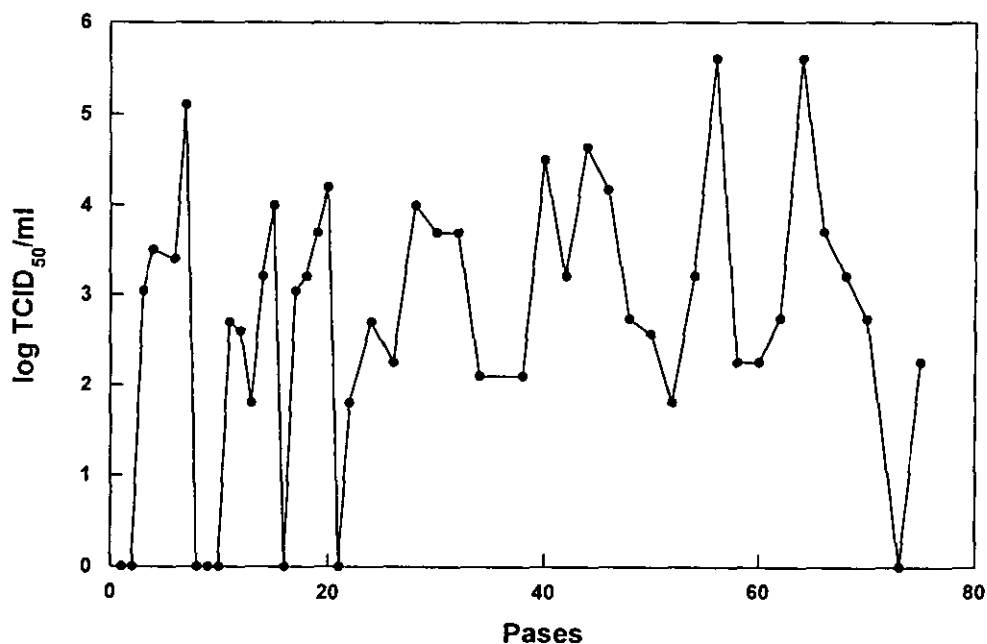
MOI	Días post-infección	Título viral log (TCID <sub>50</sub> /ml)	Células Viables %
1.0	1	4.6	62
	2	5.6	34
	3	4.2	0.25
0.1	1	2.6	90
	2	4.0	73
	3	4.5	27
	4	3.7	0.04
0.01	1	1.5	96
	2	3.0	74
	3	3.5	56
	4	4.0	65
	5	3.8	56
0.001	1	-	99
	2	-	85
	3	2.6	63
	4	2.7	79
	5	3.0	80
	6	3.0	89



## 2. Establecimiento de una infección persistente del HSV-1 en la línea celular P388D1.

Una vez que se determinó que el HSV-1 se replicaba en la línea P388D1, se procedió a establecer una infección persistente. La obtención de la infección persistente se estudió a MOIs de 0.001 y 0.01, ya que a una MOI más elevado los cultivos no sobreviven la infección.

No se utilizaron factores externos para establecer la infección persistente, es decir no se recurrió a sustancias o condiciones que alteraran el curso de la infección. Por lo que una vez infectados los cultivos semiconfluentes sólo se subcultivaron cada 2 o 3 días dependiendo de la confluencia del cultivo y en una relación de duplicación de 1:2. En cada pase se recolectaron los sobrenadantes para determinar la producción de virus extracelular infectivo mediante TCID<sub>50</sub>. El medio de cultivo se cambió todos los días desde el principio de la infección.

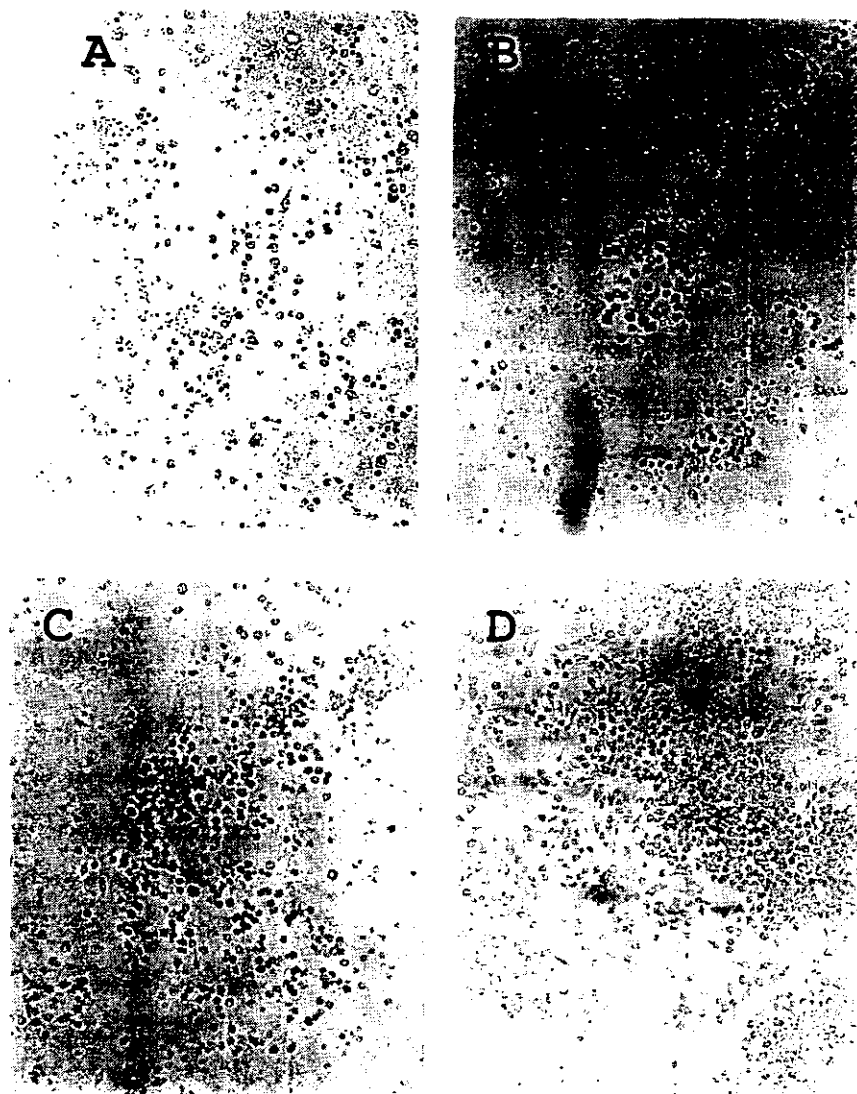


**Figura 5. Producción extracelular de HSV-1 en un cultivo de células P388D1 persistentemente infectadas.** Las células se infectaron con un MOI de 0.001 y se subcultivaron cada 2 o 3 días en una relación de 1:2. En cada pase se determinó el título viral de los sobrenadantes celulares.

En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos cuando la infección se realizó con una MOI de 0.001, la línea celular se subcultivo por más de 75 pases (160 días después de la infección), con una producción constante de virus extracelular infectivo.

La infección se caracterizó por una fluctuación cíclica del título de virus extracelular (0 a  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml), acompañado de la destrucción y reconstitución de la monocapa celular. Esto

es, se presentaron períodos de “crisis”, los cuales se caracterizaron por una producción elevada de virus extracelular, de  $10^4$  a  $10^5$  o más TCID<sub>50</sub>/ml, con la subsecuente destrucción de casi toda la monocapa celular, como se observa en la Figura 6A, quedando al final de la crisis sólo unas pocas células aisladas (Figura 6B), en este momento el título de virus extracelular llegó a reducirse hasta niveles no detectables o valores bajos. Al pasar los días las células se duplicaron (Figura 6C), hasta que finalmente se volvió a tener un cultivo semiconfluyente como se muestra en la Figura 6D, con el consiguiente aumento del título viral.

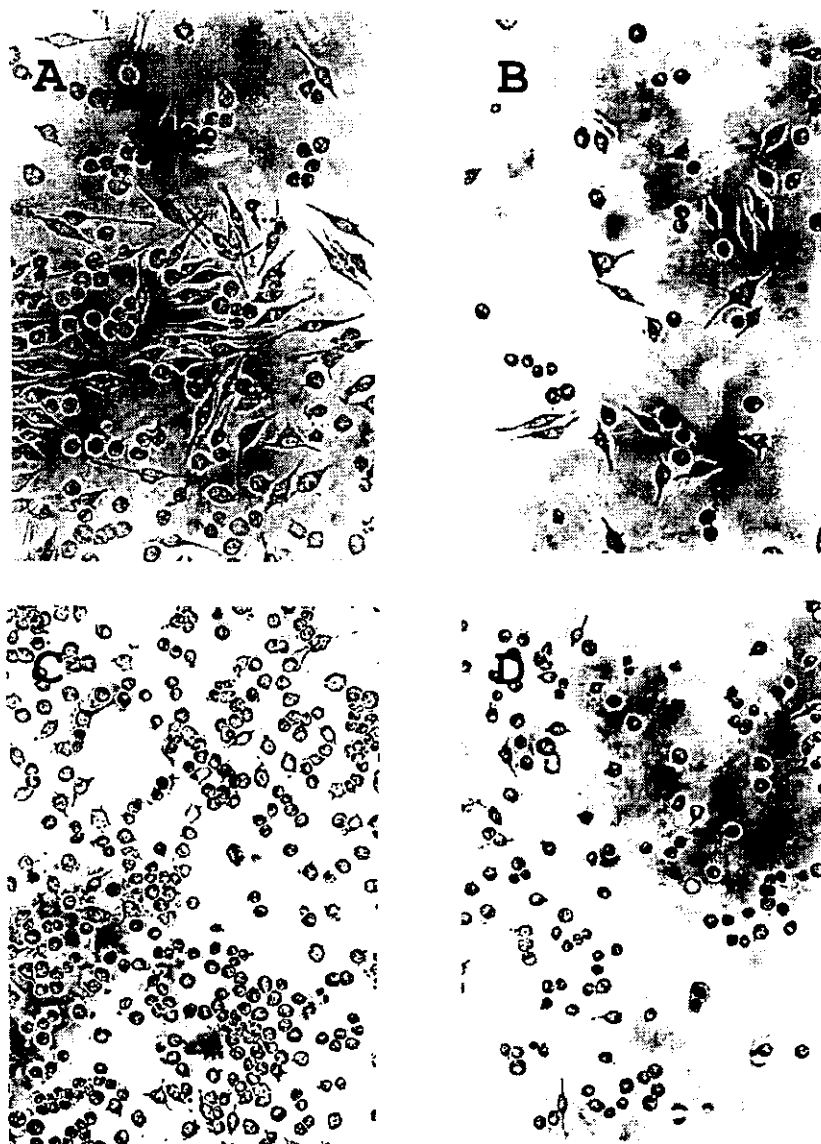


**Figura 6. Aspecto del cultivo P388D1per durante un período de crisis.** Aspecto que presentaba el cultivo P388D1per durante una crisis. (A) Cultivo en crisis; (B) dos días después de la crisis; (C) cuatro días después de la crisis; (D) siete días post-crisis. (Aumento 10X).

Durante los primeros 20 pases se observaron crisis muy severas, después de 60 días de persistencia las crisis se hicieron menos evidentes, sin embargo a los 160 días todavía se

observó otra crisis severa. Ocasionalmente, en los casos más severos el cultivo no lograba sobrevivir el periodo de crisis, lo que ocasionaba la pérdida del cultivo. En otras ocasiones una vez que se había recuperado el cultivo, se perdía de manera espontánea la producción de virus extracelular.

La apariencia morfológica de las células cambió conforme se fueron produciendo los pases, en el inicio de la infección las células eran visualmente indistinguibles de las células sin infectar, como se observa en la Figura 7A y B, conforme avanzaron los pases la proporción de células redondas fue mayor (Figura 7C y D). Sin embargo la velocidad de crecimiento no se modificó ya que el tiempo para duplicar los cultivos fue el mismo.

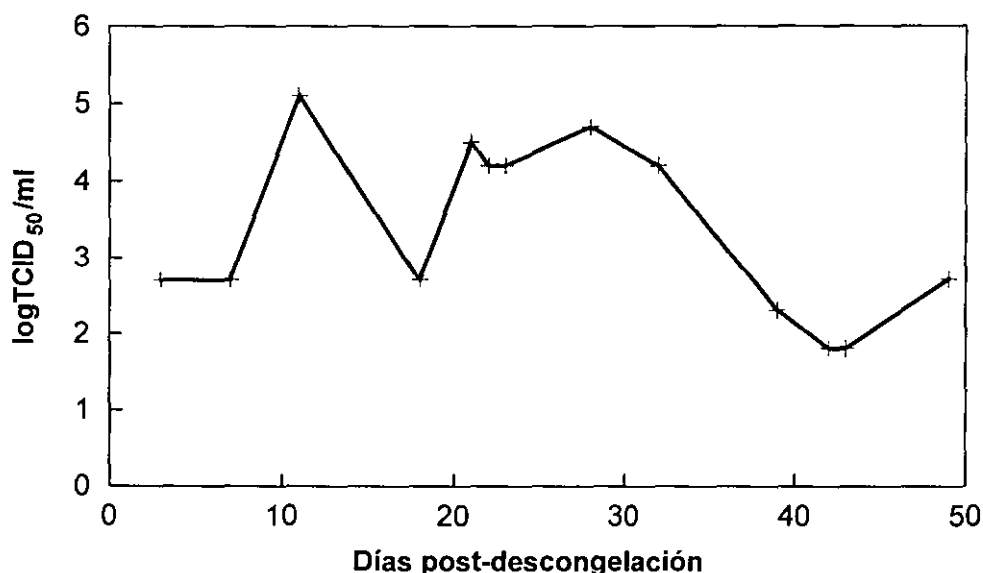


**Figura 7.** Aspecto morfológico de las células P388D1per después de varios pases. Las células P388D1per presentaron cambios en la morfología celular conforme avanzaron los pases. (A) Células P388D1; (B) pase 17; (C) pase 27; (D) pase 60. (Aumento 40X)

Este patrón cíclico no se vio modificado por la congelación y descongelación de las células, ya que si las células se congelaban a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un momento en el cual se encontraban produciendo virus extracelular y posteriormente se descongelaban, las células volvían a ser viables formando monocapas que continuaban liberando virus extracelular con los consiguientes periodos de crisis, como se observa en la Figura 8.

Todas las características mostradas por los cultivos persistentes se reprodujeron en varias infecciones independientes a bajas MOI.

Con estos experimentos se cumplió el primer requisito para la obtención de un cultivo persistente que es la producción de virus infectivo por largos periodos y múltiples pases. Las células que cumplieron este requisito se denominaron **P388D1per**.



**Figura 8. Producción de virus extracelular en células P388D1per sometidas a un proceso de congelación y descongelación.** Células P388D1per se sometieron a un proceso de congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  y posterior descongelación para ver si sufría alteración la infección persistente, encontrándose el mismo patrón cíclico de producción extracelular de virus.

### 3. Detección de antígenos virales en las células P388D1per.

Otra de las características que se espera tener en una infección persistente es la presencia de antígenos virales en las células infectadas. Para comprobar esto se procedió a detectar los antígenos virales por dos métodos, ELISA e inmunofluorescencia (IF).

Como se muestra en la Tabla 3, en el ELISA se determinó la absorbancia neta de varios de los pases del 1 al 44. En todos los casos se determinó una señal que mostró la presencia de

antígenos virales en las células P388D1per. En algunos pases como en el 11 y 13 no se detectó virus extracelular cuando se realizó el ensayo y sin embargo se tenía una clara señal de la presencia de antígenos virales, en estos casos la presencia de virus extracelular se detectó al siguiente pase.

Cuando el antígeno viral se visualizó mediante ELISA con peroxidasa y por IF indirecta, en los pases del 34 al 44, en todos ellos se observaron células que presentaban una señal positiva (Tabla 3). Las células control no infectadas fueron negativas a las determinaciones. En la Figura 9B se observa una típica señal de fluorescencia indirecta, en comparación con la falta de señal que se tenía en células sin infectar (Figura 9A).

La presencia de antígenos virales también se detectó por IF directa, en la Figura 9D se observa un campo característico de la fluorescencia que presentaron las células P388D1per por IF directa. Las células control no muestran señal (Figura 9C).

**Tabla 3. Expresión de antígeno viral en las células P388D1per**

Pase	Título de virus extracelular log (TCID <sub>50</sub> /ml)	Detección por ELISA <sup>a</sup>	Detección por IF indirecta
1	3.2	0.147±0.024	ND <sup>b</sup>
3	3.5	0.490±0.032	ND
4	4.4	0.516±0.025	ND
6	3.2	0.118±0.028	ND
11	- <sup>c</sup>	0.044±0.020	ND
13	-	0.119±0.022	ND
34	3.7	0.238±0.033	+ <sup>d</sup>
36	2.3	0.080±0.025	+
38	2.7	0.150±0.020	+
42	2.3	0.067±0.031	+
44	6.1	0.830±0.037	+

<sup>a</sup> Determinación espectrofotométrica, se indica la absorbancia neta (D.O. células P388D1per - D.O. células sin infectar).

<sup>b</sup> No determinado.

<sup>c</sup> No detectado

<sup>d</sup> Reacción positiva, por IF indirecta sólo se determinó la presencia de células con fluorescencia.

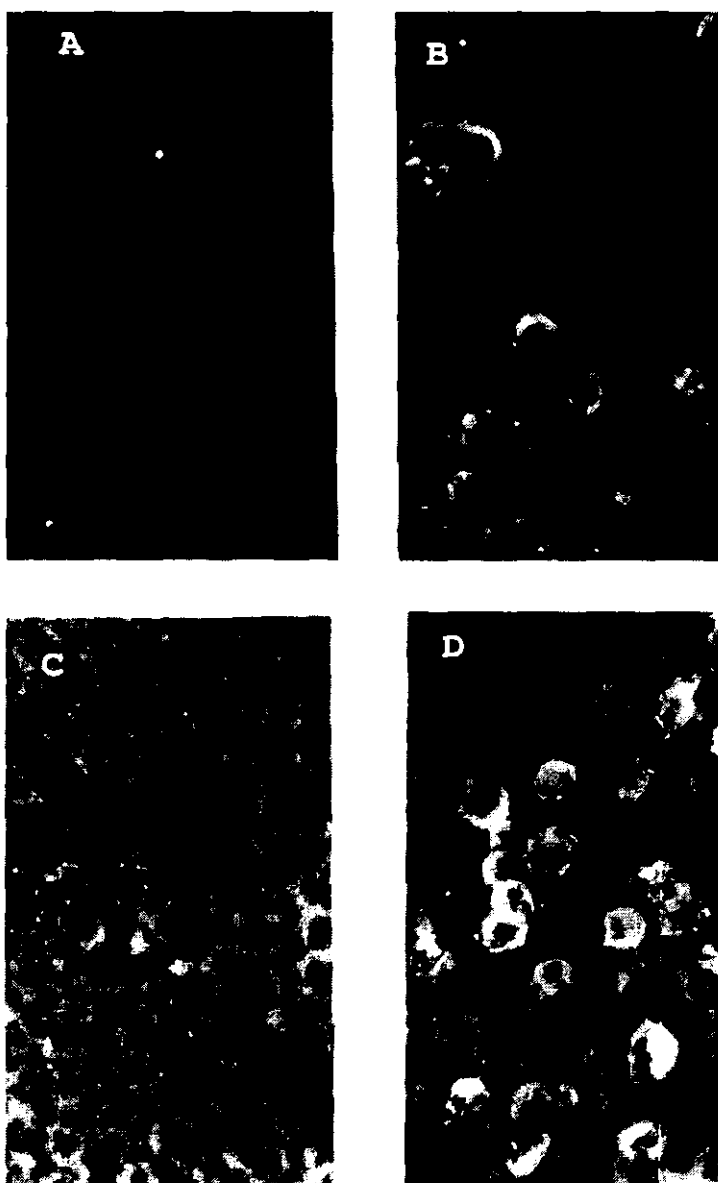
#### 4. Determinación del número de células P388D1per que producen virus infeccioso y que expresan antígeno viral.

Para determinar el porcentaje de células del cultivo persistente que producen virus infeccioso, se procedió a realizar ensayos de centros de infección. Este ensayo consiste en

determinar el número de células que liberan virus infeccioso al resembrar las células P388D1per sobre una monocapa de células susceptibles.

El ensayo se practicó a varios pases del 63 al 75, los cuales mostraron diferentes títulos de virus extracelular como se muestra en la Tabla 4, se puede apreciar que el porcentaje de células que producían virus infeccioso fue del 0.008 al 12.5%.

La cuantificación de células que presentaban antígenos virales se realizó mediante una IF directa. En la Figura 9D se muestra un campo típico de la IF directa que presentaron las células P388D1per, en comparación con las células P388D1 (Figura 9C). El porcentaje de células P388D1per que presentaron antígeno viral fue del 1.0 al 15%, como se muestra en la Tabla 4.



**Figura 9. Expresión del antígeno viral en las células P388D1per, detectado por inmunofluorescencia. IF indirecta de células P388D1 (A) y células P388D1per (B). IF directa de células P388D1 (C) y células P388D1per (D).**

**Tabla 4. Porcentaje de células que liberan virus infeccioso y que expresan antígeno viral, en diferentes pases de las células P388D1per.**

Pase	Título de virus extracelular log (TCID <sub>50</sub> /ml)	Células que liberan <sup>a</sup> virus infeccioso %	Células que <sup>b</sup> expresan antígeno viral %
63	4.2	2.6±0.40	ND <sup>c</sup>
64	1.8	0.008±0.002	ND
66	4.7	ND	15.0±0.80
68	2.7	0.05±0.03	1.0±0.42
70	5.5	11.0±0.50	10.0±0.62
71	4.8	5.6±0.45	ND
72	4.7	9.0±0.30	7.8±0.38
73	4.6	4.1±0.60	ND
74	4.6	7.9±0.72	4.5±0.30
75	3.7	12.5±0.64	ND

<sup>a</sup> Determinado por el ensayo de centros de infección.

<sup>b</sup> Determinado por IF directa, se indica el número de células fluorescentes por cada cien.

<sup>c</sup> No determinado.

## 5. Reinfeción de las células P388D1per con el HSV-1.

Para tratar de obtener un cultivo más homogéneo, sin la producción de crisis, ni fluctuaciones en el título de virus extracelular, se procedió a reinfecar los cultivos persistentes con el virus original a una MOI de 40.

Se reinfecaron cultivos persistentes del pase 20 que estaban produciendo virus extracelular así como aquellos que después de una crisis habían dejado de producir virus extracelular.

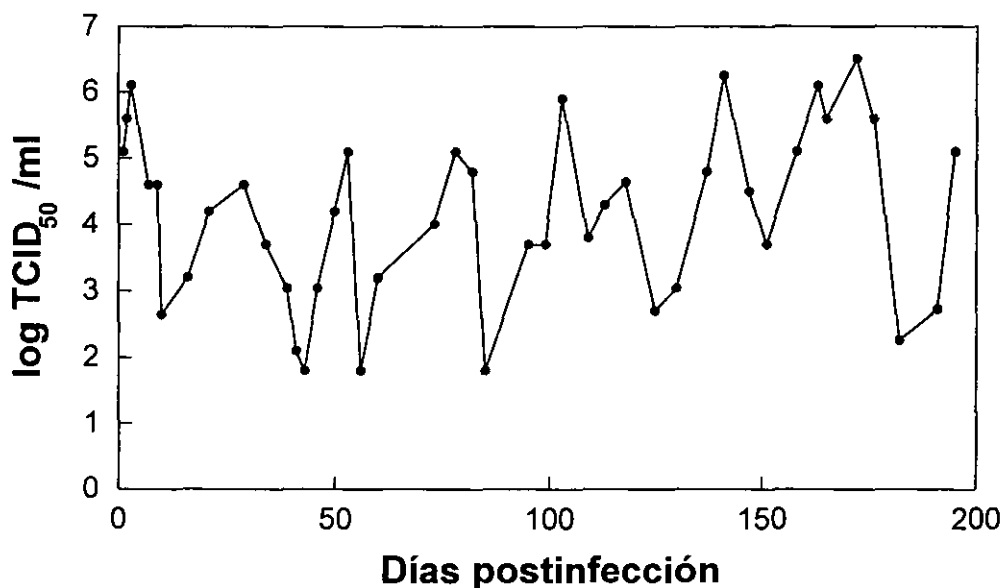
Después de la reinfeción los cultivos sobrevivieron por varias semanas y pases (Figura 10), mientras que células normales, bajo las mismas condiciones sólo sobrevivieron tres días.

Esta observación muestra que el establecimiento del cultivo persistente va ligado al desarrollo de resistencia a la reinfeción con el virus original.

Los cultivos reinfecados mantuvieron el mismo patrón cíclico del título viral extracelular, sin embargo las fluctuaciones fueron menores (de 10<sup>1.8</sup> a 10<sup>6.5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml), como se observa en la Figura 10, donde un cultivo reinfecado se siguió por más de 190 días y 70 pases, una de las cosas importantes es que las crisis fueron menos severas ya que nunca se llegó a tener una destrucción masiva de las células como en los primeros pases de los cultivos persistentes y tampoco se llegaron a presentar valores de cero en el título de virus extracelular.

La formación de sincitios sólo se observó de tres a cinco días después de la infección, en los días sucesivos únicamente se observó el redondeamiento de las células.

Después de la reinfección las células continuaron expresando antígenos virales en todos los pases analizados por ELISA e inmunofluorescencia indirecta.



**Figura 10. Producción de virus extracelular después de una reinfección de las células P388D1per.** Después de una reinfección con el virus original a una MOI de 40, se titularon los sobrenadantes de los cultivos persistentes por más de 190 días después de la reinfección.

## 6. Propiedades de células P388D1per clonadas.

Otro proceso que se utilizó para tratar de obtener cultivos persistentes homogéneos fue la clonación de células. La clonación a partir de una célula no fue posible, sin embargo se obtuvieron cultivos a partir de 2 a 10 células.

Después de la clonación las células necesitaron aproximadamente de tres semanas para alcanzar un cultivo confluyente. Estos cultivos se caracterizaron por no producir virus extracelular y tampoco fue posible detectar la presencia de antígenos virales por ELISA ni por IF, como se muestra en la Tabla 5, donde al analizar los pases 8 y 11 de un cultivo de células obtenidas por clonación, no se detectó la presencia de antígenos ni título viral.

Cuando estas clonas se re infectaron con una MOI de 40, mostraron ser resistentes al virus original y sobre todo las células no presentaron la formación de sincitios, sólo se observó el redondeamiento de las células. Después de la reinfección las células producen virus



extracelular con el mismo patrón cíclico, sin embargo los periodos de crisis fueron menos severos.

En los pases siguientes a la reinfección, fue posible detectar la presencia de antígenos virales por ELISA y por IF como se observa en la Tabla 5, en algunos casos en el momento de realizar el ensayo de ELISA e inmunofluorescencia no se detectaba virus infectivo en el sobrenadante celular, pero si se observaba la presencia de antígenos. Sin embargo un pase posterior el virus extracelular ya se podía detectar, como es el caso del pase 4.

**Tabla 5. Expresión de antígenos virales en cultivos obtenidos a partir de la clonación de células P388D1per.**

Pase <sup>a</sup>	Título de virus extracelular log (TCID <sub>50</sub> /ml)	Detección de antígenos por ELISA <sup>b</sup>	Detección de antígenos por IF indirecta
8	- <sup>c</sup>	0	-
11	-	0	-
2r	5.1	0.900±0.035	ND <sup>d</sup>
3r	4.6	0.230±0.025	ND
4r	-	0.100±0.020	+ <sup>e</sup>
5r	3.7	0.165±0.026	+
6r	2.7	0.068±0.020	+
7r	4.2	0.273±0.023	+

<sup>a</sup> Los pases 8 y 11 son de cultivos obtenidos a partir de la clonación de células P388D1per antes de la reinfección. Los pases 2r a 7r son de cultivos obtenidos después de la reinfección del pase 11 con una MOI de 40.

<sup>b</sup> Determinación espectrofotométrica, se indica la absorbancia neta.

<sup>c</sup> No detectado.

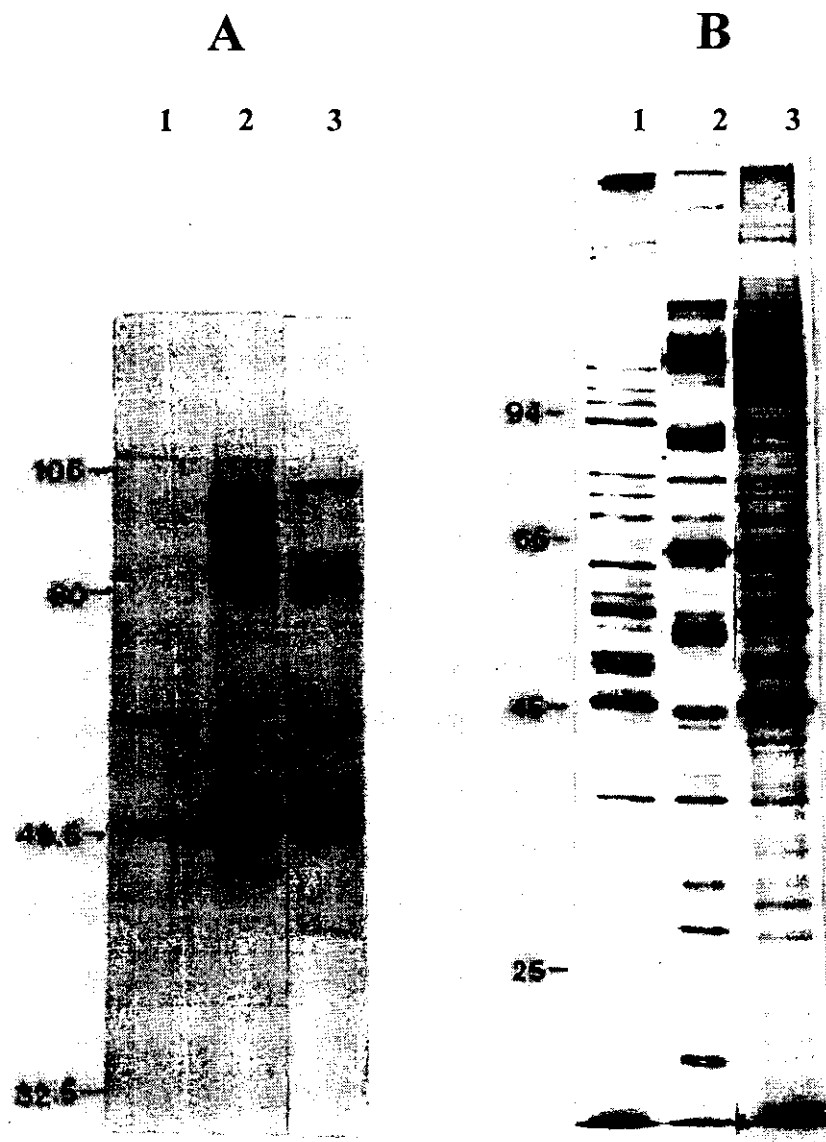
<sup>d</sup> No determinado.

<sup>e</sup> Reacción positiva.

## 7. Detección de las proteínas virales que se producen en las células P388D1per.

Se detectaron las proteínas de células infectadas (ICP) que se produjeron en el cultivo persistentemente infectado, mediante Western blot y por autorradiografía de células marcadas con metionina-[<sup>35</sup>S].

Los resultados obtenidos en el Western blot se muestran en la Figura 11. Se encontraron diferencias en el número de las proteínas presentes en las células P388D1per y las células P388D1 infectadas con HSV-1. En las células P388D1per se observaron cuatro proteínas con pesos moleculares aparentes (PM) de entre 53 y 103 kDa (Figura 11A, línea 3; Tabla 6). En contraste en los extractos obtenidos en las células P388D1 infectadas con HSV-1 se encontraron ocho proteínas con pesos moleculares de entre 48 y 103 kDa. (Figura 11A, línea 2; Tabla 6).



**Figura 11. Análisis por Western blot y por Autorradiografía del patrón electroforético de las ICP que se generaron durante la infección persistente y la infección de las células P388D1 con HSV-1. A. Western blot. B. Autorradiografía. Líneas 1: Células P388D1 no infectadas. Líneas 2: Células P388D1 infectadas con HSV-1 a una MOI de 1.0. Líneas 3: Células P388D1 per La posición y los pesos moleculares (kDa) de las proteínas estándar se muestran a la izquierda.**

**Tabla 6. Pesos moleculares aparentes de las ICP detectadas en las células P388D1per y P388D1 infectadas con HSV-1, mediante autorradiografía y Western Blot.**

Autorradiografía		Western blot		Posible proteína	Función
P388D1+ HSV-1	P388D1per	P388D1+ HSV-1	P388D1per		
151	151			ICP5,VP5	Principal proteína de la cápside.
119	119			gB,VP8.5	Glicoproteína entrada y fusión.
114	114			U <sub>L</sub> 52	Componente del complejo helicasa- primasa.
110	110			ICP0	Transactivador de genes.
103	103	103	103	gB/gH	Posible precursor de gB ó gH
		96			
		95		ICP18.5	Requerido para rompimiento o empaquetamiento del DNA.
		89	89		
87		87		gE, VP12.3 (VP12)	Forma complejo con gI, involucrada en la diseminación del virus.
85	85	85	85	U <sub>L</sub> 12	DNAsa alcalina.
78	78				
65	65			$\alpha$ -TIF	Transactivador de la transcripción.
53	53	53	53	VP19C	Proteína de ensamble de cápside.
		48			
44				ICP36	Timidina cinasa.
37	37			VP22a	Proteína de cápside
28	28				

La síntesis de proteínas en las células P388D1 infectadas con HSV-1 y en las células P388D1per se determinó por marcaje con metionina-[<sup>35</sup>S]. En este ensayo se encontró un mayor número de ICPs con un rango más amplio de PM (entre 28 y 151 kDa), en comparación con el Western Blot. En las células P388D1per se observaron 12 ICP (Figura 11B, línea 3; Tabla 6) y 14 en las células infectadas con HSV-1 (Figura 11B, línea 2; Tabla 6). De manera general se puede observar que la concentración de las proteínas virales fue menor en las células P388D1per.

Además se observó una mayor intensidad en las bandas de las proteínas celulares de las células P388D1per en comparación con las células P388D1 infectadas en forma aguda con el HSV-1 (Figura 11B, líneas 2 y 3).

## II. Estudio de las propiedades de los virus aislados durante la infección persistente.

### 8. Determinación del tamaño de las placas originadas por el HSV-1 y los virus aislados de las células P388D1per.

Se estudiaron dos cepas virales obtenidas a partir de las células P388D1per. Una se aisló del pase 47 (HSV<sub>A</sub>) y la otra del pase 60 (HSV<sub>B</sub>). Los virus aislados se clonaron sobre células Vero.

La primera característica que se estudio fue el tamaño de las placas originadas por estos virus.

En la Figura 12 se observa un ensayo característico, donde se muestran las placas originadas por las diferentes cepas virales, a simple vista se puede observar que el tamaño de las placas del virus original (HSV-1) fue mayor que las originadas por la cepa HSV<sub>A</sub> y mucho mayor que el de las formadas por la cepa HSV<sub>B</sub>.

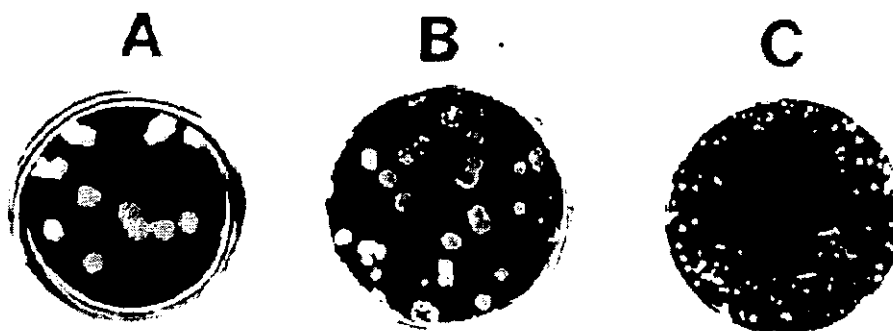


Figura 12. Placas originadas por los virus obtenidos a partir de las células P388D1per. Monocapas de células Vero se infectaron con las diferentes cepas virales: (A) HSV-1; (B) HSV<sub>A</sub>; (C) HSV<sub>B</sub>.

Los diferentes tamaños de las placas se muestran en la Tabla 7, el HSV-1 produjo placas que iban de los 2.0 a los 5.0 mm, éstas últimas estaban en mayor proporción, en promedio tenían un tamaño de  $3.83 \pm 0.89$  mm. En el caso del HSV<sub>A</sub> las placas más grandes llegaron a medir 2.5 mm mientras que las más pequeñas medían 1.0 mm, en promedio  $1.75 \pm 0.45$  mm. Las placas originadas por el HSV<sub>B</sub> resultaron ser las más pequeñas con un promedio de  $0.8 \pm 0.34$  mm, con un tamaño entre 0.5 y 1.0 mm, estas placas son aproximadamente 5 veces más pequeñas que las placas que formó el virus original.

**Tabla 7. Tamaño de las placas producidas por los virus aislados de las células P388D1 per**

Virus	Tamaño de placa (mm)
HSV-1	$3.83 \pm 0.89$
HSV <sub>A</sub>	$1.75 \pm 0.45$
HSV <sub>B</sub>	$0.80 \pm 0.34$

### 9. Estudio del efecto citopático producido por las cepas HSV<sub>A</sub> y HSV<sub>B</sub>.

Otra de las características que se estudió del HSV<sub>A</sub> y el HSV<sub>B</sub> fue determinar si había cambios en el efecto citopático producido por estos virus. Para estudiar esto se infectaron monocapas de células Vero o P388D1 con las diferentes cepas virales a una MOI de 1.0.

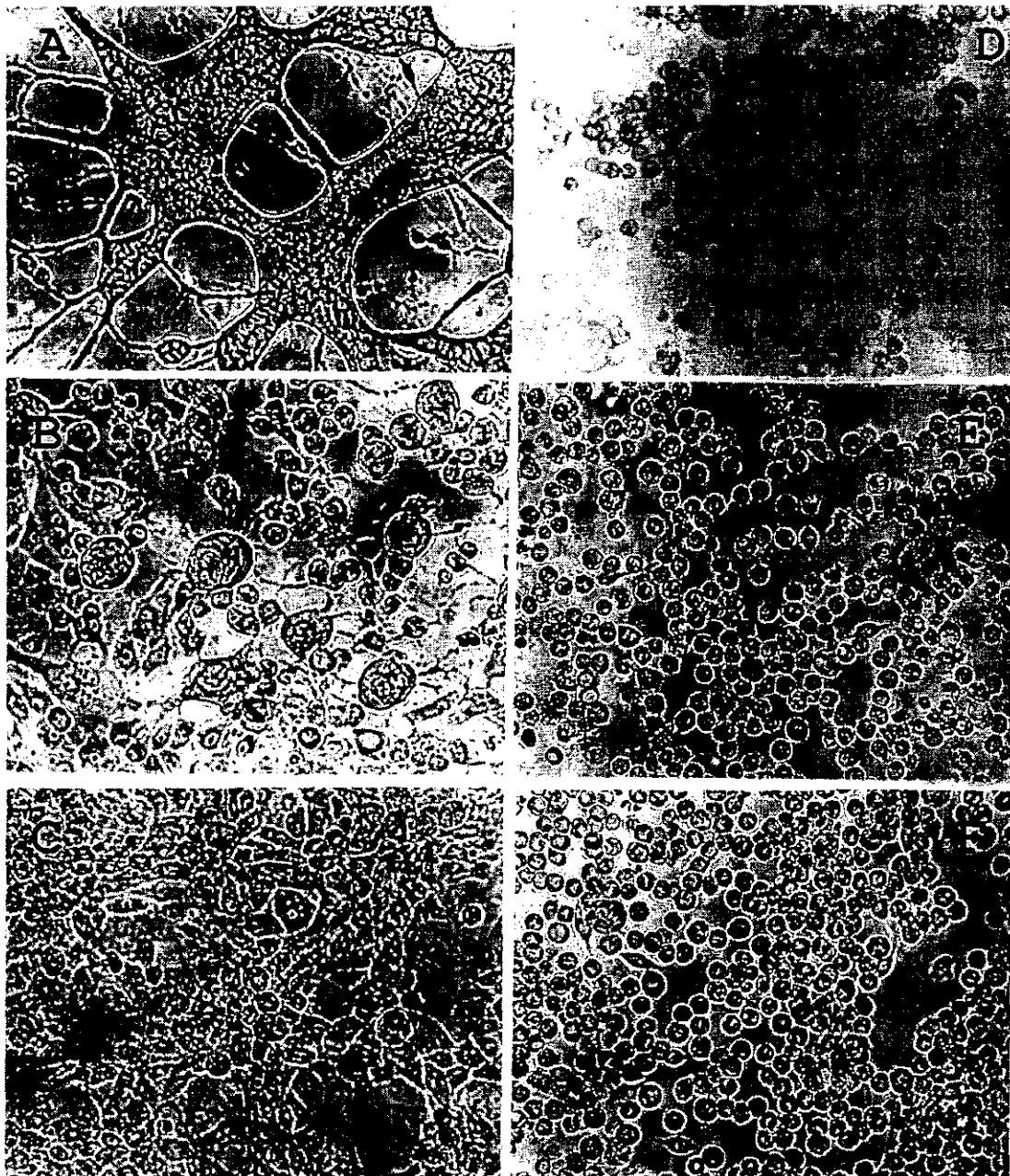
En la Figura 13 se puede ver el efecto citopático que se produjo sobre monocapas de células Vero a las 48 horas post-infección. En la Figura 13A se tiene la típica formación de sincitios de la cepa MP del HSV-1, que fue el virus con el cual se estableció la infección persistente.

La cepa HSV<sub>A</sub> desarrolló un efecto citopático diferente al del virus original, los sincitios son más pequeños, además se observó el redondeamiento de células (Figura 13B).

Por su parte la cepa HSV<sub>B</sub> no produjo sincitios, únicamente causó el agrupamiento y redondeamiento de las células como se puede ver en la Figura 13C.

Cuando se infectaron las células P388D1 con las diferentes cepas virales, el efecto citopático mostrado por el virus original fue la formación de sincitios y redondeamiento de las células como se ve en la Figura 13D. Con la cepa HSV<sub>A</sub> sólo se observó el redondeamiento de las células, no se apreció la formación de sincitios, Figura 13E. Este mismo efecto se encontró cuando la infección se llevó a cabo con HSV<sub>B</sub> como se aprecia en la Figura 13F.

Estos resultados muestran que el fenotipo Syn se perdió en forma gradual durante el desarrollo de la persistencia



**Figura 13. Efecto citopático producido por el HSV-1 y las cepas HSV<sub>A</sub> y HSV<sub>B</sub>.** Monocapas de células Vero se infectaron con el HSV-1 (A); con HSV<sub>A</sub> (B); y con HSV<sub>B</sub> (C). Células P388D1 se infectaron con el HSV-1 (D); con HSV<sub>A</sub> (E) y con HSV<sub>B</sub> (F). Las infecciones se realizaron con una MOI de 1.0 y se observaron a las 48 horas post-infección. (Aumento 40X).

#### 10. Comparación de la infectividad entre el HSV-1 y las cepas HSV<sub>A</sub> y HSV<sub>B</sub>.

Se realizó un estudio comparativo de la infectividad entre la cepa original y las cepas aisladas de las células P388D1 per.

Los resultados se observan en la Tabla 8, donde se muestra una comparación de los títulos máximos obtenidos cuando las cepas se propagaron a una MOI de 1.0 en las diferentes líneas celulares.

Cuando las cepas virales se propagaron sobre células Vero (Tabla 8), se encontró que tanto HSV<sub>A</sub> y HSV<sub>B</sub> se propagaron en menor proporción con respecto al virus original, esto es los títulos máximos que se alcanzaron con los virus aislados durante la persistencia tuvieron una reducción de 143 y 105 veces respectivamente con respecto al virus original. Las cepas HSV-1 y HSV<sub>A</sub> tardaron 48 horas en destruir la monocapa de células Vero, mientras que HSV<sub>B</sub> tardó 24 horas más para destruir la monocapa.

Cuando las cepas virales infectaron a las células P388D1, los títulos máximos alcanzados por las tres cepas fueron similares, esto es, no se tiene una gran diferencia en la reducción del título viral. Además en este caso las células sobrevivieron por más tiempo.

**Tabla 8. Infectividad de las cepas aisladas del cultivo persistente.**

Células infectadas	Virus	Título extracelular <sup>a</sup> ufp/ml	Reducción del título viral (veces) <sup>b</sup>
Vero	HSV-1	2.0X10 <sup>9</sup>	
	HSV <sub>A</sub>	1.4X10 <sup>7</sup>	143
	HSV <sub>B</sub>	1.9X10 <sup>7</sup>	105
P388D1	HSV-1	4.5X10 <sup>6</sup>	
	HSV <sub>A</sub>	9.0X10 <sup>5</sup>	5
	HSV <sub>B</sub>	7.6X10 <sup>5</sup>	6

<sup>a</sup> Título máximo obtenido.

<sup>b</sup> Se calculó el número de veces que se redujo el título viral dividiendo el título obtenido con el HSV-1 entre el título de las cepas HSV<sub>A</sub> y HSV<sub>B</sub>.

## 11. Detección de las ICP que se expresan durante una infección con HSV-1, HSV<sub>A</sub> y HSV<sub>B</sub>.

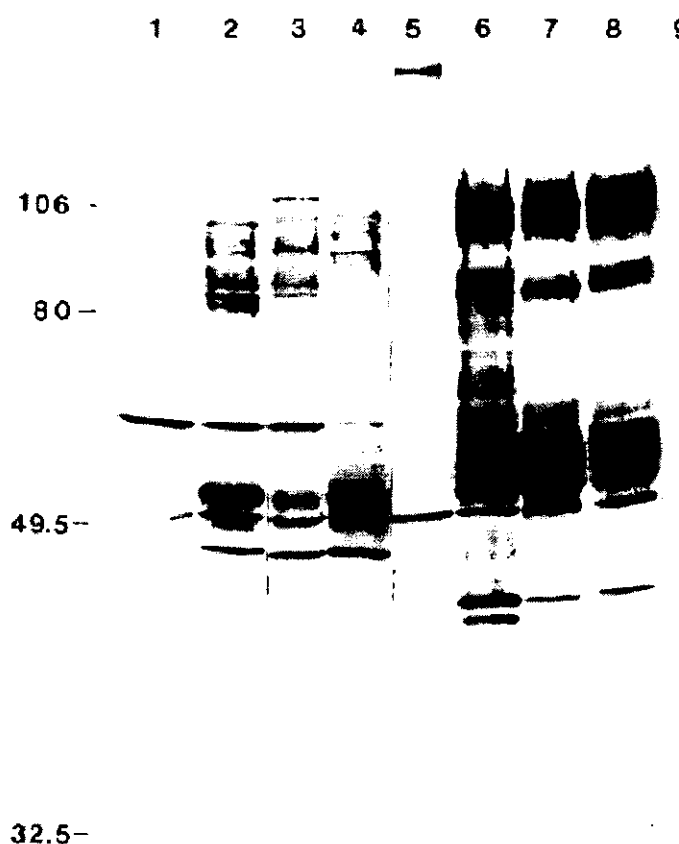
Se estudió el patrón de las ICP en una infección producida por HSV-1 y las cepas virales aisladas durante la persistencia, mediante ensayos de Western Blot. Se infectaron células P388D1 y Vero, con el virus original y las cepas HSV<sub>A</sub> y HSV<sub>B</sub> (Figura 14). Se observaron diferencias en el número y concentración de las ICP producidas por las diferentes cepas virales.

En la infección de las células P388D1 con las diferentes cepas, se detectó que el HSV-1 produce 8 proteínas (Figura 14, línea 2; Tabla 9), mientras que con HSV<sub>A</sub> y HSV<sub>B</sub> se detectaron 7 y 6 proteínas respectivamente (Figura 14, líneas 3 y 4; Tabla 9), con pesos moleculares que varían entre 48 y 106 kDa.

La proteína que más cambios presentó con respecto a la concentración fue una de 53 kDa ya que se encontró en menor cantidad con el HSV<sub>A</sub> pero en mayor cantidad con el HSV<sub>B</sub>.

Cuando se infectaron las células Vero, se detectó un mayor número y concentración de las proteínas con respecto a la infección de las células P388D1. Las células Vero infectadas con HSV-1, HSV<sub>A</sub> y HSV<sub>B</sub> muestran 19, 14 y 14 ICP respectivamente, con un peso molecular entre 42 y 106 kDa (Figura 15, líneas 6,7 y 8; Tabla 9).

Las únicas proteínas que se encontraron de manera constante en todas las infecciones fueron las de 53 y 103 kDa.



**Figura 14.** Análisis por Western blot de las ICP que se producen durante la infección de células Vero y P388D1 con HSV-1, HSV<sub>A</sub> y HSV<sub>B</sub>. Células P388D1 infectadas con: (1) no infectadas; (2) HSV-1; (3) HSV<sub>A</sub>; (4) HSV<sub>B</sub>. Células Vero infectadas con: (5) no infectadas; (6) HSV-1; (7) HSV<sub>A</sub>; (8) HSV<sub>B</sub>. Las células se infectaron a una MOI de 1.0 y se cosecharon a las 48 horas. La posición y los pesos moleculares (kDa) de las proteínas estándar se muestran a la izquierda.



**Tabla 9. Pesos moleculares aparentes de las ICP detectadas en las células P388D1 y Vero infectadas con HSV-1, HSV<sub>A</sub> y HSV<sub>B</sub> mediante Western Blot.**

P388D1 + HSV-1	P388D1 + HSV <sub>A</sub>	P388D1 + HSV <sub>B</sub>	Vero+ HSV-1	Vero+ HSV <sub>A</sub>	Vero+ HSV <sub>B</sub>	Posible Proteína	Función
				106	106		
103	103	103	103	103	103	gB/gH	Posible precursor de gB ó gH
		99	99	99	99	U <sub>L</sub> 5	Componente del complejo helicasa- primasa.
96							
95	95					ICP18.5	Requerido para rompimiento o empaquetamiento del DNA.
		94				U <sub>L</sub> 9	Proteína de unión al DNA.
89	89	89↓	89				
87	87		87	87	87	gE, VP12.3 (VP12)	Forma complejo con gI, involucrada en la diseminación del virus.
85	85↓					U <sub>L</sub> 12	DNAsa alcalina.
			78	78↓	78↓		
			76	76↓	76↓		
			72	72↓	72↓		
			69			ICP22	Proteína reguladora.
			66	66	66		
			65	65	65↓	gI	Forma complejos con gE para el transporte a la membrana.
			63	63	63		
			59	59	59	gD, VP17-18	Glicoproteína para entrada del virus en la célula.
53	53↓	53↑	53	53	53	VP19C	Proteína de ensamble de la cápside.
			50				
			49				
48	48	48	48				
			46				
			44	44↓	44↓	ICP36	Timidín cinasa.
			42	42↓	42↓	VP21	Proteína de cápside.

↓ Menor cantidad; ↑ Mayor cantidad.

## Discusión.

Los macrófagos juegan un papel importante en el control de las infecciones herpéticas y posiblemente pueden servir de reservorios para la persistencia del HSV-1 en humanos, por lo tanto, resulta importante el estudio de la interacción macrófago-HSV-1. Las líneas inmortalizadas de células parecidas a macrófagos son un sistema apropiado para estudiar *in vitro* las interacciones entre el HSV-1 y los macrófagos; en este caso para estudiar la persistencia viral.

De manera general se ha observado que los macrófagos son menos permisivos a la infección del HSV-1 en comparación con muchas otras células como los fibroblastos de embrión de ratón o las células Vero (51,52). Sin embargo, se ha reportado que los macrófagos aumentan su permisividad al HSV-1 cuando se cultivan *in vitro* por lo menos tres días antes de la infección (2,74,86).

En este trabajo se investigó la permisividad de una línea de células parecidas a macrófagos de origen murino a la infección del HSV-1. Las células P388D1 mostraron un título máximo de aproximadamente 1000 veces menor al título máximo alcanzado en las células permisivas (Vero). Resultados similares obtuvieron Morahan y col. (51), cuando compararon la infección del HSV-1 en células Vero, M $\phi$  derivados de médula ósea y M $\phi$  peritoneales, encontraron que el HSV-1 se replicó en las células Vero  $10^3$  y  $10^5$  veces más que en estos M $\phi$ s respectivamente. De igual manera Tenney y Morahan (79), encontraron que en células similares a macrófagos humanos (U937), el HSV-1 replica 100 veces menos que en las células Vero. Por lo que la línea celular P388D1 es permisiva a la infección por el HSV-1, pero la permisividad de estas células es baja como se ha reportado para otro tipo de macrófagos (2,43,70).

El efecto citopático producido en los macrófagos fue similar al que se presentó en las células Vero, es decir hubo formación de sincitios (fenotipo Syn), además en las células P388D1 también se observó el redondeamiento de las mismas.

La infección persistente sólo pudo establecerse a una baja MOI (0.001), ya que a MOIs más elevadas las células no sobreviven a la infección.

Para el establecimiento de la persistencia del HSV-1 en las células P388D1 aparte de la infección con el virus, no se utilizaron otro tipo de sustancias o condiciones especiales. Del mismo modo se han obtenido infecciones persistentes en células de hámster chino (24), células L (55), BHK21 (16), MDBK (48) y células neuronales (13). Por el contrario en otras células se utilizaron anticuerpos (84), hidrocortisona (57) o interferón  $\alpha$  y  $\beta$  (15), para establecer o mantener una infección persistente. Por lo que el establecimiento de la persistencia del HSV-1 es un proceso que puede o no requerir la ayuda de factores externos, en el caso de las células P388D1 no fue necesaria la presencia de otros factores.

La infección persistente se caracterizó por fluctuaciones cíclicas del título de virus extracelular, además un aumento máximo en el título estaba acompañado de crisis en el cultivo celular con una subsecuente disminución en el número de células viables. Este patrón cíclico con producción de crisis se observa frecuentemente en cultivos celulares infectados persistentemente con el HSV-1 como células linfoblastoides humanas, de linfoma y MDBK. (10,24,26,48). Sin embargo, también se han observado infecciones persistentes del HSV-1 donde no se presentan crisis ni fluctuaciones tan marcadas en el título viral extracelular como en células de glia de ratón y linfocitos B y T (12,61,68). Todo esto parece indicar que el

desarrollo o no de crisis en el cultivo puede deberse al tipo de células en donde se lleva a cabo la infección.

Al principio se presentaron crisis muy severas, sin embargo conforme fue pasando el tiempo estas se hicieron menos evidentes, esto podría deberse a la presencia y aumento de células más resistentes a la infección o a una disminución en la infectividad del virus o a ambas cosas.

En algunos experimentos después de las crisis las células que sobrevivieron dejaron de producir virus extracelular, además de que no se les detectó la presencia de antígenos virales, esto podría indicar la finalización de la infección persistente, aunque cabe la posibilidad de que el virus entró en una fase de latencia o que el cultivo dejó de producir virus infectivo como se demostró en un trabajo de nuestro laboratorio (81).

El comportamiento cíclico de la producción viral se ha explicado en otras infecciones del HSV-1 por la producción de partículas defectivas (19). Otra posible explicación de la naturaleza cíclica de la producción viral es la coexistencia de dos poblaciones celulares en el cultivo, una persistentemente infectada y otra no infectada pero susceptible de ser infectada y que al lisarse produce un elevado título de virus infectivo. La mayoría de las células que sobreviven a una crisis pueden estar persistentemente infectadas y por lo tanto ser resistentes a la reinfección como se ha demostrado en células T persistentemente infectadas con HSV-1 (10); sin embargo, algunas células no estarían infectadas, consecuentemente se requiere de algunos pases para alcanzar la relación células no infectadas y persistentemente infectadas para originar una crisis. Otra posibilidad es que los Mφs se diferencian espontáneamente y por lo tanto aumenta el número de células susceptibles a la infección por el HSV-1, como han reportado Bruun y col. (6).

Para tratar de evitar las fluctuaciones del título viral y la producción de crisis en el cultivo persistente se siguieron dos estrategias: la reinfección de los cultivos y la clonación de células.

Las células P388D1per resistieron a reinfecciones del virus original con una MOI elevada (de 40) y esto fue independiente de que las células estuvieran o no produciendo virus extracelular, con la reinfección únicamente se logró una disminución en la severidad de las crisis, sin embargo se siguieron presentando, además el título de virus extracelular nunca fue menor a  $10^{1.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml.

Con respecto a la clonación, no se pudo obtener una clona que produjera virus extracelular ni que presentara antígenos virales, esto es similar a lo encontrado por Holland y col. (32), donde al clonar células de un cultivo persistentemente infectado con virus de la estomatitis vesicular sólo lograron aislar células que no producen virus. Una explicación para esto es que el porcentaje de células productoras de virus es bajo (un máximo del 12.5%) y que las células no infectadas están en mayor cantidad y pueden sobrevivir el proceso de clonación. Otra posibilidad es que en el cultivo exista la necesidad de cooperación entre más de una célula para poder mantener la persistencia.

La noción de que dos diferentes tipos de macrófagos estaban presentes en los cultivos P388D1per es apoyado por los ensayos de inmunofluorescencia y de centros de infección. En ambos casos los valores obtenidos implican que una baja proporción de macrófagos estaban infectados, las células que presentaban antígeno variaban de 1-15% y las que producían virus infectivo de 0.008% a 12.5%. Resultados similares se han encontrado en estudios realizados en macrófagos de bazo (15) y en cultivos de promonocitos persistentemente infectados, donde el porcentaje de células que producen virus infectivo varía de 0.04 al 3% (76). Estos resultados nos indican que la infección persistente de nuestro modelo queda dentro de la

categoría de cultivo acarreador (46), esto es, sólo un pequeño porcentaje de las células se mantienen infectadas por el virus, liberándolo al medio y propiciando su persistencia conforme el cultivo es propagado.

Una comprobación más de que las células estaban persistentemente infectadas fue la detección de varias ICPs por Western blot y marcaje con  $^{35}\text{S}$  (Tabla 6). Con el ensayo de inmunoblot se observó que las células P388D1per sólo presentaban la mitad de las proteínas virales encontradas durante la infección lítica de las células P388D1 (4 contra 8). Al estudiar la síntesis de proteínas mediante marcaje con  $^{35}\text{S}$  se encontró una diferencia de sólo dos proteínas entre las células P388D1per y las P388D1 infectadas líticamente (12 contra 14). Independientemente del ensayo utilizado las células P388D1per presentan un menor número de proteínas con respecto a la infección lítica. Una de las proteínas que no se detectó en las células P388D1per pero sí se encontró en las células infectadas en forma aguda con el HSV-1, con cualquiera de los dos ensayos realizados, fue una proteína de 87 kDa, que posiblemente se trató de la glicoproteína gE que está involucrada junto con gI en la diseminación del virus (11). La ausencia de algunas proteínas en el patrón electroforético de las células P388D1per podría deberse a una diferencia en la expresión de las proteínas virales y esto tal vez formar parte del mecanismo para el establecimiento de la persistencia. Sin embargo, estos resultados difieren de las observaciones de Roumillat y col. (68); quienes encontraron el mismo número y patrón de proteínas entre una línea de células linfoblastoides persistentemente infectadas con HSV-1 y células Vero infectadas con el virus utilizado para establecer la persistencia. Lo cual podría indicar que estos cambios también dependen de la cepa viral y la línea celular estudiada.

La diferencia en el número de proteínas entre los dos ensayos (Western blot y marcaje con  $^{35}\text{S}$ ), a pesar de que en éstos se estudian eventos diferentes, sugiere que la sensibilidad límite del ensayo radioactivo fue mayor que el inmunoblot, además el suero anti-HSV-1 utilizado no tenía anticuerpos contra todas las proteínas virales, ya que fue producido por Chemicon International contra proteínas tardías e ICPs no especificadas.

Un hecho que llamó la atención durante el estudio de la síntesis de proteínas con metionina- $^{35}\text{S}$ , fue la diferencia en la intensidad de las bandas de proteínas celulares entre el cultivo P388D1per y las células P388D1 infectadas en forma aguda con HSV-1, se observó una mayor intensidad en las bandas celulares de las células P388D1per (Figura 11B), lo cual podría sugerir que no se presenta de manera normal la característica inhibición (shut off) de la síntesis de proteínas celulares que regularmente realiza el HSV-1 al infectar células permisivas (39). Este proceso lo realiza normalmente la proteína VHS durante una infección lítica (77), sin embargo, se ha visto que las neuronas presentan resistencia a la acción de esta proteína lo cual puede ser importante en el establecimiento de la latencia (54), en el caso de los macrófagos si se presentara un efecto similar, también podría ayudar al establecimiento y mantenimiento de la persistencia del HSV-1.

Muchos investigadores han reportado que virus aislados a partir de cultivos persistentes difieren en algunas propiedades biológicas con respecto al virus original utilizado para establecer la persistencia, la evolución de la población viral durante la persistencia es un fenómeno ampliamente documentado (1,87).

En el presente trabajo encontramos cambios en algunas de las propiedades de los virus aislados durante la infección persistente, una de ellas fue el tamaño de la placa. Se encontró que el tamaño de las placas originadas por los virus aislados fue menor al que produce el virus

original, este cambio también se ha encontrado en líneas de linfoblastos humanos (10,35,68), sin embargo, también se ha encontrado lo contrario, es decir un aumento en el tamaño de las placas originadas por los virus aislados durante la persistencia, como en las células de hamster chino y Raji (25,35). Lancz (40), ha relacionado los cambios en el tamaño de la placa con la aparición de mutantes sensibles a temperatura (ts), en nuestro caso este hecho no se estudio, por lo que no se descarta la posibilidad de que se tengan este tipo de mutantes.

También se encontraron cambios en el efecto citopático producido por los virus, el virus original presenta un fenotipo Syn, mientras que el HSV<sub>A</sub> a pesar de que sigue presentando el mismo fenotipo tiene una variación ya que los sincitios que produce son más pequeños en comparación de los sincitios del virus original, algo similar ocurre en una infección persistente del HSV-1 en células MDBK (48). Por el contrario la cepa HSV<sub>B</sub> si tiene un cambio en el fenotipo ya que presenta el fenotipo Syn<sup>+</sup>, es decir no se observó la formación de sincitios sino el redondeamiento y agrupamiento de las células. Cambios en el efecto citopático del HSV-1 también se han observado en una infección persistente de células Raji (35), sin embargo en este caso el cambio es de un fenotipo Syn<sup>+</sup> a Syn, la explicación a esta modificación ofrecida por los autores es que se produjo una selección progresiva del fenotipo Syn durante la infección persistente. En las células P388D1per pudo haberse presentado el mismo fenómeno. Esto es, los cambios fenotípicos de Syn a Syn<sup>+</sup> son probablemente el resultado de la acumulación progresiva de varias mutaciones en el virus HSV<sub>B</sub>.

Los cambios en el fenotipo Syn están relacionados principalmente con cambios en las glicoproteínas involucradas en la formación de sincitios: gD, gE, gI, gM y gHgL (11). Por lo que al parecer los virus aislados durante la persistencia tendrían cambios en estas glicoproteínas. En los ensayos por Western blot la única diferencia encontrada al respecto fue cuando HSV<sub>B</sub> se propagó en las células P388D1 donde no se observa la banda de 87 kDa, que es posiblemente gE, la cual si se observó en las infecciones de las otras cepas tanto en P388D1 como en Vero (Tabla 9). Sin embargo, no se podría asegurar que el cambio en el fenotipo Syn es una consecuencia de la persistencia, ya que virus aislados de personas infectadas pueden presentar el fenotipo Syn (42,72). Además, virus Syn<sup>+</sup> pueden cambiar a Syn, espontáneamente (17) o bajo la presión de anticuerpos anti-HSV-1 (31).

El que no se haya observado una clara diferencia en el efecto citopático que se presentan en las células P388D1 cuando se infectaron con las cepas HSV<sub>A</sub> y HSV<sub>B</sub>, mientras que en las células Vero si se observó, puede deberse al hecho de que el fenotipo Syn también depende del tipo de célula que se infecta (4,73).

Otra de las propiedades estudiadas fue la infectividad que presentaban los virus que se aislaron durante la persistencia, cuando estos virus se propagaron sobre las células Vero se encontró una reducción de más de cien veces en los títulos máximos que se obtuvieron. Sin embargo, cuando se infectaron las células P388D1 no se encontró una reducción significativa en los títulos máximos (Tabla 8). Este hecho podría explicarse por un cambio en las propiedades de virulencia de los virus, aunque también podría deberse al hecho de que los virus aislados durante la persistencia estaban adaptados a propagarse en los macrófagos y por eso cuando se propagaron en las células Vero el título fue menor. En otras infecciones persistentes del HSV-1 se ha encontrado un aumento (10,25), una disminución (24), o no se han detectado cambios (68) en la infectividad de los virus aislados durante la persistencia, por lo que no es algo que tenga un patrón definido y que varía de acuerdo al tipo de células utilizadas. Los macrófagos normalmente son menos permisivos a la infección por el HSV-1

por lo que puede ser que cambios en la infectividad sean difíciles de detectar, en cambio en células muy permisivas a la infección como son las células Vero los cambios en cuanto a la infectividad del virus son más evidentes.

También se encontraron cambios en el patrón de proteínas que se obtuvieron cuando se infectaron de manera lítica células P388D1 y Vero con las cepas HSV<sub>A</sub> y HSV<sub>B</sub>. Un mayor número de proteínas virales fue detectado en la infección de células Vero en comparación con la infección de las células P388D1, independientemente del virus utilizado. Además, las cepas HSV<sub>A</sub> y HSV<sub>B</sub> producen menos ICP que el HSV-1, en cualquiera de las dos líneas celulares utilizadas, lo cual habla de posibles cambios en la expresión de las proteínas de los virus aislados durante la persistencia en relación al virus original.

El encontrar un menor número de ICPs en las células P388D1, podría estar relacionado con el hecho de que los Mφ son menos permisivos a la infección del HSV-1 que las células Vero y debido a esto podrían expresarse un menor número de proteínas o expresarse en una cantidad tan baja que no es posible detectarlas con las técnicas utilizadas.

Sólo dos proteínas se encontraron de manera constante en todas las infecciones, una de 53 y otra de 103 kDa. Se trató de identificar las proteínas por su movilidad electroforética. Sin embargo esto es difícil ya que la migración está influenciada por varios factores como la cepa viral, la historia de propagación del virus (célula huésped y rondas de replicación) y las condiciones del ensayo. Además, 11 de las 49 proteínas que se expresan en cultivos celulares están glicosiladas, su peso molecular aparente varía de acuerdo con el número de residuos de carbohidratos, lo cual difiere con la célula huésped utilizado para propagar el virus (33,82). Por lo que los nombres de las proteínas que aparecen en las Tablas 6 y 9 sólo son predicciones en base a la bibliografía. Las proteínas virales se pueden identificar con anticuerpos monoclonales. Sin embargo, hay que tener en mente que cambios en el epítipo de los antígenos podrían alterar el reconocimiento por el monoclonal (22). Un siguiente paso en este trabajo sería la identificación de las ICP expresadas en las células P388D1 per.

En este trabajo se estableció una infección persistente del HSV-1 en macrófagos, que es un tipo de células que puede ser importante en diseminar la infección y servir de reservorio para el virus. Por lo que los macrófagos podrían sumarse al grupo de células no neuronales, como las células de la córnea (45,50,58) y los linfocitos (37), donde el HSV-1 puede persistir *in vivo*. Además el hecho de tratarse de células murinas hace posible que se pueda utilizar una gran número de reactivos disponibles para el estudio de la persistencia viral. Entre estos estudios está la identificación precisa de las proteínas que se expresan durante la persistencia o las que dejan de hacerlo, estudiar los posibles cambios en la secuencia de bases o de aminoácidos de las proteínas virales, identificar cambios en los procesos de regulación determinando la expresión de las proteínas reguladoras o la síntesis del RNAm, etc.

## CONCLUSIONES

1. Las células P388D1 son moderadamente permisivas a la infección por el HSV-1.
2. Se estableció una línea de células similares a macrófagos infectadas persistentemente con el HSV-1, utilizando una baja MOI (0.001) y sin la ayuda de factores externos.
3. La infección persistente se caracterizó por:
  - a) Un patrón cíclico de fluctuaciones en la producción de virus extracelular.
  - b) Producción de crisis celular con un extenso efecto citopático y muerte celular.
  - c) Las células persistentes presentaron antígeno viral con un porcentaje máximo del 15%.
  - d) Dentro de la población de células infectadas hay hasta un 12.5% de células que liberan virus infectivo.
  - e) El cultivo persistente fue resistente a la reinfección con el virus original a una MOI de 40.
  - f) El patrón electroforético de las proteínas presentes en las células persistentemente infectadas demostró la presencia de proteínas que se observan durante una infección lítica, sin embargo hay un menor número de proteínas presentes.
  - g) En la infección persistente se observan con más intensidad las bandas de las proteínas celulares en comparación con la infección aguda, lo que podría hablar de cambios en el proceso de interferencia en la síntesis de las proteínas de la célula huésped, que normalmente produce el HSV-1.
4. Los virus aislados durante la infección persistente presentaron los siguientes cambios con respecto al virus original:
  - a) Disminución en el tamaño de las placas formadas.
  - b) Cambios en el efecto citopático producido por las cepas virales, de un fenotipo Syn se cambió a un fenotipo Syn<sup>+</sup>.
  - c) Disminución en el título viral que se obtiene cuando infectan células permisivas (Vero).
  - d) El patrón electroforético de las proteínas que se producen cuando los virus infectan de forma lítica muestran diferencias en el número y en la intensidad de las bandas de las proteínas virales observadas.

Con estos resultados se puede comprobar que el HSV-1 es capaz de producir una infección persistente en macrófagos y que el virus sufre cambios durante la persistencia

## BIBLIOGRAFIA.

1. Ahmed R, Morrison LA, Knipe DM. 1996. Persistence of Viruses. **In:** Fields Virology, Third Ed., Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds.). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia; pp.207-237.
2. Albers I, Kirchner H, Domke-Optiz I. 1989. Resistance of human blood monocytes to infection with herpes simplex virus. *Virology* **169**:466-469.
3. Boehmer PE, Lehman IR. 1997. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **66**:347-384.
4. Bond VC, Person S. 1984. Fine structure physical map locations of alterations that affect cell fusion in herpes simplex virus. *Virology* **169**:466-469.
5. Braun RW, Teute HK, Kirchner H, Munk K. 1984. Replication of herpes simplex virus in human T lymphocytes: characterization of the viral target cell. *J. Immunol.* **132**:914-919.
6. Bruun T, Kristoffersen AK, Rollag H, Degre M. 1998. Interaction of herpes simplex virus with mononuclear phagocytes is dependent on the differentiation stage of the cells. *APMIS* **106**:305-314.
7. Campadelli-Fiume G, Qi S, Avitabile E, Foà-Tomasi L, Brandimarti R, Roizman B. 1990. Glycoprotein D of herpes simplex virus encodes a domain which precludes penetration of cells expressing the glycoprotein by superinfecting herpes simplex virus. *J. Virol.* **64**:6070-6079.
8. Chou J, Kern ER, Whitley RJ, Roizman B. 1990. Mapping of herpes simplex virus neurovirulence to  $\gamma$ 34.5, a gene nonessential for growth in cell culture. *Science* **252**:1262-1266.
9. Coleman V, Jawtez E. 1961. A persistent herpes simplex infection in antibody-free cell culture. *Virology* **13**:375-377.
10. Cummings PJ, Lakomy RJ, Rinaldo CR. 1981. Characterization of herpes simplex virus persistence in a human T lymphoblastoid cell line. *Infect. Immun.* **34**:817-827.
11. Davis-Poynter N, Bell S, Minson T, Browne H. 1994. Analysis of the contributions of herpes simplex virus type 1 membrane proteins to the induction of cell-cell fusion. *J. Virol.* **68**:7586-7590.
12. Dawson GJ, Elizan TS, Mowshowitz SL, Cohen R. 1983. Virus-host cell interaction in rat C 6 glial cell cultures persistently infected with herpes simplex virus. *Intervirology* **19**:95-104.
13. Doller E, Aucker J, Weissbach A. 1979. Persistence of herpes simplex virus type 1 in rat neurotumor cells. *J. Virol.* **29**:43-50.
14. Domke-Optiz I, Straub P, Kirchner H. 1986. Effect of interferon on replication of herpes simplex virus types 1 and 2 in human macrophages. *J. Virol.* **60**:37-42.
15. Domke-Optiz I, Poberschin P, Mitnacht S, Kirchner H. 1987. Role of interferon in persistent infection of macrophages with herpes simplex virus. *Virology* **159**:306-311.
16. Dunn JE, Meinke WJ, Spizizen J. 1979. Further characterization of herpes virus persistence. *J. Gen. Virol.* **43**:467-472.
17. Ejercito PM, Kieff ED, Roizman B. 1968. Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviour of infected cells. *J. Gen. Virol.* **2**:357-364.



18. Fawcett RL, Roizman B. 1994. The molecular basis of herpes simplex virus pathogenicity. *Seminars in Virology* **5**:261-271.
19. Frenkel N, Jacob RJ, Honess RW, Hayward GS, Locker H, Roizman B. 1975. Anatomy of herpes simplex virus DNA. III. Characterization of defective DNA molecules and biological properties of virus populations containing them. *J. Virol.* **16**:153-167.
20. Friedman RM, Ramseur JM. 1979. Mechanisms of persistent infections by cytopathic viruses in tissue culture. *Arch. Virol.* **60**:83-103.
21. García-Barreno B, Palomo C, Peñas C, Delgado T, Pérez-Breña P, Melero JA. 1989. Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J. Virol.* **63**:925-932.
22. Gompels VA, Carss AL, Saxby C, Hancock DC, Forrester A, Minson AC. 1991. Characterization and sequence analyses of antibody-selected antigenic variants of herpes simplex virus shown a conformationally complex epitope on glycoprotein H. *J. Virol.* **65**:2393-2410.
23. Gortz J, Brake B, Harle-Grupp V, Falke D. 1984. Replication of HSV-1 in murine peritoneal macrophages: comparison of various virus strains with different properties. *Arch. Virol.* **79**:173-187.
24. Hampar B, Copeland ML. 1965. Persistent herpes simplex virus infection *in vitro* with cycles of cell destruction and regrowth. *J. Bact.* **90**:205-212.
25. Hampar B, Burroughs MAK. 1969. Mechanism of persistent herpes simplex virus infection *in vitro*. *J. Natl. Cancer Inst.* **43**:621-631.
26. Hampl W, Conrad S, Kleinschmidt AK. 1991. Herpes simplex virus type 1 long-term persistence, latency, and reactivation in infected Burkitt lymphoma cells. *Arch. Virol.* **117**:251-267.
27. Haarr L, Skulstad S. 1994. The herpes simplex virus type 1 particle: structure and molecular functions. *APMIS* **102**: 321-346.
28. Harris P, Ralph P. 1985. Human leukemic models of myelo-monocytic development: A review of the HL-60 and U937 cell lines. *J. Leukocyte Biol.* **37**:407-422.
29. Heine JW, Honess RW, Cassai E, Roizman B. 1974. Proteins specified by herpes simplex virus XII. The virion polypeptides of type 1 strains. *J. Virol.* **14**:640-651.
30. Ho D. 1992. Herpes simplex virus latency: Molecular aspects. *Prog. Med. Virol.* **39**:76-115.
31. Hoggan MD, Roizman B. 1959. The isolation and properties of a variant of herpes simplex producing multinucleated giant cells in monolayer cultures in the presence of antibody. *Am. J. Hyg.* **70**:208-219.
32. Holland JJ, Villarreal LP, Welsh RM, Oldstone MBA, Kohne D, Lazzarini R, Scolnick E. 1976. Long-term persistent vesicular stomatitis virus and rabies virus infection of cells *in vitro*. *J. gen. Virol.* **33**:193-211.
33. Honess RW, Roizman B. 1973. Proteins specified by herpes simplex virus. XI. Identification and relative molar rates of synthesis of structural and non-structural herpesvirus polypeptides in infected cells. *J. Virol.* **12**:1346-1365.
34. Howie S, Norval M, Maingay J, McBride WH. 1986. Interactions between herpes simplex virus and murine bone marrow macrophage. *Arch. Virol.* **87**:229-239.
35. Klauck SM, Hampl W, Kleinschmidt AK. 1995. HSV type 1 genome variants from persistently productive infections in Raji and BJAB cell lines, *Arch. Virol.* **140**:1195-1213.

36. Koren HS, Handwerger BS, Wunderlich JR. 1975. Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line. *J. Immunol.* **114**:894-897.
37. Kulcsar G, Dan P, Nasz J, Csata S, L'vov ND, Barinskii IF, Posevaia TA. 1990. Persistence of herpes simplex virus and adenoviruses in lymphocytes of patients with urogenital tumors. *Vopr. Virusol.* **35**:50-52.
38. Kuo YC, Liu WT, Lin CY. 1993. Herpes simplex virus type 1 genes in human mononuclear cells and affecting cell-mediated immunity. *J. Med. Virol.* **41**:138-145.
39. Kwong AD, Frenkel N. 1989. The herpes simplex virus virion host shutoff function. *J. Virol.* **63**:4834-4839
40. Lancz GJ. 1974. Herpes simplex virus types 1 and 2; type and strain specific characteristics affecting virus plaque formation, *Arch. Ges. Virusforsch.* **46**:36-43.
41. Liesegang TJ. 1992. Biology and molecular aspects of herpes simplex and varicella-zoster virus infections. *Ophthalmology* **99**:781-799.
42. Lonsdale DM, Brown SM, Suback-Sharpe JH, Warren KG, Koprowski H. 1979. The polypeptide and the DNA restriction enzyme profiles of spontaneous isolates of herpes simplex virus type 1 from explants of human trigeminal, superior cervical and vagus ganglia. *J. gen. Virol.* **43**:151-171.
43. Lopez C, Dudas G. 1979. Replication of herpes simplex virus type 1 in macrophages from resistant and susceptible mice. *Infect. Immun.* **23**:432-437.
44. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Parr AL, Randall R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
45. Maggs DJ, Chang E, Nasisse MP, Mitchell WJ. 1998. Persistence of herpes simplex virus type 1 DNA in chronic conjunctival and eyelid lesions of mice. *J. Virol.* **72**:9166-9172.
46. Mahy BWJ. 1985. Strategies of virus persistence. *Br. Med. Bull.* **41**:50-55.
47. Mannini-Palenzona A, Sinibaldi P, Costanzo F, Cassai E. 1979. Influence of genetic and physiological properties of the host cell on the cytopathic expression of herpes simplex virus. *Arch. Virol.* **61**:127-140.
48. Mannini-Palenzona A, Bartoletti AM, Foa-Tomasi L, Baserga M, Tognon M, Manservigi R. 1985. Establishment and characterization of a persistent infection of MDBK cells with herpes simplex virus. *Microbiologica.* **8**:165-180.
49. Manservigi R, Spear PG, Buchan A. 1977. Cell fusion induced by herpes simplex virus is promoted and suppressed by different viral glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:3913-3917.
50. Mitchell WJ, Gressens P, Martin JR, DeSantos R. 1994. Herpes simplex virus type 1 DNA persistence, progressive disease and transgenic immediate early gene promoter activity in chronic corneal infections in mice. *J. Gen. Virol.* **75**:1201-1210.
51. Morahan PS, Connor JR, Leary KR. 1985. Viruses and the versatile macrophage. *Br. Med. Bull.* **41**:15-21.
52. Morahan PS, Mama S, Anaraki F y Leary K. 1989. Molecular localization of abortive infection of resident peritoneal macrophages by herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **63**:2300-2307.
53. Morse LS, Pereira L, Roizman B, Schaffer PA. 1978. Anatomy of herpes simplex virus (HSV) DNA. X. Mapping of viral genes by analysis of polypeptides and functions specified by HSV-1 X HSV-2 recombinants. *J. Virol.* **26**:389-410.

54. Nichol PF, Chang JY, Johnson EM Jr, Olivo PD. 1994. Infection of sympathetic and sensory neurones with herpes simplex virus does not elicit a shut-off of cellular protein synthesis: implications for viral latency and herpes vectors. *Neurobiol. Dis.* **1**:83-94.
55. Nii S. 1969. Persistent infection with herpes simplex virus *in vitro*. 1. Establishment and characteristics of persistent herpes simplex virus infection in Earle's L cells. *Biken J.* **12**:45-67.
56. Nii S. 1970. Persistent infection with herpes simplex virus *in vitro*. II. Effect of antibody on the course of herpetic persistency in Earle's L cells. *Biken J.* **13**:339-352.
57. Nishiyama Y, Rap F. 1979. Regulation of persistent infection with herpes simplex virus *in vitro* by hydrocortisone. *J. Virol.* **31**:841-844.
58. Openshaw H, McNeill JI, Lin XH, Niland J, Cantin EM. 1995. Herpes simplex virus DNA in normal corneas: persistence without viral shedding from ganglia. *J. Med. Virol.* **46**:75-80.
59. Reed LJ, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* **27**:493.
60. Rinaldo CR, Richter BS, Black PH, Hirsch MS. 1979. Persistent infection of human lymphoid and myeloid cell lines with herpes simplex virus. *Infect. Immun.* **25**:521-525.
61. Robey WG, Graham BJ, Harris CL, Madden MJ, Pearson GR, Vande-Woude GF. 1976. Persistent herpes simplex virus infections established in two Burkitt lymphoma derived cell lines. *J. gen. Virol.* **32**:51-62.
62. Rock DL. 1993. The molecular basis of latent infections by alphaherpesviruses. *Seminars Virol.* **4**:157-165.
63. Roizman B. 1982. The family herpesviridae: general description, taxonomy, and classification. pp.1-23. *In: The Herpesvirus. Vol. 1.* Roizman B (ed). Plenum Press, New York.
64. Roizman B, Baines J. 1991. The diversity and unity of *Herpesviridae*. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:63-79.
65. Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. 1992. The family *Herpesviridae*: An update. *Arch. Virol.* **123**:425-449.
66. Roizman B. 1996. *Herpesviridae*. *In: Fields Virology, Third Ed.,* Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds.). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia; pp.2221-2230.
67. Roizman B, Sears AE. 1996. Herpes simplex viruses and their replication. pp.2231-2295. *In: Fields Virology, Third Ed.,* Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds.). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
68. Roumillat LF, Feorino PM, Caplan DD, Lukert PD. 1980. Analysis and characterization of herpes simplex virus after its persistence in a lymphoblastoid cell line for 15 months. *Infect. Immun.* **29**:671-677.
69. Rueda P, García-Barreno B, Melero JA. 1994. Loss of conserved cysteine residues in the attachment (G) glycoprotein of two human respiratory syncytial virus escape mutants that contain multiple A-G substitutions (hypermutations). *Virology* **198**:653-662.
70. Sarmiento M. 1988. Intrinsic resistance to viral infection. Mouse macrophage restriction of herpes simplex virus replication. *J. Immunol.* **141**:2740-2748.
71. Sears AE, Halliburton IW, Meignier B, Silver S, Roizman B. 1985. Herpes simplex virus 1 mutant deleted in the  $\alpha 22$  gene: growth and gene expression in permissive and restrictive cells and establishment of latency in mice. *J. Virol.* **55**:338-346.

- 72.Spear PG. 1985. Glycoproteins specified by herpes simplex viruses. pp.315-356. **In:** The Herpesvirus. Vol. 3. Roizman B (ed). Plenum Press, New York.
- 73.Spear PG. 1993. Entry of alphaherpesvirus into cells. *Seminars Virol.* **4:**167-180.
- 74.Stevens JG, Cook ML. 1971. Restriction of herpes simplex virus by macrophage. An analysis of the cell virus interaction. *J. Exp. Med.* **133:**19-38.
- 75.Stevens JG. 1994. Overview of herpesvirus latency. *Seminars Virol.* **5:**191-196.
- 76.Stewart DR, Anaraki F, Leary K. 1992. Analysis of the basis for persistence of herpes simplex virus type 1 in undifferentiated U937 Cells. *Viral Immunol.* **5:**173-184.
- 77.Strelow L, Smith T, Leib D. 1997. The virion host shutoff function of herpes simplex virus type 1 plays a role in corneal invasion and functions independently of the cell cycle. *Virology* **231:**28-34.
- 78.Tang JL, Yamamoto M, Sakuma S, Mori R, Nagayama A. 1988. Persistent infection with herpes simplex virus type 1 in an Ia antigen-positive murine macrophage cell line. *Microbiol. Immunol.* **32:**363-374.
- 79.Tenney DJ, Morahan PS. 1987. Effects of differentiation of human macrophage-like U937 cells on intrinsic resistance to herpes simplex virus type 1. *J. Immunol.* **139:**3076-3083.
- 80.Tenney DJ, Morahan PS. 1991. Differentiation of the U937 macrophage cell line removes an early block of HSV-1 infection. *Viral Immunol.* **4:**91-102.
- 81.Tirado R, Sarmiento RE, Gómez B. 1998. Spontaneous shift of an HSV type 1 productive, persistently infected macrophage-like culture to a non-productive culture. *Res. Virol.* **149:**145-151.
- 82.Ward PL, Roizman B. 1994. *Herpes simplex* genes: the blueprint of a successful human pathogen. *Trends in genetics* **10:**267-274.
- 83.Ward PL, Roizman B. 1998. Evasion and Obstruction. The central strategy of the interaction of human herpesviruses with host defenses. **In:** *Herpesviruses and Immunity.* Medveczky PG, Friedman H, Bendinelli M (eds). New York: Plenum Press; pp 1-32.
- 84.Wheeler CE. 1960. Further studies on the effect of neutralizing antibody upon the course of herpes simplex infections in tissue culture. *J. Immunol.* **84:**394-403.
- 85.Whitley RJ. 1996. Herpes simplex virus. **In:** *Fields Virology, Third Ed.,* Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds.). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia; pp.2297-2343.
- 86.Wu L, Morahan PS. 1992. Macrophage and other non-specific defenses: role in modulation resistance against herpes simplex virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **179:**89-110.
- 87.Younger JS, Preble OT. 1980. Viral persistence: evolution of the viral population. *Comprehensive Virology* **16:**73-135.