

11261  
11  
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudios de Posgrado  
Instituto Mexicano del Seguro Social  
Unidad de Investigación Biomédica  
División de Inmunología

Caracterización de las propiedades antiherpéticas de cuatro polielectrolitos sulfatados: heparina, condroitín, dextrán y protamina.

TESIS DE POSGRADO

Que para obtener el Grado de Maestro en  
CIENCIAS BIOMEDICAS  
( Area de Inmunologia )

p r e s e n t a

Dr. José Manuel Ramos Kuri

Asesor: Dr. Alvaro Aguilar Setien



MEXICO, D. F.

1 9 9 0

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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 está 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.

## Í N D I C E .

DEDICATORIA.....	III
PREFACIO.....	IV
RESUMEN.....	VI
RESUMEN EN INGLÉS.....	VIII
AGRADECIMIENTOS.....	IX
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- HERPES VIRUS.....	2
1.2.- MEMBRANA VIRAL.....	11
1.3.- RELACIÓN VIRUS-CELULA.....	18
1.4.- HEPARINA.....	21
1.5.- ACYCLOVIR.....	28
2.- OBJETIVOS.....	31
3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
4.- RESULTADOS.....	39
5.- DISCUSIÓN.....	65
6.- CONCLUSIONES.....	75
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	77

## RESUMEN.

**CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIHERPÉTICAS DE CUATRO POLIELECTROLITOS SULFATADOS: HEPARINA, CONDROITÍN, DEXTRÁN Y PROTAMINA.**

El efecto inhibitorio de la heparina sobre los virus herpes, se conoce desde 1964. Sin embargo, el tema se dejó de estudiar desde entonces hasta reiniciarse a finales de los ochentas. En el presente trabajo, se estudió el mecanismo de inhibición sobre el virus herpes de tres aminoglicanos polianiónicos sulfatados: heparina, condroitín y dextrán sulfato, así como un policatiógeno proteico: la protamina sulfato.

Se utilizó principalmente el virus herpes *suid* o virus de la pseudorrabia (PRV), así como el Herpes simplex 1 (HSV-1). Se utilizaron modelos *in vitro* en células de riñón de bovino, así como un modelo *in vivo* en ratones CD-1.

La heparina y el dextrán mostraron un fuerte efecto anti-PRV *in vitro*, desde concentraciones tan bajas como 1.9 ug/ml, pero sólo cuando se añaden antes del desafío viral. La protamina también inhibe al PRV, pero en menor proporción que los otros dos. Por otro lado, el condroitín aumentó la citopatogenicidad del virus en un 20 a 30%.

Estos mismos polielectrolitos se probaron *in vitro* sobre el HSV-1 en células vero. El efecto fue muy parecido al observado con el PRV, lo que hace suponer que el receptor viral que utilizan ambos virus herpes pudiera ser el mismo.

En los ensayos *in vivo*, sólo la heparina mantuvo su efecto antiviral sobre el PRV; para que tenga este efecto debe inyectarse

antes y por la misma vía que el PRV. El condroitín y el dextrán no modificaron la infección, mientras que la protamina mostró un efecto paradójico con respecto a su efecto *in vitro*, aumentando la letalidad del virus.

El mecanismo de acción de la heparina, la protamina y el dextran es bloqueando la adherencia inicial del virus a la membrana celular. Este proceso es el primer paso para la penetración del virus a la célula, lo realiza la proteína de membrana viral gIII del PRV al unirse a moléculas de heparán sulfato presentes en la membrana celular (Zuckermann et al., 1989). Presumiblemente la heparina se une a la gIII del virus, mientras que la protamina se une al heparán sulfato de la membrana celular. Se proponen algunos posibles usos de los polielectrolitos, y algunas líneas de estudio para la mejor caracterización del fenómeno.

## ENGLISH ABSTRACT.

**TITLE. CHARACTERIZATION OF THE ANTIVIRAL EFFECT OF FOUR SULFATED POLYELECTROLITES: HEPARIN, CHONDROITIN, DEXTRAN AND PROTAMIN.**

The inhibitory effect of the heparin on the herpes virus infection, is known since 1964. However, this subject was forgotten since this year until 1989.

In the present investigation, we studied the inhibitory mechanism of three polyanionic, sulfated, glycosaminoglycans: heparin, chondroitin and dextran. As well as a polycationic protein: protamine sulfate.

The *in vitro* tests were made mainly with the **Suid herpesvirus 1** also called pseudorabies virus (PRV), in bovin kidney cells (MDBK); likewise the **Herpes simplex virus 1** (HSV-1) in Vero Cells. The *in vivo* model was carried out with PRV on CD-1 mice.

The heparin and dextran showed a strong anti-PRV effect *in vitro*. Concentrations as low as 1.9 ug/ml, inhibit PRV infection in 93%. The effect is achieved only when they are additionated before the viral challenge. Likewise, the protamine inhibits the PRV, but not as much as the two formers ones. In the other hand, the chondroitin increased the viral citopatogenicity in a 20%.

This polyelectrolites, were also tested *in vitro* against the HSV-1. The effect was quantitative and cualitatively similar to that observed with PRV. It make us suspect that the viral receptor of both herpes virus could be the same.

At *in vivo* assays, only the heparin showed antiviral effect on PRV infection, it diminishes the letality in a 30% ( $p < 0.025$ ). It must be injected previously, just by the same path (subcutaneous) and near to the site of virus inoculation. The chondroitin and dextran did not modify the morbi-mortality of the infection, meanwhile the protamine showed a paradoxical effect with respect to its *in vitro* effect, increasing the viral lethality in 20% ( $p < 0.05$ ).

The mechanism of action of heparin, dextran and protamine, is blocking the initial adherence of the virus over the plasmalemma, that is mediated by the viral attachment protein of the PRV called gIII, and his cellular receptor the heparan sulfate. Conjecturally, the heparin binds to the gIII of the virus, while the protamine binds to heparan sulfate of the plasmalemma.

Some possible uses of the polyelectrolites, and research lines for a better characterization of the phenomenon are discussed.

## A G R A D E C I M I E N T O S .

A todo el personal profesional y técnico que participó directa e indirectamente en la realización de esta tesis. La salida del Centro Médico después del terremoto de 1985, hizo que colaboraran un gran número de personas.

En especial a mis asesores, Dr. Alvaro Aguilar Setién y al Dr. Roberto Kretschmer. Gracias a su valiosa colaboración realicé esta tesis.

Al pasante de Técnico Laboratorista Pedro Cumplido, quien directamente colaboró en los ensayos in vivo; así como a todo el personal profesional y técnico de las siguientes instituciones:

- Unidad de Investigaciones Biomédicas del Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Productora Nacional de Biológicos Veterinarios.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, laboratorio de Epizootiología.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, donde realicé la fase final del trabajo. Especialmente a los comentarios y sugerencias de los Doctores Julio Sotelo y Blanca Lilia Barrón.

Al Dr. Julio Santiago y a la Dra. Beatriz Gómez de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M., con quienes realicé los ensayos en el virus herpes humano.

Finalmente a la asesoría en informática para la edición e impresión del trabajo que me brindaron el Dr. Hugo Solís, el Dr. Jorge Bravo Martínez, el Sr. Juan Soto, el pasante en Economía Gerardo Herrera y los Ingenieros Ricardo Acedo y Rafael Acuña.

A todos, muchas gracias.

**1.- INTRODUCCIÓN .****ÍNDICE DE LA INTRODUCCIÓN.****1.1.- HERPES VIRUS.****1.11.- Características generales.****1.12.- Genoma viral.****1.13.- Cápside viral.****1.14.- Virus de la seudorrabia.****1.15.- Clasificación y homología entre los virus herpes****1.2.- MEMBRANA VIRAL.****1.21.- Generalidades.****1.22.- Glicoproteína gC.****1.23.- Glicoproteína gB.****1.24.- Glicoproteína gD.****1.25.- Glicoproteína gH.****1.26.- Glicoproteína gA, gE y gF.****1.3.- RELACIÓN VIRUS-CELULA.****1.31.- Adherencia.****1.32.- Fusión de membranas virus-célula.****1.33.- Fusión de membranas celulares.****1.4.- HEPARINA****1.41.- Naturaleza química.****1.42.- Efectos inmunológicos.****1.43.- Fisiología de la heparina.****1.44.- Efecto antiviral.****1.5.- ACYCLOVIR.**

## 1.- INTRODUCCIÓN.

### 1.1.- HERPES VIRUS.

#### 1.1.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES.

Los virus herpes son un grupo de virus que se clasifican juntos en base a varias características que comparten: todos son virus relativamente grandes, miden de 145 a 200 nm, con características morfológicas idénticas; contienen un 6.9% de DNA, 1.7% de carbohidratos, 22.1% de fosfolípidos y 69.2% de proteínas (Lerner 1983) y son extremadamente sensibles a la inactivación por eter. Los virus herpes se ensamblan dentro del núcleo de la célula huésped, por lo que inducen la formación de inclusiones intranucleares eosinofílicas (Kaplan, 1969).

Se han descrito cerca de 80 especies de herpesvirus distintos (Nahmias, 1981), que parasitan desde hongos hasta animales invertebrados y vertebrados. De éstas, 57 especies infectan a mamíferos y 7 de ellas a humanos, que son:

<u>Herpes simplex 1</u>	Virus varicela-zoster
<u>Herpes simplex 2</u>	Citomegalovirus
Virus Epstein-Barr	Herpesvirus 6
Herpesvirs B del mono.	

Este último virus causa zoonosis ocasionales en humanos, provocando una encefalitis mortal en personas mordidas por monos portadores del virus; sólo hay alrededor de 20 casos reportados.

La familia herpesviridae ha sido dividida en subfamilias según sus características de replicación. En el presente trabajo se realizaron experimentos con el Suid herpesvirus 1 conocido también como virus de la seudorrabia (PRV) y con el Herpes simplex 1 (HSV-1). Ambos virus pertenecen a la subfamilia alfa de los herpesvirus; estos virus se caracterizan por tener un ciclo replicativo corto y ser altamente citopáticos en cultivos celulares, causando una rápida destrucción de células susceptibles.

Otra característica importante de esta subfamilia, es que causa infecciones latentes, provocando cuadros recurrentes que pueden ser subclínicos, lo que entorpece mucho su tratamiento y control epidemiológico. Finalmente hay que agregar que estos dos

TABLA I.  
 CARACTERISTICAS DE LOS VIRUS HERPES QUE INFECTAN  
 HUMANOS.

Nombre de la familia.	Herpetoviridae.
Acido nucleico.	DNA.
Virus que causan enfermedad en humanos.	Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) Herpes simplex tipo 2 (HSV-2) Virus varicela-zoster (VZV) Citomegalovirus (CMV) Virus Epstein-Barr (EBV) Herpesvirus B del mono Herpesvirus 6
Tamaño aproximado.	145 a 200 nm.
Simetría.	Polidrico
Número de capsómeros.	162
Otras características.	Sensibles al ether. Contienen envoltura Establecen infecciones latentes.

TABLA II.  
ORIGEN DEL NOMBRE DE LAS ENFERMEDADES HERPÉTICAS.

Herpes (griego): alude al rash vesicular y deslizante de la piel.
Varicela (latín): significa vesícula.
Zoster (griego): significa faja, y alude al área afectada de la piel.
Citomegalovirus: se refiere a los cambios histopatológicos en las células infectadas.
Epstein-Barr virus: fué descrito en 1964 por M.A. Epstein, M. Barr, y B.G. Achon.
Herpesvirus B del mono: herpesvirus de simios, transmitido por mordedura de monos portadores del virus, letal en humanos.
Virus de la seudorrabia: llamado así porque causa en roedores una encefalitis clínicamente similar a la rabia
Herpesvirus 6: Por ser el sexto virus herpes descrito, que causa infección en humanos.

virus (HSV-1 y PRV) tienen características antigénicas y morfológicas en común (Petrovskys & Post, 1987; Kaplan, 1969), lo que permite estudiarlos juntos.

Las enfermedades por Herpes simplex virus, tienen un alto índice de morbilidad y algunas de sus formas clínicas como el herpes labial, el herpes genital o la keratitis herpética, son causa frecuente de consulta. Además el HSV-1 es una de las principales causas de mortalidad por encefalitis viral a nivel mundial. A pesar de esto, sólo se han reportado en México, dos estudios epidemiológicos (Calderón Jaimés, 1988), que aunque no son recientes, nos dan una idea de la magnitud del problema.

El primer estudio en México es del año 1971, el Dr. Ruiz Gómez demuestra, en una encuesta serológica, que más del 80% de los adolescentes entre 11 y 15 años de edad, tenían anticuerpos séricos neutralizantes contra Herpes simplex, evidencia indirecta de que habían sufrido infección, generalmente subclínica, o no diagnosticada como herpes. El otro estudio se realizó de 1963 a 1971, y mostró que el herpes simplex causaba el 11.6 % de los casos de meningoencefalitis viral en niños de la ciudad de México (tabla III) (Gutiérrez, 1978).

A partir de 1986, el herpes genital se considera una enfermedad de declaración obligatoria por la Organización Mundial de la Salud, por lo que tanto la Secretaría de Salud, como el Instituto Mexicano del Seguro Social reportan ya en sus anuarios estadísticos los índices de morbilidad por herpes genital (Secretaría de Salud, 1987; IMSS, 1986).

#### 1.12.- GENOMA VIRAL.

El genoma de los Herpes simplex 1 y 2 está constituido por una molécula de DNA de doble cadena, con un peso molecular de 95,000 D (Corey, 1986; Tooze, 1981) y 152 pares de kilobases: tiene información suficiente para codificar de 70 a 80 genes, hasta ahora sólo se conoce la función de aproximadamente la mitad de ellos (Hull & Mc Geoch, 1989), veinticuatro son proteínas estructurales (Kattar & Wilcox, 1989; Lycke, 1983). Como característica distintiva con otros desoxi-ribonucleótidos, el DNA del HSV puede

TABLA III.  
MENINGOENCEFALITIS VIRAL EN NIÑOS DE LA  
CIUDAD DE MEXICO. 1963-1971.

ETIOLOGÍA	NÚMERO DE CASOS	PORCENTAJE
Poliovirus	34	39.6%
Adenovirus	12	14.0
Parotiditis	11	12.8
Herpes simplex	10	11.6
Coxsackie	5	5.8
Mononucleosis	4	4.6

FUENTE: Manual de Infectología. Dr. Gonzalo Gutiérrez.

hidrolizarse con álcalis y contiene en su estructura varios ribonucleótidos (Tooze, 1981).

La molécula de DNA de los virus herpes está formada por dos componentes unidos en una sola cadena doble: un componente largo (L) y otro corto (S), que comprenden el 82% y el 18% del genoma total, respectivamente. Cada uno de estos segmentos contiene una porción de secuencias únicas, y otra de secuencias repetidas. Las secuencias únicas son más grandes y se llaman  $U_L$  (secuencia única larga) y  $U_S$  (secuencia única corta). En estas secuencias está la información necesaria para sintetizar la mayor parte de las proteínas estructurales. Ambas tienen en sus extremos otras dos secuencias pequeñas que están repetidas, y pueden estar o no invertidas, lo que le confiere también a los herpes una estructura única entre los virus DNA.

Las cuatro secuencias que flanquean al componente  $U_L$  se llaman a, b y su duplicado invertido se llama: b', a', cada uno de ellos comprende el 6% de todo el DNA. Al componente  $U_S$  lo flanquean los segmentos a', c' y c, a, que corresponden al 45% del DNA total. El orden final de las secuencias de genes es:

SEGMENTO L	SEGMENTO S
<u>a, b, <math>U_L</math>, b', a'</u>	<u>a', c', <math>U_S</math>, c, a</u>

donde las letras con comillas representan las secuencias invertidas. Como los segmentos S y L se pueden invertir entre sí, el DNA aislado de virus puede tener cuatro isómeros difiriendo únicamente en la orientación (Reichman, 1984; Tooze, 1981). La importancia de estos arreglos se desconoce.

Además, los genes del HSV se clasifican según el momento en que se expresan. Son de tres tipos:

- genes inmediatos tempranos, llamados genes alfa,
- genes tempranos o beta y
- genes tardíos o genes gamma.

Hay cinco genes alfa, el principal es el que codifica a la proteína alfa 4 llamado también gen ICP4 ó IE175K ; está asociado específicamente con los genes alfa y regula la expresión de los genes beta (Kattar & Wilcox, 1989; Kriestie & Roizman, 1986).

En los genes beta tenemos principalmente a los que sintetizan las enzimas reguladoras de la síntesis de DNA, dentro de las cuales está la DNA polimerasa y la timidín cinasa; ambas enzimas son blanco de medicamentos antivirales. Finalmente, los genes gamma codifican las glicoproteínas de membrana y otras proteínas estructurales del virus.

#### 1.13.- CÁPSIDE VIRAL.

La cápside viral es un icosaedro formado por 162 capsómeros, cada uno tiene forma de prisma alargado; doce de éstos son prismas pentagonales y los otros 150 son hexagonales al corte transversal. Cada prisma mide 9.5 x 12.5 nm y tiene un agujero central de 4 nm de diámetro.

#### 1.14.- VIRUS DE LA SEUDORRABIA

El virus de la enfermedad de Aujeszky, conocido también como virus de la seudorrabia (PRV) pertenece a la familia viral Herpetoviridae, subfamilia alfa, al igual que los herpes simplex. Causa en animales domésticos y salvajes, una enfermedad conocida como enfermedad de Aujeszky, quien la describió a principios de siglo. También se le llamó virus de la seudorrabia, pues en los animales se parece clínicamente a la rabia, posteriormente se vió que no tenían ninguna relación entre sí (Iglesias, 1987).

En la ganadería porcina, la seudorrabia produce cuantiosas pérdidas económicas (Solórzano & Mercado, 1985). De hecho es una de las cinco enfermedades epizooticas que produce mayores pérdidas económicas en la porcicultura nacional (Correa, 1985; Ramírez, 1985), causa hasta 90% de letalidad en lechones infectados y provoca abortos a cerdos en gestación. La prevención que se sigue para la PRV es la vacunación; lo que disminuye el número de casos, pero favorece la aparición de portadores asintomáticos de cepas patógenas; esto dificulta particularmente el control y erradicación de la seudorrabia (Hill, 1985; Pastoret et al., 1982), sobretodo cuando un animal portador asintomático llega a una granja no protegida, se provoca una alta mortandad.

El mecanismo es el siguiente: por un lado, el virus de la seudorrabia, como otros virus herpes, tiene capacidad de sobrevivir en el ganglio trigémino de modo latente. Por otro lado, el PRV es altamente letal, por lo que un animal no vacunado que padece la enfermedad de Aujeszky, generalmente morirá, pero si está vacunado, tiene muchas posibilidades de recuperarse de la infección y quedar como portador del virus. Cuando uno de estos animales portadores llega a una granja no protegida, se provoca una alta mortandad.

Existe una amplia variedad de medicamentos antiherpéticos, que se usan principalmente en medicina humana (Nicholson, 1984; Whitley & Alford, 1981), pero la especificidad y alto costo de estos fármacos, dificulta su aplicación en veterinaria. Por ésto es necesario investigar alternativas terapéuticas contra el PRV.

Otra razón por la que usamos el virus de la seudorrabia en este trabajo, fue para probarlo como modelo de los virus Herpes simplex 1 y 2; estos virus se están manejando con muchas medidas de seguridad por el riesgo de contaminación (Gómez, 1988; Rawls & Piccardo, 1981). Una solución que aquí se estudia, es utilizar el PRV como modelo del HSV-1, ambos virus pertenecen a la subfamilia Alfa herpesviridae, con un alto parecido a nivel biológico y molecular como se revisa a continuación (Petrovskis, 1987; Kaplan, 1969).

#### 1.15.- CLASIFICACIÓN Y HOMOLOGÍA DE LOS VIRUS HERPES.

La clasificación de los virus herpes, como la de otros virus, es provisional; se basa en propiedades biológicas generales y en los arreglos de secuencia de DNA. Los virus de la familia herpesviridae, se clasifican en tres subfamilias: alfa, beta y gamma herpesvirus (Tooze, 1981).

El grupo alfa incluye al herpes simplex 1 (HSV-1), y el herpes simplex 2 (HSV-2), al virus de la mamilitis bovina (BMV), virus de la seudorrabia (PRV) y el Equid herpesvirus 1 (EHV). Se caracterizan por tener un rango de huéspedes muy variable, esto es desde muy amplio hasta muy específico; y cuentan con un ciclo replicativo corto. Son altamente citopáticos en cultivos celulares,

causan rápida destrucción de células susceptibles y frecuentemente causan infecciones latentes en animales.

La familia beta incluye al citomegalovirus humano y murino. La principal característica de esta familia es que agrandan células infectadas, de donde reciben su nombre los citomegalovirus. Los gamma incluyen al virus Epstein Baar y su principal característica es que se replican en células linfoides.

El peso molecular del DNA de los herpesvirus es de 87 a 105 KD y está constituido por dos componentes unidos covalentemente. Los dos tipos de herpes simplex tienen algunas diferencias antigénicas y están asociados con infecciones en sitios específicos del organismo. El HSV-1 es causante del 97 al 99% de infecciones oro-labiales y keratitis herpética, mientras que el tipo 2 causa del 91 al 97% de las infecciones en tracto genital, así como el 72% de las infecciones del neonato. A pesar de esto, los cuadros clínicos causados por estos dos agentes infecciosos, se traslapan y hay infecciones genitales por HSV-1, así como keratitis por HSV-2.

La homología genética entre el HSV-1 y el 2 es de 50%, pero son lo suficientemente distintos como para tener cada uno sus propiedades biológicas específicas (NIH Conference, 1985). Las secuencias homólogas se encuentran en todo el mapa genómico y la mayoría de los polipéptidos de membrana del HSV-1 están antigénicamente relacionados con los del tipo 2 (Corey & Spear, 1986), con excepción de una que sí es tipo específico.

Un buen ejemplo de homología lo tenemos en la glicoproteína D (gD), que es común a ambos tipos 1 y 2 y es el principal blanco de los anticuerpos neutralizantes. Los genes de ambas proteínas están altamente conservados, mostrando una homología del 85% en la secuencia de 394 aminoácidos para la gD-1 (la glicoproteína D del HSV-1) y 393 aminoácidos para la gD-2.

Además de la homología genética comparten otras características estructurales: las dos liberan un péptido de 25 aminoácidos en un proceso postraducciona, ambas contienen 3 sitios para N-glicosilación, cuentan con un dominio hidrofóbico que los ancla a la membrana y tienen los siete residuos de cisteína entre

los aminoácidos 66 y 202, seis de los cuales forman los tres puentes disulfuro de la proteína. Una estructura muy similar se encontró en la gp50 del virus de la pseudorrabia la cual parece ser la homóloga de la gD (Wilcox et al., 1988).

El virus de la pseudorrabia, es muy parecido al herpes simplex humano (Robbins et al., 1989; Petrovskis & Post, 1987; Halliburton & Freeman, 1985; Kaplan, 1969) y pertenece al grupo Alfa herpesvirinae. Se ha demostrado que comparten de 8 a 10% de secuencias de DNA entre el PRV y el SHV (Tooze, 1981). La homología aumenta al comparar marcos de lectura abierta (zonas de transcripción); como es el caso de la proteína 11K del PRV y su similar en el HSV la US9, una proteína del tegumento, que muestran homología en el 30% de su secuencia de aminoácidos (Petrovskis & Post, 1987) (Fig. 2). No se sabe la función de esta proteína, pero las cepas virales sin este gen son poco virulentas.

Otras características que comparte el PRV con los HSV, es que el PRV tiene 8 glicoproteínas de membrana, varias de ellas son homólogas a las glicoproteínas de membrana del HSV. También muestran secuencias repetidas e invertidas en su DNA; el número de proteínas codificadas por sus genes es similar y la estructura secundaria y terciaria de las proteínas de ambos virus es muy parecida (Highlander et al., 1989).

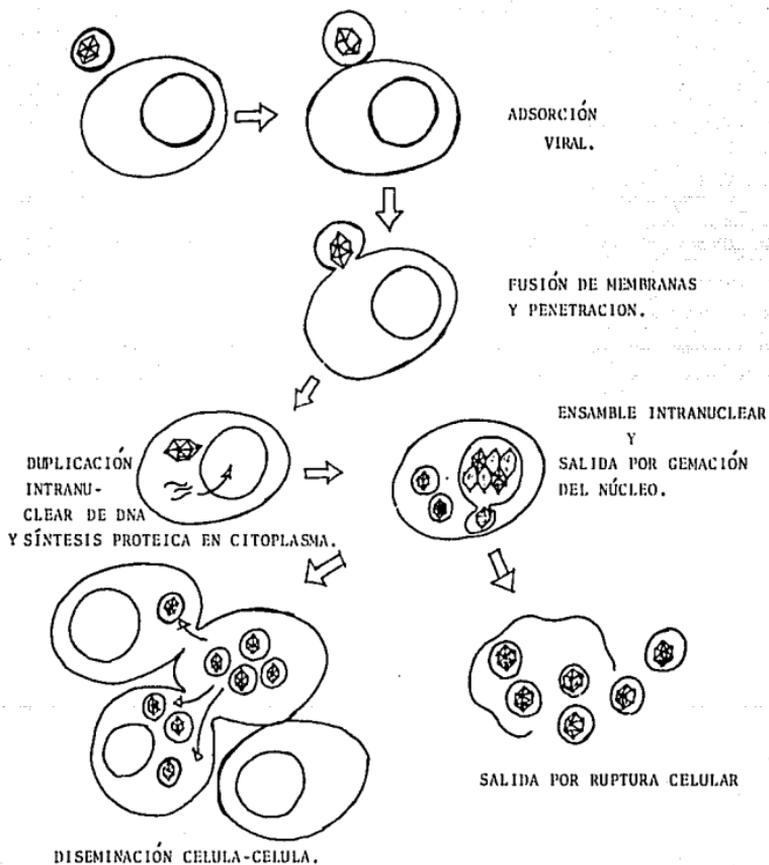
## 1.2.-MEMBRANA VIRAL.

### 1.21.-GENERALIDADES

Una de las principales armas del HSV para su patogenicidad es su membrana externa. De hecho el HSV sin envoltura, pierde su infectividad.

La envoltura viral, la capa más externa del virión, es una membrana que vista al microscopio electrónico, muestra una estructura trilaminar análoga a la membrana celular. El virus la obtiene del núcleo de la célula parasitada del siguiente modo: las proteínas virales se sintetizan en el citoplasma celular, y posteriormente se ensamblan en el núcleo, después salen al citoplasma por un proceso de gemación; durante este proceso el virus obtiene su envoltura del núcleo celular (Fig. 1). Así, el

FIGURA 1.



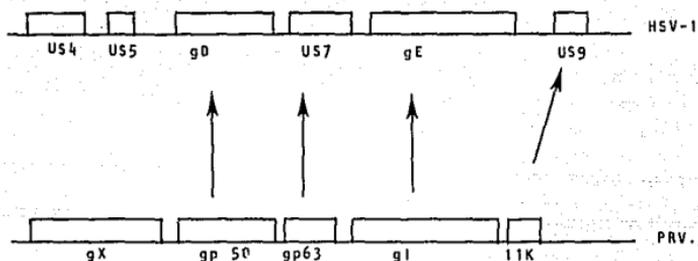


FIGURA 2.- COMPARACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN GENÉTICA DE DOS COMPONENTES DE LA REGIÓN ÚNICA DEL HSV-1 y EL PRV. LAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS SE MARCAN CON UNA FLECHA. (Petrovskis et al., 1987).

esqueleto lipídico de la membrana viral proviene del núcleo, aunque también puede obtenerla de otras membranas intracelulares (Reichman, 1984).

Todas las glicoproteínas de la envoltura viral, son codificadas por su genoma y se ha demostrado que ninguna de estas proteínas proviene del huésped (Corey, 1986; Lycke, 1983). En cambio, las glicoproteínas virales sí se expresan en la superficie de la membrana celular infectada (NIH Conferece, 1985; Norrild, 1981). Para este trabajo es especialmente importante la estructura de la membrana, pues los polielectrolitos actúan precisamente a este nivel.

Ambos virus herpes simplex, expresan en su membrana siete glicoproteínas llamadas: gA, gB, gC, gD, gE, gF y gH. Estas glicoproteínas tienen diversas funciones: la gC permite la adhesión inicial del virus a la célula huésped; posteriormente la gB, la gD y la gH fusionan ambas membranas para la penetración del virus, mientras que las otras tres glicoproteínas gA, gE y gF colaboran, por mecanismos no muy bien conocidos, con la replicación viral (WuDunn & Spear, 1989; Reichman, 1985).

Por encontrarse en la superficie exterior de la membrana viral, las 7 glicoproteínas son los determinantes antigénicos reconocidos por el sistema inmune, e inducen la formación de anticuerpos neutralizantes y células T citotóxicas antígeno específicas capaces de eliminar una infección por herpes.

Por esto mismo algunas de estas glicoproteínas, son candidatos para la realización de vacunas antiherpéticas. Comenzaremos por describir cada una de ellas.

#### 1.22.- GLICOPROTEÍNA C (gC).

La gC es la principal glicoproteína sobre la que actúan los polielectrolitos; y es la primera proteína que le permite al virus adherirse a la célula.

La función de la glicoproteína C se conoce por los estudios realizados en la proteína homóloga a ésta, pero que se encuentra en el virus de la pseudorrabia, la gIII. Esta proteína juega un papel clave en la adsorción viral y en su posterior liberación de

la célula, después de replicarse; es también un inmunógeno importante.

El glicano de la gIII tiene dos funciones. La primera es la adsorción del virus a la célula, y la segunda es permitir una correcta localización de la glicoproteína en la membrana viral; por ejemplo, si durante la síntesis viral de la cepa vacunal Bartha del virus de la PRV, se disminuye su glicosilación, la gC permanecerá en el citoplasma celular en lugar de localizarse en la membrana viral (Robbins et al., 1989; Lomniczi et al., 1987).

La principal función de la gC es la adsorción viral a la célula, que es el primer paso para la penetración. Por ésto la gC y la gIII se pueden considerar como la proteína de adherencia viral (VAP, Viral Attachment Protein) o receptor inicial para adherirse a la célula; la adherencia se logra uniéndose a moléculas de heparán presentes en la membrana celular de una amplia variedad de mamíferos (Zuckermann et al., 1989).

Posterior a la adherencia por la gC, la penetración se lleva a cabo através de un complejo de glicoproteínas formada por la gB, la gD y la gH.

Cuando al PRV le falta la gIII, la adsorción es menos eficiente. Obviamente, los anticuerpos policlonales anti gIII inhiben la adsorción; aunque mutantes gIII negativas (i.e.: que no tienen gIII), sí se adhieren a la célula a pesar de la presencia de estos anticuerpos, lo que sugiere que el fenómeno de adsorción lo puede también realizar alguna otra glicoproteína de membrana (Zuckermann et al., 1989).

#### 1.23.- GLICOPROTEÍNA B (gB).

La glicoproteína B del HSV tipo I fué la primera que se demostró necesaria para la infectividad viral, por lo que es la mejor conocida. Estos estudios se basan en el análisis de mutaciones del gen que codifica para esta proteína (Highlander, et al., 1988). La gB está relacionada antigénicamente con la gA. Su función es promover la penetración viral (Lycke, 1983), provocando la fusión de la membrana celular con la viral. Además, la gB promueve la fusión celular inducida por los HSV-1 y HSV-2.

La gB tiene un peso molecular aproximado de 126 KD (Tooze, 1981), y está formada por 104 aminoácidos. Se divide en seis dominios llamados: sitio I, II, III y IV, así como la fracción transmembranal y la región citoplásmica o intracelular, que son el quinto y sexto dominio respectivamente (Highlander et al., 1989). Los sitios I, III y IV se encuentran en el extremo amino terminal de la molécula, distales a la membrana, mientras que el sitio II es proximal. El sitio IV es el más distal, abarca aproximadamente los aminoácidos del 1 al 280. El residuo 85 es tipo específico, i.e.: no se encuentra en el HSV-2, que tiene una arginina en lugar de la lisina que se encuentra en el HSV-1 (Highlander et al., 1989).

Los anticuerpos monoclonales contra el sitio IV de la gB inhiben la penetración celular y la fusión de membranas celulares, que normalmente permiten la diseminación directa célula a célula al HSV.

El sitio antigénico III, se localiza entre los aminoácidos 283 y 390. Se puede modificar fuertemente su antigenicidad cambiando una glutamina por lisina en su residuo 305, lo que impide su neutralización con anticuerpos monoclonales contra este sitio. Las modificaciones en los residuos 305, 277 y 373 producen además mutantes con defectos en la glicosilación, incapaces de penetrar superficies celulares. Los anticuerpos monoclonales contra el sitio III neutralizan al virus sin ayuda del complemento, por el fenómeno de inhibición viral.

El sitio I se localiza entre los residuos 381 y 441. Las mutaciones a este nivel también disminuyen la velocidad de penetración a la célula. El sitio II es proximal a la membrana, y termina uniéndose a la fracción transmembranal; se encuentra entre los residuos 596 y 737 de la gB. Los sitios II y III contienen estructuras importantes para la infección viral. Ambos dominios son comunes en la gB del HSV-1 y 2.

La alteración en el sitio antigénico II, también provoca defectos en la adición de carbohidratos y disminuye la velocidad de penetración viral. Lo que demuestra la importancia de la

estructura proteica y de la glicosilación de las proteínas, para la penetración del virus a la célula.

#### 1.24.- GLICOPROTEÍNA D (gD).

La gD es otro componente importante para la fusión de la membrana del HSV con la membrana celular; la gD se encuentra en el HSV-1 y 2. Su polipéptido está formado por 369 aminoácidos, siete de ellos cisteínas, que forman 3 puentes disulfuro, cada cisteína se llama gD cys·1 a gD cys·7 (Wilcox et al., 1988); de la cys·1 a la cys·6 forman los tres puentes disulfuro. Estos puentes se encuentran en el extremo amino terminal, distales a la membrana, entre los residuos 66 y 202, mientras que el residuo cys·7 se localiza transmembranalmente (Wilcox et al., 1988). Estos puentes disulfuro conforman la estructura terciaria y los principales determinantes antigénicos a la proteína. Al romper alguno de los puentes o substituir una de la primeras seis cisteínas se altera fuertemente la antigenicidad de la proteína.

La gD es sintetizada por los ribosomas y posteriormente se glicosila en el aparato de Golgi. La substitución de alguna de las primeras cisteínas además de modificar su conformación antigénica, altera la glicosilación de la proteína, integrándose sólo del 0 al 10% de oligosacáridos con respecto a la gD normal.

Fuller y Spear (1987), demostraron que algunos anticuerpos monoclonales anti gD no inhiben la adsorción viral, pero sí evitan que el virus penetre a la célula. Esto implica que la función de la gD es clave también para la fusión de membranas en la penetración celular del virus.

Inmunológicamente hablando, la gD estimula altos títulos de anticuerpos neutralizantes, que juegan un papel decisivo en los estadios iniciales de la infección viral. Animales inmunizados con varias formas de gD se protegen de un desafío letal con HSV. Por ésto y por ser común al HSV 1 y 2, es un fuerte candidato para la realización de vacunas biosintéticas antiherpes (Wilcox et al., 1988).

### 1.25.- GLICOPROTEÍNA H (gH).

Es otra de las tres glicoproteínas de envoltura (gB, gD y gH), indispensables para la infectividad viral y responsables de la producción de anticuerpos neutralizantes no dependientes de complemento. Se han encontrado diversos homólogos de gH en otros virus herpes. Su función es fusionar la membrana viral a la célula, junto con la gB y gD. Los anticuerpos monoclonales anti gH no bloquean la adhesión a la célula pero sí su penetración (Fuller et al., 1989).

### 1.26.- GLICOPROTEÍNAS A, E y F.

Las otras tres glicoproteínas han sido menos estudiadas, por lo que sólo las mencionaremos brevemente. Se ha demostrado que no son indispensables para la replicación viral en cultivos celulares, aunque la falta de alguna de ellas disminuye la infectividad específica del virus (Fuller et al., 1989).

La gA está antigénicamente relacionada con la gB y juega un papel importante para la penetración del virus a la célula (Lycke, 1983).

La gE es especialmente interesante, pues tiene un receptor para Fc de la IgG (Corey, 1986), por lo que puede fijar inmunoglobulinas. Como sucede con otras proteínas virales, se expresa en la membrana de células infectadas, por lo que pueden unirse inmunoglobulinas a la membrana celular de las células infectadas. El significado biológico de estos receptores para Fc durante la infección viral se desconoce (Lycke, 1983; Norrild, 1981).

### 1.3.- RELACIÓN VIRUS-CELULA.

Las relaciones huésped-parásito, involucran necesariamente la interacción de sus membranas. El estudio de las superficies del HSV y las células así como su papel en esta interacción es crucial para la comprensión de su patogenicidad. En especial para los virus que inician la infección adhiriéndose a la superficie celular como son el virus herpes, el virus de la influenza, el rinovirus o el poliovirus. El mecanismo de adherencia es importante en el ciclo

viral, pues es el primer paso de la replicación. De hecho, el virus herpes sin membrana pierde su capacidad infectiva (Lycke, 1983).

La heparina y los polielectrolitos interfieren precisamente a nivel de esta interacción entre las membranas celular y viral, por lo que es importante revisar el fenómeno de penetración del HSV a la célula, para entender el mecanismo de acción de los polielectrolitos.

Como se ha descrito en otros trabajos (WuDunn & Spear, 1989; Fuller & Spear, 1987; Morgan et al., 1968), la penetración del virus herpes simplex a la célula se lleva a cabo por dos fenómenos estrechamente relacionados, pero independientes. El primero es la simple adherencia o adsorción del virus a la membrana celular por cargas iónicas; y el segundo es la fusión de las membranas celular y viral, para que finalmente la cápside penetre al citoplasma (WuDunn & Spear, 1989). A continuación se describirá el primer paso de penetración viral: la adherencia.

#### 1.31.- ADHERENCIA.

Hasta hace algunos años, se desconocía el receptor celular para los virus herpes (Corey, 1985); aunque el amplio rango de huéspedes del virus, ya hacía sospechar que el receptor para el HSV debería ser una molécula ampliamente distribuida.

No fué sino hasta principios de 1989, cuando Spear y WuDunn, demostraron que la interacción inicial del virus herpes es con moléculas de heparán sulfato, que se encuentran frecuentemente en la superficie de las células, lo que permite al virus infectar a muchos huéspedes y tipos celulares.

El interés por la acción antiviral de los polielectrolitos se reinició en 1987, cuando dos grupos de investigación (Ito et al., 1987; Veno et al., 1987), describieron que el dextrán sulfato y la heparina inhibían al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) *in vitro*. Poco después se reinició la investigación del efecto de la heparina sobre el HSV.

La presencia de oligosacáridos en la membrana viral se conocía también desde hace varios años, aunque no se sabía su función, pues se pensaba que servía sólo para estabilizar los

péptidos de membrana o para evitar la digestión intracelular de los mismos, o para el transporte de las glicoproteínas a la membrana celular, durante el proceso de replicación viral intracelular (Lycke, 1983). Nadie pensaba que fueran los receptores virales, se proponía que el virus se adhería a la célula por las proteínas. En enero de 1989, WuDunn demostró que el virus herpes se adhiere a moléculas de heparán sulfato presentes en la membrana celular. Para septiembre de ese año se describió que la glicoproteína viral que se une al heparán, es la gC para el HSV y la gIII para el PRV (Zuckermann et al., 1989).

El modo como WuDunn lo demostró fue marcando radiactivamente al virus infectivo con timidina tritiada, y posteriormente inhibiendo su penetración a la célula, ya fuera con policaciones que se unen al heparán sulfato, como la poli-L-lisina y el factor plaquetario 4; o por medio de la digestión enzimática de la membrana celular con heparinasa, heparitinasa, o condroitinasa. Era importante, demostrar que se inhibía la adsorción y la penetración a la célula; para lo que comparó la entrada del virus radiactivo cuando éste se incubaba en células tratadas previamente con o sin los reactivos antes mencionados.

La digestión enzimática del heparán sulfato de membrana celular, disminuyó significativamente la entrada del virus a las células, volviéndolas resistentes a la infección; no así al digerir el dermatán sulfato o el condroitín sulfato (WuDunn & Spear, 1989).

Podemos resumir, diciendo que para la adherencia del HSV a la célula es necesario que la gC de la membrana viral se una al heparán sulfato de la membrana plasmática; lográndose así el primer paso del ciclo de infección viral. Sin embargo, la unión del HSV con el heparán sulfato es sólo el primer paso en una cascada de interacciones que culmina con la fusión de la envoltura del virión a la membrana plasmática (WuDunn & Spear, 1989).

### 1.32.- FUSIÓN VIRUS-CÉLULA.

La entrada del virus a la célula se lleva a cabo por dos procesos distintos, la adhesión y la fusión de membranas. Fuller

y Spear (1987) demostraron que algunos anticuerpos monoclonales, que neutralizan al virus herpes reaccionando con la gD, no evitan la adherencia del virus a la célula, pero sí impiden su penetración.

Aunque para la adsorción viral es suficiente la presencia del heparán sulfato en la membrana celular, la penetración necesita de interacciones subsecuentes con otros receptores de la membrana celular, que le permitan su fusión y finalmente se libere la cápside dentro de la célula. Esta función de penetración la llevan a cabo la gB, la gD y la gH (Fuller et al., 1989). Estas proteínas en cambio, no se requieren para la adsorción inicial. Se ha demostrado que viriones sin gB ni gD sí se adhieren a la célula, pero no pueden penetrarla.

#### 1.33.- FUSIÓN DE MEMBRANAS CELULARES.

Además de producir la fusión de membranas entre el virus y la célula, la gB colabora con la fusión de membranas celulares que se observa en las infecciones por HSV; y es la causa de la formación de sincicios, que es un fenómeno presente en las infecciones por estos virus. De hecho una línea celular que expresa la gB, induce la formación de megacariocitos, aun sin infección viral (Highlander, 1989). Para el PRV la penetración la realiza la gII y la gp50, que corresponden a la gB y la gD, respectivamente.

#### 1.4.- HEPARINA.

##### 1.41.- NATURALEZA QUÍMICA.

La heparina es un carbohidrato ácido con rotación óptica positiva, capaz de formar sales con metales. Perteneció al grupo de los mucopolisacáridos, descubierto en 1916 y utilizado en clínica como anticoagulante desde 1938 (Goodman & Gilman, 1984). Perteneció al grupo de los glicosaminoglicanos. La heparina se desarrolló como fármaco para uso clínico en 1935 por grupos de investigación en Toronto y Estocolmo. Desde entonces este fármaco se ha utilizado por millones de pacientes y ha sido objeto de numerosos estudios

(Jaques, 1985). Se encuentra regularmente en células cebadas, donde tiene un peso molecular de 750 KD, con sólo el 10% de la actividad anticoagulante que la heparina comercial; ésta tiene un peso muy variable de 3 a 75 KD (Jaques, 1979), y está formada por 2 a 22 hexasacáridos. La heparina comercial tiene una actividad aproximada de 150 unidades internacionales (UI) de anticoagulación por mg de heparina, una potencia diez veces mayor que la heparina tisular (Goodman & Gilman, 1984).

Dependiendo de su actividad anticoagulante, la heparina se puede separar en dos fracciones, una muy activa  $1\beta_2$  y otra relativamente inactiva  $1\beta_1$  (Rosenberg et al., 1978). La fracción activa está formada en un 95% por cadenas repetitivas del tetrasacárido  $1\beta_2$ , que contiene las siguientes hexosas:

Acido L-idurónico. → D-glucosamina 6-sulfato N-acetilada →

Acido D-glucurónico. → N-sulfato D-glucosamina-6-sulfato.

Sólo del 25 al 35 % de una preparación de heparina es de este tipo, pero es responsable de cerca del 90% de la actividad anticoagulante (Rosenberg et al., 1978). La heparina con alta actividad anticoagulante se une fuertemente a la antitrombina, mientras que la de baja actividad no se une a la antitrombina (Thomas, 1984; Rosenberg & Lam, 1979).

#### 1.42.- EFECTOS INMUNOLÓGICOS DE LA HEPARINA.

La mayor parte de los efectos no anticoagulantes de la heparina, están relacionados con mecanismos de inflamación o del sistema inmune (Tabla IV).

Se pueden resumir estos efectos inmunológicos en dos: inhibe reacciones de hipersensibilidad como anafilaxia, sistema de complemento, glomerulonefritis, reacciones antígeno-anticuerpo, etc.; y segundo, mejora la respuesta inmune celular: incrementa la migración de linfocitos B, estimula pinocitocis y fagocitosis de los macrófagos.

Un buen ejemplo de la importancia de la heparina en la respuesta inmune, lo menciona Straus en 1984, quien demostró que una cepa de ratones Balb/c con una baja respuesta inmune, tiene

una concentración tisular doble de heparina que los ratones Balb/c pero con alta respuesta inmune.

La distribución de heparina durante el desarrollo fetal, muestra que se encuentra casi exclusivamente en el tejido hematopoyético y linfoide del feto: bazo, timo y ganglios linfáticos; mientras que del lado materno está abundantemente en la placenta. En el adulto se encuentra en el intestino, piel y pulmones -que son tejidos en contacto directo con el medio ambiente-, además de encontrarse en timo, y ganglios linfáticos.

En la tabla IV, se recopilan algunos efectos inmunológicos descritos para la heparina. Algunas de estas funciones son contradictorias y se debe a que no se ha estudiado a fondo el papel inmunológico de la heparina, sólo existen reportes aislados al respecto (Straus et al., 1984); y porque para su estudio suelen utilizarse preparaciones comerciales de la heparina que difieren mucho de la molécula nativa, como mencionamos anteriormente. El verdadero papel inmunológico y fisiológico de la heparina se conocerá bien cuando se relicen ensayos con heparina nativa, o al menos con heparina de alto peso molecular y baja actividad anticoagulante.

#### 1.43.- FISIOLÓGIA DE LA HEPARINA.

Las células cebadas contienen gran cantidad de gránulos que les dan su característico color metacromático con azul de toluidina y que se debe a la presencia de heparina, heparitina y condroitín sulfato, además de la histamina. Para tener una idea de la importancia de la heparina en la célula cebada, basta decir que los polianiones constituyen el 25% y la histamina el 9% del contenido orgánico de estas células (Jaques, 1979).

La heparina activa macrófagos y forma complejos con agentes tóxicos como los venenos. Por esto se puede considerar a la célula cebada como un "botiquín de emergencia" (Jaques, 1979). Su misma función anticoagulante podría servir para facilitar algunas reacciones inflamatorias, permitiendo la distribución y el movimiento de células en la proximidad de los vasos.

TABLA IV. EFECTOS DE LA HEPARINA EN EL SISTEMA INMUNE.

EFECTO EN CÉLULAS INMUNES.	
<p>ACTIVACIÓN</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>+ Produce linfocitosis. (1)</li> <li>+ Incrementa la migración de linfocitos. (1)</li> <li>+ Estimula citotoxicidad por macrófagos. (2)</li> <li>+ Promueve la liberación de lactoferrina por los PMN. (2)</li> <li>+ En presencia de FMLP promueve la agregación de PMN. (2)</li> <li>+ Estimula pinocitosis y fagocitosis.</li> </ul>	<p>INHIBICIÓN.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>+ Inhibe linfocitos B y T. (1)</li> <li>+ Inhibe la liberación de exudado mononuclear. (2)</li> </ul>
EN SISTEMA DE COMPLEMENTO.	
<p>ACTIVACIÓN</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>+ La incubación de suero y heparina disminuye los niveles de <math>C_1</math>, <math>C_2</math>, ó de <math>C_3</math> a <math>C_9</math>. (3)</li> <li>+ Se deposita en la superficie plaquetaria, atrae IgG, y las lisa por activación de C.</li> <li>+ La interacción heparina-protamina, activa fuertemente a <math>C_1</math>, <math>C_4</math> y <math>C_2</math>. (3)</li> </ul>	<p>INHIBICIÓN.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>+ Inhibe la unión de <math>C_1q</math>, <math>C_1s</math>, y <math>C_2</math>. (1)</li> <li>+ Potencia al inhibidor de <math>C_1</math>. (1)</li> <li>+ Inhibe la amplificación de convertasa. (1)</li> </ul>

**TABLA IV.3 .EFECTOS DE LA HEPARINA EN EL SISTEMA INMUNE.**  
(Continúa de la tabla IV)

INIBICIÓN DE REACCIONES.	
+ Inhibe el shock anafiláctico en cobayos, y pichones. (1)	+ Inhibe broncoespasmo en pichones. (1)
+ Fenómeno de Arthus. (1)	+ Inhibe anafilotoxinas en cobayos y pichones. (1)
+ Prueba de lupus eritematoso. (1)	+ Prueba de Coombs. (1)
+ Anticuerpos antirriñón de rata. (1)	+ Suero nefrotóxico en conejos. (1)
+ Nefritis de Masugi. (1)	+ Junto con cortisona tiene acción anti-inflamatoria. (5)
+ Inhibe la actividad de la proteína básica principal, la cual es citolítica.	

EFECTO PROTECTOR CONTRA.	
+ Aminas vasoactivas. (1,4)	+ Fármacos: curare, digitales, ouabaina, neomicina, polimixina. (1)
+ Toxinas de peritonitis, quemaduras, veneno de víbora Russell, tromboplastina tisular. (1)	

OTROS EFECTOS RELACIONADOS CON SISTEMA INMUNE.	
+ Incrementa la electronegatividad celular. (2)	+ Inhibe el crecimiento tumoral. (4,5)
+ Efecto antiviral. (4)	+ Inhibe proliferación celular. (2)
+ Control de proliferación celular. (6)	+ Anticoagulación local, permitiendo la movilización de células inflamatorias.
+ Incrementa la angiogénesis tumoral. (5)	+ Junto con cortisona es un potente inhibidor de la angiogénesis.

BIBLIOGRAFIA: 1.- Jaques, L.B., 1979.

2.- Mitchell, 1978.

3.- Rent et al., 1975.

4.- Straus, 1984.

5.- Folkman, 1983.

6.- Parker, 1984.

7.- Escobar, 1988.

Además, la heparina promueve la liberación de lactoferrina, y aumenta la agregación de polimorfonucleares; los complejos de heparina-lactoferrina, actúan a manera de complejos inmunes para aumentar la degranulación de polimorfonucleares (Cairo et al., 1983).

En base a todas estas características que se mencionan en los párrafos anteriores, así como por otros efectos (tabla IV y IV·a), se puede considerar a la heparina como una molécula del sistema inmune, aunque faltan estudios más específicos para saber cuál es su función principal.

Considerando la clasificación de Roitt (1985), que divide al sistema inmune en dos divisiones funcionales: el sistema inmune innato y el adaptativo, se puede considerar a la heparina como un factor soluble del sistema inmune innato. Dentro de éste grupo de factores están clasificados, entre otros, la lisozima, el complemento y las proteínas de fase aguda.

#### 1.44.- EFECTO ANTIVIRAL DE LA HEPARINA.

Otro de sus efectos a nivel inmunológico y que nos interesa especialmente, es la inhibición de algunos virus. Se ha demostrado que tanto la heparina como otros polielectrolitos, inhiben a un gran número de virus (Antohi et al., 1983; Aguilar-Setién et al., 1983; Vogt, 1970; Horvath & Hadhazy, 1965; Vaheri, 1964).

El primer reporte del efecto de los polianiones sobre los virus es el de Cohen quien en 1942, utilizó estos compuestos para aislar y cristalizar algunos virus de plantas. En 1949 Warren utilizó la protamina para purificar virus. Penttinen en 1956 inhibe el virus de la influenza en embriones de pollo con un policatiógeno el polifluoroglucinolfosfato.

Los primeros que describen el efecto de la heparina sobre el HSV son Nahmias y Kibrick en 1964: haciendo estudios de replicación del virus herpes en leucocitos humanos, observaron que la presencia de heparina en el medio de cultivo, tenía un claro efecto inhibitorio sobre el virus.

En ese año, Antti Vaheri descubre independientemente el mismo fenómeno y llega a conclusiones similares, pero su estudio es mucho

más extenso; todo un suplemento de cerca de 100 páginas de la Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, se dedicó al estudio del efecto antiviral de la heparina.

Es interesante recalcar que el efecto inhibitorio de la heparina sobre la adsorción viral se entendió bastante bien, desde estas primeras descripciones del fenómeno. En el primer artículo Nahmias y Kibrick en 1964, afirman: "La heparina ha demostrado afectar la infección viral en su fase más temprana, probablemente en la adherencia electrostática primaria del virus a la célula", donde se ve que el fenómeno se entendió bastante bien; contrario a lo que afirma WuDunn en 1989, refiriéndose a este artículo: "Las bases para la inhibición del virus herpes por la heparina se conocían desde mucho tiempo atrás, pero no se entendió su mecanismo...".

¿Por qué entonces se olvidó el fenómeno?, parece haber dos razones: primero se pensó que el fenómeno era inespecífico, por lo que no se le dió la importancia debida; nadie pensó que el receptor celular para el virus herpes pudiera ser un análogo de la heparina, a pesar del claro efecto inhibitorio que mostraba. Y la segunda razón es porque la heparina se investigó como fármaco antiviral.

Por su alto efecto anticoagulante y baja acción antiviral in vivo obtenidos en varios trabajos, la relación heparina-herpes se dejó de estudiar, luego de los trabajos iniciales en los años sesentas.

Por ejemplo, Vaheri probó sin éxito el polifluoroglucofosfato y la heparina contra la queratitis experimental por herpes simplex 1 en conejo; en 1983 Grossman y Thonard, tampoco obtuvieron beneficio terapéutico al administrar heparina tópica en cuadros recurrentes de herpes genital.

Así, en el período comprendido entre las primeras publicaciones de Nahmias (1964) y la de WuDunn en 1989, hay muy pocos trabajos que estudien la interacción heparina-herpes.

El único trabajo que reporta utilidad de la heparina contra el virus herpes in vivo es el que mencionamos anteriormente, en el que el Dr. Aguilar-Setién (1983) protegió a un 100% de ratones contra

el virus herpes del cerdo al administrar heparina y virus por vía subcutánea. Sin embargo el 15% de los ratones morían como consecuencia de las hemorragias causadas por el efecto anticoagulante de la heparina.

#### 1.45.- PROTAMINA .

La protamina es un grupo de proteínas nucleares con un peso molecular aproximado de 4,500 Daltones, que se obtienen del esperma o testículos maduros de peces de la familia Salmonidae (Horrow, 1985). Son fuertemente básicas con carga policatiónica, por su alto contenido en arginina. Cerca del 67% de los aminoácidos de la protamina son residuos de arginina (Antoñi et al., 1983). En clínica, la protamina se usa como antagonista de la heparina, cuando se han administrado dosis altas de ésta. A su vez la protamina es un agente trombocitopénico y liberador de histamina (Jaques, 1979).

#### 1.5.- A C Y C L O V I R .

Los antiherpéticos son, con mucho, la terapia antiviral más avanzada y efectiva en la actualidad. El descubrimiento de la idoxiuridina al principio de los años sesentas permitió el tratamiento exitoso de la queratitis herpética. Le siguieron la vidarabina en los setentas y el acyclovir en 1979; este último, ha sido el más efectivo para disminuir la letalidad del virus herpes en los cuadros de meningoencefalitis y la infección diseminada del neonato.

El acyclovir (9-2-(2hidroxi-etoximetil) guanina, acyclo-guanosina) (ACV) es un análogo de los nucleósidos descrito por primera vez el año de 1979 (Elion et al., 1979). Tiene un alto grado de especificidad contra los virus herpes simplex tipo I y II, varicela zoster y contra el virus de la pseudorrabia (Thiry et al., 1983). Actualmente se consigue en preparación oral intravenosa, tópica y oftálmica. Es el mejor antiherpético conocido actualmente (Hirsch & Schooley, 1983). Existen otros fármacos antiherpéticos como son la vidarabina, el interferón, el

fosfonoformato, la bromovinildesoxiuridina, la trifluorotimidina, la idoxuridina, etc. Esta última sigue usándose en oftalmología, en los casos de keratitis herpética pues tiene un buen efecto terapéutico y es de bajo costo (Vera, 1988). Pero el acyclovir por su baja toxicidad y alta especificidad contra el virus herpes simplex, así como sus excelentes resultados contra todos los tipos de infección herpética, es el principal avance en la terapia contra el virus herpes.

Sin embargo, el acyclovir tiene sus limitaciones. En los cuadros de herpes agudo oral o genital, debe administrarse desde la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad; si se inicia el tratamiento estando presentes ya las vesículas, tiene poco efecto. La segunda limitación es que el herpes ha formado cepas resistentes al acyclovir, de hecho ya hay descritas algunas de éstas.

Además tiene un alto costo, el tratamiento de un cuadro agudo de herpes genital con acyclovir oral, cuesta alrededor de diez días de salario mínimo; además es muy frecuente la presentación de cuadros recurrentes por herpes genital u oral, hasta 12 ó 15 veces por año.

Estos cuadros, no se eliminan con la administración del ACV durante los cuadros agudos. Por lo que se han probado tratamientos con ACV por períodos prolongados, o se administra cada vez que aparece el cuadro herpético; pero estos tratamientos presentan a su vez otros problemas:

- 1.- Facilitan la aparición de cepas virales resistentes al acyclovir (Schnipper et al, 1982; Burns et al, 1982).
- 2.- Los efectos colaterales del ACV en tratamientos prolongados están aún en estudio, por lo que se recomienda este tratamiento sólo en casos repetitivos severos o muy frecuentes y nunca por períodos mayores de 12 meses.
- 3.- El tratamiento preventivo, dos tabletas diarias durante seis meses, representa un costo aproximado de casi cuatro meses de salario mínimo.

4.- El principal problema: al suspender el acyclovir se presenta el mismo número de recurrencias, como si no se hubiera administrado este tratamiento.

Todas estas limitaciones del acyclovir, hacen ver la importancia del estudio de terapias alternativas contra las enfermedades herpéticas, que cumplan con las siguientes características: que su administración en el cuadro agudo evite los cuadros repetitivos, que evite la aparición de cepas resistentes y que sea de bajo costo.

## OBJETIVOS.

- 1.- Estudiar el efecto antiviral in vitro e in vivo, de tres glicosaminoglicanos polianiónicos sulfatados: heparina, dextrán y condroitín; sobre el virus de la seudorrabia.
- 2.- Probar el efecto antiherpético de la protamina sulfato, un polielectrolito proteico.
- 3.- Caracterizar el efecto de estos polielectrolitos sobre el virus herpes y sobre las células.
- 4.- Estudiar el efecto inhibitorio de estos cuatro polielectrolitos sobre el virus herpes simplex 1.
- 5.- Evaluar la posible aplicación terapéutica de estos polielectrolitos contra el virus de la seudorrabia.
- 6.- Probar diversas dosis de heparina in vivo, buscando mantener su efecto antiviral, sin provocar mortalidad por hemorragia.

### 3.- MATERIAL Y MÉTODOS.

#### 3.1. - M A T E R I A L .

##### VIRUS.

El virus de la seudorrabia o Suid herpesvirus 1, cepa Schope fue donado por el "Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias", Palo Alto, México. Los ensayos con Herpes simplex-1, cepa macroplaque de Roizman se realizaron en conjunto con los Dres. Beatriz Gómez y Julio Santiago del laboratorio de Virología, departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina de la U N A M .

##### POLIELECTROLITOS.

Se emplearon las siguientes sustancias: heparina de membrana mucosa intestinal de cerdo, con una actividad de 140 UI/mg actividad USP (Laboratorios Proquifim, Tenancingo Estado de México); condroitín sulfato sal sódica, grado II de cartílago de ballena (Sigma Chemical Co., San Luis Missouri, E.U.A.); dextrán sulfato con un peso molecular promedio de aproximadamente 5,000 daltones (Sigma Chemical Co.) y protamina sulfato, libre de histonas, grado III (Sigma Chemical Co.).

##### CULTIVO DE TEJIDOS.

Monoestratos de células de riñón de bovino llamadas células MDBK (Madin Derby Bovine Kidney), se cultivaron en medio esencial mínimo (MEM) (Gibco Laboratories, Ohio, E.U.A.), a 37°C y atmósfera húmeda.

#### 3.2.- M É T O D O S .

##### EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN VIRAL IN VITRO.

Después de eliminar el sobrenadante de las células MDBK, se les añadió cada uno de los polielectrolitos disueltos en el MEM a las siguientes concentraciones: heparina, condroitín sulfato, y dextrán sulfato a 500 ug/ml; la protamina sulfato a 50 ug/ml. Inmediatamente después se desafiaron las células con 0.1 ml de la suspensión viral, la cual contenía de 50 a 200 unidades formadoras de placa; después de una hora de adsorción a 37°C, los monoestratos celulares se cubrieron con MEM suplementado con agarosa al 1% y suero fetal de ternera inactivado a 57°C durante 30 minutos; como control se usaron células infectadas con la misma dilución viral

pero sin polielectrolitos. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 a 72 horas. Posteriormente las células se fijaron en formol al 3%, fueron teñidas con cristal violeta al 0.3%, o con tinción de giemsa; las placas líticas eran visibles a simple vista, por lo que se contaron con la ayuda de un negatoscopio.

#### ENSAYOS CON HERPES SIMPLEX I.

Se realizó un ensayo in vitro en condiciones similares, pero con herpes simplex-1 en lugar del Suid herpesvirus y células Vero en lugar de células MDBK. Se usaron las mismas condiciones y concentraciones de polielectrolitos que en el ensayo inicial in vitro con el PRV.

#### ADICIÓN DE HEPARINA Y PROTAMINA ANTES O DESPUÉS QUE EL VIRUS.

Para revisar el momento en que la heparina y la protamina inhibían al virus, se aplicaron 50 ug/ml de cada uno de éstos, a diferentes tiempos desde 1 hora antes, hasta 3 horas después del desafío viral.

#### EFFECTO DIRECTO DE LOS POLIELECTROLITOS SOBRE EL VIRUS HERPES.

El efecto directo de polielectrolitos sobre las partículas virales, se estudió incubando el PRV junto con cada uno de los poli-iones a diluciones logarítmicas desde 5,000 hasta 0.5 ug/ml, durante 10 minutos a 37°C, antes de añadirlo a las células. Como control se incubó el virus con el mismo medio de cultivo celular BHK-21 a 37°C pero sin polielectrolitos; finalmente se agregaron a monoestratos celulares y se midió su efecto citopático a las 72 horas. Este ensayo se describe en la tabla V.

#### EFFECTO DIRECTO DE LOS POLIELECTROLITOS SOBRE LAS CÉLULAS.

Ahora se probó el efecto directo de los poli-iones sobre las células con un ensayo similar al anterior, pero se incubaron los polielectrolitos con las células durante 15 minutos, después se lavaron con PBS y finalmente se desafiaron con el virus. La descripción detallada de este ensayo se muestra en la tabla V.a.

#### ENSAYO CON ACYCLOVIR.

Se realizó un ensayo para comparar la acción antiherpética de la heparina y el acyclovir. La concentración del acyclovir fué de 20 ug/ml, que corresponde a una dosis inhibitoria 50 (Laboratorios

TABLA V. EFECTO DE LOS POLIELECTROLITOS SOBRE EL VIRUS.

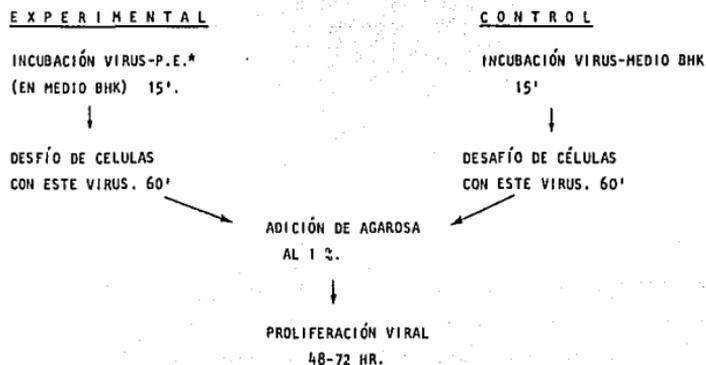
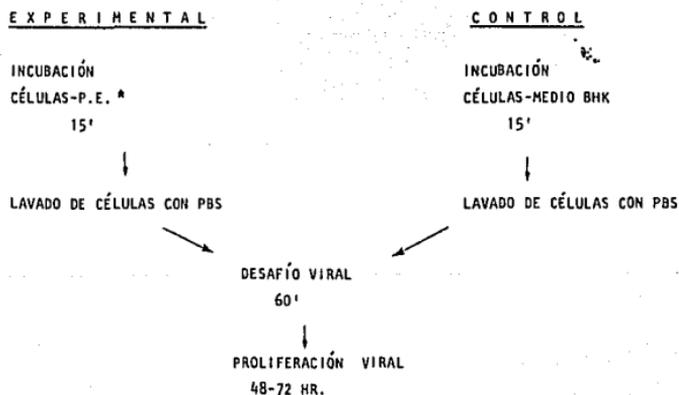


TABLA V EFECTO DE LOS POLIELECTROLITOS SOBRE LAS CÉLULAS.



(\*) PE: polielectrolitos.

Burroughs-Wellcome), mientras que la concentración de heparina fue de 500 ug/ml. En todos los pozos se añadió primero el antiviral y luego el virus.

#### PRUEBAS DE PROTECCIÓN IN VIVO.

##### DETERMINACIÓN DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN.

Se probaron tres vías de administración de la heparina:

- 1.- Subcutánea al azar: se inyectaron virus y heparina por vía subcutánea en el dorso del ratón, en un sitio escogido de manera indiscriminada.
- 2.- Subcutánea en el mismo sitio: se marcó un punto con tinta indeleble en el dorso del ratón, y en ese mismo sitio se administró el virus y las tres dosis de heparina.
- 3.- Intramuscular: se administró el virus por vía subcutánea y la heparina por una vía distinta, intramuscular. Se aplicaron tres dosis de 50 UI de heparina a los mismos tiempos que los otros grupos.

En los dos primeros grupos, la tercera dosis se inyectó cuatro horas después de la inoculación viral y consistió en una dosis doble del poli-ión, disuelta en 0.4 ml de gelatina según la técnica de Evans (Evans & Boller, 1946). Esta administración en forma de gel, se usó con el fin de alcanzar una liberación sostenida durante 48 a 72 horas y observar si con este gel se disminuían las hemorragias provocadas por la heparina.

##### DETERMINACIÓN DE LA DOSIS.

Se probaron también varias dosis de heparina buscando disminuir la dosis de la misma, pero manteniendo su efecto antiviral. En todos los lotes se administró virus y heparina por vía subcutánea. Se probaron las siguientes dosis:

- a) Tres dosis de heparina 50x50x100 en gel:
  - Hora 0: 50 UI de heparina subcutánea.
  - Hora 2: 2 dosis letales 50% del PRV.
  - Hora 4: 50 UI de heparina, subcutánea.
  - Hora 6: 100 UI de heparina en gel.
- b) Tres dosis de heparina 25x25x50 en gel :

Es el mismo esquema que el anterior, pero con la mitad de la dosis.

c) Tres dosis de heparina 50x50x50 sin gel:

El mismo esquema que en el ensayo a), pero con la mitad de la dosis en la tercera administración, y sin gel. Este es el esquema seguido por el Dr. Aguilar-Setién en 1983.

d) Una dosis de heparina:

Una sola dosis de heparina de 50 UI sin gel, previo a la administración de las dos dosis letales 50% del PRV.

PRUEBAS IN VIVO CON TODOS LOS POLIELECTROLITOS:

En base a los dos ensayos anteriores, se realizó el ensayo definitivo in vivo, probando los cuatro polielectrolitos. En todos los grupos se administraron virus y polielectrolitos por vía subcutánea, siguiendo un esquema similar al de tres dosis de heparina (50x50x100) con gel en la última administración según se muestra en la tabla VI.

GRUPO CONTROL.

Se inocularon por vía subcutánea 25 ratones con 0.15 ml de la suspensión viral con dos dosis letales 50 del virus de laseudorrabia; aproximadamente 11,000 unidades formadoras de placa.

GRUPOS EXPERIMENTALES.

Cuatro grupos de 25 ratones recibieron 3 inyecciones subcutáneas de alguno de los polielectrolitos.

- La primera dosis se administró dos horas antes de la inoculación viral,
- la segunda dosis 2 horas después del virus.
- La tercera se inyectó 4 horas después de la inoculación. En esta última, se administró la dosis doble del poli-ión disuelta en 0.4 ml de gelatina según la técnica de Evans (Evans y Boller, 1946).

En la tabla VI se describen detalladamente estos tiempos y dosis de administración de los poli-iones. La observación y conteo de la mortalidad de ratones se siguió durante 10 días, posterior a lo cual ya no mueren los ratones porseudorrabia.

TABLA VI.  
 ESQUEMA DE PROTECCIÓN DE RATONES CONTRA EL VIRUS DE  
 LA PSEUDORRABIA, POR MEDIO DE POLIELECTROLITOS.(+)

GRUPO	1a. DOSIS	VIRUS	2a. DOSIS	3a. DOSIS.
		2 HORAS	4 HORAS	6 HORAS.
CONTROL	PBS	1 DL <sub>50</sub> %	PBS	GEL (*)
HEPARINA	50 UI	"	50 UI	100 UI
CONDROITÍN	5 mg	"	5 mg	10 mg
DEXTRÁN	1 mg	"	1 mg	2 mg
PROTAMINA	0.5 mg	"	0.5 mg	1 mg

(+) Tanto el virus como los polielectrolitos se administraron subcutáneamente.

(\*) La tercera dosis se administró con un gel según la fórmula de Evans , con el fin de obtener una liberación lenta del fármaco.

**PRUEBAS ESTADÍSTICAS.**

Los resultados se evaluaron estadísticamente por la prueba de 'chi' cuadrada y por análisis de varianza (Daniel, 1974).

## 4.- R E S U L T A D O S .

4.1.- RESULTADOS DE LOS ENSAYOS IN VITRO.

- 4.11.- PRIMEROS ENSAYOS IN VITRO.
- 4.12.- DETERMINACIÓN DE LA DOSIS INHIBITORIA IN VITRO.
- 4.13.- ENSAYOS IN VITRO CON MICRODOSIS DE HEPARINA.
- 4.14.- PROTECCIÓN AL AÑADIR PROTAMINA Y HEPARINA DESPUÉS DEL DESAFÍO VIRAL.
- 4.15.- INHIBICIÓN INTRACELULAR.
- 4.16.- ADICIÓN DE LA PROTAMINA ANTES DEL VIRUS.
- 4.17.- SITIO DE ACCIÓN DE LOS POLIELECTROLITOS.
- 4.18.- EFECTO DE LOS POLIELECTROLITOS SOBRE EL VIRUS.
- 4.19.- EFECTO DE LOS POLIELECTROLITOS A NIVEL CELULAR.
- 4.20.- ENSAYOS CON HERPES SIMPLEX VIRUS.
- 4.21.- COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIHERPÉTICO DE LA HEPARINA Y EL ACYCLOVIR.

4.3.- E N S A Y O S I N V I V O.

- 4.31.- VÍA DE ADMINISTRACIÓN DE LA HEPARINA.
- 4.32.- DETERMINACIÓN DE LA DOSIS.
- 4.33.- MORTALIDAD POR HEMORRAGIA.
- 4.34.- ENSAYOS IN VIVO CON OTROS POLIELECTROLITOS.

#### 4.- RESULTADOS.

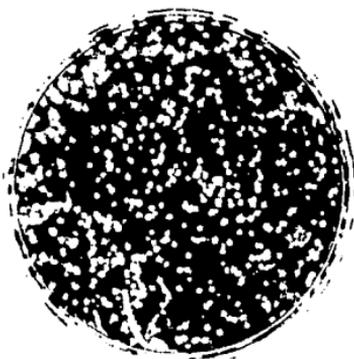
##### 4.11.- PRIMEROS ENSAYOS IN VITRO (Figs. 3 y 4).

El primer ensayo que se realizó fue para estudiar a grosso modo el efecto antiviral in vitro de los polielectrolitos; por lo que se probaron concentraciones altas de los polielectrolitos: heparina, condroitín y dextrán sulfatados a 500 ug/ml y la protamina a 50 ug/ml.

La figura 3 muestra las fotografías de un ensayo de protección de las células MDBK contra el virus de laseudorrabia. Cada partícula viral que infecta a una célula forma una zona lítica en el monoestrato que se identifica como una perforación en la monocapa celular. A simple vista se observa que la heparina, el dextrán y la protamina reducen el número de placas líticas, en cambio el condroitín sulfato las aumenta. El número de placas que se observa en ésta figura 3 se cuantificó y graficó en la figura 4.

La heparina redujo claramente el número de placas formadas por el virus de laseudorrabia en  $1.4 \times \log_{10}$  (Fig. 4); el dextrán sulfato también redujo el número de las placas en  $1.0 \log_{10}$ . La protamina las disminuyó en  $1.2 \log_{10}$ . Por otra parte, el condroitín sulfato aumentó en un 35% el número de placas líticas con respecto al control.

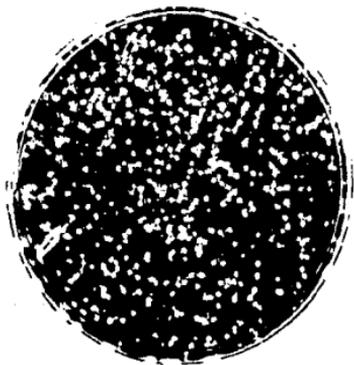
EPECTO DE LOS POLIELECTROLITOS SOBRE EL NÚMERO Y TAMAÑO DE LAS PLACAS LÍTICAS PRODUCIDAS POR EL VIRUS DE LA PSEUDORRABIA.



CONTROL



HEPARINA

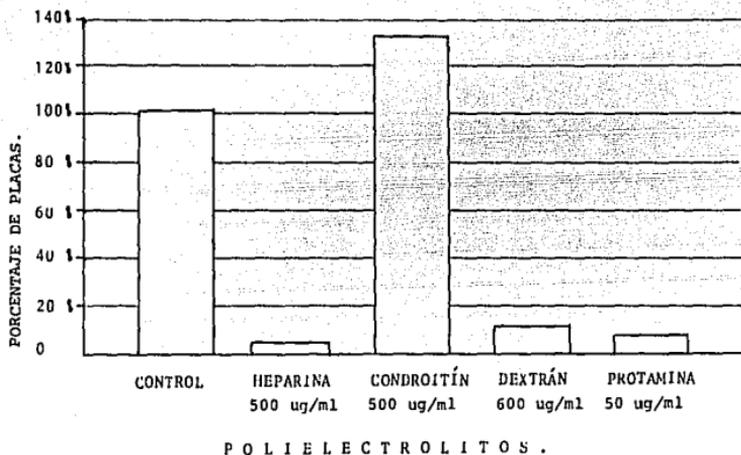


CONDROITÍN SULFATO



DEXTRÁN SULFATO.

FIGURA 4 . EFECTO IN VITRO DE LOS POLIELECTROLITOS  
SOBRE EL VIRUS Suid herpesvirus 1.



EL EXPERIMENTO DE LA FIGURA 3 SE CONTABILIZÓ Y SE HIZO UNA COMPARACIÓN PORCENTUAL, TOMANDO EL CONTROL COMO 100% DE PLACAS .

#### 4.12.-DETERMINACIÓN DE LA DOSIS INHIBITORIA IN VITRO (Fig. 5).

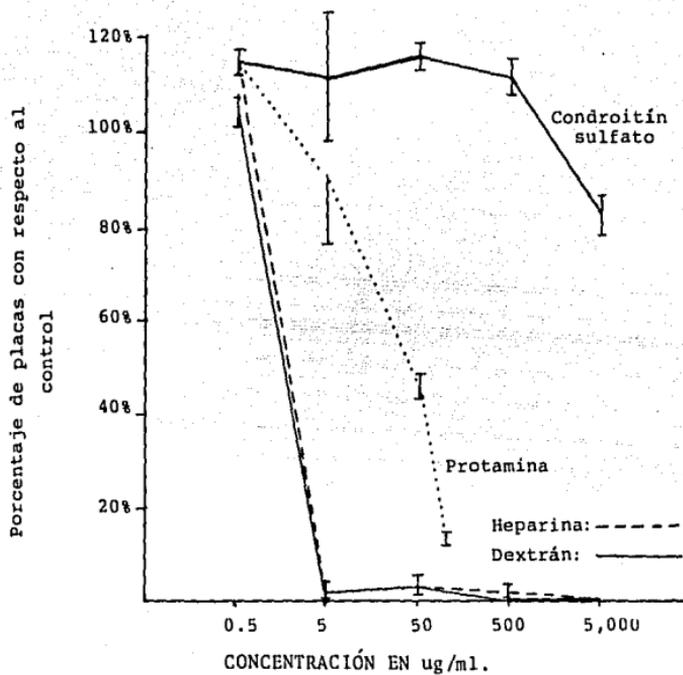
Como puede verse en la figura 4, se utilizó una sola concentración de los poli-iones, por lo que a continuación se probaron diversas concentraciones desde 0.5 hasta 5,000 ug/ml de cada uno de ellos. Los resultados se muestran en la figura 5.

Nuevamente se confirmó que la heparina y el dextrán sulfato tienen un fuerte efecto antiviral; desde concentraciones tan bajas como 5 ug/ml se logra casi 100% de inhibición.

La protamina en cambio, mostró un efecto antiviral menor que en el primer ensayo; y menor efecto también que la heparina y la protamina; el máximo efecto protector se alcanza a 100ug/ml. A concentraciones iguales o mayores de 500 ug/ml, la protamina es citotóxica sobre las células MDBK, lo que impide probarla a estas concentraciones. Esta es la razón por la que se añadió otra dosis de protamina no tóxica de 100 ug/ml, que no se utilizó con los otros polielectrolitos.

De nuevo, el condroitín no inhibe al virus; sino que aumentó el número de placas líticas significativamente entre 20 y 40 % a todas las concentraciones, excepto a 5,000 ug/ml en que redujo en 15% el número de placas.

FIGURA 5 .



INHIBICIÓN DEL VIRUS PRV, UTILIZANDO CONCENTRACIONES LOGARÍTMICAS DE CADA POLIELECTROLITO.

#### 4.13.- ENSAYOS IN VITRO CON DOSIS BAJAS DE HEPARINA (Fig. 6).

Se probaron dosis menores de heparina, para conocer la mínima concentración inhibitoria in vitro. La concentración de heparina, con un claro efecto antiviral más baja fue de 1.9 ug/ml, que muestra aún 93% de inhibición; a 0.6 ug/ml inhibe sólo un 15% con respecto al control.

#### 4.14.- PROTECCIÓN IN VITRO AL AÑADIR HEPARINA Y PROTAMINA DESPUÉS DEL DESFIO VIRAL (Fig.7).

Al añadir la protamina y la heparina a varios tiempos después del desafío viral (Fig. 7). Básicamente se observa que los dos polielectrolitos inhiben al PRV sólo si se añaden antes que el virus penetre a la célula. Si la protamina se adiciona 15 minutos después, disminuye mucho su efecto antiviral y a los 60 minutos ya no lo presenta. De manera similar, al añadir heparina de una a tres horas después que el virus ha penetrado disminuye su efecto entre 80% y 100%

#### 4.15.-INHIBICIÓN INTRACELULAR.

Por el contrario, la heparina inhibió en un 20 % al virus al añadirse hasta tres horas después que éste (Fig.7). El análisis de este sencillo fenómeno de inhibición intracelular es particularmente interesante, y se comenta en el capítulo de discusión.

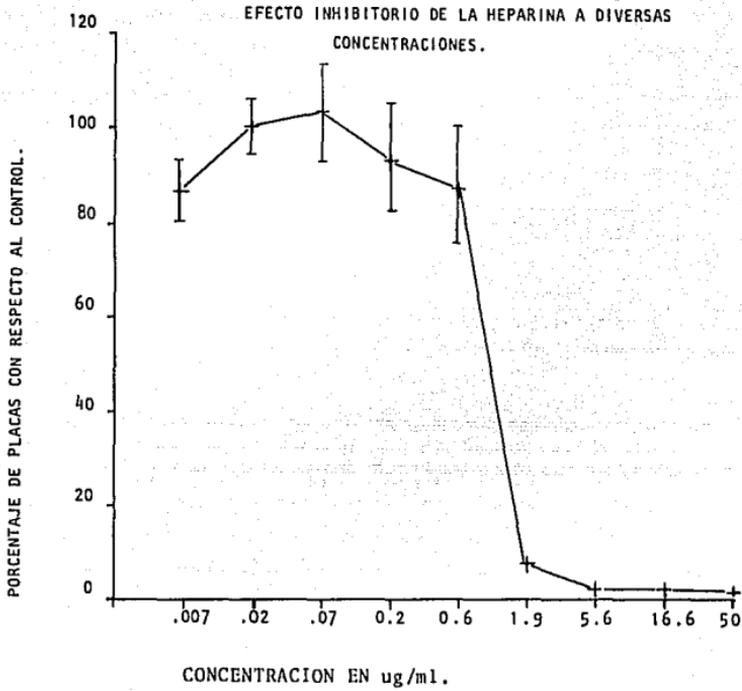
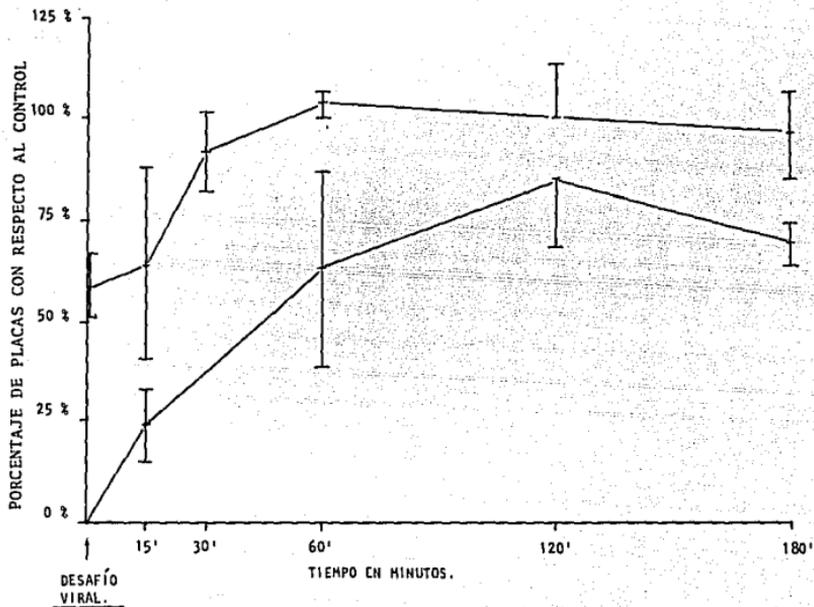


FIGURA 7.

PROTECCIÓN IN VITRO AÑADIENDO HEPARINA Y PROTAMINA  
DESPUÉS DEL VIRUS SUID HERPES.



#### 4.16.- ADICIÓN DE LA PROTAMINA ANTES DEL VIRUS (Fig.8).

Ahora se revisó lo contrario, el efecto antiviral de la protamina al añadirla antes del desafío viral. Hay que recalcar que son varios tiempos (60, 40 y 20 minutos) antes que el virus (Fig. 8) y no después, como en el ensayo anterior (Fig. 7).

La adición de la protamina antes que el virus, también disminuye su efecto antiviral: a mayor tiempo desde la adición de ésta hasta el desafío, presenta menor efecto. Como puede verse, la máxima acción antiviral se logra al añadir la protamina al mismo tiempo que el virus.

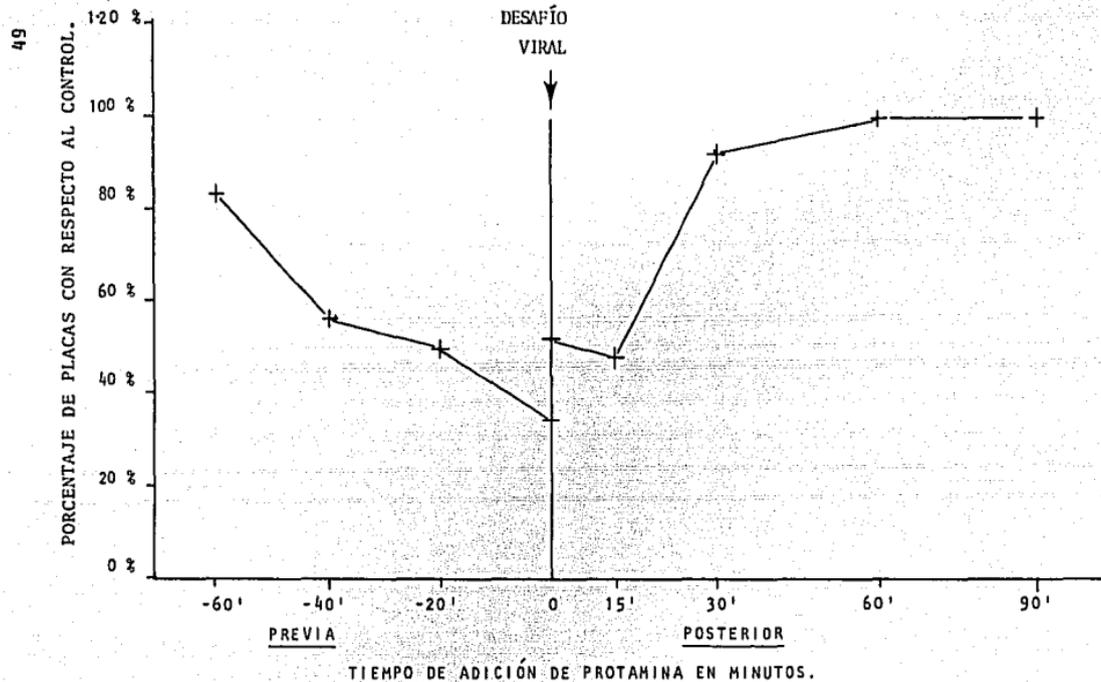
#### 4.17.- SITIO DE ACCIÓN DE LOS POLIELECTROLITOS (Figs. 9 y 10).

Los polielectrolitos podrían actuar a dos niveles: en la célula o en el virus. A este respecto, los reportes previos son contradictorios.

Para estudiar ésto hicimos dos ensayos, uno incubando los polielectrolitos con el virus antes del desafío; y el otro incubando los polielectrolitos con las células 15 minutos y eliminandolos antes del desafío, según se explica en material y métodos y en la tablas V y V.a.

El efecto de los polielectrolitos sobre el virus se analiza al incubar estos dos antes de desafiar las células y se muestra en la figura 9. En cambio el efecto de los polielectrolitos sobre las células se observa en la figura 10.

F I G U R A 8. EFECTO DE LA PROTAMINA AL AÑADIRLA DESDE 60 MINUTOS ANTES HASTA 90 MINUTOS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN.



#### 4.18.- EFECTO DE LOS POLIELECTROLITOS SOBRE EL VIRUS (Fig.9).

El efecto de los polielectrolitos sobre los virus se muestra en las cuatro gráficas de la figura nueve. Si quisiéramos resumir este efecto, diríamos que los polielectrolitos no mostraron efecto viricida directo:

- La heparina inhibe igual, si se añade a las células antes del virus, o si se incuba con el virus antes de agregarlo a las células.
- El condroitín no produjo incremento de letalidad, cuando se incubó primero con el virus, fenómeno que sí se aprecia cuando se añade a las células antes del virus.
- El dextrán, al igual que la heparina, produjo una inhibición menor a la dilución más baja.
- La protamina tienen un efecto inhibitorio un poco menor cuando se agrega al virus y se incuba previamente al desafío de las células.

En resumen: la protamina, heparina y dextrán tienen el mismo efecto antiviral excepto en una de las concentraciones, lo que no alcanza significancia estadística que nos haga pensar que el efecto sea lisis directa del virus por los polielectrolitos.

#### 4.19.-EFECTO A NIVEL CELULAR (Fig.10).

Para estudiar si el efecto de los polielectrolitos era sobre las células, se incubaron los poli-iones con las células durante 15 minutos a 37°C, posteriormente se lavaron éstas con PBS y finalmente se agregó el virus (Tabla V.a).

## FIGURA 9.

EFFECTO INHIBITORIO DE LOS POLIELECTROLITOS AL INCUBARLOS  
CON EL VIRUS, PREVIO AL DESAFÍO. (Según se explica en la  
tabla V).

En las cuatro gráficas se representa así:

- + ————— Virus y Polielectrolitos  
incubados antes de agregarlos a las células.
- + - - - - - Adición de polielectrolitos a  
las células MDBK, antes del desafío.

Figura 9.

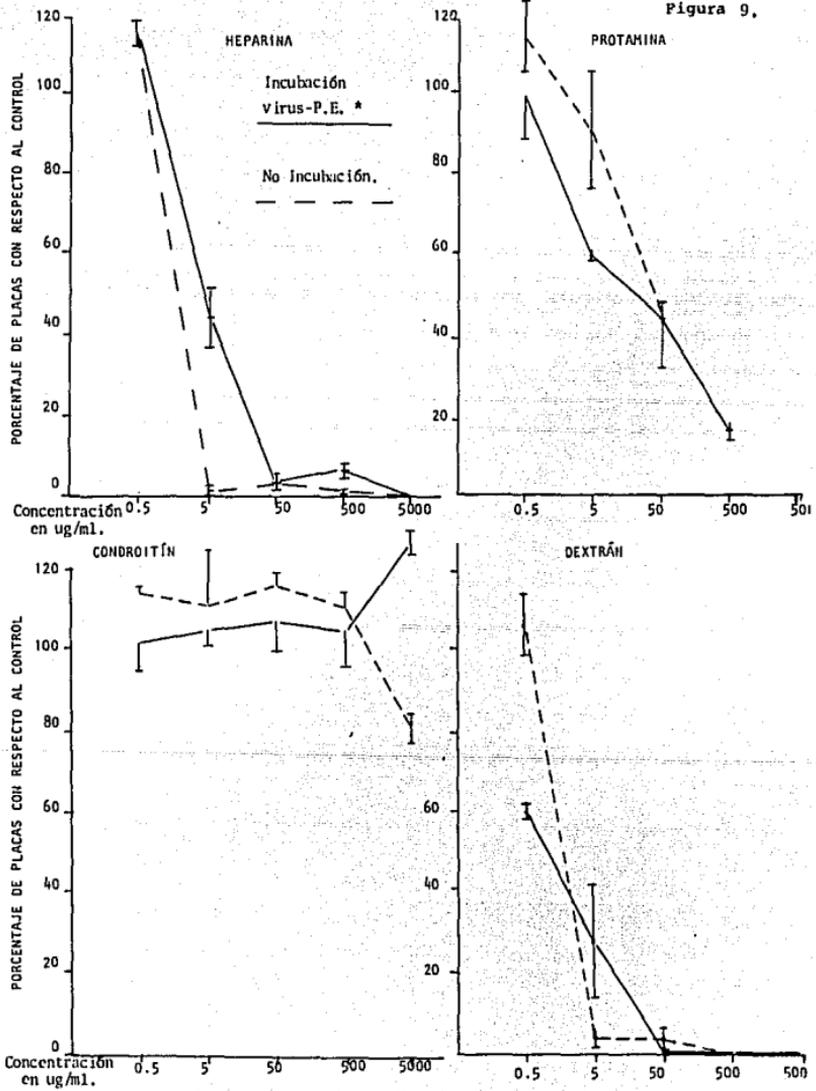
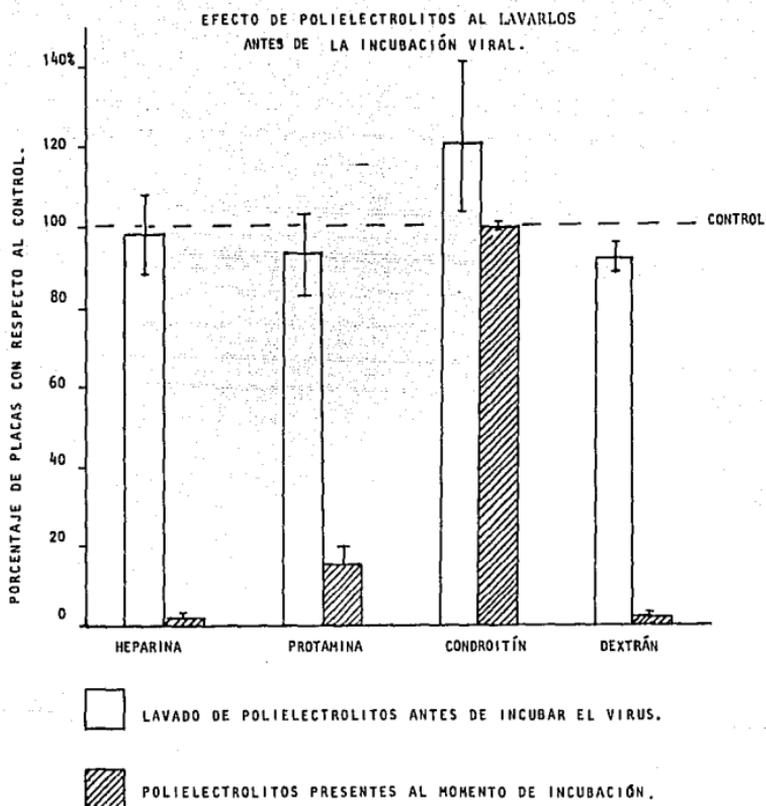


FIGURA 10.



Los resultados se ven en la figura 10. Ninguno de los polielectrolitos inhibió al virus si el poli-ion se lava antes del desafío viral. Un simple lavado de los polielectrolitos, antes del desafío elimina prácticamente todo efecto antiviral.

#### 4.20.- ENSAYOS CON HERPES SIMPLEX VIRUS (Figs. 11 y 12).

Todos los ensayos revisados hasta aquí, se hicieron con el herpes suid, pero teníamos especial interés en observar el efecto sobre el herpes humano. Los ensayos con HSV se observan en la figura 11, y se comparan con los del PRV en la figura 12.

Los cuatro polielectrolitos muestran porcentajes de inhibición o facilitación (en el caso de condroitín), similares con ambos virus. Esta identidad de efecto se aprecia mejor en la figura 12, donde se compara la acción sobre ambos virus.

#### 4.21.- COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRAL DE LA HEPARINA Y EL ACYCLOVIR (Fig. 13).

Se hizo un ensayo in vitro para comparar el efecto antiviral del acyclovir y la heparina, así como para probar un posible efecto sinérgico. El acyclovir se usó a las concentraciones recomendadas para ensayos in vitro (20 ng/ml), pues a dosis mayores, causa efecto citotóxico.

A estas concentraciones, la heparina mostró un efecto antiherpético in vitro mayor que el acyclovir (Fig. 13).

La última columna de la figura 13, muestra el efecto inhibitorio al estar presentes los dos fármacos. Se observa

FIGURA 11.

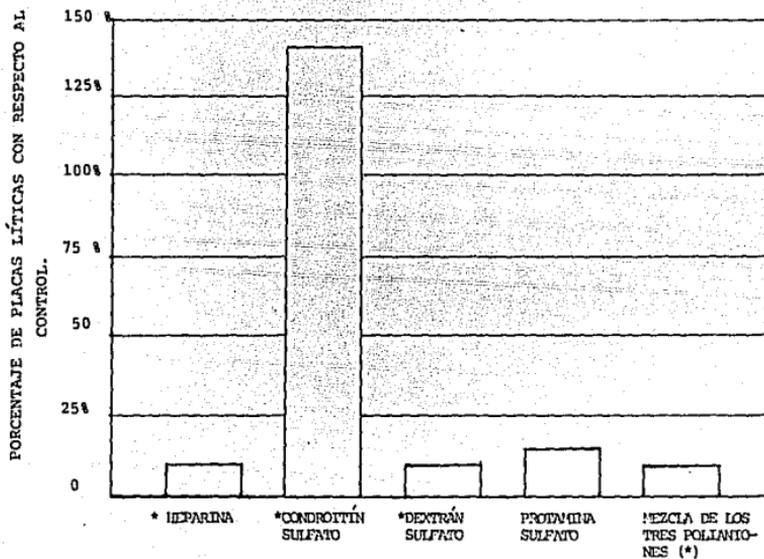
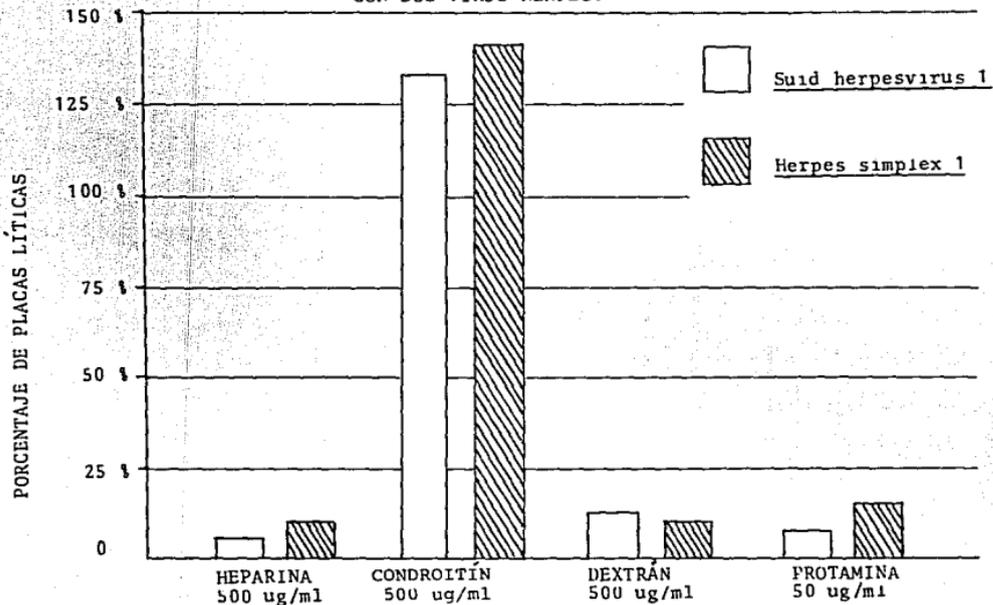
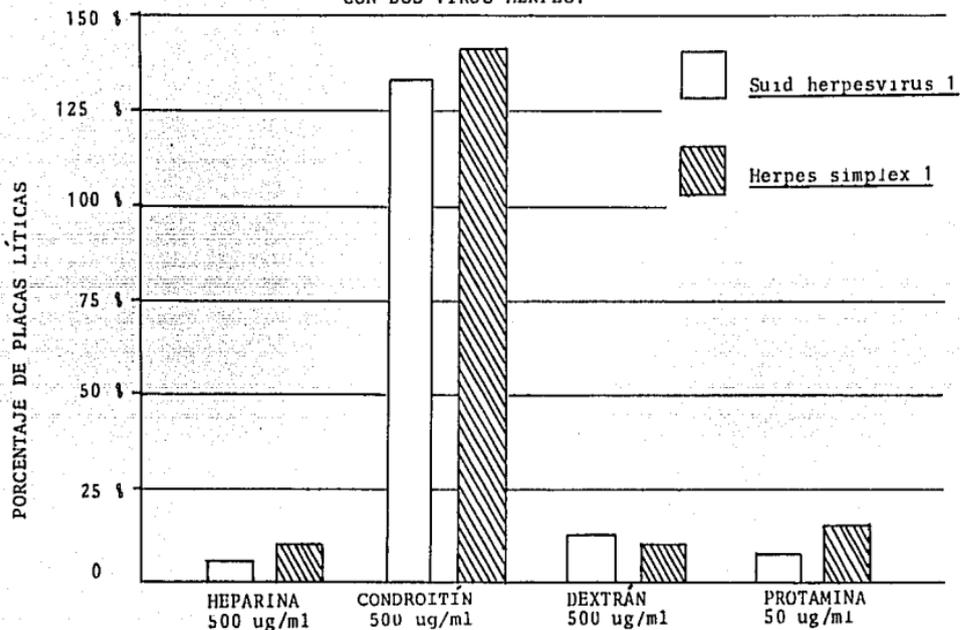
PROTECCIÓN IN VITRO CONTRA EL VIRUS HERPES SIMPLEX 1

FIGURA 12  
COMPARACIÓN DEL EFECTO IN VITRO DE LOS POLIELECTROLITOS  
CON DOS VIRUS HERPES.



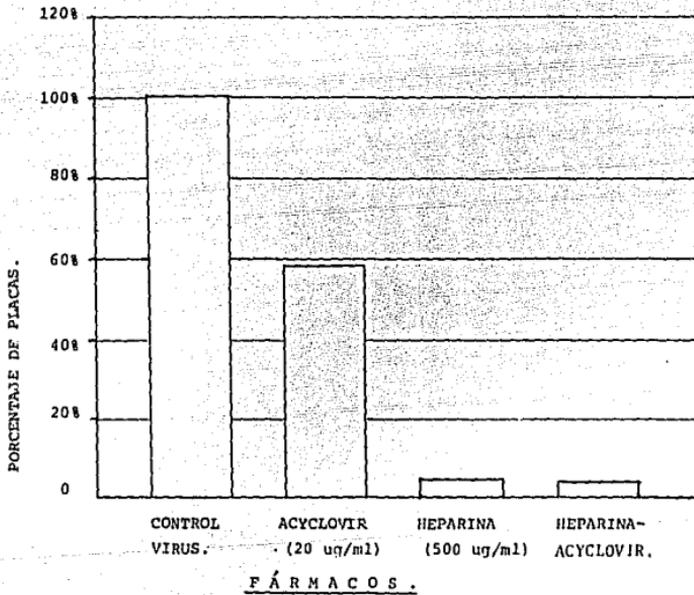
POLIELECTROLITOS.

FIGURA 12  
COMPARACIÓN DEL EFECTO IN VITRO DE LOS POLIELECTROLITOS  
CON DOS VIRUS HERPES.



POLIELECTROLITOS.

Fig. 13 COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRAL DE LA  
HEPARINA Y EL ACYCLOVIR.



prácticamente la misma inhibición que al añadir heparina sola, por lo que no se puede concluir si hay o no efecto sinérgico.

#### 4.3.- ENSAYOS IN VIVO.

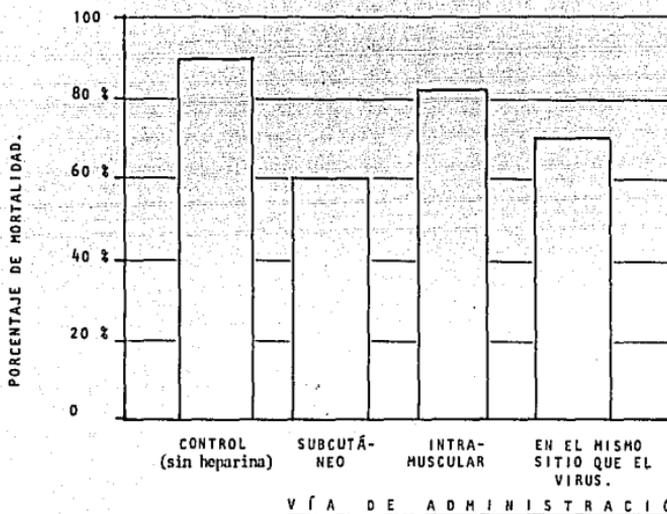
En 1983 el Dr. Aguilar-Setién utilizó un modelo inyectando el virus y la heparina por vía subcutánea, obteniendo en aquella ocasión 100% de protección en los ratones inyectados con heparina, aunque con una mortalidad por hemorragia del 15% de ratones, como efecto secundario de la heparina.

En el presente trabajo, al utilizar ese mismo esquema de protección no obtuvimos porcentajes de protección mayores al 10% con respecto al control. Se hicieron varios ensayos con heparina para probar que vía y dosis era la más efectiva contra el SHV-1.

#### 4.31.- DETERMINACIÓN DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN DE LA HEPARINA IN VIVO (Fig.14).

Primero se estudiaron otras vías de administración. En la figura 14 se observa la mortalidad por virus de la pseudorrabia al utilizar tres vías de administración de la heparina: dos subcutáneas en el dorso del animal, la primera inyectando virus y polielectrolitos en sitios distintos (vía subcutánea al azar). El segundo grupo se marcó con tinta indeleble en un punto del dorso, para administrar virus y heparina en el mismo sitio (vía subcutánea en el mismo sitio). Al tercer grupo se le administró el virus por vía intramuscular y la heparina por vía subcutánea (vía subcutánea-intramuscular).

FIGURA 14.



COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRAL DE LA HEPARINA, AL ADMINISTRARLA POR DIVERSAS VÍAS. EN TODOS LOS CASOS, EL VIRUS SE ADMINISTRÓ POR VÍA SUBCUTÁNEA.

Como se ve en la figura 14, la vía subcutánea al azar es la que mejor protege a los ratones contra la seudorrabia, disminuyendo la mortalidad hasta 30% con respecto al control, contra 10 y 17% de protección al inyectar por las otras vías.

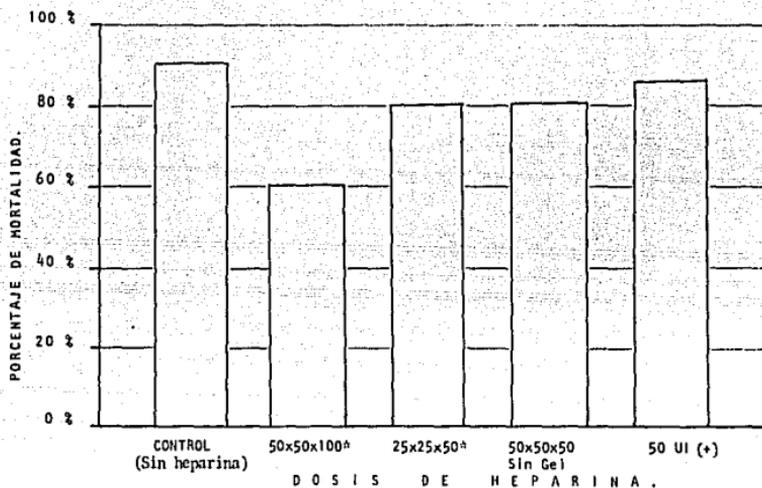
#### 4.32.- DETERMINACIÓN DE LA DOSIS (Fig.15).

Una vez conocida la mejor vía de administración, subcutánea al azar, se probaron cuatro dosis distintas, la que mejor protegió a los ratones fué la dosis 50x50x100 UI + gel, que corresponde a tres dosis de heparina; dos primeras de 50 UI y la tercera de 100 UI en gelatina, para obtener su liberación durante 24-48 horas. Ensayamos de nuevo tres dosis de 50 UI sin gelatina subcutáneas (50x50x50), pero ésta mostró menor protección contra el PRV y mayor mortalidad por hemorragia (Fig. 15).

#### 4.33.-MORTALIDAD POR HEMORRAGIA (TABLA VII).

Se analizó la mortalidad por hemorragia según la vía y dosis, los resultados se muestran en la tabla VII. La vía subcutánea al azar fue la mejor, pues no provocó muertes por hemorragia, en cambio por vía intramuscular murieron 40% de los ratones; por vía subcutánea en el mismo sitio, murieron el 30% de ratones por hemorragia al día siguiente de la administración de la heparina (tabla VII).

Por lo que la dosis que se eligió para proteger a los ratones en el ensayo definitivo, fué la triple de heparina con la última dosis administrada en gel (50x50x100+gel).



COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRAL DE DIVERSAS DOSIS DE HEPARINA ADMINISTRADA EN TODOS LOS CASOS POR VÍA SUBCUTÁNEA

(\*): La tercera dosis se administró en gel.

(+): Dosis única, administrada al mismo tiempo que el virus.

VÍA DE ADMÓN.	DOSIS ** HEPARINA.	GEL	MORTALIDAD POR HEMORRAGIA	PORCENTAJE DE PROTECCIÓN.
CONTROL	—	—	0 %	—
S.C.	50 x 50 x 100	SÍ	0 %	30 %
S.C.	25 x 25 x 50	SÍ	0 %	10 %
S.C.	50 x 50 x 50	No	30 %	10 %
S.C.	50	No	0 %	4 %
I.M.	50 x 50 x 50	No	40 %	8 %
*S.C.M.S.	50 x 50 x 100	SÍ	30 %	19 %

TABLA VII. - COMPARACIÓN DE LA MORTALIDAD POR HEMORRAGIA Y LA PROTECCIÓN OBTENIDA AL ADMINISTRAR LA HEPARINA POR LAS VÍAS Y DOSIS QUE SE OBSERVAN EN LAS FIGS. 13 y 14.

\* Subcutánea en el mismo sitio.

\*\* Dosis en Unidades Internacionales de Heparina.

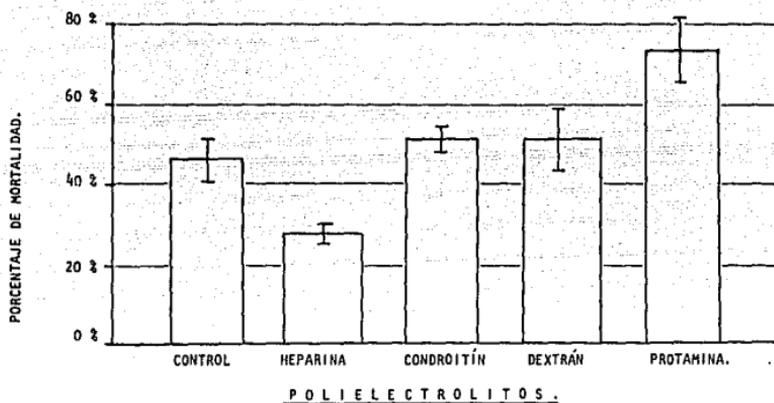
4.34.- EXPERIMENTO IN VIVO CON OTROS POLIELECTROLITOS (Fig. 16).

Se realizó finalmente, el ensayo in vivo más importante, con todos los otros polielectrolitos. Se utilizó un esquema de administración de cada una de éstos similar al de la heparina: dos dosis iniciales, con una tercera disuelta en gel.

La descripción detallada de estas dosis se muestra en el capítulo de métodos, en la tabla VI.

La heparina fue el único polielectrolito que disminuyó la mortalidad por virus de la seudorrabia in vivo en un 21% ( $p < 0.025$ ) (Fig. 16). Ni el condroitín ni el dextrán sulfato modificaron los porcentajes de mortalidad causada por el virus de la seudorrabia. Los ratones tratados con protamina, tuvieron en cambio, mayor mortandad que el grupo control ( $p < 0.05$ ).

FIGURA 16 .



PORCENTAJES DE MORTALIDAD DE RATONES INFECTADOS CON VIRUS DE LA SEUDORRABIA, PROTEGIDOS CON LOS DIVERSOS POLIELECTROLITOS.

## 5.- DISCUSIÓN.

- 5.11.- EFECTO IN VITRO DE LOS POLIELECTROLITOS.
- 5.12.- CONDROITÍN SULFATO Y ESPECIFICIDAD DE LA REACCIÓN.
- 5.13.- ENSAYOS IN VITRO CON DOSIS BAJAS DE HEPARINA.
- 5.14.- PROTECCIÓN IN VITRO AL AÑADIR HEPARINA Y PROTAMINA  
DESPUÉS DEL DESAFÍO VIRAL.
- 5.15.- INHIBICIÓN INTRACELULAR.
- 5.16.- ADICIÓN DE LA PROTAMINA DIVERSOS TIEMPOS ANTES DEL VIRUS.
- 5.17.- SITIO DE ACCIÓN DE LOS POLIELECTROLITOS.
- 5.18.- EFECTO SOBRE LAS CÉLULAS.
- 5.19.- ALGUNAS CONSIDERACIONES DEL EFECTO ANTI HERPÉTICO IN VITRO  
DE LA PROTAMINA.
- 5.20.- EFECTO CITOTÓXICO DE LA PROTAMINA.
- 5.21.- ENSAYOS CON HERPES SIMPLEX VIRUS.
- 5.22.- COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRAL DE LA HEPARINA Y EL  
ACYCLOVIR.

## 5.3.- ENSAYOS IN VIVO.

- 5.31.- ANÁLISIS DE LOS ENSAYOS IN VIVO.
- 5.32.- EFECTO PARADÓJICO IN VIVO DE LA PROTAMINA.
- 5.33.- ACCIÓN ESPECÍFICA E INESPECÍFICA DE LOS POLIELECTROLITOS.

#### EFFECTO IN VITRO DE LOS POLIELECTROLITOS.

Tres de los cuatro polielectrolitos probados, tienen una fuerte acción antiviral. La heparina y el dextrán sulfatados mostraron una curva de inhibición sobre el PRV in vitro prácticamente idéntica (Fig. 5). Concentraciones tan bajas como 5ug/ml, inhiben al virus casi en un 100%.

Aunque en el ensayo inicial (Fig. 4), la protamina mostró casi el mismo efecto que la heparina y el dextrán, al probar diversas concentraciones de la protamina se observó que en realidad tiene mucho menor efecto que los dos anteriores. Además, mostró un fuerte efecto citotóxico a concentraciones por arriba de 500 ug/ml. Los otros tres polianiones no son tóxicos aún a concentraciones tan altas como 5 mg/ml.

El condroitín en cambio, aumentó la citopatogenicidad del virus hasta en un 35%. Este fenómeno se discute a continuación.

#### CONDROITÍN SULFATO Y ESPECIFICIDAD DE LA REACCIÓN.

A pesar de que el condroitín tiene carga aniónica, la misma que la heparina; aumentó la patogenicidad de ambos virus herpes en lugar de inhibirlos (Figs. 4 y 12). Este fenómeno sugiere que el efecto antiviral de los polielectrolitos es específico y no un simple efecto de cargas iónicas contrarias que bloquean el fenómeno de adherencia.

Si la reacción fuera sólo por cargas iónicas, inespecífica, cualquier polianión inhibiría al virus, lo que no se ha observado ni por nosotros, ni por otros autores como Vaheri, quien en 1964 utilizó monosacáridos cargados aniónicamente sin tampoco inhibir al virus.

#### ENSAYOS IN VITRO CON DOSIS BAJAS DE HEPARINA.

La heparina inhibió al PRV en un 93% a concentraciones tan bajas como 1.9 ug/ml. Hay que recalcar esta fuerte acción antiviral pues muestra por un lado la potencia, y de algún modo también, la especificidad de la reacción. Si se hubiera valorado adecuadamente esta acción inhibitoria en los años sesentas, el hallazgo no hubiera caído en el olvido.

**PROTECCIÓN IN VITRO AL AÑADIR HEPARINA Y PROTAMINA  
DESPUÉS DEL DESFIO VIRAL.**

Este ensayo ayuda a explicar el mecanismo de acción de los polielectrolitos. Se ha propuesto que la heparina se une a la gIII del PRV, y esto bloquea un mecanismo patogénico clave del virus herpes: la fusión de membranas viral y celular (Zuckermann et al., 1989). La gIII es la molécula de la membrana viral que se ancla a la membrana celular. A este tipo de moléculas con las que el virus se une a membranas celulares se les llama VAP o proteínas de adhesión viral (Viral Attachment Protein).

Si la heparina y la protamina inhiben al virus antes de que éste penetre, deben hacerlo bloqueando la unión de la gIII al heparán sulfato. Por su carga aniónica la heparina y el dextrans deben unirse a la gIII, mientras que la protamina debe unirse a la molécula de heparán sulfato de la membrana celular.

**INHIBICIÓN INTRACELULAR.**

Como mencionamos en resultados, la heparina inhibió en un 20% al virus al añadirse hasta tres horas después que éste (Fig.7). El análisis de este sencillo fenómeno de inhibición intracelular es particularmente interesante.

El mecanismo de acción de la heparina para inhibir al virus intracelularmente, podría ser bloqueando el mecanismo de diseminación intracelular, que se lleva a cabo fusionando membranas celulares (Fig. 1), función que es realizada por la gB cuando se expresa en la membrana celular, durante la replicación viral (Zuckermann, 1989).

Este bloqueo de la diseminación intracelular, es un fenómeno que se ha observado desde hace muchos años en los ensayos de inhibición de placa, (que es una técnica de rutina en virología). No se conocía bien por qué mecanismo sucedía esto. Sólo se había observado que la adición de concentraciones altas de agarosa a los pozos de cultivo inhibía la formación de placas líticas virales. La agarosa es una mezcla de carbohidratos, varios de ellos con cargas polianiónicas, que inhiben la diseminación intracelular. De

hecho, para contrarrestar este efecto inhibitorio de la agarosa, se recomienda disminuir la concentración de ésta, o añadir protamina al medio para neutralizar el efecto de los polianiones (Lennete, 1981).

Pero este efecto inhibitorio del 20% post-desafío, podría mediarse por algún otro mecanismo, interferón por ejemplo, aunque no hemos estudiado esta posibilidad. En todo caso, lo que nos dice este fenómeno, es que el 80% del efecto antiviral de la heparina es por inhibición de la adsorción viral y el 20% restante, por algún otro mecanismo.

Nos inclinamos a pensar que el mecanismo de inhibición intracelular, es bloqueando la fusión de membranas celulares, pero se necesitan otros ensayos para demostrarlo con certeza.

#### ADICIÓN DE LA PROTAMINA DIVERSOS TIEMPOS ANTES DEL VIRUS.

También fue interesante que al añadir la protamina a diversos tiempos antes que el virus, se disminuía fuertemente su acción antiviral (Fig. 8). ¿Qué sucedió con la protamina?, hay varias posibilidades: que haya ingresado a las células, que se desnaturalice, o que su carga sea neutralizada por amortiguadores presentes en el medio de cultivo. Nos inclinamos por la primera posibilidad, pues una característica de la protamina es incrementar la entrada de macromoléculas a la célula (Folkman et al., 1983), por lo que podría internarse al citoplasma y perder así su efectividad.

Esta disminución del efecto de la protamina al añadirse antes que el virus también sugiere, pero no demuestra, que su efecto antiviral no es induciendo interferón. Si fuera así, podría añadirse algunos minutos antes o después que el virus y mantendría la inducción de interferón.

Basándonos en el hecho que el virus se une a las moléculas de heparán sulfato de la membrana celular por la gIII (Wu Dunn et al., 1989; Zuckerman et al., 1989) y que los polielectrolitos actúan durante la adsorción viral (Figs. 7 y 8) se pueden concluir otros dos detalles del mecanismo de acción de los poli-iones:

- a) La heparina y el dextrán actúan a nivel de membrana viral, y más específicamente sobre los glicanos de la gIII, que tienen carga catiónica.
- b) La protamina bloquea a ese mismo nivel pero actuando sobre el receptor de membrana celular: el heparán sulfato.

#### SITIO DE ACCIÓN DE LOS POLIELECTROLITOS.

Ya que se había definido que los polielectrolitos actúan extracelularmente, justo antes de que el virus penetre a la célula, es decir durante la penetración viral, había que descartar otros posibles mecanismos de inhibición de los polielectrolitos:

- a) Efecto viricida directo.
- b) Efecto citotóxico.

Si los polielectrolitos no tuvieran ninguno de estos dos efectos podríamos prácticamente asegurar que actúan sobre los mecanismos de penetración viral.

#### EFEECTO SOBRE LAS CÉLULAS.

Como se muestra en la figura 10, un simple lavado de los polielectrolitos antes del desafío viral, elimina prácticamente todo efecto antiviral. Esto demuestra en primer lugar, que el efecto antiviral de los polielectrolitos, no es por daño celular.

Esto se puede explicar porque los polielectrolitos se unen a las glicoproteínas de membrana por medio de enlaces iónicos que son enlaces de baja energía y un simple lavado los remueve.

De este ensayo se desprenden otras conclusiones importantes:

- a) es indispensable que los polielectrolitos estén presentes durante el desafío viral para que ejerzan su efecto inhibitorio,
- b) debido a estos enlaces de baja afinidad, es muy fácil remover su efecto antiviral. Esto explica, en buena medida, por qué tienen tan baja acción in vivo.
- c) El mecanismo de acción de los polielectrolitos no es viricida ni citotóxico, sino que inhiben los mecanismos de penetración del virus a la célula.

### ALGUNAS CONSIDERACIONES DEL EFECTO ANTIHERPÉTICO IN VITRO DE LA PROTAMINA.

El efecto antiherpético de la protamina sólo se ha mencionado en la bibliografía por Vaheri en 1964. En la extensa revisión que hizo, probando el efecto antiherpético de varias decenas de substancias emparentadas con la heparina, menciona que la protamina inhibe al virus herpes simplex humano, pero no realizó más ensayos.

Sin conocer ese experimento de Vaheri, hallamos el mismo fenómeno de inhibición con protamina in vitro. Por su potencial utilización como antiviral, era de especial interés estudiarlo, por lo que se hicieron varios ensayos especiales con ésta; finalmente mostró menor acción que la heparina, pero su estudio ayudó a comprender mejor la relación polielectrolitos-virus-célula.

La protamina mostró menor efecto antiviral que la heparina y el dextrán. Sólo a concentraciones de 50 y 100 ug/ml se obtiene un buen efecto antiherpético (Fig.3). La protamina, a concentraciones iguales o mayores de 500 ug/ml, mostró un fuerte efecto citotóxico, sobretodo si se queda en el sobrenadante celular durante las 72 horas de proliferación viral.

### EFFECTO CITOTÓXICO DE LA PROTAMINA.

Cabe preguntarse si la protamina inhibe al virus por acción viricida directa, pues se ha descrito que algunos policationes como la protamina y la histona H1 causan picnosis al virus de la influenza y tienen efecto bacteriolítico (Antoñi et al., 1983). Además está nuestra observación de su efecto citotóxico. Por lo que quizá la protamina actúa lisando al virus o dañando a las células antes de la penetración.

Los experimentos de la Fig. 9 y 10, descartan esta posibilidad, pues de ser así, el virus incubado con protamina mostraría un efecto antiviral mayor que cuando no se incubaron. Esto sugiere que su acción es a nivel de la adsorción modificando la carga iónica de las membranas celular y viral.

Una última posibilidad en cuanto al mecanismo de acción de la protamina sería inhibiendo directamente el metabolismo celular, e indirectamente la replicación viral. Tampoco parece ser el caso,

pues la adición de la protamina sólo 30 minutos después del desafío viral, no bloquea su replicación (Fig. 7). Si el mecanismo de acción de la protamina fuera inhibiendo el metabolismo celular, su adición aún varias horas después del desafío, mostraría una inhibición similar.

#### ENSAYOS CON HERPES SIMPLEX VIRUS.

Sorprendentemente, los cuatro polielectrolitos tienen un efecto muy parecido sobre ambos virus herpes, lo que sugiere que utilizan los mismos receptores de membrana, aunque faltan más ensayos para probarlo con certeza.

#### COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRAL DE LA HEPARINA Y EL ACYCLOVIR.

In vitro, la heparina mostró mayor efecto antiviral que el acyclovir, lo que comprueba la fuerte acción atiherpética de la heparina; pero in vivo, ésta tiene muy poca acción antiviral. El acyclovir actúa a nivel intracelular inhibiendo la síntesis de DNA, que lo hace un medicamento ideal para tratar la infección herpética aguda. Por el contrario, la heparina que actúa a nivel extracelular, tiene muy poca acción in vivo, como veremos en seguida.

#### ANÁLISIS DE LOS ENSAYOS IN VIVO.

Entre muchos poli-iones con efecto antiherpético in vitro, la heparina es casi el único que se ha probado in vivo (Vaheri, 1964; Aguilar-Setién, 1983; Grossman y Thonnard, 1983). De estos trabajos, sólo reporta resultados positivos el Dr. Aguilar.

Siguiendo esa misma metodología, no obtuvimos protección mayor del 10% (Figs. 14 y 15). Al probar otras dosis y vías de administración, se obtuvieron porcentajes de protección contra el PRV entre el 20 y el 40% (Figs. 14 a 16). De cualquier modo, la protección obtenida ahora con la heparina, alcanza una buena significancia estadística ( $p < 0.01$ ), además que ahora se evitaron

las muertes por hemorragia, gracias a la administración de la heparina en gel en la tercera dosis, para su liberación lenta.

Cabe recalcar que para lograr estos porcentajes de protección es indispensable administrar la heparina antes que el virus, y por la misma vía que éste, i.e.: es necesario que la heparina esté presente sobre las células retadas, al momento del desafío viral. Si se administra la heparina por vía intramuscular y el virus por vía subcutánea, no hay protección (Fig. 15).

No sabemos por qué esta diferencia, hay varias posibilidades: una es que en esta ocasión hayamos obtenido un porcentaje de protección más real que en 1983. También podría intervenir alguna variable desconocida v. gr.: el lote de heparina utilizado entonces, o la experiencia inmunológica del ratón; si el lote de ratones utilizado en aquella ocasión había tenido contacto con algún otro virus herpes no letal, se mostraría resistencia cruzada a la infección por el PRV.

También se probaron el condroitín y el dextrán para evaluar su acción atiherpética in vivo, y tratar de substituir a la heparina que provoca una alta mortalidad por hemorragia. Es la primera ocasión que se prueban estos dos polianiones como antivirales in vivo. El dextrán que tuvo un buen efecto antiviral in vitro, no mostró ningún efecto in vivo. El condroitín tampoco mostró acción antiviral in vivo.

A pesar de los bajos resultados obtenidos por estos ensayos, hace falta estudiar otros polielectrolitos que podrían tener más efecto antiviral. En especial hay que probar los fragmentos  $1\beta$ , (fracción altamente activa) y el fragmento  $1\beta_1$  (fracción relativamente inactiva) de la heparina; también la heparina nativa, o heparina de alto peso molecular y baja actividad anticoagulante.

#### EFFECTO PARADÓJICO IN VIVO DE LA PROTAMINA.

También es el primer ensayo in vivo que se realiza con la protamina contra algún virus. Ésta mostró un efecto contrario a sus resultados in vitro (Fig. 5), pues in vivo incrementó la letalidad del PRV (Fig. 16), a éste fenómeno lo nombramos efecto paradójico de la protamina.

Este efecto paradójico podría explicarse simplemente por los diferentes modelos utilizados; el modelo in vitro en células de riñón de bovino, mientras que in vivo es en ratón. Pero no es la primera vez que se observa un efecto de este tipo con polielectrolitos. Por ejemplo, se ha demostrado que algunas moléculas de heparina de bajo peso molecular y con muy poco efecto anticoagulante in vitro, tienen un alto efecto in vivo. Igualmente, algunos fragmentos de heparina con un alto efecto in vitro contra el factor Xa de la coagulación, al probarlos en animales no son tan efectivos como se esperaría (Thomas, 1984).

También se han descrito efectos paradójicos de los polielectrolitos, pero en modelos virales; v.gr.: el dextrán sulfato inhibe in vitro al virus del sarcoma aviario a concentraciones de 4 ug/ml, pero aumenta su infectividad a concentraciones mayores (Vogt, 1970). Un último ejemplo interesante del efecto paradójico: la heparina promueve el crecimiento de angiomas in vivo, pero si se administra simultáneamente con cortisona, se inhibe la angiogénesis (Folkman, et al. 1983).

#### ACCIÓN ESPECÍFICA E INESPECÍFICA DE LOS POLIELECTROLITOS.

Hasta aquí hemos mencionado que la heparina actúa uniéndose a la gIII de la membrana viral; pero si por el contrario, nos basamos en un reporte de Espinoza et al. de 1987, en que demuestran por microscopía electrónica, que la heparina se adhiere a la membrana celular; o en la observación de que la heparina se une rápidamente a células de la pared vascular; se pensaría lo contrario, que la heparina bloquea al virus uniéndose a la membrana celular y no a la membrana viral.

Esto, junto con el efecto paradójico de la protamina nos hace pensar que los polielectrolitos podrían actuar con las membranas celular y viral, a dos niveles uno específico y el otro inespecífico:

- A nivel específico: como hemos mencionado ampliamente, con receptores como la gIII o el heparán sulfato.

- A nivel inespecífico: con otros glicosaminoglicanos presentes en las membranas, que tengan diversas cargas. Dependiendo de la molécula a que se unan, facilitarán (como el condroitín sulfato), o inactivarán al virus (como la protamina o la heparina).

Estas interacciones específicas e inespecíficas, explicarían los efectos paradójicos y contradictorios reportados en éste y otros trabajos (Espinoza et al., 1987; Thomas, 1984; Folkman et al., 1983; Vogt et al., 1970 ).

Otra conclusión importante es que si se obtuviera un enlace polielectrolito-membrana de mayor fuerza, se lograría una inhibición viral mayor y a concentraciones bajas de los polielectrolitos, lo que permitiría su uso in vivo.

## CONCLUSIONES.

## 1.- GENERALES.

- 1.1. Los polielectrolitos inhiben al virus sólo antes de que éste penetre a la célula.
- 1.2. El virus herpes se une inicialmente a la célula por cargas iónicas de la membrana celular. Es probable que se adhiera a una molécula similar a la heparina. Por ser un enlace de tipo iónico, es fácilmente disociable.
- 1.3. El mecanismo de acción de los polielectrolitos es bloqueando esta adherencia inicial del virus a la célula.
- 1.4. Los polielectrolitos pueden actuar sobre las dos membranas: celular y viral. Presumiblemente, la heparina se une a la gIII del virus, mientras que la protamina se une a la molécula heparínicoide de membrana celular.

## 2.- POLIANIONES.

- 2.1. La heparina y el dextrán tienen una fuerte acción antiviral in vitro, si se añaden antes que el virus penetre a la célula.
- 2.2. El condroitín sulfato, por el contrario, aumenta el número de placas líticas producidas por el virus.
- 2.3. Después que el virus penetra a la célula, la heparina muestra aún un 20% de inhibición, que podría ser bloqueando la fusión de membranas celulares entre células infectadas y células sanas.

## 3.- PROTAMINA.

- 3.1. La protamina también inhibe al virus herpes, pero en menor proporción que la heparina y el dextrán.
- 3.2. Su mecanismo de acción no es por efecto viricida directo ni por inhibición del metabolismo celular.
- 3.3. Actúa al mismo nivel que la heparina y el dextrán, inhibiendo la adsorción viral.

#### 4.- ESPECIFICIDAD DE LA REACCIÓN.

- 4.- La unión heparina-gIII es específica y no por simple atracción de cargas contrarias, pues el condroitín sulfato que también tiene carga aniónica no inhibe al virus.

#### 5.- EFECTO SOBRE HERPES HUMANO.

- 5.- Los polielectrolitos inhiben en proporciones similares al HSV y al PRV, lo que sugiere que estos dos virus podrían compartir receptores celulares, aunque faltan ensayos más específicos para demostrarlo.

#### 6.- EFECTO IN VIVO.

- 6.1. Sólo la heparina mantiene su acción antiviral in vivo.
- 6.2. Al igual que el efecto in vitro, el efecto in vivo de la heparina es preventivo, i.e.: sólo tiene acción protectora si se administra antes que el virus y por la misma vía (subcutánea), de manera que se inhiba al virus antes de que penetre a las células.
- 6.3. La protamina en cambio muestra efecto paradójico: In vitro inhibe al PRV, pero in vivo facilita la infección.
- 6.4. Se disminuyó la mortalidad por hemorragia al administrar heparina con gel para su lenta liberación.
- 6.5. Sin embargo, el bajo porcentaje de inhibición de la infección in vivo, impide aún que los polielectrolitos tengan utilidad práctica.

## BIBLIOGRAFÍA.

AGUILAR SETIÉN, A.; PABLO SANTIAGO, G.; HERNÁNDEZ, J.P.; 1983. Protection de la souris contre la maladie d'Aujeszyk par l'heparine. Ann. Méd. Vét., 127:527-545.

ANTOHI, S.; SAMUEL, I.; DUMITRESCU, S.M.; PETRESCU, A.; BRUMFELD, V.; CAJAL, N.; 1983. Polycation induced alterations of the envelope surface of influenza and parainfluenza viruses. Rev. Roum. Med. Virol., 34 (3):163-166.

BAKER, D.A.; MILCH, P.O.; 1986. Acyclovir for genital herpes simplex virus infections. A review. Jour. Reprod. Med., 31, (5), (supplementum may/1986):433-438.

BURNS, W.H.; SARAL, R.; SANTOS, G.W.; et al.; 1982. Isolation and characterisation of resistant herpes simplex virus after acyclovir therapy. Lancet, 1982 (i):421-423.

CAIRO, M.S.; ALLEN, J.; HIGGINGS, C.; BACHNER, R.L.; & BOXER, L.A.; 1983. Synergistic effect of heparin and chemotactic factor on polymorphonuclear leucocyte aggregation and degranulation. American Journal of Pathology. 13, 1:67-74.

CALDERÓN, J.; 1988. Comunicación personal.

COHEN, S.S.; 1942. The isolation and crystalization of plant viruses and other protein macromolecules by means of hydrophilic compounds. J. Biol. Chem. 144:358-362.

COREY, L.; SPEAR, P.G.; 1986. Infections with herpes simplex viruses (primera de dos partes). New Engl. Jour. Med., 314 (11):686-691.

COREY, L.; SPEAR, P.G.; 1986. Infections with herpes simplex viruses (segunda parte). New Engl. Jour. Med., 314 (12): 749-757.

COREY, L.; 1985. Herpes simplex viruses. En: Braunwald, E.; Isselbacher, K.J.; Petersdorf, R.G.; Wilson, J.D.; Martin, J.B.; Fauci, A.S.. Harrison's Principles of Internal Medicine. Décimoprimer edición. Mc. Graw-Hill Book Company, U.S.A..Capítulo 136, pp. 692-697.

CORREA, G.P.; 1985. Pseudorrabia. En: Morilla, A.; Correa, P.; Stephano, A., (editores). Avances en Enfermedades del Cerdo. Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas, A.C.. México, pp. 668.

DANIEL, W.; 1974. Biostatistics, foundation for analysis in the health sciens. Publicado por: John Wiley & Sons Inc., pp. 193-243 y pp. 325-358.

De CLERQ, E.; ECKESTEIN, F.; MERIGAN, T.C.; 1971. Structural requirements for synthetic polyanions to act as interferon

DOUGLAS, J.; CRITCHLOW, C.; COREY, L.; et al.; 1984. A double blind study of oral acyclovir for suppression of recurrences of genital herpes simplex virus infection. *N. Engl. J. Med.*, 310:1551-1556.

ELION, G.B.; FURMAN, P.A.; FYFE, J.A.; DEMIRANDA, P.; BEAUCHAMP, L.; SCHAFFER, H.J.; 1977. Selectivity of action of an antitherpetic agent 9(2hydroxyethoximehyl) guanina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5116-5120.

ESCOBAR, A.; 1988. Moléculas de la Inflamación. En: Hicks, J.J.; Díaz Zagoya, J.C.; Bioquímica e Inmunología. Publicado por la Facultad de Medicina, U.N.A.M., pp. 505-523.

ESPINOZA, L.E.L.; AGUILAR, S.A. & HERNÁNDEZ, J.P.; 1987. Protección de la heparina a la penetración del virus Aujeszky en células pK-15, estudio ultraestructural. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria 1987. México.*

EVANS, J.A.; BOLLER, R.J.; 1946. The subcutaneous use of heparin in anticoagulant therapy. *J.A.M.A.*, 131:879-882.

FOLKMAN, J.; LANGER, R.; LINHARDT, R.L.; HAUDENSCHILD, C.; TAYLOR, S.; 1983. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science*, 221(4612):719-725.

FULLER, A.O.; SANTOS, R.E.; SPEAR, P.G.; 1989. Neutralizing antibodies specific for glycoprotein H of Herpes simplex virus permit viral attachment to cells but prevent penetration. *Jour. Virol.* 63 (8); 3435-3443.

FULLER, A.O., and SPEAR, P.G.; 1987. Antiglycoprotein D antibodies that permit adsorption but block infections by herpes simplex virus 1 prevent virion-cell fusion at the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:5454-5458.

GÓMEZ, B.; 1988. Comunicación personal.

GOODMAN AND GUILMAN; 1984. *Pharmacological basis of therapeutics.*

GROSSMAN, J.H.; THONNARD, N.E.; 1985. Topical heparin for recurrent genital herpes simplex virus infections. *Jour. Repr. Med.*, 1985.

GUTIÉRREZ, G.; 1978. Meningoencefalitis viral. En: Kumate, J.; Gutiérrez, G.; 1971. *Manual de infectología. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. Sexta edición, México, pp. 431.*

HALLIBURTON, I.W.; FREEMAN, I.J.; 1985. A comparison of the acid soluble polypeptides of five herpesviruses. *J. Gen. Virol.* 60, 2243-2248.

## ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

HERRLER, G.; REUTER, G.; ROTT, R.; KLENK, H.D.; SCHAUER, R.; 1987. N-Acetyl-9-O-Acetylneuraminic acid, the receptor determinant for influenza C virus, is a differentiation marker on chicken erythrocytes. *Biol. Chem.* Hoppe-Seyler. 366, 451-454.

HIGHLANDER, S.L.; CAI, W.; PERSON, S.; GLORIOSO, J.C.; 1988. Monoclonal antibodies define a domain on herpes simplex virus glycoprotein B involved in virus penetration. *Jour. of Virol.* June 1988. 62 (6), 1881-1888.

HIGHLANDER, S.L.; DORNEY, D.J., GAGE, P.J.; HOLLAND, T.C.; CAI, W.; PERSON, S.; LEVINE, M.; GLORIOSO, J.C.; 1989. Identification of MAR mutations in Herpes simplex virus type I glycoprotein B which alter antigenic structure and function in virus penetration. *Jour. of Virol.* Feb. 1989. 63 (2), 730-738.

HILL, T.J.; 1985. Mechanisms of herpes virus latency and reactivation with particular reference to the immune response. En: *Immunity to herpesvirus infections of domestic animals*. Pastoret, P.P.; Thiry, E.; Saliky, J. (Editores). Publicado por: Commission of the European Communities. Brusseles Luxemburg, pp. 201-207.

HIRSCH, M.S.; SCHOOLEY, R.T.; 1983. Treatment of herpesvirus infections. *N. Engl. J. Med.*, 309:963-970.

HORROW, J.CH.; 1985. Protamine: a review of its toxicity. *Anesth. Analg.* 64: 348-361.

HORVATH, E.; HADHAZY, G.; 1965. Effect of heparin on the growth of the herpes group viruses. *Acta Microbiol. Sci. Hung.*, 12: 146-149.

HULL, R. & MCGEOCH, D.J.; 1989. Some highlights of virus research in 1988. *J. Gen. Virol.*, 70:2825-2842.

IGLESIAS, S.G.; 1987. Infección con el virus de la enfermedad de Aujeszky en cerdos. En: Moreno, Ch. R.; *Ciencia Veterinaria*. Editado por la Universidad Nacional Autónoma de México. 1a. Edición, México. Vol. 4:225-255.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL. SUBDIRECCIÓN GENERAL DE FINANZAS. JEFATURA DE PLANEACIÓN FINANCIERA. DEPARTAMENTO DE ESTADÍSTICA. 1986. Anuario Estadístico de Servicios Médicos. México.

ITO, M.; BABA, M.; SATO, A.; PAUWELS, R.; deCLERQ; and SHIGETA, S.; 1987. Inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on the replication of human immunodeficiency virus in vitro. *Antiviral Res.* 7: 361-367.

JAQUES, L.B.; 1979. Heparin: an old drug with a new paradigm. *Science.* 206: 528-533.

JAKUES, L.B.; 1985. The new understanding of the drug heparin. *Chest* 88(5), 751-754.

JEFFRIES, D.J.; 1985. Clinical use of acyclovir. *British Medical Journal*. 290 (6463):177-178.

KAPLAN, A.S.; 1969. Herpes Simplex and Pseudorabies Virus. Publicado por: Springer Verlag, New York Inc.. 1a. edición. pp.115.

KATTAR, C.; WILCOX, K.W.; 1989. Characterization of the DNA binding properties of herpes simplex virus regulatory protein ICP4. *Journal of Virology*. 63, 2: 696-704.

LENNETTE, E.H.; & SCHMIDT, N.J.; 1979. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5a. ed.. American Public Health Association, Washington D.C..

LERNER, A.M.; 1983. Infections with herpes simplex virus. En: Petersdorf, R.G.; Adams, R.D.; Braunwald, E.; Isselbacher, K.J.; Martin, J.B.; Wilson, J.D. (editores). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 10a. edición. Mc Graw-Hill International Book Company. Japan. Capítulo 210, p. 1162.

LOMNICZI, B.; WATANABE, S.; BEN PORAT, T.; KAPLAN, A.S.; 1987. Genome localization and identification of functions defective in the Bartha vaccine strain of pseudorabies virus. *J. Virol.* 61:796-801.

LYCKE, E.; 1983. Herpes Viruses. En: Lycke, E.; Norby, E. (editores). *Textbook of Medical Virology*. Publicado por Butterworths, London, 304-322.

METTENLEITER, T.C.; ZSAK, L.; ZUCKERMANN, F.; SUGG, N.; KERN, H.; BEN-PORAT, T.; 1990. Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparina-like substance mediates adsorption of Pseudorabies virus. *Journal of Virology*. 64, 1: 278-286.

MITCHELL, S.C.; ALLEN, J.; HIGGINS, C.; BAHENER, R.L.; BOXER, L.A.; 1984. Synergistic effect of heparin and chemotactic factor on polymorphonuclear leukocyte aggregation and degranulation. *Am. Jour. Path.*, 113:6774.

MORGAN, C.; ROSE, H.M.; and MEDNIS, B.; 1968. Electron microscopy of Herpes simplex virus I entry. *Jour. Virol.* 2:507-516.

NAHMIA, A.J.; DOWDLE, W.R.; SCHINAZI, F., (editores); 1981. *The Human Herpesviruses. An Interdisciplinary Perspective*. Elsevier. New York, pp. 721.

NAHMIA, A.J.; DANNENBARGER, J.; WICKLIFFE, C., MUTHER, J.; 1981. Clinical aspects of Infection with Herpes simplex viruses 1 and 2. En: Nahmias, A.J.; Dowdle, W.R.; Schinazi, F., (editores); 1981. *The Human Herpesviruses. An Interdisciplinary Perspective*. Elsevier. New York, pp. 721.

NAHMIAS, A.J.; KIBRICK, S.; 1964. Inhibitory effect of heparin on herpes simplex virus. *J. Bacteriol.*, 87:1060-1066.

NIH CONFERENCE, STRAUS, S.E.; ROONEY, J.F.; SEVER, J.L.; SEIDLIN, M.; NUSINOFF-LEHRMAN, S.; CREMER, K.; 1985. Herpes simplex infection: Biology, treatment and prevention. *Ann. Int. Med.* 103: 404-419.

NORRILD, B.; 1981. Molecular structure of Herpes simplex virus antigen determinants. En: NAHMIAS, A.J.; DOWDLE, W.R.; SCHIMAZI, F.; (Editores); 1981. The human herpesvirus, an interdisciplinary perspective. Elsevier. New York. pp. 721.

PARKER, C.W.; 1984. Mediators: release and function. En: Paul, W.E. (editor); *Fundamental Immunology*. Publicado por Raven Press. New York, pp. 697-747.

PASTORET, P.P.; THIRY, E.; BROCHIER, B.; 1982. Bovid herpesvirus 1, infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. *Ann. Rech. Vét.*, 13:221-235.

PETROVSKIS, E.A.; POST, L.E.; 1987. A small open reading frame in pseudorabies virus and implications for evolutionary relationships between herpesviruses. *Virology*, 159: 193-195.

PENTTINEN, K.; 1956. Effect of plyphloroglucinolphosphate on influenza virus and chicken red cells. *Ann. Med. Exp. Fenn.*, 34:88-94.

RAMÍREZ, N.R.; 1985. Importancia de la enfermedad de Aujeszky en México. En: Morilla, A.; Correa, P.; Stephano, A. (editores). *Avances en Enfermedades del Cerdo*. Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas. México, pp. 167-175.

RAMOS-KURI, M.; KRETSCHMER, R.; AGUILAR-SETIÉN, A.; 1985. Sexto Congreso Nacional de Inmunología. Septiembre de 1985, México.

RAMOS-KURI, M.; AGUILAR-SETIÉN, A.; 1987. Efecto de un polianión y un policatión sobre la virulencia del Suid herpesvirus-1. Séptimo Congreso Nacional de Inmunología. Zacatecas, México. 25-28 de agosto de 1987.

RAWLS, W.E.; CAMPIONE-PICCARDO, J.; 1981. Epidemiology of herpes simplex virus type 1 and type 2 infections. En: Nahmias, A.J.; Dowdle, R.; Schinazi, R.F., editores. *The Human Herpesviruses, an interdisciplinary Perspective*. Elsevier, New York, Oxford, pp.138-150.

REICHMAN, R.C.; 1984. Herpes simplex viruses. En: Belshe R.B.. *Textbook of human virology*. Editorial PSG Publishing Company Inc. Littleton, Massachusetts, U.S.A..

RENT, R.; ERTEL, N.; EISENSTEIN, R.; GEWURZ, H.; 1975. Complement activation by interactions of polyanions and polycations. *J. Immunol.*, 114(1):120-124.

ROBBINS, A.K.; RYAN, J.P.; WHEALY, M.E.; ENQUIST, L.W.; 1989. The gene encoding the gIII envelope protein of pseudorabies virus vaccine strain Bartha contains a mutation affecting protein localization. *J. Virol.* 63(1):250-258.

ROBBINS, A.K.; DORNEY D.J.; WATHEN, M.W.; WHEALY, M.E.; GOLD, C.; WATSON, R.J.; ENQUIST, L.W.; The pseudorabies virus gII gene is closely related to gB glycoprotein gene of HSV. *J. Virol* 61:2691-2701. penetration. *J. Virol.* 63(2):730-738.

ROITT, I.M.; BROSTOFF, J. & MALE, D.K.; 1985. Immunology. Gower Medical Publishing. Hong Kong.

ROSENBERG, R.D.; ARMAND, G.; LAM, L.H.; 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 3065-3069.

ROSENBERG, R.D.; LAM, L.; 1979. Correlation between structure and function of heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76(3):1218-1222.

RUIZ-GÓMEZ, J.; GÚTIERREZ, G.; BUSTAMANTE, M.E.; 1971. Encuesta serológica en niños de la ciudad de México. Investigación de anticuerpos contra herpes simple. *Salud Pública de México*, 13: 489.

SECRETARÍA DE SALUD. SUBSECRETARÍA DE PLANEACIÓN. DIRECCIÓN GENERAL DE INFORMACIÓN Y ESTADÍSTICA. 1987. Anuario Estadístico. Versión antes de imprenta.

SCHNIPPER, L.E.; CRUMPACKER, C.S.; MARLOWE, S.I.; KOWALSKY, P.; HERSHEY, B.J.; LEVIN, M.J.; 1982. Drug resistant herpes simplexvirus in vitro and after treatment in an immunocompromised patient. *Am. J. Med.*, 73:387-392.

SKOLDENBERG, B.; FORSGREN, M.; ALESTIG, K.; 1984. Acyclovir versus vidarabina in herpes simplex encephalitis. *Lancet*, 1984 ii; 707-711.

SOLÓRZANO, F.R.; MERCADO, S.M.; 1985. Pruebas serológicas disponibles y resultados de la encuesta de pseudorrabia en México. En: Morilla, A.; Correa, P.; Stephano, A., (editores). Avances en enfermedades del cerdo. Publicado por la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, México. pp. 257-270.

STRAUS, A.H.; SANT'ANNA, O.A.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; 1984. An inverse relationship between heparin content and antibody response in genetically selected mice. *Biochem. J.*, 220:625-630.

THOMAS, D.P.; 1984. Heparin, low molecular weight heparin, and heparin analogues. *British Jour. Hemat.* 58:385-390.

THIRY, E.; LEROY, P.; PATORET, P.P.; SCHWERS, A.; BROCHIER, B.; ACIEAUX, Y.; HOVOIS, P.; 1983. In vivo and in vitro effect of acyclovir on pseudorabies virus, infectious bovine rinotracheitis virus and pigeon herpesvirus. *Ann. Rech. Vét.*, 14:239-245.

TOOZE, J.; 1981. Herpes simplex viruses. En: Tooze, J.. *DNA tumor viruses. (Molecular biology of tumor viruses)*, 2th edition. Cold Spring, Harbor Laboratory Publications.

TOYOSHIMA, K.; VOGT, P.K.; 1969. Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. *Virology* 38, 414-426.

VAHERI, A.; 1964. Heparin and related polyionic substances as virus inhibitors. *Acta Path. Microbiol. Scand. Supplementum* 171:198.

VAN VORIS, L.P.; 1984. Antiviral chemotherapy. En: BELSHE, R.B.; *Texte of human virology*. PSG Publishing company. Massachusetts, U.S.A.. pp. 1072.

VOGT, P.K.; TOYOSHIMA, K.; YOSHII, S.T.; 1970. Factors promoting avian tumor virus infections. (Ver Toyoshima & Vogt).

VENO, R. & KUNO, S.; 1987. Dextran sulfate a potent anti-HIV agent in vitro having synergism with zidovudina. *Lancet*, i:1397.

WARREN, J.; WEIL, M.L.; RUSS, S.B.; JEFFRIES, H.; 1949. Purification of certain viruses by use of protamine sulfate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 72:662-664.

WHITLEY, R.J.; ALFORD, CH. A.; 1981. Parental antiviral chemotherapy of human herpesviruses. En: Nahmias, A.J.; Dowdle, R.; Schinazi, R.F., (editores). *The human herpesviruses, an interdisciplinary perspective*. Elsevier, New York, Oxford, pp. 478-490.

WHITLEY, R.J.; LINNEMAN, C.; LIU, CH. AND THE NIAID COLLABORATIVE ANTIVIRAL STUDY GROUP; 1986. Vidarabine versus acyclovir therapy in herpes simplex encephalitis. *The New England Journal of Medicine*. 314 (3):144-149.

WILLCOX, W.C.; LONG, D.; SODORA, D.L.; EISENBERG, R.J.; & COHEN, G.H.; 1988. The contribution of cysteine residues to antigenicity and extent of processing of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. *Journal of Virology*, 62 (8):1941-1947.

WU-DUNN, D.; SPEAR, G.P.; 1989. Initial interaction of Herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* 63(1):52-58.

ZIJL, M.V.; QUINT, W.; BRIAIRE, J.; ROVER, T.D.; GIELKENS, A.; BERNS, A.; 1988. Regeneration of herpesviruses from molecularly cloned subgenomic fragments. *J. Virol.* 62(6):2191-2195.

ZUCKERMANN, F.; ZSAK, L.; REILLY, I.; SUGG, N.; BEN-PORAT, T.; 1989.  
Early interactions of pseudorabies virus with host cells: function  
of the glycoprotein gIII. *J. Virol.* 63(8):3323-3329.