

*Editor*

11261  
2ej  
20

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DE LAS RECRUDESCENCIAS HERPETICAS EN LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL  
SISTEMA INMUNE HUMANO

TESIS

Que para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS,

Area Microbiología,

Presenta:

JULIO RAUL SANTIAGO CRUZ.  
México, D. F., 1989.

**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## CONTENIDO

Reconocimientos	i
Contenido	iii
Abreviaturas	v
Lista de cuadros	v
Lista de figuras	v
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
El virus herpes simple tipo 1 y el fenómeno de la latencia	2
Estrategias que se han usado para estudiar la latencia	3
Funciones virales y su relación con la latencia	3
Uso de mutantes en el estudio de la latencia	4
Productos virales durante la latencia	4
Factores de la célula blanco relacionados con la latencia	5
Dos hipótesis acerca de la interacción virus-neurona	5
La infección latente en el organismo completo	6
Participación de la respuesta inmune en el fenómeno de la latencia	7
Actividad antiviral del sistema inmune humano durante la recrudescencia	8
Hipótesis	12
Objetivos	12
Diseño experimental	13
MATERIAL Y METODOS	14
Virus	14
Líneas celulares	14
Desprendimiento celular	14
Cuenta viable	15
Producción viral	15
Titulación viral	15
Titulación de anticuerpos neutralizantes	16
Separación de células mononucleares humanas	16
Cuenta diferencial	17
Separación de linfocitos y monocitos	17
Separación de células T	18
Separación de subpoblaciones de células T	19
Determinación de la actividad antiviral de las células linfoides	19
a) Ensayo de reducción de placa	20
b) Ensayo de reducción de la progenie viral	20
Estudio de la población de voluntarios	20
Pruebas de estadística	21
RESULTADOS	22
1. Establecimiento de las condiciones óptimas de propagación y cuantificación del VHS-1	22
A) Producción viral	22
i) Cinética de producción	22
ii) Efecto de la congelación en la liberación del virus intracelular	22
iii) Efecto de la temperatura sobre la infectividad del	

	VHS-1	24	
B)	Cuantificación de la suspensión viral	24	
	1) Tinción de las placas virales	24	
	ii) Cinética de crecimiento de la placa viral del VHS-1		26
2.	Actividad antiviral del sistema inmune durante la fase aguda o latente de la infección por el VHS-1	27	
	A) Actividad antiviral humoral contra el VHS-1	27	
	B) Actividad antiviral de las CM contra el VHS-1	29	
	1) Reducción de placas	29	
	ii) Reducción de la progenie viral	29	
3.	Relación de la actividad antiviral del sistema inmune y la frecuencia de la recrudescencia del VHS-1	29	
	A) Actividad antiviral humoral contra el VHS-1	33	
	B) Actividad antiviral celular contra el VHS-1	33	
4.	Correlación entre la actividad antiviral de las CM y la actividad antiviral del plasma	35	
5.	Participación de las subpoblaciones de células linfoides en la actividad antiviral de las CM	36	
	A) Rendimiento de las células linfoides	36	
	B) Actividad antiviral de los linfocitos	36	
	C) Actividad antiviral de los monocitos	36	
	D) Actividad antiviral de las células no T	38	
	E) Actividad antiviral de las células T	38	
	F) Relación entre la actividad antiviral de las CM y las subpoblaciones de células linfoides	38	
	G) Actividad antiviral de las células T con diferente densidad	38	
DISCUSION		42	
CONCLUSIONES		47	
APENDICE		48	
	Material y reactivos	48	
	Preparación de las soluciones de trabajo	49	
BIBLIOGRAFIA		52	

## ABREVIATURAS

PBS	Amortiguador salino de fosfatos (Phosphate buffer saline)
CM	Células mononucleares
MDI	Multiplicidad de infección
OMK	Owl Monkey Kidney, línea celular de mono lechuzca, <u>Aotus sp</u>
ufp	Unidades formadoras de placa
Vero	Línea celular de mono verde africano, <u>Cercopithecus aetiops</u>
VHS-1	Virus herpes simple tipo 1

## LISTA DE CUADROS

1. Características de los modelos animales para el estudio de la latencia del VHS-1 6
2. Efecto de la congelación en la liberación del virus intracelular 24
3. Crecimiento de la placa viral del VHS-1 26
4. Clasificación de los voluntarios y determinaciones de la actividad antiviral 28
5. Título de anticuerpos neutralizantes en el plasma de voluntarios con infección activa o latente por VHS-1 30
6. Actividad antiviral de las CM contra el VHS-1 32
7. Reducción de la progenie viral por las CM 33
8. Actividad antiviral de monocitos, linfocitos, células T y células no T contra el VHS-1 37
9. Actividad antiviral de células T de diferente densidad contra el VHS-1 40

## LISTA DE FIGURAS

1. Efecto citopático del VHS-1 sobre células Vero 23
2. Cinética de producción viral 23
3. Efecto de la congelación en la liberación del virus intracelular 25
4. Efecto de la temperatura sobre la infectividad del VHS-1 25
5. Cinética de crecimiento de la placa viral 27
6. Título de anticuerpos neutralizantes y actividad antiviral de las CM de voluntarios con infección activa por el VHS-1 y voluntarios con infección latente 31
7. Efecto de la frecuencia de las recrudescencias sobre la actividad antiviral de plasma y CM 34
8. Correlación entre actividad antiviral de las CM y título de anticuerpos neutralizantes anti-VHS-1 35
9. Actividad antiviral de CM, monocitos, linfocitos, células T y células no T contra el VHS-1 37
10. Actividad antiviral CM vs. linfocitos (o) y monocitos (o) 39
11. Actividad antiviral CM vs. células T (o) y células no T (o) 39
12. Actividad antiviral de las células T de diferente densidad contra el VHS-1 41

## RESUMEN

Se estudió la actividad neutralizante del plasma y la actividad antiviral contra el virus Herpes simple tipo 1 (VHS-1) de las células mononucleares (CM), de sangre periférica humana. Participaron en el estudio 37 voluntarios con historia clínica de Herpes labialis, los cuales se agruparon de la siguiente manera: 18 sujetos tenían la lesión herpética en el momento de tomar la muestra; 14 sujetos no presentaban lesión, pero tenían antecedentes de herpes labial y 5 voluntarios no tenían antecedentes de la infección.

La actividad antiviral del plasma se expresó como el título de anticuerpos neutralizantes. La actividad antiviral de las CM se determinó en un sistema in vitro de naturaleza xenogénica y se expresó como el porcentaje de placas virales inhibidas; el sistema consistió en una línea celular de mono (Vero) infectada con el VHS-1 a la cual se le adicionaron las CM humanas en una relación CM:célula infectada de 5:1.

Se observó que las recrudescencias virales incrementan la actividad antiviral de las CM ( $p < 0.001$ ) y el título de anticuerpos ( $p < 0.01$ ). Además la magnitud de la actividad celular se correlaciona con la frecuencia de la lesión herpética ( $\alpha = 0.001$ ). En cambio, no hay correlación entre el título de anticuerpos y la frecuencia de la lesión ( $\alpha = 0.001$ ).

No se encontró correlación entre la actividad antiviral de los anticuerpos y la actividad de las CM ( $r = 0.2083$ ).

La actividad antiviral de las CM parece correlacionarse con la actividad de las células T en cambio no se correlaciona con los monocitos y las células no T. Los monocitos mostraron una elevada actividad antiviral en la mayoría de los casos estudiados y dicha actividad fue independiente de la recrudescencia. Las células asesinas naturales mostraron valores intermedios y elevados y no está clara la relación de su actividad con las recrudescencias herpéticas.

## INTRODUCCION

El virus herpes simple tipo 1 y el fenómeno de la latencia.

El virus herpes simple tipo 1 (VHS-1) causa la destrucción de la célula en la cual se multiplica. La destrucción empieza desde las primeras etapas de la infección. El virus inhibe la síntesis de ADN y de proteínas de la célula hospedera: aglomera la cromatina nuclear y disocia los polirribosomas; paraliza en forma progresiva la maquinaria celular e incluso usa las bases del ADN hospedero para la duplicación del ADN propio. La consecuencia final de la infección productiva es la progenie viral y la muerte celular (37). A pesar de su potencial destructivo, la característica central de la infección por el VHS-1 es la capacidad de permanecer latente en el sistema nervioso central del ser humano por el resto de su vida (53).

El VHS-1 es el causante, en un 90% de los casos, del Herpes labialis. Esta infección tiene características muy especiales: las lesiones recurrentes a menudo se presentan en el mismo sitio; las recurrencias son inducidas por estímulos muy diversos como fiebre, exposición a los rayos solares, menstruación, tensión nerviosa, etc.; durante los intervalos entre las recrudescencias no es posible aislar el virus de los sitios periféricos donde ocurren las lesiones (53). Por otra parte, desde hace mucho tiempo se empezó a relacionar el sistema nervioso central con la infección herpética. Por ejemplo, en 1905 se observó que después de cortar en forma quirúrgica la raíz posterior del nervio trigémino se presentaban vesículas herpéticas en los tejidos inervados por las ramificaciones de este nervio (11).

Estas observaciones condujeron finalmente al desarrollo del siguiente modelo hipotético de la infección: el virus se transmite por medio de secreciones contaminadas, coloniza las células epiteliales, se multiplica, invade las terminaciones nerviosas, viaja por el nervio hasta los ganglios espinales —generalmente al ganglio trigémino—, donde produce una infección aguda y se establece en forma latente en las neuronas. Durante las reactivaciones, bajo diferentes estímulos, el virus pasa a un estado activo de multiplicación en el ganglio,

viaja en forma centrífuga de nuevo por el nervio, de regreso al sitio de entrada, donde se multiplica y produce de nuevo la lesión herpética (31, 42, 51, 53 y 76).

Al parecer, el establecimiento de la latencia en el ganglio depende de la interacción específica entre el virus y la célula blanco; es decir, la neurona, sin embargo, el medio ambiente fisiológico tiene una gran influencia sobre la infección, desde la entrada del virus en el epitelio hasta su llegada al ganglio, así como en el establecimiento y mantenimiento de la latencia (53).

Estrategias que se han usado para estudiar la latencia.

La latencia se ha estudiado con tres enfoques diferentes. Por una parte se ha tratado de determinar cuáles funciones virales están relacionadas con el fenómeno, ya sea con el establecimiento o el mantenimiento de la latencia. Por otro lado, se ha intentado definir cuáles son las características relevantes de la célula hospedera. Por último, se ha tratado de integrar la información concerniente al virus y a la célula hospedera en el marco del organismo completo, de manera que se ha experimentado con modelos animales para buscar datos que se puedan correlacionar con las observaciones hechas en el ser humano.

Funciones virales y su relación con la latencia.

La búsqueda de una función viral que se encuentre relacionada directamente con la latencia se basa en un principio conceptual simple: la entrada del genoma viral silvestre en una célula permisiva da como resultado su expresión (37). Así, básicamente se tienen dos posibilidades. La primera es que el fenómeno de la latencia dependa de genes virales y la segunda es que sea consecuencia de la fisiología particular de la neurona (53). Los genes virales que en teoría podrían estar relacionados con el fenómeno se han tratado de identificar mediante dos formas diferentes: el uso de mutantes y la determinación de los productos virales en los ganglios con la infección latente.

Uso de mutantes en el estudio de la latencia. Mediante el uso de mutantes termosensibles se ha observado que ciertas cepas incapaces de duplicar su ADN son capaces de establecer la infección latente en ratón. Esto sugiere que ni la duplicación del ADN ni la infección productiva son esenciales para el establecimiento de la latencia en las neuronas (32, 35 y 79). Otro gen que aparentemente no es necesario para el establecimiento de la infección latente es el gen de la timidina quinasa (53).

En cuanto al resto de los genes virales, se han obtenido pocos datos. Sólo se sabe que cuando menos el 20% del genoma viral no es esencial para la multiplicación lítica del virus en cultivo de células. En resumen, entonces, por medio de mutantes no se ha podido confirmar que algún gen viral sea indispensable para el establecimiento o el mantenimiento de la latencia (3).

Productos virales durante la latencia. Para definir la naturaleza molecular del fenómeno, es necesario determinar si se expresan uno o más genes virales durante la latencia y cuáles son. En este aspecto ha sido difícil demostrar en forma convincente la producción de proteínas virales en la célula con el virus latente. Sin embargo, existe un reporte de que un polipéptido de expresión temprana se presenta en el ganglio trigémino de conejos con la infección latente, pero se desconoce su relación con el estado latente del virus (25).

Por otra parte, en la búsqueda de ARN se han detectado secuencias homólogas a los dominios que codifican genes de expresión intermedia y tardía (21 y 22). También se detectó un transcrito sin residuo de poliadenina, que se encontraba en una concentración de  $10^4$  a  $10^5$  moléculas/célula (68). (El transcrito corresponde a la cadena opuesta, "antisentido", del gen para una proteína temprana del ciclo lítico, pero el papel de esta proteína aún no está claro (3)). Sin embargo el gen que codifica este transcrito asociado a la latencia parece pertenecer a una clase nueva de acuerdo con los criterios de inhibición en células infectadas (69); es decir no presenta las características usuales de los genes del VHS-1.

La hibridación in situ ha mostrado que la región del genoma que se transcribe en ratones con la infección latente es la misma que se ha detectado en humanos (8). Además, la detección de los transcritos in situ permite también calcular el porcentaje de neuronas infectadas que podrían liberar virus en una explantación (3).

#### Factores de la célula blanco relacionados con la latencia.

En caso de que la latencia no dependa de la expresión particular de uno o más genes virales; entonces la segunda posibilidad es que la latencia sea consecuencia de la fisiología particular de la neurona. En este sentido, las características más notables de la neurona son: es una célula que generalmente no se divide más, está completamente diferenciada y tiene una función especializada. Si la latencia finalmente dependiera de las características de la neurona, esto explicaría la idea general de que cambios en el metabolismo de esta célula pueden estar relacionados con la reactivación del virus latente (28).

#### Dos hipótesis acerca de la interacción virus-neurona.

Se han propuesto dos modelos principales para explicar el fenómeno de la latencia. El modelo del estado estático propone que el genoma viral no se expresa durante la latencia. El modelo dinámico en cambio, propone que el genoma se expresa cuando menos en un nivel reducido (53). Existen datos que apoyan el estado estático; entre éstos se mencionan los siguientes: por inmunofluorescencia no se han podido detectar antígenos virales en cortes secuenciales de ganglios de ratones infectados (51); como ya se mencionó, diferentes mutantes termosensibles incapaces de sintetizar ADN se establecieron en forma latente, lo cual sugiere que la síntesis de ADN no es esencial para el establecimiento de la latencia (32 y 79); y durante la infección latente se ha observado mucho menor número de copias de ADN en comparación con la infección activa (0.11 contra 1.5 copias por célula), lo mismo que de ARN (menos de 0.0005 contra 0.15 copias por célula, respectivamente) (45). Con base en estos resultados se considera que es muy posible que la infección latente esté basada en

un mecanismo estático. Sin embargo, no se puede descartar por completo la hipótesis dinámica.

La infección latente en el organismo completo.

También se ha estudiado la latencia considerando el ambiente fisiológico del organismo en el cual se desarrolla la infección. Para esto han sido de gran utilidad varios modelos animales, entre éstos se encuentran el ratón, la rata y el conejo. En el cuadro 1 se muestran algunas características de estos modelos (28 y 53). Para que el modelo sea representativo, el animal debe ser capaz de conservar el virus en forma latente en el sistema nervioso central (53). Esto facilita el estudio de los diferentes pasos del proceso de latencia.

Cuadro 1

---

Características de los modelos animales para el estudio de la latencia del VHS-1.

Modelo	Inoculado en	Ventajas	Desventajas
Ratón	Ojo	Permite observar la multiplicación y el establecimiento de la latencia.	Es difícil inducir las reactivaciones <u>in vivo</u> .
Ratón	Oreja	Es relativamente fácil inducir las reactivaciones con ciertas cepas.	Es difícil de reproducir; presenta reactivaciones espontáneas.
Conejo	Ojo	Permite observar la multiplicación y el establecimiento de la latencia.	Presenta reactivaciones espontáneas.
Rata	Nervio mandibular	Permite observar la multiplicación y el establecimiento de la latencia.	No se han podido inducir reactivaciones <u>in vivo</u> .

---

Los diferentes modelos experimentales han sido de utilidad para estudiar el establecimiento de la infección latente. Por ejemplo, se ha visto que cuando el virus llega a los ganglios es capaz de producir una infección aguda, como lo demuestran los estudios con los modelos de ratón y conejo (74, 75 y 76). En el ratón, después de la inoculación en el cojinete plantar, se puede recuperar fácilmente el virus infeccioso de los siguientes tejidos: nervio ciático, ganglios espinales, nervio sacrociático, raíces dorsales, médula espinal y cerebro. En los ganglios espinales el virus infeccioso aparece al segundo día, alcanza el máximo de multiplicación hacia el cuarto día y desaparece al séptimo día; en los ratones que sobreviven a la infección aguda es posible demostrar la presencia del virus latente en los ganglios espinales (28).

En lo que respecta a las reactivaciones del virus, en ratones se ha observado que diversos estímulos pueden reactivar la infección; por ejemplo, cortar la raíz nerviosa del ganglio, lesionar directamente el ganglio (38, 44 y 80), un traumatismo en el epitelio (5 y 27), la administración de un agente inmunosupresor (39 y 61) y una sobreinfección con neumococos (76).

Aunque son varios los modelos en los cuales se han descrito las recrudescencias de las lesiones herpéticas, el único sistema hasta la fecha en el cual se han observado tanto reactivaciones espontáneas como inducidas es el ratón inoculado en oreja (28). Las principales ventajas de este modelo son, en particular, las siguientes: la oreja tiene una superficie epitelial relativamente lisa y desnuda donde se puede inocular fácilmente el virus y se pueden observar las lesiones; las lesiones recurrentes se pueden inducir por estímulos que también desencadenan las reactivaciones en el humano (v.gr., luz ultravioleta y traumatismos) y el uso de ratones es muy práctico y económico.

Participación de la respuesta inmune en el fenómeno de la latencia.

Aunque no se conocen con certeza los factores que participan en el establecimiento y mantenimiento de la latencia; se han hecho las

siguientes observaciones interesantes: la transición de la fase aguda de la infección primaria a la fase latente ocurre en forma simultánea con la aparición de los mecanismos específicos de la respuesta inmune, en particular: los anticuerpos antivirales (42 y 51), la hipersensibilidad retardada y la citotoxicidad celular (51); las infecciones primarias en individuos inmunocompetentes por lo general son asintomáticas; la forma sintomática es localizada, autolimitante, se resuelve favorablemente en dos a tres semanas y conduce al estado de latencia; las mismas infecciones en sujetos inmunodeficientes, pacientes inmunocomprometidos y en neonatos tienden a agravarse, generalizarse y conducir a la muerte (42 y 51). Estos datos sugieren que la respuesta inmune es importante para el establecimiento y para el mantenimiento de la latencia.

Con base en resultados obtenidos, principalmente con ratones, Openshaw y cols. (40) han propuesto un modelo que explica la función de la respuesta inmune durante el establecimiento y el mantenimiento de la latencia. Según este modelo, las células ganglionares no son permisivas para el virus; sin embargo, diversos estímulos, como la misma multiplicación de virus en la piel o la inflamación, las pueden volver permisivas. En este caso la respuesta inmune eliminaría el estímulo reduciendo la multiplicación del virus en el epitelio; así, las células nerviosas regresarían al estado no permisivo y se establecería la latencia. Este modelo concuerda muy bien con las observaciones realizadas sobre el modelo de ratón. Por ejemplo, los diversos estímulos que reactivan la infección latente —como neurectomía, traumatismo epitelial, inmunosupresión con ciclofosfamida e irradiación con rayos X— podrían actuar como señales que afectan el metabolismo de las células y cambian así el estado de permisividad.

Actividad antiviral del sistema inmune humano durante la recrudescencia.

Los efectores del sistema inmune humano que se consideran de importancia en la resistencia a las infecciones virales son de dos tipos: específicos e inespecíficos. Entre los inespecíficos se encuentran los siguientes: complemento e interferón (humorales) y

macrófagos, polimorfonucleares y células asesinas naturales (celulares).

Los efectores específicos pueden ser dependientes de anticuerpos: neutralización; citotoxicidad por complemento; y citotoxicidad celular por macrófagos, polimorfonucleares y células asesinas. O pueden ser mediados por células: citotoxicidad por células T y producción de linfocinas, como interferón gama, activadores de macrófagos y linfoquinas.

Se han realizado diversos estudios para evaluar la actividad antiviral de los diferentes componentes en individuos que padecen frecuentes recrudescencias herpéticas, con el fin de determinar la función que desempeñan en el mantenimiento de la latencia y las reactivaciones. Los ensayos que se han realizado con mayor frecuencia para medir la actividad antiviral de los componentes son: neutralización de la infectividad viral por anticuerpos séricos (24, 49, 50, y 84), pruebas de citotoxicidad (33, 54, 63, 73 y 81), determinación de factores solubles liberados por las células linfoides (10, 41, 48, 62, 70 y 81) y pruebas de transformación blastoide (30, 36, 41, 49, 62, 72, 73 y 81).

De acuerdo con las observaciones realizadas, al parecer los anticuerpos no desempeñan una función fundamental en la protección contra las recrudescencias. En primer lugar, las lesiones recurrentes aparecen incluso en presencia de altos títulos de anticuerpos (14, 20, 36 y 86). Además, varios autores reportan que los anticuerpos no varían durante una reactivación (14, 20, 81 y 86), lo cual no permite relacionar el descenso en la respuesta humoral con el riesgo de una recrudescencia. Sin embargo, aunque los anticuerpos no sean relevantes para la protección contra las recrudescencias, sí podrían ser importantes en el control de la infección después de la reactivación, ya que pueden inactivar los virus que se encuentran en el medio extracelular y, en combinación con el complemento o con células linfoides, son capaces de lisis, al menos in vitro, células infectadas (2, 9 y 33).

Un procedimiento muy usado para evaluar la actividad de los linfocitos es el ensayo de la transformación blastoide inducida por los antígenos virales. Sin embargo, las observaciones hechas mediante esta prueba son contradictorias: algunos investigadores informan que los linfocitos de los individuos con recrudescencias tienen una actividad disminuida (30); otros investigadores reportan una actividad normal (57, 58 y 81); y otros más la encuentran aumentada (41 y 49).

Las células T citotóxicas, una población de linfocitos, son capaces de lisar en forma específica células infectadas por virus (para esto las células infectadas deben presentar el mismo antígeno de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad que las células T). A pesar de que estas células podrían ser relevantes en la resistencia contra el VHS-1, no se ha estudiado su actividad en relación con las recrudescencias herpéticas. Sólo se ha observado que son capaces de lisar in vitro células infectadas (83), de manera que se desconoce su actividad in vivo.

Al parecer las células asesinas, capaces también de lisar células infectadas (in vitro y en colaboración con anticuerpos) (33), tampoco desempeñan una función significativa contra las recrudescencias ya que, como se mencionó antes, las recrudescencias se presentan aún en el caso de altos títulos de anticuerpos. En realidad no se conoce la importancia in vivo de esta población celular.

Otra población de particular interés en el control de una infección viral son las células asesinas naturales (linfocitos capaces de lisar en forma inespecífica y espontánea células infectadas con virus y células tumorales) (46 y 82). Se ha observado que una baja actividad de citotoxicidad natural se correlaciona con una mayor susceptibilidad a la infección herpética (7), pero no se ha encontrado ninguna relación entre esta actividad y el mantenimiento de la latencia.

También han sido investigados los factores solubles producidos por los linfocitos ante un estímulo antigénico. Por ejemplo, se ha observado que las células linfoides aumentan su capacidad de

sintetizar interferón después de una recrudescencia (10 y 48); esta capacidad disminuye con el tiempo y, de acuerdo con el descenso, es posible predecir una nueva recrudescencia (10).

Otro factor estudiado ha sido el factor inhibidor de la migración de leucocitos y en este caso se han observado variaciones en la capacidad de producción del factor en relación con una recrudescencia herpética (41). Dado que el interferón también presenta actividad de inhibidor de la migración, el factor medido en este estudio quizá era interferón, sin embargo los autores no hicieron determinaciones específicas para confirmarlo.

Como se puede apreciar, no está claro qué función tienen, en el mantenimiento de la latencia, la mayoría de los efectores de la respuesta inmune, resulta evidente entonces que se necesitan realizar más estudios al respecto. Además pocos trabajos han determinado al mismo tiempo la actividad de los anticuerpos y la actividad celular (36, 73 y 81).

Por otra parte, varios autores han utilizado modelos in vitro para evaluar la actividad antiviral de las células linfoides (6, 16, 56 y 67) y en uno de ellos se reporta una correlación entre la actividad in vitro de las células linfoides, la hipersensibilidad retardada y la producción del factor inhibidor de la migración de los macrófagos (67).

En el presente trabajo se decidió estudiar la actividad antiviral de las células mononucleares (CM) humanas, de las subpoblaciones celulares y del plasma, con el propósito de entender la relación de la actividad de los componentes inmunes con la reactivación de la lesión herpética.

Para determinar la actividad antiviral de las células linfoides se usó un sistema in vitro de naturaleza xenogénica. El sistema consiste en una línea celular de mono infectada con el virus y la actividad antiviral se midió como el porcentaje de placas virales inhibidas por las CM. Este modelo tiene las ventajas de que sirve para

evaluar las poblaciones celulares en forma individual y para medir en forma global el efecto directo de las células y el efecto de los factores solubles (6, 16, 56 y 67).

La actividad antiviral del plasma se determinó como el título de anticuerpos neutralizantes contra el VHS-1. Las determinaciones de la actividad antiviral celular y humoral se realizaron durante las recrudescencias y durante los intervalos sin lesión herpética.

En un estudio preliminar (59) se observó una relación directa entre la actividad antiviral de las CM y la presencia de la lesión herpética. Sin embargo, sólo se estudiaron 13 sujetos. En el presente trabajo se incrementó la población de voluntarios a 37.

Además, con el fin de estudiar el papel de las subpoblaciones celulares, se realizaron ensayos de la actividad antiviral de las diferentes poblaciones de células linfoides: monocitos, Linfocitos, linfocitos T, linfocitos no T y subpoblaciones de linfocitos T.

#### Hipótesis

La presencia de la lesión herpética influye en la actividad antiviral humoral y celular del sistema inmune.

La actividad antiviral está relacionada con la frecuencia de las recrudescencias herpéticas.

La magnitud de la actividad antiviral de cada subpoblación de células linfoides es diferente.

#### Objetivos

Determinar, en individuos con antecedentes de herpes labial, la actividad antiviral del plasma en presencia o ausencia de la lesión herpética.

Determinar en los mismos individuos la actividad antiviral de las CM.

Determinar la relación entre la actividad antiviral humoral y la frecuencia de recrudescencias herpéticas.

Determinar la relación entre la actividad antiviral celular y la frecuencia de recrudescencias herpéticas.

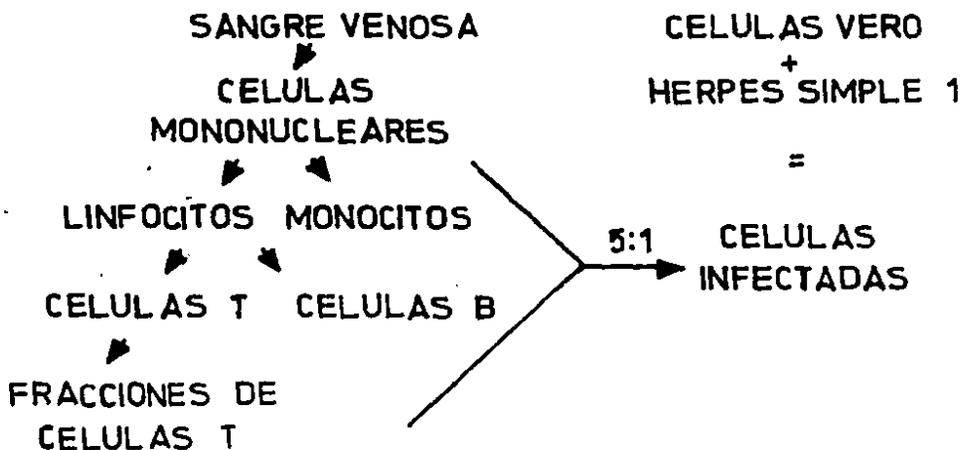
Determinar la relación entre la actividad antiviral celular y la actividad humoral.

Determinar la actividad antiviral de monocitos, linfocitos, linfocitos no T, linfocitos T y subpoblaciones de linfocitos T en individuos con y sin lesión herpética.

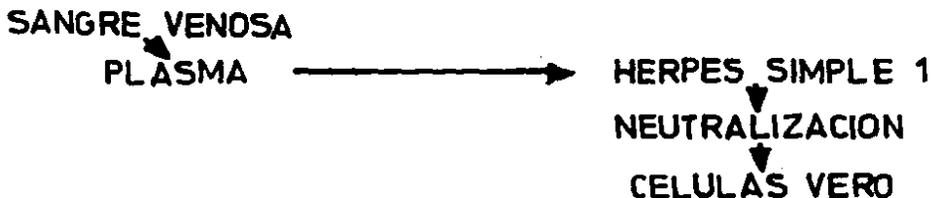
## DISEÑO EXPERIMENTAL

### Actividad antiviral celular

CELULAS EFECTORAS: CELULAS BLANCO



### Actividad antiviral humoral



## MATERIAL Y METODOS .

Virus. Se trabajó con el virus Herpes simple tipo 1 cepa Macroplaque; este virus fue aislado y donado amablemente por el Dr. Bernard Roizman de la Universidad de Chicago. El virus se adaptó a las líneas celulares mediante un mínimo de tres pases.

Líneas celulares. Las líneas celulares usadas fueron la línea OMK (Owl Monkey Kidney) de mono Aotus sp., donada amablemente por el Dr. Robert Honess del National Institute for Medical Research Mill Hill, Londres, Inglaterra, y la línea Vero, fibroblastos de riñón de mono verde africano, donada por el M. C. Julio de Mucha Macías del Instituto Nacional de Virología, México, D. F. Las células se cultivaron en Medio Eagle Modificado por Dulbecco, complementado con 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 0.03% de glutamina y 0.37% de bicarbonato de sodio; esta solución, en lo sucesivo, se denominará medio de cultivo (véase, en el apéndice, la procedencia de reactivos y la preparación de soluciones de cultivo).

Desprendimiento celular. Las células OMK y Vero se resebraron mediante la técnica descrita por Kuchler (34) con algunas modificaciones. A una botella de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (véase en el apéndice la procedencia del material empleado) con una monocapa confluyente de células, se le retiró el medio, se lavó con amortiguador salino de fosfatos (PBS, "phosphate buffer saline") y con EDTA al 0.2%, se incubó con 500 µl de tripsina al 0.25% hasta el desprendimiento de la monocapa, lo que se aprecia a simple vista. Las células se resuspendieron de inmediato en medio de cultivo complementado con 10% de suero fetal de ternera. Se realizó una cuenta viable, se ajustó la concentración y se distribuyeron alícuotas de la suspensión en la siguiente forma:

Recipiente	células/ml
botella de 25 cm <sup>2</sup>	3 x 10 <sup>6</sup> /5
pozo (caja de 24 pozos)	2 x 10 <sup>5</sup> /0.5
pozo (caja de 96 pozos)	4 x 10 <sup>4</sup> /0.1.

Las células se incubaron a 37°C en ambiente húmedo y con 5% de

CO<sub>2</sub>; en lo sucesivo, todas las incubaciones a 37°C son en este ambiente a menos que se especifique lo contrario. En estas condiciones se forman monocapas confluentes en 24 h.

Cuenta viable. Las células se contaron en una cámara de Neubauer y la viabilidad celular se determinó por exclusión de azul de tripano según las recomendaciones de Kuchler (34). Para esto, la suspensión celular se diluyó 1:10 con azul de tripano al 0.02% en PBS; se contaron las células lo más rápido posible, a los cuatro minutos de mezclarlas con el colorante, y se determinó la concentración.

Producción viral. El VHS-MP se propagó siguiendo el método de Doller y cols. (13) con algunas modificaciones. Se infectó una monocapa confluyente de células Vero a una multiplicidad de infección (MDI) de 0.01 ufp/célula. El inóculo se incubó a 37°C durante 30 min. Se lavó la monocapa con 5 ml de PBS, se adicionó medio de cultivo y se incubó a 37°C. Después de comprobar la formación de sincitios y el desprendimiento celular (efecto citopático) a las 48 h, se liberó el virus intracelular con tres ciclos de congelación-descongelación en una mezcla de etanol-acetona (1:1) y hielo seco. La suspensión se centrifugó 10 min a 1 000 x g y 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se le determinó el título viral por ensayo de placas. El virus se fraccionó en alícuotas de 1.8 ml y se conservó en nitrógeno líquido hasta su uso.

Titulación viral. El VHS-MP se tituló por ensayo de placas según el método de Doller y cols. (13) con algunas modificaciones. El virus se diluyó de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>. De cada dilución se adicionaron 200 µl a una monocapa de células Vero, en una caja de 24 pozos. A tres testigos celulares se les adicionó sólo medio. Se incubaron las monocapas 30 min a 37°C, se les retiró el virus no adsorbido, se lavaron con PBS y se agregó a cada una medio de cultivo complementado con 2% de suero humano con un título de anticuerpos neutralizantes contra el VHS-1 de 512, este medio se denominó medio anti-VHS-1. Las monocapas se incubaron a 37°C.

Se comprobó la aparición del efecto citopático. Las células se

fijaron con formaldehído al 4 % durante 10 min. Para teñirlas, se lavaron con agua de la llave y se incubaron durante 30 min con cristal violeta al 1 % en etanol o con colorante de Giemsa. Se contaron las placas virales y se calculó el título con la siguiente fórmula:

$$\text{ufp/ml} = \text{PV} \times 5 \times \text{factor de dilución},$$

donde PV son las placas contadas en las monocapas con mayor cantidad de placas individuales y 5 es el factor de corrección para los 200  $\mu\text{l}$  de inóculo.

Titulación de anticuerpos neutralizantes. Los plasmas se titularon mediante el procedimiento de Ratner y Smith (50) con algunas modificaciones. Para esto, se inactivaron a 56° C durante 30 min y se diluyeron de  $2^{-2}$  a  $2^{-10}$  con medio de cultivo. Cada dilución de plasma (500  $\mu\text{l}$ ) se incubó con 100 ufp/500  $\mu\text{l}$  de virus durante 30 min a 25°C. Se preparó un testigo viral mezclando 500  $\mu\text{l}$  de medio con 500  $\mu\text{l}$  de virus. Para el testigo celular se preparó medio solo. Cada mezcla se adicionó por triplicado a una monocapa celular de una caja de 24 pozos y se incubó durante 30 min a 37° C. Se retiró el virus no adsorbido y se lavaron las monocapas con PBS. A cada monocapa se le adicionó medio anti-VHS-1 y se incubó la caja a 37° C por un tiempo de 18 h. Las monocapas se fijaron y tiñeron como indica el procedimiento para la titulación viral.

El título de anticuerpos neutralizantes del plasma se reportó como el valor recíproco de la dilución que reduce el 50% de las placas virales. El valor se calculó con la fórmula de Irwin y Cheeseman (29):

$$\text{Log}_2 X = \text{Log}_2 N - \frac{\text{PR} > 50 - 50}{\text{PR} > 50 - \text{PR} < 50},$$

donde  $\text{Log}_2 X$  es el logaritmo en base 2 de la dilución que reduciría exactamente en un 50% las placas (recuérdese que los logaritmos de las diluciones son negativos), N es la mayor dilución que reduce más del 50 %,  $\text{PR} > 50$  es el porcentaje de reducción en N y  $\text{PR} < 50$  es el porcentaje de reducción en la dilución siguiente a N. Finalmente, el  $\text{Log}_2 X$  se puede convertir en  $\text{log}_{10} X$  y en X mediante:

$$X = \text{Antilog}_{10} (0.3010 \text{Log}_2 X).$$

Separación de células mononucleares humanas. La separación de las

células mononucleares (CM) de sangre periférica humana se hizo mediante el método descrito en el boletín 1077 de Sigma (66). Se mezclaron 22 ml de sangre venosa humana con 220  $\mu$ l de heparina 1 000 UI/ml y con 11 ml de PBS. La mezcla se depositó lentamente, sobre 15 ml de Histopaque en un tubo de centrifuga de 50 ml. El tubo se centrifugó 30 min a 400 x g a 25° C. Con la centrifugación se formó, entre el plasma y el Histopaque, una interfase, la cual contenía las CM. La fase superior, el plasma, se recuperó y se conservó a -10° C para titular posteriormente los anticuerpos neutralizantes anti-VHS-1.

Con una pipeta Pasteur se aspiró la interfase opaca de las CM, y se transfirió a otro tubo de 50 ml donde se mezcló con 10 ml de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 0.83 % y se incubó 10 min a 25° C. El tubo se centrifugó 10 min a 250 x g a 25° C, el sobrenadante se desechó: el botón de las CM se resuspendió en 20 ml de PBS y se centrifugó 10 min a 250 x g a 25° C. Este lavado con PBS se repitió dos veces y, finalmente, las CM se resuspendieron en medio anti-VHS-1. Se realizó una cuenta viable y una cuenta diferencial y los porcentajes siempre fueron mayores del 98 % tanto de células viables como de CM. Se ajustó la concentración de la suspensión a  $10^6$  CM/ml y se empleó de inmediato en la prueba de actividad antiviral de las células linfoides.

Cuenta diferencial. El método para realizar una cuenta diferencial se describe en el boletín 840 de Sigma (65). Con 25  $\mu$ l de la suspensión de células linfoides se preparó una fina película sobre un portaobjetos, se dejó secar y se trató con el colorante de Wright. Según el caso, se contaron las CM, los linfocitos o los monocitos, de acuerdo con su morfología, y se calculó el porcentaje en la población total.

Separación de linfocitos y monocitos. Se siguió el método descrito por Rosenberg y Lipsky (55). Los linfocitos y los monocitos se separaron y caracterizaron gracias a que los monocitos se adhieren al plástico. Para esto 15 ml de la suspensión final de CM se incubaron una h a 37° C en una botella de cultivo de 75  $\text{cm}^2$ . Las células no adherentes se resuspendieron suavemente y se transfirieron a otra botella donde se incubaron una hora más a 37° C. Las células que

tampoco se adhirieron en este segundo periodo, principalmente linfocitos, se resuspendieron, se les realizó una cuenta viable y una cuenta diferencial, se ajustó la concentración a  $10^6$  células/ml y se emplearon de inmediato en la determinación de la actividad antiviral. Generalmente más del 95 % de las células fueron linfocitos y más del 98 % permanecieron viables.

Las células adheridas a la primera botella se consideraron monocitos. Estas células se lavaron vigorosamente con PBS a  $37^\circ\text{C}$ , se descartó el sobrenadante y las células adherentes se desprendieron suavemente con un gendarme en 2 ml de medio anti-VHS-1. Se determinó la proporción de monocitos por cuenta diferencial y en todos los casos fue mayor del 98 %. Se determinó la proporción de células viables y ésta fue mayor del 95 % en todas las muestras. Se ajustó la concentración de la suspensión a  $10^6$  monocitos/ml y se empleó de inmediato en el ensayo de la actividad antiviral.

Separación de células T. Las células T se separaron y se caracterizaron por medio de la formación de rosetas con eritrocitos de carnero siguiendo el método de Fauci y cols. (17) con ligeras modificaciones. En un tubo de centrifuga de fondo redondo se mezclaron  $4 \times 10^7$  linfocitos en 12 ml de medio con 9 ml de eritrocitos de carnero al 1 % y se incubaron 5 min a  $37^\circ\text{C}$ . Se centrifugó la mezcla a  $200 \times g$  durante 5 minutos y se incubó enseguida 2 h a  $4^\circ\text{C}$ . El botón se resuspendió muy suavemente en 12 ml de medio y se observó una muestra de la suspensión al microscopio para verificar la formación de rosetas. Se adicionaron lentamente 6 ml de la suspensión sobre 3 ml de Histopaque y se centrifugaron 30 min a  $400 \times g$  a  $25^\circ\text{C}$ . Durante la centrifugación los linfocitos que no formaron rosetas se estabilizan en la interfase entre el medio y el Histopaque y aquellos que sí las forman se sedimentan en el fondo con los eritrocitos. Con una pipeta Pasteur se recuperaron las células de la interfase, se lavaron con 10 ml de PBS y se centrifugaron 10 min a  $250 \times g$ . Estas células, con más del 95 % de viabilidad, se resuspendieron en medio anti-VHS-1 y se ajustó la concentración de la suspensión a  $10^6$  células/ml. En lo sucesivo, esta suspensión se denominó células no T.

El paquete de eritrocitos y células formadoras de rosetas obtenido en la centrifugación sobre Histopaque, se resuspendió en 10 ml de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 0.85 %, la suspensión se incubó 10 min a 25° C y después se centrifugó 10 min a 250 x g. El botón celular se resuspendió en 10 ml de PBS y se centrifugó de nuevo 10 min a 250 x g. El botón celular se resuspendió en medio anti-HSV-1. Se realizó una cuenta viable y una cuenta diferencial: los porcentajes de células viables siempre fueron mayores al 95 % y los porcentajes de linfocitos, al 98 %. Se ajustó la concentración a  $10^6$  células T/ml.

Separación de subpoblaciones de células T. El procedimiento para separar las subpoblaciones de células T con diferente densidad fue el de Fitzgerald y cols. (19). Este procedimiento separa en las fracciones ligeras a los linfocitos granulares grandes con actividad citotóxica natural y en las fracciones densas a los linfocitos T citotóxicos. Para la separación se prepararon suspensiones de Percoll con las siguientes concentraciones: 57.5, 55, 52.5, 50, 47.5, 45, 42.5 y 40 % (véase el apéndice). Se depositaron 1.4 ml de Percoll al 57.5 %, la suspensión más densa, en un tubo de centrifuga de 12 ml de policarbonato; se depositaron muy lentamente 1.4 ml de Percoll al 55 % sobre la suspensión anterior y sucesivamente se colocaron las suspensiones restantes. Este gradiente discontinuo se debe manejar con mucho cuidado para evitar que se altere. Se colocaron  $10^7$  células T en la superficie del gradiente; se centrifugaron 60 min a 550 x g y 25°C. Mediante una pipeta Pasteur se recuperó cada subpoblación celular en el nivel superior de cada fase. Se lavó cada fracción celular dos veces con 5 ml de medio (10 % suero fetal de ternera) centrifugando 20 min a 250 x g y a 25° C. Con el sedimento celular del segundo lavado se preparó una suspensión en 2 ml de medio anti-VHS-1, se realizó una cuenta viable y se ajustó la concentración celular de cada fracción a  $10^6$  células/ml en medio anti-VHS-1.

Determinación de la actividad antiviral de las células linfoides. La actividad antiviral de las células linfoides se determinó a) en un ensayo de reducción de placas y b) en un ensayo de reducción de la progenie viral.

a) Ensayo de reducción de placas. Para este ensayo se siguió el método descrito por Santiago y Gómez (60) con ligeras modificaciones. A una caja de 96 pozos con monocapas confluentes de células OMK o Vero, se le retiró el medio de cultivo. Se lavaron las monocapas con 200  $\mu$ l de PBS cada una. Se infectaron con aproximadamente 50 ufp de VHS-1 propagado en células Vero u OMK, según las células que se iban a infectar; para esto se adicionó el virus en un volumen de 200  $\mu$ l y se incubaron las monocapas 30 min a 37° C. Los testigos celulares se incubaron con medio en lugar de virus. Se retiró el sobrenadante de los pozos y estos se lavaron con PBS. Se adicionaron 200  $\mu$ l de la suspensión de células linfoides (200 000 células) a una monocapa infectada de 40 000 células. Como testigo viral, a una monocapa infectada en lugar de las células linfoides se le agregaron 200  $\mu$ l de medio anti-VHS-1. De manera semejante se preparó una monocapa sin infectar con células linfoides y una sólo con medio anti-VHS-1. Se incubaron las monocapas a 37° C. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. A las 18 h se fijaron las células y se tiñeron como en la prueba de titulación viral. Finalmente se contaron las placas virales y se calculó el porcentaje de placas inhibidas mediante la siguiente fórmula:

$$PR = 100 - 100(PV_{exp}/PV_{tes}),$$

donde PR es el porcentaje de reducción en el número de placas virales,  $PV_{exp}$  son las placas virales producidas sobre las monocapas con células linfoides y  $PV_{tes}$  son las placas en los testigos virales. A todas las muestras se les determinó la actividad en células Vero y a 9 sujetos se les determinó además en células OMK.

b) Ensayo de reducción de la progenie viral. En cinco experimentos, dos con voluntarios que tenían la infección activa en el momento de tomar la muestra y tres sin la infección, las monocapas infectadas con el virus e incubadas con las CM no se fijaron ni se tiñeron; en vez de esto, se lavaron muy suavemente con PBS, se les adicionó medio y se sonicaron para liberar el virus intracelular. El sobrenadante se tituló y se calculó la cantidad de virus liberado por placa.

Estudio de la población de voluntarios. Para este estudio, el

diagnóstico de la lesión herpética se realizó con base en la localización en el labio de una vesícula eritematosa que cicatrizó en 3 a 5 días. Participaron 32 voluntarios adultos de 24 a 50 años de edad con un promedio de  $29.9 \pm 6.30$  años. Todos estaban aparentemente sanos y no tenían historia clínica de infecciones genitales herpéticas. Los sujetos fueron agrupados de la siguiente manera: sujetos con antecedentes de herpes labial, pero sin infección activa en el momento de tomar la muestra y sujetos con antecedentes e infección activa. La muestra se tomó del día 2 al día 5 de aparecer la lesión, en el caso de los individuos con la recrudescencia.

Además, se incluyó un grupo testigo, de tres niños de 5 a 10 años de edad y dos adultos, sin historia clínica de infecciones por Herpes simple.

En resumen se realizaron los siguientes ensayos: a todos los voluntarios se les determinó la actividad antiviral del plasma (título de neutralización) y la actividad antiviral de las CM en células Vero (a 9 también en células OMK). A 8 sujetos se les determinó la actividad antiviral de monocitos, linfocitos y subpoblaciones de linfocitos.

Pruebas de estadística. El estudio de la correlación de datos se realizó mediante pruebas de regresión lineal simple (85) y de Ji cuadrada de independencia (64). Las diferencias significativas se estudiaron mediante pruebas de t de Student (85).

## RESULTADOS

1. Establecimiento de las condiciones óptimas de propagación y cuantificación del VHS-1.

### A) Producción viral.

i) Cinética de producción. Durante la propagación del VHS-1 se estudió el tiempo óptimo de cosecha, con el fin de obtener suspensiones virales con el mayor título de partículas infecciosas. El virus se propagó en células Vero y se cuantificó a intervalos de seis horas. A las 18 horas de la infección se observó un cambio evidente en la morfología celular la monocapa infectada se había convertido en una capa sincitial (figura 1b). A las 48 horas las células Vero se encontraban aglutinadas en gigantescas células multinucleares que cubrían sólo en parte la superficie de la botella (figura 1c). Los títulos de los sobrenadantes en ufp/ml ( $\times 10^6$ ) fueron los siguientes: a las 12 h, 0; a las 18, 0; a las 24, 0.24; a las 30, 0.36; a las 36, 1.00; a las 42, 3.05; a las 48, 6.00 y a las 54, 0.10 (figura 2). Como se puede ver en la gráfica, el título viral aumentó de las 24 a las 48 horas, después de este tiempo el título descendió. En resumen a las 18 h toda la monocapa presentó el efecto citopático y el máximo título viral se observó a las 48.

ii) Efecto de la congelación en la liberación del virus intracelular. Se determinó el efecto de la congelación en la liberación del virus intracelular. Para esto, las suspensiones celulares de tres botellas infectadas se centrifugaron a  $1\ 000 \times g$  y a  $4^\circ C$  durante 10 min. Se recuperaron los sobrenadantes y se titularon; los botones se resuspendieron en 1 ml de medio para congelarlos y descongelarlos tres veces. Después de las congelaciones la suspensión del virus intracelular se centrifugó en las condiciones anteriores y se titularon los nuevos sobrenadantes. Los resultados se muestran en el cuadro 2 y la figura 3. El título del sobrenadante original fue en promedio de  $3.64 \pm 2.27 \times 10^6$  ufp y el virus liberado del botón fueron  $2.99 \pm 0.55 \times 10^6$  ufp. El virus liberado fue el  $45.10 \% \pm 8.34$  del virus total obtenido.

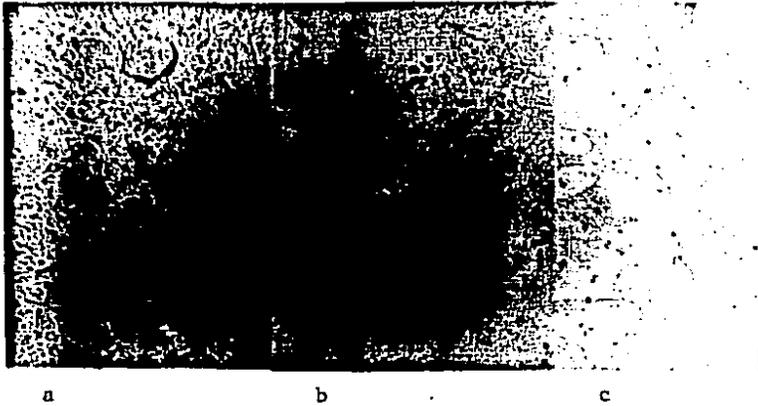


Figura 1. Efecto citopático del VHS-1 sobre células Vero. a, Testigo celular; b, células a las 18 h de la infección; c, células a las 48 h de la infección. Las monocapas fueron infectadas a una multiplicidad de infección de 0.01 ufp/célula.

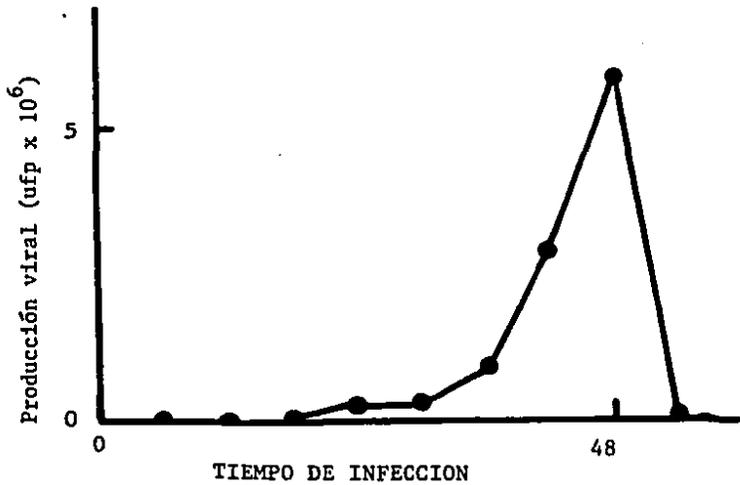


Figura 2. Cinética de producción viral.

Cuadro 2.

Efecto de la congelación en la liberación del virus intracelular.

Botella	Producción del VHS-1 x 10 <sup>6</sup> ufp (%)		
	sobrenadante	botón celular	total
1	2.15 (44.06)	2.73 (55.94)	4.88
2	5.58 (60.65)	3.62 (39.35)	9.20
3	3.20 (54.90)	2.62 (45.02)	5.82
$\bar{x}$	3.64 (54.90)	2.99 (45.10)	6.63

iii) Efecto de la temperatura sobre la infectividad del VHS-1. En un trabajo anterior (59) se estudió el efecto de la temperatura en la conservación del VHS-1. En este trabajo se probó la estabilidad de la infectividad viral a 4° C. Durante la incubación de una suspensión viral a 4° C se observaron las siguientes variaciones: el título inicial fue de 2.65 x 10<sup>6</sup> ufp/ml; a los 40 min, de 2.50 x 10<sup>6</sup> y a los 80 min, de 2.45 por 10<sup>6</sup>. El título prácticamente no descendió (figura 4).

B) Cuantificación de la suspensión viral.

Las suspensiones virales se cuantificaron por ensayo en placa. Con el fin de determinar el tiempo adecuado de incubación para el ensayo se hizo un seguimiento del tamaño de la placa viral en relación con el tiempo; pero antes se probaron dos diferentes colorantes para teñir las células infectadas: cristal violeta y colorante de Giemsa.

1) Tinción de las placas virales. Las monocapas tratadas con cristal violeta se teñían de un color intenso en forma homogénea, de manera que era difícil observarlas con detalle. Las placas virales se pudieron observar al microscopio (con el objetivo de cuatro aumentos) desde las 30 h y tenían la apariencia de regiones circulares u ovaladas, sobre la monocapa, con huecos que representaban el desprendimiento celular a causa de la infección. A las 36 h las placas se pudieron observar a simple vista como zonas de desprendimiento celular, carentes de coloración, que tenían un diámetro mayor de 500 µm.

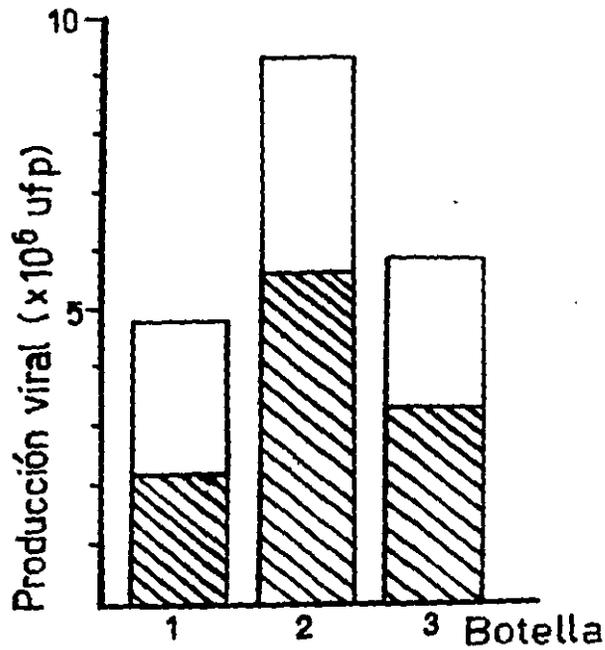


Figura 3. Efecto de la congelación en la liberación del virus intracelular. Símbolos: ▨, sobrenadante; □, botón celular congelado tres veces.

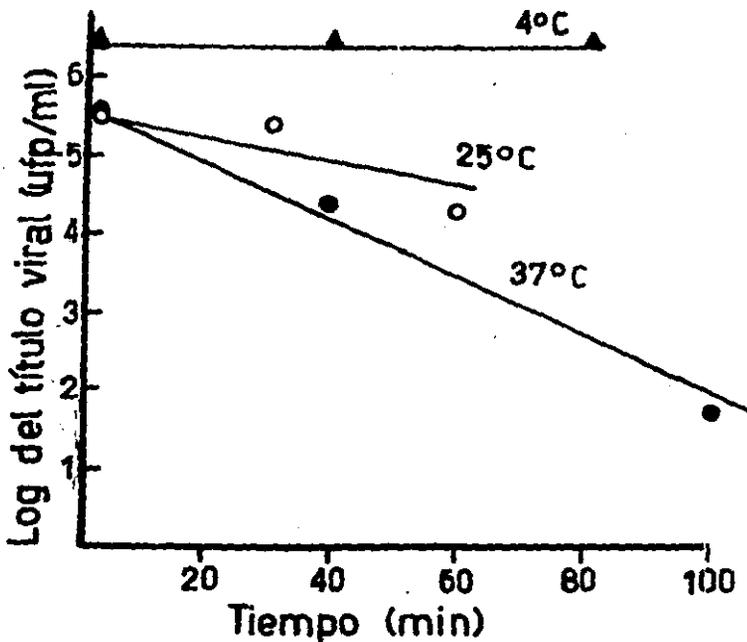


Figura 4. Efecto de la temperatura sobre la infectividad del VHS-1.

Las placas alcanzan un tamaño mayor cuando se dejan crecer más tiempo.

Las placas teñidas con el colorante de Giemsa se observaron bien al microscopio (con el objetivo de cuatro aumentos) a las 18 h. Este colorante teñía con mayor intensidad el núcleo celular mientras que el citoplasma permanecía de un tono más claro. Gracias a esto las placas se pudieron observar con claridad como células gigantes multinucleares, en las cuales los núcleos se localizaban agrupados estrechamente en el centro de la placa viral. Con base en esta diferencia en lo sucesivo las placas virales se tiñeron con el colorante de Giemsa.

ii) Cinética de crecimiento de la placa viral del VHS-1. Una vez establecidas las condiciones óptimas de tinción, se procedió a realizar la cinética de crecimiento de la placa viral. El diámetro de la zona de células fusionadas, o desprendidas, se midió a diferentes intervalos. Los resultados se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3

Crecimiento de la placa viral del VHS-1.

Tiempo (h)	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	Núcleos por placa
9	ausentes	ausentes
12	50-150	4-10
15	100-250	10-18
18	150-300	20-30
21	200-350	35-70
24	más de 300	más de 80

A las 9 h no fue posible observar placas virales. El diámetro representa la variación observada.

A las 9 h no se pudieron observar placas virales con un aumento de 200 diámetros (10 x 20) (figura 5a). A dicho aumento se pueden observar con detalle células individuales; a las 12 h las placas tuvieron un diámetro de 50 a 150  $\mu\text{m}$  y presentaron de 4 a 10 células fusionadas (figura 5b); a las 18 h la cantidad de células incluidas en las placas fue de 20 a 30 y el diámetro fue de 150 a 300  $\mu\text{m}$  y a las 30

horas los sincitios generalmente se desprendieron y las placas de lisis presentaron un diámetro variable de 500 a 700  $\mu\text{m}$ . En lo sucesivo las placas se observaron a las 18 h, lo cual permitió contar con claridad de 40 a 50 placas en los pozos de 0.32  $\text{cm}^2$  y hasta 200 placas en los pozos de 2  $\text{cm}^2$ .

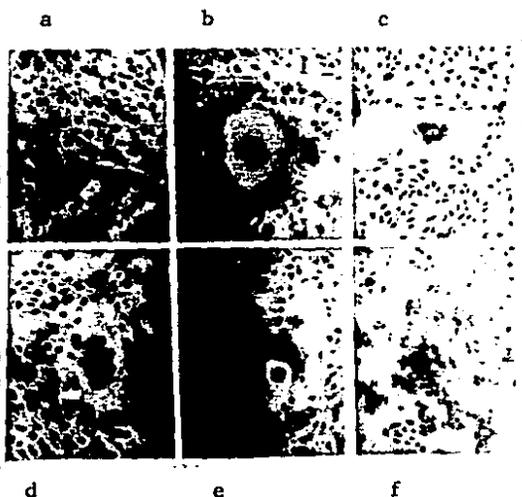


Figura 5. Cinética de crecimiento de la placa viral. a, células Vero sin infectar; b, placa viral a las 12 h; c, a las 15 h; d, a las 18 h; e, a las 21 h; f, a las 24 h.

2. Actividad antiviral del sistema inmune durante la fase aguda o latente de la infección por el VHS-1.

Para este estudio, se formaron dos grupos de voluntarios, los que tenían lesión herpética y los que no la tenían (cuadro 4) y en primer lugar se determinó la actividad antiviral del plasma y de las CM.

A) Actividad antiviral humoral contra el VHS-1.

La actividad antiviral del plasma, en este caso el título de anticuerpos, se expresó como el logaritmo base 2 del factor inverso de la dilución que inactiva el 50 % de los viriones infecciosos.

Los valores de neutralización en el grupo sin antecedentes de herpes labial presentaron una variación de  $<2$  a  $2.9 \log_2$  y la media

Cuadro 4

Clasificación de voluntarios y determinaciones de la actividad antiviral.

Sujetos	Neutralización del plasma	Células						
		CM/V	CM/O	L	M	T	no T	sT
1*	+	+						
2*	+	+		+	+	+	+	+
3*	+	+						
4*	+	+						
5*	+	+	+					
6*	+	+						
7*	+	+	+					
8*	+	+	+					
9*	+	+	+					
10*	+	+			+	+	+	+
11*	+	+						
12*	+	+						
13*	+	+						
14*	+	+						
15*	+	+	+					
16*	+	+		+	+	+	+	+
17*	+	+	+					
18*	+	+			+	+	+	+
19	+	+						
20	+	+						
21	+	+						
22	+	+						
23	+	+						
24	+	+						
25	+	+		+	+	+	+	+
26	+	+		+	+		+	+
27	+	+		+	+	+	+	+
28	+	+		+	+	+	+	+
29	+	+	+					
30	+	+	+					
31	+	+						
32	+	+	+					
33a	+	+						
34	+	+						
35	+	+						
36	+	+						
37	+	+						

Símbolos: CM/V, células mononucleares con células Vero infectadas; CM/O, células mononucleares con células OMK infectadas; L, linfocitos M, monocitos; sT, subpoblaciones de linfocitos T; \*, con infección activa; a, 33-37 sin antecedentes de herpes labial.

fue de  $<2.3 \pm 0.42$ . Los valores en el grupo de voluntarios sin la lesión tuvieron una variación de 2.8 a 9.2 con una media de  $5.43 \pm 1.86 \log_2$ . En cambio los sujetos que presentaron la recrudescencia tuvieron una variación de 4.1 a 10.0 con una media de  $7.4 \pm 1.71$  (cuadro 5). La diferencia entre los valores de los sujetos sin la lesión y los valores de los sujetos con ella fue estadísticamente significativa con una t calculada de 2.881 y una t de tablas de 2.477 con 31 grados de libertad ( $p < 0.01$ ) (figura 6).

#### B) Actividad antiviral de las CM contra el VHS-1.

La actividad de las CM se determinó como el porcentaje de reducción de placas virales y el porcentaje de reducción de la progenie.

i) Reducción de placas. Los valores de reducción de placas en los voluntarios sin antecedentes de herpes labial variaron de 0 a 19 % con un promedio de  $10.41 \pm 9.61$ . Los valores de los sujetos con la infección latente fluctuaron de 0 a 38 % con una media de  $16.67 \pm 11.34$ . Los sujetos con la recrudescencia presentaron valores que fluctuaron de 30 a 96 % con una media de  $58.07 \pm 17.60$  (cuadro 6). La diferencia entre estos dos últimos grupos de valores fue estadísticamente significativa con una t calculada de 9.1347 y una t de tablas de 3.551 con 40 grados de libertad ( $p < 0.001$ ) (figura 6).

ii) Reducción de la progenie viral. Con las muestras de cinco sujetos se estudió el efecto de las CM en la producción viral; para esto se determinó la cantidad de virus intracelular en las monocapas incubadas con las CM. Los valores de reducción de la progenie variaron de 24 a 60 % y tuvieron una media de 42.87 % (cuadro 7). Los valores de los sujetos con la infección latente variaron de 29 a 57 % con una media de 43.47. Los valores de los sujetos con la infección activa variaron de 24 a 60 % (sólo se realizaron dos determinaciones) con una media de 41.96 %.

### 3. Relación de la actividad antiviral del sistema inmune y la frecuencia de la recrudescencia del VHS-1.

Se investigó si la actividad antiviral tenía relación con la

Cuadro 5

Título de anticuerpos neutralizantes en el plasma de voluntarios con infección activa o latente por el VHS-1.

Sujeto	Título		Frecuencia de la recrudescencia
	Inverso	Log <sub>2</sub>	
1*	17	4.1	3-4
2*	803	9.6	3-4
3*	42	5.4	3-4
4*	71	6.1	3-4
5*	1 024	10.0	3-4
6*	912	9.8	3-4
7*	79	6.3	3-4
8*	74	6.2	3-4
9*	186	7.5	2-3
10*	468	8.9	2-3
11*	646	9.3	2-3
12*	362	8.5	2-3
13*	97	6.6	2-3
14*	193	7.6	2-3
15*	66	6.0	2-3
16*	250	8.0	2-3
17*	113	6.8	1-2
18*	96	6.6	1-2
19	26	4.7	1-2
20	588	9.2	1-2
21	13	3.6	1-2
22	16	4.0	1-2
23	224	7.8	1-2
24	7	2.8	1-2
25	16	4.0	0-1
26	21	4.4	0-1
27	40	5.3	0-1
28	64	6.0	0-1
29	21	4.4	0-1
30	74	6.2	0-1
31	288	8.1	0-1
32	48	5.6	0-1
33	7	2.9	a
34	<4	△2	
35	<4	△2	
36	6	2.6	
37	<4	△2	

Símbolos: a, 33-37 sin antecedentes de herpes labial; \*, con infección activa.



Cuadro 6

Sujeto		Placas virales		Reducción de placas	Frecuencia de recrudescencia
Vero	OMK	Testigo	CM		
1*	+	43.00 ± 1.73	1.50 ± 0.46	96.14	3-4
2*	+	45.33 ± 1.53	6.66 ± 1.15	85.30	3-4
3*	+	94.66 ± 5.03	22.33 ± 2.52	76.42	3-4
4*	+	26.66 ± 3.05	6.66 ± 0.57	75.02	3-4
5*	+	21.33 ± 3.79	6.00 ± 1.00	71.84	3-4
5*	+	27.66 ± 2.88	7.00 ± 1.00	74.69	3-4
6*	+	22.33 ± 2.08	6.66 ± 2.31	70.15	3-4
7*	+	196.66 ± 12.34	68.00 ± 5.58	64.42	3-4
7*	+	159.22 ± 11.02	54.33 ± 4.04	64.22	3-4
8*	+	150.33 ± 12.52	57.50 ± 0.71	61.69	3-4
8*	+	72.33 ± 5.86	39.00 ± 9.90	62.41	3-4
9*	+	102.33 ± 5.69	40.00 ± 12.00	60.94	2-3
9*	+	98.53 ± 7.57	41.33 ± 11.72	60.94	2-3
10*	+	72.66 ± 2.08	30.66 ± 3.05	57.89	2-3
11*	+	43.33 ± 10.06	19.00 ± 1.00	56.15	2-3
12*	+	22.66 ± 1.53	11.33 ± 1.53	50.00	2-3
13*	+	134.33 ± 6.03	68.66 ± 6.43	49.87	2-3
14*	+	67.00 ± 6.08	37.33 ± 1.53	44.29	2-3
15*	+	109.33 ± 3.05	64.66 ± 4.51	41.37	2-3
15*	+	109.33 ± 3.05	65.00 ± 6.24	40.48	2-3
16*	+	42.00 ± 1.73	27.33 ± 2.31	34.93	2-3
17*	+	140.33 ± 14.44	93.66 ± 13.58	32.89	1-2
17*	+	160.00 ± 17.32	108.66 ± 10.06	30.56	1-2
18*	+	42.66 ± 2.08	50.00 ± 4.00	31.19	1-2
19	+	53.33 ± 2.30	32.66 ± 1.15	38.76	1-2
20	+	43.00 ± 1.73	30.00 ± 6.56	30.24	1-2
21	+	201.33 ± 10.27	155.33 ± 5.03	22.84	1-2
22	+	45.66 ± 2.08	35.66 ± 2.52	21.19	1-2
23	+	22.33 ± 2.08	17.66 ± 1.63	20.19	1-2
24	+	144.33 ± 4.04	145.66 ± 5.13	16.44	1-2
25	+	40.66 ± 2.31	30.33 ± 2.31	25.40	0-1
26	+	45.33 ± 2.52	34.00 ± 2.65	25.00	0-1
27	+	46.66 ± 0.58	37.00 ± 1.00	20.70	0-1
28	+	40.00 ± 3.00	32.55 ± 2.52	18.75	0-1
29	+	105.33 ± 8.74	91.66 ± 6.11	13.05	0-1
29	+	251.33 ± 9.02	206.66 ± 6.03	12.29	0-1
30	+	122.66 ± 2.52	100.33 ± 8.38	18.20	0-1
30	+	12.00 ± 1.00	10.66 ± 1.53	0	0-1
31	+	98.66 ± 6.03	84.33 ± 11.15	0	0-1
32	+	128.66 ± 9.29	123.00 ± 6.24	0	0-1
32	+	102.00 ± 2.65	99.66 ± 4.72	0	0-1
33	+	39.66 ± 3.05	31.66 ± 2.08	18.09	a
34	+	45.55 ± 2.08	37.00 ± 1.73	18.96	
35	+	39.33 ± 2.08	37.00 ± 2.00	0	
36	+	30.00 ± 1.00	28.33 ± 2.52	0	
37	+	30.00 ± 1.00	25.66 ± 2.00	15.00	

Las CM se incubaron con las células Vero (u OMK) infectadas en una relación de 5:1. Los resultados representan 3 experimentos + una desviación estándar. Símbolos: véase el cuadro 5.

Cuadro 7

Sujeto	Reducción de la progenie viral por las CM.				
	Placas virales a	Reducción de placas (%)	Virus intracelular ufp	Virus por placa viral b	Reducción de la progenie (%)
1* Testigo	43.00		1 700	39.53	
CM	1.50	96.14	45	30.00	24.10
3* Testigo	94.66		4 750	50.17	
CM	22.33	76.42	450	20.15	59.83
19 Testigo	53.33		2 300	43.12	
CM	32.66	38.76	600	18.37	56.99
20 Testigo	43.00		1 700	39.53	
CM	30.00	30.24	670	22.33	44.50
22 Testigo	45.66		4 500	98.55	
CM	35.66	21.29	2 500	70.11	28.93

La reducción de la progenie se calculó con la siguiente fórmula:  

$$\text{reducción} = 100 - 100(\text{VPcm}/\text{VPtes}),$$
 donde: VPcm son los virus por placa en el experimento con las CM y VPtes son los virus por placa en el testigo. Símbolos: \*, con infección activa; a, media de tres experimentos; b, virus intracelular/placas virales.

frecuencia de la recrudescencia; para esto se agruparon los voluntarios de acuerdo con el número de reactivaciones que sufrían por año: de 0 a 1, de 1 a 2, de 2 a 3 y de 3 a 4.

#### A) Actividad antiviral humoral contra el VHS-1.

Con respecto a la frecuencia de la recrudescencia, se obtuvieron los siguientes valores de neutralización: el grupo con 0 a 1 recrudescencias por año presentó una media de  $5.5 \pm 1.33 \log_2$ ; el grupo con 1 a 2 recrudescencias tuvo una media de  $5.17 \pm 2.25$ ; el grupo con 2 a 3 recrudescencias presentó una media de  $7.8 \pm 1.12$  y el grupo con 3 a 4 recrudescencias tuvo una media de  $7.18 \pm 2.27$ . Con los datos se realizó una prueba de Ji cuadrada de independencia y se obtuvo un valor de  $X^2$  de 4.5, el valor de tablas es de 16.27 con 3 grados de libertad y un nivel de significancia de  $\alpha = 0.001$  (figura 7).

#### B) Actividad antiviral celular contra el VHS-1.

En relación con la frecuencia de la recrudescencia de la lesión

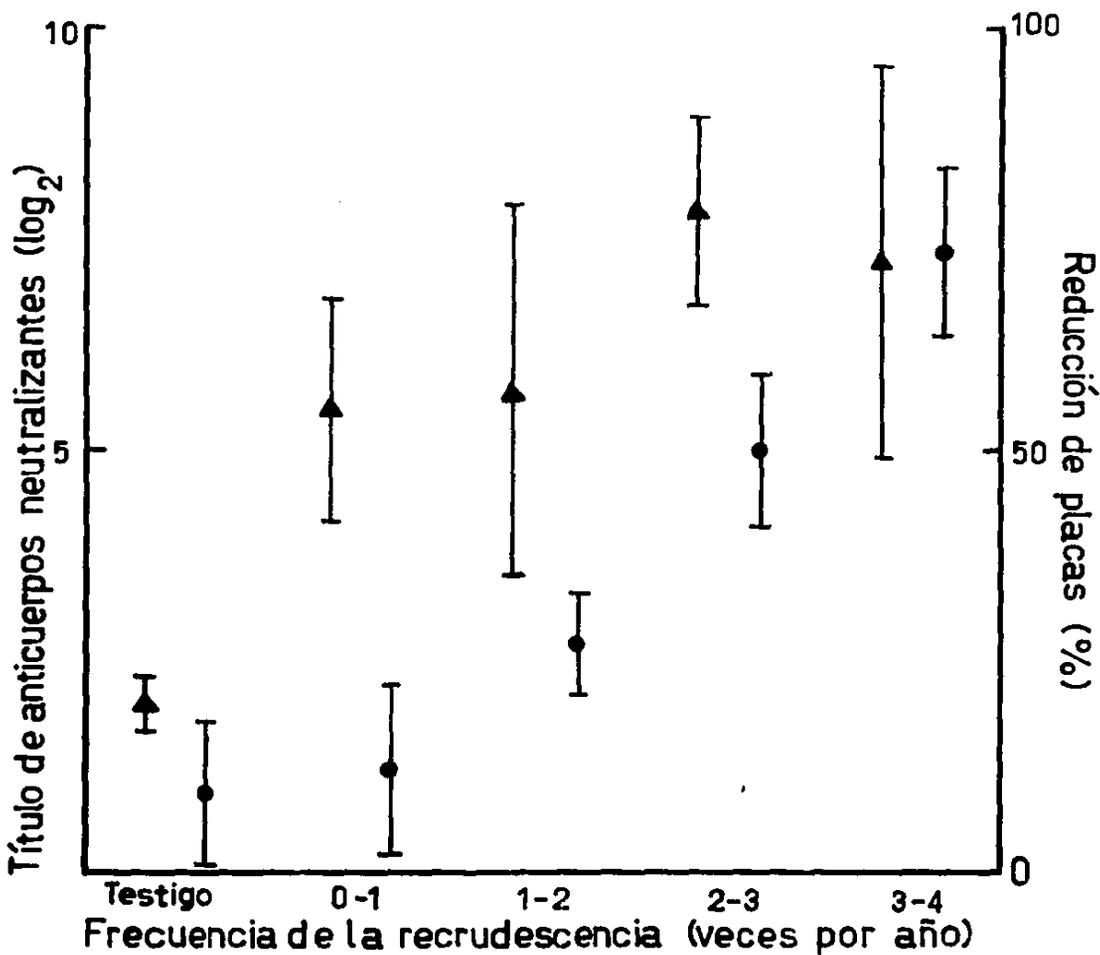


Figura 7. Efecto de la frecuencia de las recrudescencias sobre la actividad antiviral de plasma y CM. Los valores corresponden cuando menos a cinco experimentos  $\pm$  una desviación estándar. Símbolos: ▲, título de anticuerpos; ●, reducción de placas por las CM.

herpética, se obtuvieron los siguientes valores de reducción de placa por las CM: el grupo con 0 a 1 recrudescencias por año presentó los valores más bajos con una media de  $12.13 \pm 10.42$ , el grupo con 1 a 2 reactivaciones presentó valores con una media de  $24.19 \pm 6.21$ , el grupo con 2 a 3 reactivaciones tuvo una media de  $49.68 \pm 9.21$  y el grupo con más de tres recrudescencias por año presentó valores con una media de  $72.96 \pm 10.51$ . La prueba de  $X^2$  de independencia dio una  $X^2$  calculada de 30.68, el valor de tablas es de 16.27 con 3 grados de libertad y un nivel de significancia de  $\alpha = 0.001$  (figura 7).

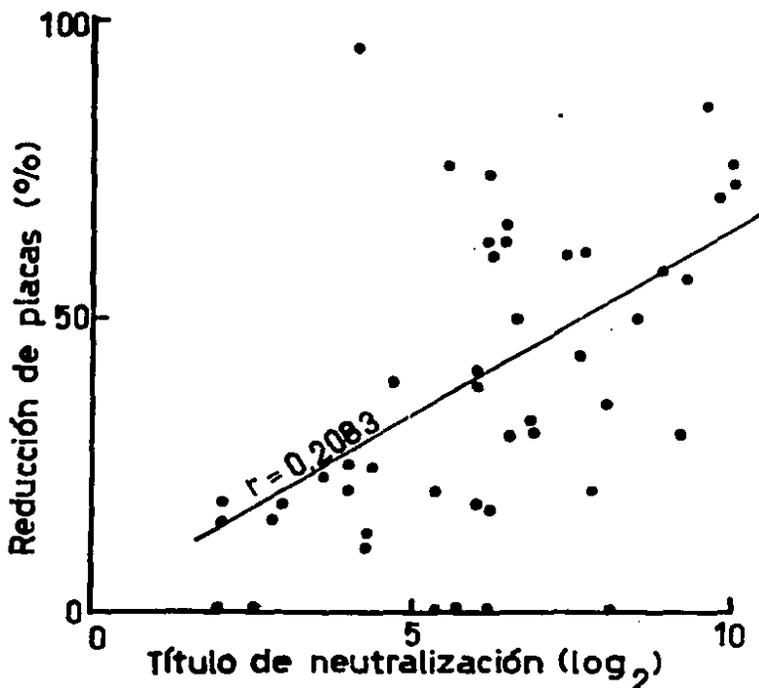


Figura 8. Correlación entre actividad antiviral de CM y título de anticuerpos neutralizantes anti-VHS-1.

4. Correlación entre la actividad antiviral de las CM y la actividad antiviral del plasma.

Se correlacionó la actividad antiviral del plasma con la actividad antiviral de las CM. Con los títulos de neutralización y los porcentajes de reducción de placa se realizó una prueba de regresión lineal simple. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.1101 para los individuos con la infección latente. En los voluntarios con la

infección activa el coeficiente de correlación también fue bajo, de 0.0601. Cuando se evaluaron en conjunto los datos de ambos grupos, el coeficiente de correlación fue de 0.2083 (figura 8).

5. Participación de las subpoblaciones de células linfoides en la actividad antiviral de las CM.

Con el fin de determinar la participación de las diferentes poblaciones de células linfoides en la actividad antiviral de las CM, se estudiaron las siguientes subpoblaciones: linfocitos, monocitos, células T, células no T y fracciones de células T. Se trabajó con ocho muestras, cuatro de voluntarios con la infección latente y cuatro con la infección activa.

A) Rendimiento de las células linfoides.

Las cantidades de células linfoides que se obtuvieron por ml de sangre para los ensayos de la actividad antiviral fueron las siguientes:

CM	1	a	$2.5 \times 10^6$
Linfocitos	1	a	$1.8 \times 10^6$
Monocitos	1	a	$\times 10^5$
Células T	1	a	$5 \times 10^5$
Fracciones de células T	0.5	a	$1 \times 10^4$

B) Actividad antiviral de los linfocitos.

La actividad antiviral de los linfocitos varió de 12 a 74 % (porcentaje de reducción de placa). En general los valores más altos correspondieron a los sujetos con la infección activa, de 21 a 74 %. Los valores de los sujetos con la infección latente tuvieron una variación de 11 a 25 % (cuadro 8 y figura 9).

C) Actividad antiviral de los monocitos.

El efecto antiviral de los monocitos varió de 36 a 97 % (cuadro 8 y figura 9) con una media de  $73.31 \pm 19.49$ . En general los valores de los monocitos fueron elevados tanto en los sujetos con infección latente como en los sujetos con infección activa.

Cuadro 8

Actividad antiviral de monocitos, linfocitos, células T y células no T contra el VHS-1.

Sujetos	Actividad antiviral Reducción de placas (%)				
	CM	Linfocitos	Monocitos	T	noT
2*	85.30	74.27	80.89	90.23	17.43
10*	57.89	53.20	62.84	46.37	17.43
16*	34.93	21.42	81.76	32.22	20.15
18*	31.19		96.80	50.46	0
25	25.40	20.48	61.48	18.83	0
26	25.00	11.76	91.18		0
27	20.70	25.71	75.71	21.15	0
28	18.75	12.50	35.85	19.50	0

Símbolos: CM, células mononucleares; T, células T; no T, células no T; \*, con infección activa. La relación células linfoides:células infectadas fue de 5:1.

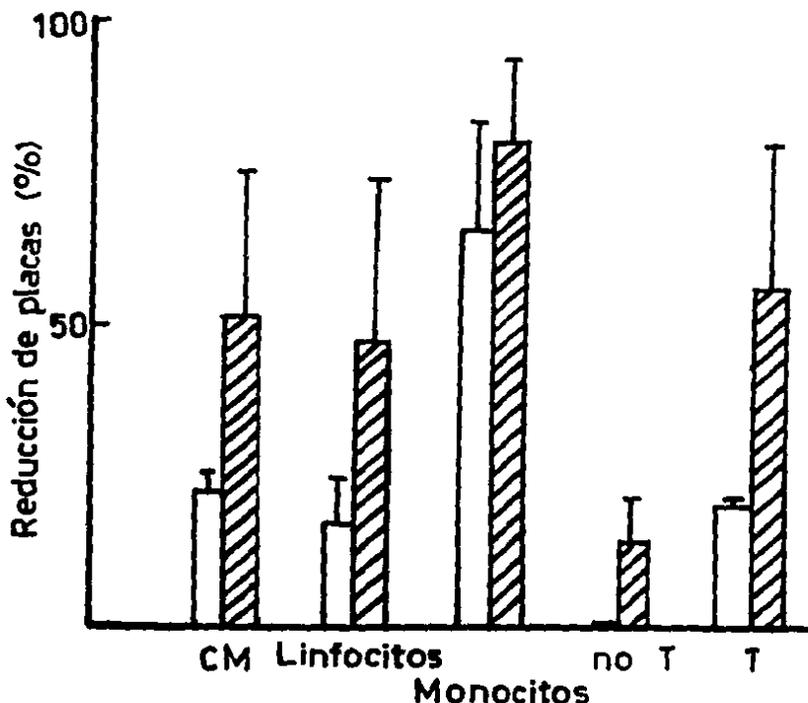


Figura 9. Actividad antiviral de CM, monocitos, linfocitos, células T y células no T contra el VHS-1. La relación células linfoides:células infectadas fue de 5:1. Símbolos: véase el cuadro 8. ▨, con infección activa; □, con infección latente.

D) Actividad antiviral de las células no T.

Mediante el procedimiento de formación de rosetas con eritrocitos de carnero, se retiraron las células T de la suspensión de linfocitos totales, la población resultante se denominó células no T. En general estas células mostraron porcentajes reducidos de actividad antiviral, en todos los casos, inferiores al 21 % (cuadro 8 y figura 9).

E) Actividad antiviral de las células T.

Los valores de reducción de placa de las células T fluctuaron de 18 a 90 % con una media de  $39.82 \pm 25.68$ . Los valores de los sujetos con la infección latente presentaron valores de 18 a 21 % con una media de  $19.83 \pm 1.16$  y los valores de los sujetos con la infección activa fueron de 32 a 90 % con una media de  $54.82 \pm 24.86$  (cuadro 8 y figura 9).

F) Relación entre la actividad antiviral de las CM y las subpoblaciones de células linfoides.

Se compararon gráficamente los valores de reducción de placa de las CM con los de monocitos, linfocitos, linfocitos no T y linfocitos T. Tanto los linfocitos como los linfocitos T presentaron valores semejantes a los de las CM (figuras 10 y 11).

G) Actividad antiviral de las células T con diferente densidad.

Se separaron 8 diferentes fracciones de células T con el gradiente de Percoll y se les determinó individualmente la actividad antiviral. En general, los porcentajes de reducción de placa fueron mayores con las fracciones más ligeras, de la 1 a la 4 y el efecto fue menor con las fracciones más densas, de la 5 a la 8 (cuadro 9 y figura 12).

En el caso de los voluntarios con la infección latente las cuatro fracciones más ligeras tuvieron promedios con una variación de 22 a 50 %. En el caso de los voluntarios con la infección activa, las fracciones ligeras presentaron valores entre 42 y 84 %.

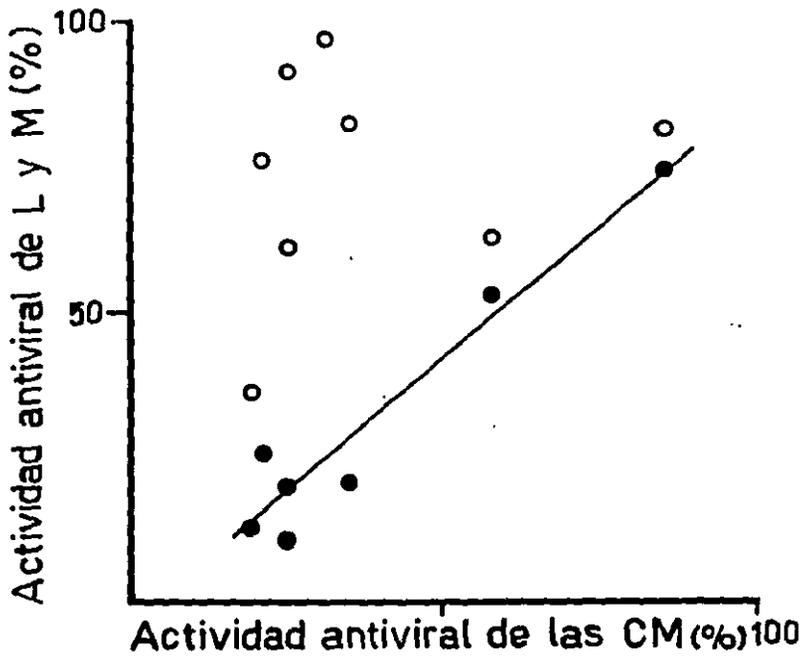


Figura 10. Actividad antiviral CM vs. monocitos (o) y linfocitos (●).

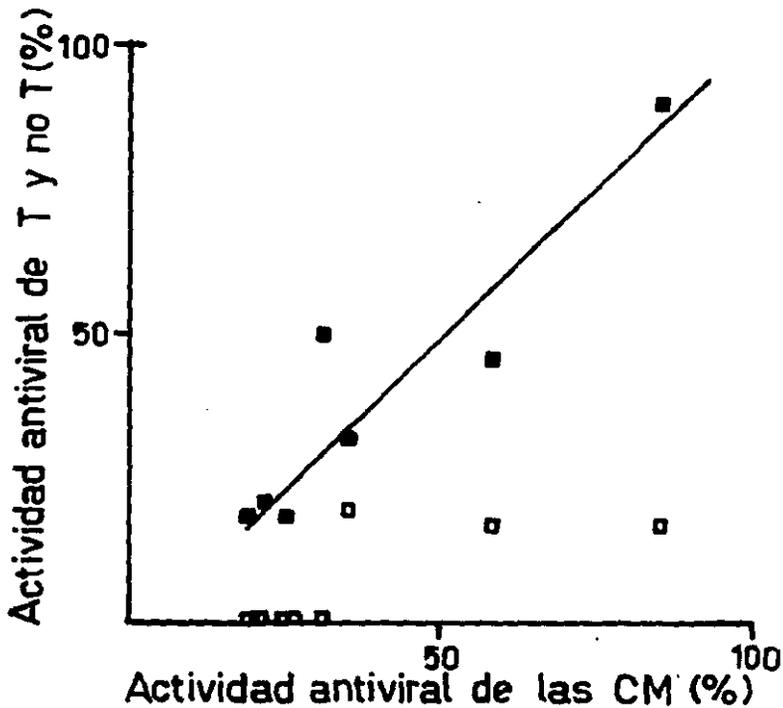


Figura 11. Actividad antiviral CM vs células T (●) y células no T (□).

Cuadro 9

## Actividad antiviral de células T de diferente densidad contra el VHS-1.

Sujeto	Reducción de placas (%)								
	CM	Fracciones de células T							
		1	2	3	4	5	6	7	8
2*	85.30	24.27	77.93	100.00	50.01	19.13	19.85	0	0
10*	57.89	65.59	56.43	79.83	47.25	20.00	18.80	50.46	6.00
16*	34.93	19.86	22.24	72.24	30.17	15.09	0	0	0
18*	31.19	100.00	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	72.48	18.00
25	25.40	8.02	0	32.48	22.13	0	0	16.37	0
26	25.00	42.65	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	22.80	16.18
27	20.70	0	15.00	65.70	19.99	22.84	31.41	0	0
28	18.75	37.50	50.00	50.00	100.00	12.50	0	50.00	0

Símbolos: \*, con infección activa; CM, células mononucleares; NSR, no se realizó.

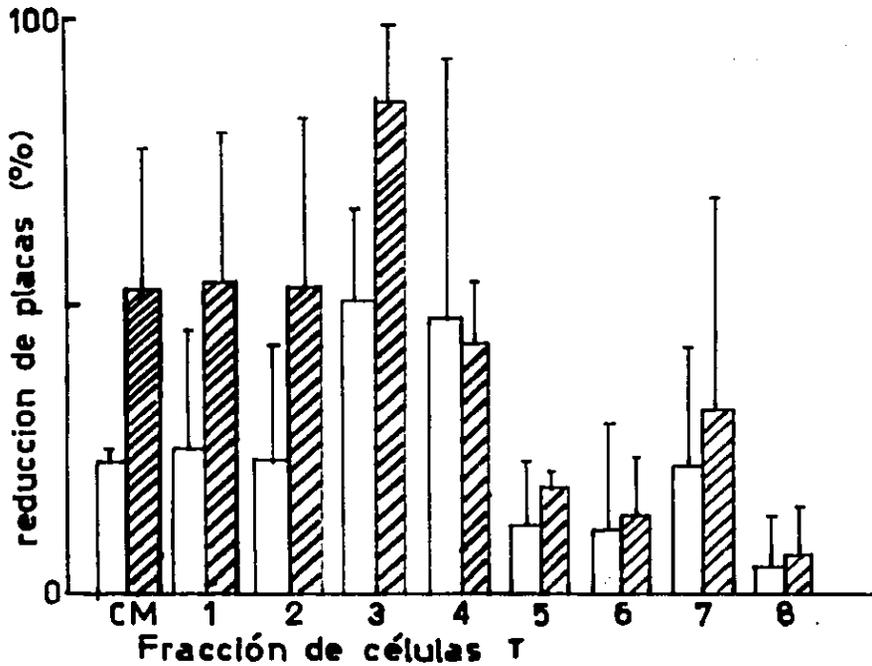


Figura 12. Actividad antiviral de las células T de diferente densidad contra el VHS-1. Símbolos: CM, células mononucleares; , infección activa; , infección latente. Los valores representan el promedio de cuando menos tres determinaciones  $\pm$  una desviación estándar.

## DISCUSION

Los resultados encontrados en este estudio demuestran que la producción viral extracelular del VHS-1 se inicia a las 24 h, que la máxima producción se da a las 48 h y que el título desciende a las 54 h. Al parecer en este momento la mayoría de las células han terminado su producción viral y el título ha descendido probablemente a causa de la temperatura de incubación; ya que a 37° C el virus tiene un índice de inactivación elevado (el título disminuye en poco más de dos logaritmos por hora). Entonces, en lo sucesivo se cosechó el virus a las 48 h de la infección.

Por otro lado, el efecto citopático, o cambio de morfología, se observó desde las 18 h de incubación a una MDI de 0.01 ufp/célula; no obstante la producción viral alcanzó el máximo a las 48 h. Esto parece concordar con la observación general de que las células infectadas sufren profundos cambios estructurales y bioquímicos casi desde el principio del ciclo lítico del virus (52); por ejemplo, Heeg y cols. (26) reportaron cambios en la morfología de las células infectadas por el VHS-1 a la hora y media de la infección. Estas observaciones se realizaron cuando se infectaron monocapas que recién habían alcanzado la confluencia. Cuando se infectaron monocapas que habían confluído dos días antes de ser infectadas y que se habían mantenido en medio sin suero de ternera, la aparición del efecto citopático se observó a las 42 h, es decir tardó un día más en comparación con las células recién confluentes. Así, al parecer es importante el estado fisiológico de las células usadas para propagar el virus. De acuerdo con esto, cuando las células se encuentran en multiplicación activa el virus se multiplica más rápido.

La cinética de producción viral se determinó con el sobrenadante de la célula infectada, es decir, no se determinó el virus intracelular. Sin embargo, en la prueba de la liberación del virus intracelular por congelación se observó que el virus del sobrenadante representa el 55 % del total con una desviación estándar del 8 %. Por lo que se consideró que el título del virus extracelular es fidedigno de la producción total de virus.

Para incubar el virus con las diluciones del plasma en la prueba

de neutralización se escogió una temperatura de 25° C, porque a ésta la infectividad del virus desciende poco y el título no disminuye mucho (a 37° C y 30 min el título del virus disminuye en un factor de 10). Se decidió incubar la mezcla a 30 min, porque se consideró que es el tiempo adecuado para que tenga lugar la reacción inmune. En general, la infectividad del VHS-1 disminuye en forma proporcional con la temperatura: a mayor temperatura de incubación, mayor índice de descenso. A 4° C el título casi no varía, pero la incubación de plasma y virus en la neutralización se debería prolongar entonces por más tiempo para asegurar la reacción entre los anticuerpos y el virus.

Se escogió trabajar con el colorante de Giemsa, porque permite distinguir perfectamente las placas a las 18 h; con este tiempo la placa se observa con claridad y se pueden contar más placas en la superficie de cultivo (200 en 2 cm<sup>2</sup> y 40 en 0.32 cm<sup>2</sup>). A las 21 h muchas placas individuales se traslapan y se vuelve difícil el conteo.

Después de establecer las condiciones óptimas de trabajo se midió la actividad antiviral de los componentes humorales y celulares de la respuesta inmune. En primer lugar se observó que el título de neutralización fue más alto en los individuos con la lesión herpética ( $p < 0.01$ ). Esto es compatible con la idea general de que los sujetos que sufren una recrudescencia tienen mayor título de anticuerpos antivirales que los individuos sin la reactivación (51) y en particular es compatible con los trabajos de Ratner y Smith (50) y de Lopez y O'Reilly (36), quienes observaron un incremento en los títulos de neutralización durante la infección activa por el VHS-1. El incremento en la actividad antiviral del plasma durante una reactivación se puede explicar porque el virus produce numerosas proteínas inmunogénicas durante el ciclo multiplicativo (24).

De las dos diferentes estrategias seguidas para determinar la actividad antiviral de las CM, reducción de placas y reducción de la progenie, la primera mostró resultados sugestivos. En el ensayo de inhibición de placas, se observó un incremento en la actividad antiviral de las CM durante la recrudescencia de la infección ( $p < 0.001$ ). Los datos reportados por otros autores acerca de la acti-

vidad de las células linfoides durante las recrudescencias son contradictorios: unos autores reportan que la actividad antiviral aumenta; otros, que permanece normal y otros más, que disminuye. Los datos obtenidos en este trabajo apoyan la idea de que durante las recrudescencias las células linfoides incrementan su actividad antiviral.

En los experimentos de reducción de la progenie viral, cinco casos estudiados, se observó que las CM redujeron la cantidad de virus producido por placa, sin embargo la variación de los valores observados al parecer fue al azar, es decir no hubo relación con los valores de reducción en el número de placas y tampoco se observó correlación con la presencia de la lesión.

Al parecer, entonces, la actividad celular y humoral del sistema inmune humano se incrementa durante las recrudescencias. La menor actividad antiviral de los individuos sin la lesión recurrente podría ser una consecuencia de la falta de estimulación antigénica durante el período de latencia, sin embargo a partir de las observaciones realizadas, no es posible confirmar esta idea.

Al estudiar el efecto de la frecuencia de la recrudescencia herpética sobre el título de anticuerpos, no se observó correlación entre las dos variables ( $\alpha=0.001$ ). Este resultado es compatible con los datos reportados por Douglas y Couch (14) quienes tampoco encontraron una correlación entre el título de anticuerpos neutralizantes y la frecuencia de la recrudescencia. Como se mencionó antes, durante una recrudescencia aumenta el título de anticuerpos; sin embargo, en este trabajo no se observó una clara relación entre la frecuencia de recrudescencias y el título de anticuerpos. Esto se podría explicar si consideramos que la respuesta inmune no es estática sino más bien dinámica, posiblemente el título de anticuerpos baje durante el periodo entre una lesión y la siguiente, por lo que el efecto final de las reactivaciones sobre la actividad antiviral del plasma no es acumulativo.

Por otra parte, la actividad antiviral de las CM fue mayor en los sujetos con mayor frecuencia de recrudescencias ( $\alpha = 0.001$ ), esto

sugiere que el efecto de la reactivación sobre la actividad antiviral de las células linfoides es acumulativo y también sugiere que los elevados valores de actividad de las CM pueden deberse a la exposición frecuente al antígeno durante las recrudescencias.

No se encontró correlación entre la actividad antiviral del plasma y la actividad antiviral de las CM ( $r = 0.208$ ). Esta observación no concuerda con los resultados de Lopez y O'Reilly (36) quienes sí encontraron una correlación ( $r = 0.696$ ) entre los títulos de anticuerpos antivirales y la respuesta celular en el caso de individuos con la infección latente. Sin embargo, estos autores miden la actividad celular por un ensayo de proliferación y realizan la prueba de regresión lineal con sólo 8 sujetos, de manera que resulta explicable la discrepancia.

Posteriormente se separaron las subpoblaciones de CM para determinar su participación en el efecto antiviral y se realizaron las siguientes observaciones relevantes:

a) La actividad de los monocitos por lo general fue alta y no tuvo relación con el estado de la infección herpética.

b) La actividad de los linfocitos fue similar a la actividad de las CM pero no tuvo una relación clara con el estado de la infección. En base a que los linfocitos presentaron valores similares a los de las CM, se separaron los linfocitos T y los linfocitos no T para estudiar la actividad de cada subpoblación.

c) En general, la actividad de las células no T fue baja y no tuvo relación con el estado de la infección herpética.

d) La actividad de los linfocitos T fue semejante a la de las CM y parece ser estimulada por la recrudescencia. En base a esto se subdividieron los linfocitos T en un gradiente de densidad.

e) Las fracciones de linfocitos grandes granulares mostraron valores más o menos altos en la mayoría de los casos y su actividad no tuvo relación con el estado de la infección herpética.

f) De todas las subpoblaciones celulares, los linfocitos (en particular los linfocitos T) presentan valores similares a los de las CM.

Estos resultados muestran en general que las subpoblaciones

celulares tienen diferente magnitud de actividad antiviral. Además los monocitos, las células T y los linfocitos granulares (población enriquecida en células asesinas naturales) participan en mayor o menor grado con la actividad antiviral de las CM. En apariencia, la actividad de las CM se relaciona con la población de linfocitos T y estos son estimulados por las recrudescencias (aunque se tienen pocos datos para que sean significativos estadísticamente).

Finalmente, el efecto de las CM en la multiplicación viral in vitro podría estar dado por células linfoides (macrófagos, células asesinas naturales, células asesinas y células T citotóxicas), por factores solubles (interferón y linfoquinas) o podrían estar participando células y factores en una forma sinérgica. Con base en que se trata de un sistema xenogénico, podemos descartar a las células T citotóxicas. En cambio los anticuerpos (del medio anti-VHS-1) unidos a los antígenos virales en las membranas de las células infectadas podrían facilitar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos por los macrófagos (monocitos diferenciados durante la incubación in vitro) y ciertas poblaciones de linfocitos (1). Las células asesinas naturales también podrían estar actuando, como sugieren los resultados con las fracciones de linfocitos granulares.

En cuanto a los factores solubles, posiblemente el interferón desempeñe un papel relevante en este sistema in vitro. Su participación en el efecto observado estaría de acuerdo con la observación de que durante una recrudescencia las CM aumentan su capacidad de sintetizarlo in vitro (10). El interferón beta se puede descartar porque es producido principalmente por fibroblastos y las células Vero no sintetizan este interferón (12). En cambio el interferón alfa, producido por leucocitos podría ser sintetizado durante la incubación de las CM con las células infectadas y el interferón gama o inmune podría ser sintetizado a consecuencia de la estimulación in vivo de las células inmunes. El interferón podría entonces colaborar con el efecto antiviral de las células mediante los siguientes mecanismos:

a) inducción de resistencia en las células blanco contra el VHS-1 (4 y 47));

b) estimulación de la actividad citotóxica y reciclamiento de las células asesinas naturales y de las células asesinas (18, 47, 77 y 78) y

c) activación de los macrófagos (47 y 71).

Es muy probable, entonces, que las exposiciones antigénicas durante las reactivaciones del VHS-1 sean capaces de estimular in vivo a las células linfoides e inducir la síntesis de interferón o de aumentar la capacidad de sintetizarlo en el ensayo in vitro; entonces, durante la incubación, se produciría el interferón; el interferón induciría el estado antiviral en la célula blanco y al mismo tiempo, incrementaría la actividad citotóxica de las células mencionadas.

#### CONCLUSIONES

1. La actividad antiviral del sistema inmune humoral y celular contra el VHS-1 se incrementa durante las recrudescencias.

2. La actividad antiviral celular depende de la frecuencia de las recrudescencias herpéticas; no así la humoral.

3. No se encontró correlación entre la actividad antiviral de las células y la del plasma.

4. La actividad antiviral de los monocitos parece ser independiente del estado de la infección herpética y de la actividad antiviral de las CM.

5. La actividad antiviral de los linfocitos T aparentemente se incrementa durante las recrudescencias herpéticas y parece ser proporcional a la actividad de las CM.

6. La actividad antiviral de los linfocitos no T es nula en la mayoría de los casos y en ninguno es mayor de 21 % de reducción de placas.

7. La actividad de las células asesinas naturales aparentemente no tiene relación con la presencia de la lesión herpética ni con la actividad de las CM contra el VHS-1.

## APENDICE

### Material y reactivos.

Después del nombre del artículo se indica el número de catálogo.

En el caso de los reactivos se proporciona la fórmula condensada.

#### Procedentes de Costar, Cambridge, E.U.A.:

Botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, 3025.

Cajas múltiples de 96 pozos, 3598.

Botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, 3075.

#### Procedentes de Linbro Connecticut, E.U.A.:

Cajas múltiples de 24 pozos, 76-033-05.

#### Procedentes de Cole Scientific Inc. California, E.U.A.:

Tubos de centrífuga de 12 ml de policarbonato, 347708.

#### Procedentes de Lux, California, E.U.A.:

Tubos de centrífuga de 50 ml de polipropileno, 4103.

#### Procedentes de Milipore Corp., Massachusetts, E.U.A.:

Membranas de 0.22 μm, GSWP 047 00.

Membranas de 0.22 μm, GSWP 025 00.

#### Procedentes de Merck, S. A., Edo. de Mex. México:

Acido clorhídrico, HCl, 319

Bicarbonato de sodio, NaHCO<sub>3</sub>, 6329.

Cloruro de amonio, NH<sub>4</sub>Cl, 201145.

Cloruro de potasio, KCl, 204936.

Cloruro de sodio, NaCl, 6404.

Formaldehído, COH<sub>2</sub>, 15858.

Fosfato monobásico de potasio, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 104873.

Fosfato dibásico de sodio anhidro, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 206586.

Hidróxido de sodio, NaOH, 6498.

#### Procedente de J. T. Baker, S. A. de C. V., Xalostoc, México:

EDTA, Na<sub>2</sub>C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>·H<sub>2</sub>O, 8993.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Procedentes de Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, E.U.A.:

- Colorante de Wright, 840-100.
- Histopaque 1077, 1077-1.
- L-glutamina, G-3126.
- Penicilina G sódica, PEN-NA.
- Percoll, P-1644.
- Sulfato de estreptomina, S-6501.

Procedentes de GIBCO, N.Y., E.U.A.:

- Azul de tripano, 630-5250.
- Medio Eagle modificado por Dulbecco, 430-1600.
- Suero de ternera, 200-617.

Procesado en el laboratorio de Virología de la Fac. de Medicina,  
UNAM, México:

- Suero humano anti-VHS-1.

Procedente de In Vitro S. A., México, D.F.:

- Suero fetal de ternera, 82023.

Procedente de Laboratorios Reforma, México, D.F.:

- Heparina, 621.

Procedente de DIFCO Laboratories, Detroit, E.U.A.:

- Tripsina, 450268.

Preparación de las soluciones de trabajo.

Medio Eagle modificado por Dulbecco. El polvo correspondiente a 1 l de medio se vierte en 900 ml de agua destilada y desionizada y se disuelve a temperatura ambiental. Se agregan 3.7 g de bicarbonato de sodio, se ajusta el pH a 7.2 (con soluciones NaOH o HCl 1 N). Se completa el volumen, se esteriliza por filtración con membranas de 0.22  $\mu$ m y se conserva a 4°C. Para su uso, se mezclan 98 ml de esta solución con 1 ml de la solución concentrada de penicilina y estreptomina y con 1 ml de L-glutamina al 3%.

Amortiguador salino de fosfatos (PBS, "phosphate buffer saline"). Este amortiguador se preparó de acuerdo con la fórmula de Dulbecco y Vogt (15). Para esto, se disuelven, en 900 ml de agua destilada y desionizada, los siguientes reactivos: NaCl, 8.0 g; KCl, 0.2 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.96 g y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 g. Se ajusta el pH a 7.2, se completa el volumen a 1 l y se esteriliza por calor húmedo a 121°C.

Solución concentrada de penicilina y estreptomina. Para preparar esta solución se disuelven 100 mg de sulfato de estreptomina y 100 000 UI de penicilina G sódica en 10 ml de PBS, se esteriliza la solución por filtración con membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  y se conserva a -10°C.

L-glutamina 3%. Se disuelven 3 g de L-glutamina en 100 ml de PBS, se esteriliza la solución por filtración como los antibióticos y se conserva a -10°C.

Suero humano anti-VHS-1. Por punción venal y en condiciones asépticas se extrajeron 20 ml de sangre y se depositaron en un tubo de 50 ml. La sangre se trató de acuerdo con el procedimiento de Garvey y cols. (23) como a continuación se describe. Se incubó 2 h a 4°C y mediante una varilla de vidrio se despegó el coágulo de la pared del tubo. Se incubó 24 h adicionales a 4°C. El suero se aspiró lentamente, se depositó en un tubo de 12 ml y se centrifugó 10 min a 1 000 x g y 4° C. Se inactivó a 56° C durante 30 min, se le determinó el título de anticuerpos neutralizantes anti-VHS-1 y se conservó a -10° C.

Suspensión de eritrocitos de carnero al 1 %. Esta suspensión se preparó de acuerdo con el procedimiento de Fauci y cols. (17) con algunas adaptaciones. La sangre de carnero se obtuvo por punción a la yugular, se colectaron 6 ml y se depositaron en 30 ml de solución de Alsever. En esta solución los eritrocitos se conservan bien durante 2 semanas. Los eritrocitos se lavan tres veces en PBS a 200 x g y se resuspenden al 1 % en medio con 2 % suero fetal de ternera, este suero se adsorbe previamente con eritrocitos de carnero.

Tripsina 2.5 %. Esta solución se preparó en la concentración in-

dicada por Kuchler (34), se disolvieron 250 mg de tripsina en 10 ml de PBS. La solución se esterilizó por filtración como los antibióticos y se conservó a  $-10^{\circ}$  C. Para su uso se diluyó 1:10 en PBS.

EDTA 0.2 %. Esta solución se preparó en la concentración indicada por Petterson y cols. (43). Se disolvieron 2 g de la sal en 1 l de PBS y se esterilizó la solución por calor húmedo a  $121^{\circ}$  C.

Percoll 100 %. La solución 100 % se preparó de acuerdo con Fitzgerald y cols. (19). Se mezclaron 90 ml de Percoll original (estéril) y 10 ml de una solución de PBS con una concentración de sales 10 veces mayor. Se comprobó, en un aparato Osmette de Precision Systems, E.U.A., que la solución tuviera una osmolaridad de 285 mOsmol/Kg de  $H_2O$ . En caso necesario, se ajustó la osmolaridad con la solución concentrada de PBS o con Percoll; a la suspensión con la osmolaridad correcta se le denominó Percoll 100 %. Se prepararon 8 suspensiones de Percoll con las siguientes concentraciones: 40, 42.5, 45, 47.5, 50, 52.5, 55, y 57.5, usando como diluyente medio de cultivo con 10 % suero fetal de ternera.

## BIBLIOGRAFIA

1. Babiuk, L. A. y B. T. Rouse, 1979. Immune control of herpes virus latency. *Can. J. Microbiol.* 25:267-274.
2. Babiuk, L. A., R. C. Wardley y B. T. Rouse, 1975. Defense mechanisms against bovine herpes virus. Relationship of virus-host cell events to susceptibility to antibody-complement cell lysis. *Infect. Immun.* 12:958-963.
3. Baichwal, V. R. y B. Sugden, 1988. Latency comes of age for herpesviruses. *Cell* 52:787-789.
4. Baron, S., S. E. Grossbert, G. R. Klimpel y P. A. Brunell, 1984. Immune and interferon systems. en: "Antiviral agents and viral diseases of man" 2a ed. (Dir. Galasso, G. J. y cols.) Raven Press, New York, págs. 123-178.
5. Blyth, W. A., T. J. Hill, H. J. Field y D. A. Harbour, 1976. Reactivation of Herpes simplex infection by uv light and possible involvement of prostaglandins. *J. Gen. Virol.* 33:547-550.
6. Centifanto, Y. M., Z. S. Zam y H. E. Kaufman, 1977. In vitro studies on the mechanism of herpesvirus plaque growth inhibition by sensitized lymphocytes. *Infect. Immun.* 17:350-355.
7. Ching, C. y C. Lopez, 1979. Natural killing of herpes simplex virus type 1-infected target cells: Normal Human responses and influence of antiviral antibody. *Infect. Immun.* 26:49-56.
8. Croen, K. D., J.M. Ostrove, L. J. Dragovic, J. E. Smialek y S. E. Straus, 1987. Latent herpes simplex virus in human trigeminal ganglia. Detection of an immediate early gene "anti-sense" transcript by in situ hybridization. *N. Engl. J. Med.* 317:1427-1432.
9. Cromeans, T. L y S. L. Shore, 1981. Lysis of herpes simplex virus-infected cells early in the infectious cycle by human antiviral antibody and complement. *Infect. Immun.* 31:1054-1061.
10. Cunningham, A. L. y T. C. Merigan, 1983. Gamma-interferon production appears to predict time of recurrence of herpes labialis. *J. Immunol.* 130:2397-2400.
11. Cushing, H., 1905. Surgical aspects of mayor neuralgia of trigeminal nerve: Report of 20 cases of operation upon the gasserian ganglion with anatomical and physiological notes on the consequence of its removal. *J. Am. Med. Assoc.* 44:1002-1008. Citado en Roizman y Sears, 1987.
12. Desmyter, J., J. L. Melnick y W. E. Rawls, 1968. Defectiveness of

- interferon production and of Rubella virus interference in a line of african green monkey kidney cells (Vero). *J. Virol.* 2:955-961.
13. Doller, E., J. Aucker y A. Weissbach, 1979. Persistence of herpes simplex virus type 1 in rat neurotumor cells. *J. Virol.* 29:43-50.
  14. Douglas, R. G. y R. B. Couch, 1970. A prospective study of chronic herpes simplex virus infection and recurrent herpes labialis in humans. *J. Immunol.* 104:289-295.
  15. Dulbecco, R. y M. Vogt, 1954. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* 99:167-182.
  16. Ennis, F. A., 1973. Host defense mechanisms against herpes simplex virus I. Control of infection in vitro by sensitized spleen cells and antibody. *Infect. Immun.* 7:898-904.
  17. Fauci, A. S., R. K. Pratt y G. Whalen, 1976. Activation of human B lymphocytes. II Cellular interactions in the PFC response to human tonsillar and PBBL and polyclonal activation by pokeweed mitogen. *J. Immunol.* 117:2100-2104.
  18. Fitzgerald, P. A., P. von Wussow y C. Lopez, 1982. Role of interferon in natural kill of HSV-1-infected fibroblasts. *J. Immunol.* 129:819-823.
  19. Fitzgerald, P. A., M. Mendelsohn y C. Lopez, 1985. Human natural killer cells limit replication of herpes simplex virus type 1 in vitro. *J. Immunol.* 134:2666-2672.
  20. Friedman, M. G. y N. Kimmel, 1982. Herpes simplex virus-specific serum immunoglobulin A: Detection in patients with primary or recurrent herpes infections and in healthy adults. *Infect. Immun.* 37:374-377.
  21. Galloway, D. A., C. Fenoglio, M. Shevchuk y J. K. McDougall, 1979. Detection of herpes simplex RNA in human sensory ganglia. *Virology* 95:265-268.
  22. Galloway, D. A., C. M. Fenoglio y J. K. McDougall, 1982. Limited transcription of the herpes simplex virus genome when latent in human sensory ganglia. *J. Virol.* 41:686-691.
  23. Garvey, J. S., N. E. Cremer y D. H. Sussdorf, 1977. *Methods in Immunology*. W. A. Benjamin Inc. London, 545 págs.
  24. Gilman, S. C., J. J. Docherty y W. E. Rawls, 1981. Antibody response in humans to individual proteins of herpes simplex viruses. *Infect. Immun.* 34:880-887.
  25. Green, M. T., R. J. Courtney y E. C. Dunkel, 1981. Detection of an immediate early herpes simplex virus type 1 polypeptide in trigeminal ganglia from latently infected animals. *Infect. Immun.*

34:987-992.

26. Heeg, U., H. P. Dienes, S. Muller y D. Falke, 1986. Involvement of actin containing microfilaments in HSV-induced cytopathology and the influence of inhibitors of glycosylation. *Arch. Virol.* 91:257-270.
27. Hill, T. J., W. A. Blyth y D. A. Harbour, 1978. Trauma to the skin causes recurrence of herpes simplex in the mouse. *J. Gen. Virol.* 39:21-28.
28. Hill, T. J., 1985. Herpes simplex virus latency. En: *The Herpesviruses. Vol 3*, Dir. Roizman, B., Plenum Press, Nueva York, págs. 175-240.
29. Irwin, J. O. y E. A. Cheeseman, 1939. On an approximate method of determining the median effective dose and its error, in the case of a quanta response. *J. Hyg.* 39:574-580.
30. Kirchner, H., M. Schwentek, H. Northoff y E. Schopf, 1978. Defective in vitro lymphoproliferative responses to herpes simplex virus in patients with frequently recurring herpes infections during the disease-free interval. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 11:267-274.
31. Klein, R. J., 1982. The pathogenesis of acute, latent and recurrent herpes simplex virus infections. *Arch. Virol.* 72:143-168.
32. Klein, R. J., 1985. Problems of herpes simplex virus latency. *Antiviral Research, suppl 1:111-120. Proc. 1st Int. TNO Conf. Antiviral Res. 1985 Rotterdam. Dirs. A. Billiau, E. De Clercq y H. Schellekens. 1985 Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division).*
33. Kohl, S., S. E. Starr, J. M. Oleske, S. L. Shore, R. B. Ashman y A. J. Nahmias, 1977. Human monocyte-macrophage-mediated antibody-dependent cytotoxicity to herpes simplex virus-infected cells. *J. Immunol.* 118:729-735.
34. Kuchler, R. J., 1977. Biochemical methods in cell culture and virology. Dowden, Hutchinson & Ross, Penn, U.S.A.
35. Lofgren, K. W., J. G. Stevens, H. S. Marsden y J. H. Subak-Sharpe, 1977. Temperature-sensitive mutants of herpes simplex virus differ in the capacity to establish latent infections in mice. *Virology* 76:440-443.
36. Lopez, C. y R. J. O'Reilly, 1977. Cell-mediated immune responses in recurrent herpes-virus infections. I. Lymphocyte proliferation assay. *J. Immunol.* 118:895-902.
37. Nahmias, A. J. y B. Roizman, 1973. Infection with herpes simplex viruses 1 and 2. *N. Engl. J. Med.* 287:719-725.

38. Nesburn, A. B., M. T. Green, M. Radnoti, y B. Walker, 1977. Reliable in vivo model for latent herpes simplex virus reactivation with peripheral virus shedding. *Infect. Immun.* 15:772-775.
39. Openshaw, H., L. V. S. Asker, C. Wohlenberg, T. Sekizawa y A. L. Notkins, 1979. Acute and latent infection of sensory ganglia with herpes simplex virus: Immune control and virus reactivation. *J. Gen. Virol.* 44:205-215.
40. Openshaw, H., T. Sekizawa, Ch. Wohlenberg y A. L. Notkins, 1979. The role of immunity in latency and reactivation of herpes simplex viruses. En: *The Human Herpesvirus: An Interdisciplinary Perspective*, Dirs. A. J. Nahmias, W.R. Dowdie y R. F. Schinazi, Elsevier, Nueva York, págs. 289-296.
41. O'Reilly, R. J., A. Chibbaro, E. Anger y C. Lopez, 1977. Cell-mediated immune responses in patients with recurrent herpes simplex infections. II. Infection-associated deficiency of lymphokine production in patients with recurrent herpes labialis or herpes proenitalis. *J. Immunol.* 118:1095-1102.
42. Overall Jr, J. C., 1984. Dermatologic viral diseases. En: *Antiviral agents and viral diseases of man*. 2a ed., Dirs.: J. G. Galasso y cols., Raven Press, New York, págs. 247-312.
43. Peterson Jr, W. D., W. F. Simpson y B. Hukku, 1979. Cell culture characterization: monitoring for cell identification. En "Methods in enzymology" (Dir. Colowick, S. P.) Vol. LVIII, págs. 164-178.
44. Price, R. W. y J. Schmitz, 1978. Reactivation of latent herpes simplex virus infection of the autonomic nervous system by postganglionic neurectomy. *Infect. Immun.* 19:523-532.
45. Puga, A., J. D. Rosenthal, H. Openshaw y A. L. Notkins, 1978. Herpes simplex virus DNA and mRNA sequences in acutely and chronically infected trigeminal ganglia of mice. *Virology* 89:102-111.
46. Rager-Zisman, B. y B. R. Bloom, 1982. Natural killer cells in resistance to virus-infected cells. *Springer Semin. Immunopathol.* 4:397-414.
47. Rager-Zisman, B. y B. R. Bloom, 1985. Interferons and natural killer cells. *Brit. Med. Bull.* 41:22-27.
48. Rasmussen, L. y T. C. Merigan, 1978. Role of T-lymphocytes in cellular immune responses during herpes simplex virus infections in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 75:3957-3961.
49. Rasmussen, L. E., G. W. Jordan, D. A. Stevens y T. C. Merigan, 1974. Lymphocyte interferon production and transformation after herpes simplex infections in humans. *J. Immunol.* 112:728-735.

50. Ratner, J. J. y K. O. Smith, 1980. Serum antibodies to herpes simplex virus type 1 during active oral herpes infection. *Infect. Immun.* 27:113-117.
51. Rawls, W. E., 1985. Herpes simplex virus. En: *Virology*, Dirs. B. N. Fields y cols, Raven Press, New York, págs. 527-561.
52. Roizman, B. y W. Batterson, 1985. Herpesviruses and their replication. En: *Virology*. Dirs. B. N. Fields y cols. Raven Press, New York, págs. 497-526.
53. Roizman, B. y A. E. Sears, 1987. An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Ann. Rev. Microbiol.* 41:543-571.
54. Rola-Pleszczynski, M. y H. Lieu, 1984. Natural cytotoxicity cell activity linked to time of recurrence of herpes labialis. *Clin. Exp. Immunol.* 55:224-230.
55. Rosenberg, S. A. y P. E. Lipsky, 1979. Monocyte dependence of pokeweed mitogen-induced differentiation of immunoglobulin-secreting cells from human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.* 122:926-931.
56. Rouse, B. T. y L. A. Babiuk, 1975. Host defense mechanisms against infectious bovine rinotracheitis virus. *Cell. Immunol.* 17:43-56
57. Russel, A. S., J. S. Percy y T. Kovithavongs, 1975. Cell-mediated immunity to herpes simplex in humans: lymphocyte cytotoxicity measured by 51Cr release from infected cells. *Infect. Immun.* 11:355-359.
58. Russell, A. A., 1973. Cell-mediated immunity to herpes simplex virus in man. *Am. J. Clin. Pathol.*, 50:826-830.
59. Santiago, J., 1984. Interferencia a la infeccion "in vitro" del virus herpes simple tipo 1 por celulas mononucleares humanas. Tesis de licenciatura, Fac. de Ciencias, UNAM, Mex.
60. Santiago, J. y B. Gomez, 1988. Antiviral response to herpes simplex virus type 1 in latent or active infection. *J. Infect. Dis.* 157:817-819.
61. Sekizawa, T., H. Openshaw, C. Wohlenberg y A. L. Notkins, 1980. Latency of herpes simplex virus in absence of neutralizing antibodies: Model of reactivation. *Science* 210:1026-1028.
62. Shillitoe, E. J., J. M. A. Wilton y T. Lehner, 1977. Sequential changes in cell-mediated immune responses to herpes simplex virus after recurrent herpetic infection in humans. *Infect. Immun.* 18:130-137.
63. Shore, S. L., A. J. Nahmias, S. E. Starr, P. A. Wood y D. E. McFarlin, 1974. Detection of cell-dependent cytotoxic antibody to

- cells infected with herpes simplex virus. *Nature* 251:350-352.
64. Siegel, S., 1986. *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta*. Editorial Trillas, México.
  65. Sigma technical bulletin, num 840, 1978. Sigma Chemical Co. Saint Louis, U.S.A.
  66. Sigma procedure num. 1077, 1987. Sigma Chemical Co. Saint Louis, U.S.A.
  67. Simmons, R. L., Y. Centifanto y H. E. Kaufman, 1974. Plaque size reduction as a measure of viral cell-mediated immunity. *Infect. Immun.* 10:1034-1039.
  68. Spivack, J. G. y N. W. Fraser, 1987. Detection of herpes simplex virus type 1 transcripts during latent infection in mice. *J. Virol.* 61:3841-3847.
  69. Spivack, J. G. y N. W. Fraser, 1988. Expression of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) latency-associated transcripts and transcripts affected by the deletion in avirulent mutant HFEM: evidence for a new class of HSV-1 genes. *J. Virol.* 62:3281-3287.
  70. Spruance, S. L., J. A. Green, G. Chiu, T. Yeh, G. Wenerstram y J. C. Overall Jr, 1982. Pathogenesis of herpes simplex labialis: correlation of vesicle fluid interferon with lesion age and virus titer. *Infect. Immun.* 36:907-910.
  71. Stanwick, T. L., D. E. Campbell y A. J. Nahmias, 1980. Spontaneous cytotoxicity mediated by human monocyte-macrophages against human fibroblasts infected with herpes simplex virus-augmentation by interferon. *Cell. Immunol.* 53:413-416.
  72. Starr, S. E., S. A. Karatela, S. L. Shore, A. Duffey y A. J. Nahmias, 1975. Stimulation of human lymphocytes by herpes simplex virus antigens. *Infect. Immun.* 11:109-112.
  73. Steele, R. W., M. M. Vincent, S. a. Hensen, D. A. Fuccillo, I. A. Chapa y L. Canales, 1975. Cellular immune response to herpes simplex virus type 1 in recurrent herpes labialis: in vitro blastogenesis and cytotoxicity to infected cell lines. *J. Infect. Dis.* 131:528-534.
  74. Stevens, J. G. y M. L. Cook, 1971. Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. *Science* 173:843-845.
  75. Stevens, J. G., A. B. Nesburn y M. L. Cook, 1972. Latent herpes simplex virus from trigeminal ganglia of rabbits with recurrent eye infection. *Nature (New Biol.)* 235:216-217.
  76. Stevens, J. G., 1975. Latent herpes simplex virus and the nervous system. En: "Current topics in microbiology and immunology" 70:31-50.

77. Stanwick, T. L., D. E. Campbell y A. J. Nahmias, 1980. Spontaneous cytotoxicity mediated by human monocyte-macrophages against human fibroblasts infected with herpes simplex virus—Augmentation by interferon. *Cell. Immunol.* 53:413-416.
78. Trinchieri, G. y D. Santoli, 1978. Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonist inhibition of susceptibility of target cells to lysis. *J. Exp. Med.* 147:1314-1333.
79. Watson, K., J. G. Stevens, M. L. Cook y J. H. Subak-Sharpe, 1980. Latency competence of thirteen HSV-1 temperature-sensitive mutants. *J. Gen. Virol.* 49:149-159.
80. Walz, M. A., R. W. Price y A. L. Notkins, 1974. Latent ganglionic infection with herpes simplex virus types 1 and 2: Viral reactivation in vivo after neurectomy. *Science* 184:1185-1187.
81. Wilton, J. M. A., L. Yvanyi y T. Lehner, 1972. Cell-mediated immunity in herpes virus hominis infections. *Brit. Med. J.* 1:723-726.
82. Yasukawa, M. y J. M. Zarling, 1983. Autologous herpes simplex virus-infected cells are lysed by human natural killer cells. *J. Immunol.* 131:2011-2016.
83. Yasukawa, M. y Y. Kobayashi, 1985. Inhibition of herpes simplex virus replication in vitro by human cytotoxic T cell clones and natural killer cell clones. *J. Gen. Virol.* 66:2225-2229.
84. Yoshino, K. y S. Taniguchi, 1965. Studies on the neutralization of herpes simplex virus. I. Appearance of neutralization antibodies having different grades of complement requirement. *Virology* 26:61-66.
85. Zar, J. H., 1984. *Biostatistical Analysis*, Prentice-Hall, Inc. N.J..
86. Zweerink, H. J. y L. W. Stanton, 1981. Immune response to herpes simplex virus infections: virus-specific antibodies in sera from patients with recurrent facial infections. *Infect. Immun.* 31:624-630.